



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie des Organismes
Master 2 Biologie et Physiologie De la Reproduction**

INTITULE :

**Effet du pollen de *Phoenix Dactylifera L* dans la
cryoconservation de la semence canine.**

Présenté et soutenu par :

- BENZEGHIBA Zakari**
- BENYAYA Khadidja**

Jury d'évaluation :

- | | | |
|-----------------------|----------------|---------------------------|
| - Mme Y.ZATRA | Blida.1 | Présidente du jury |
| - Mme Z.BIREM | Blida.1 | Examinatrice |
| - Mr R.BELALA | Blida.1 | Promoteur |
| - Mr B.MEDROUH | Blida.1 | Co-promoteur |

REMERCIEMENT :

Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté afin de mener à terme notre mémoire.

Nous voulons adresser nos plus vifs remerciements à toute personne qui nous a aidés de près ou de loin à réaliser notre travail.

En premier lieu, nous tenons à remercier et à adresser notre sincère respect à notre promoteur mr.BELALA Redha d'avoir accepté d'encadrer notre travail de recherche ainsi que pour sa gentillesse, son professionnalisme et les précieux conseils qu'il nous a fournis.

Nous remercions également notre co-promoteur mr.MEDROUH bachir sans qui ce mémoire n'aurait certainement pas été possible pour sa grande patience, sa disponibilité ainsi que de nous avoir orienté tout au long de notre travail.

Nos remerciements vont également à Mme.SAYAD Massiva pour l'honneur qu'elle nous fait d'accepter de présider notre jury.

A Mme.BIREM Zahia, nous sommes heureux de vous compter parmi notre jury en tant qu'examinatrice, veuillez accepter nos plus sincères considérations.

Nos vifs remerciements vont aussi à tout le personnel de la plateforme biotechnologique de reproduction des carnivores pour nous avoir accueilli parmi eux et nous avoir transmis toutes les connaissances nécessaires afin de mener à terme nos travaux.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années de notre parcours.

Nous espérons avoir été à la hauteur des espoirs que vous avez tous fondés en nous

DEDICACE :

JE DEDIE AVEC SINCERITE CE MODESTE TRAVAIL :

A mes parents pour m'avoir soutenue depuis toujours dans cette voie que j'ai choisi et avoir toujours cru en moi et en mes capacités. Pour leur soutien sans faille durant ces longues années où les études passaient avant tout. Merci de m'avoir porté jusque-là. Mon parcours n'aurait pas été possible sans vous.

A ma sœur Lina pour son soutien malgré toutes les difficultés.

A mon binôme Khadidja pour les longues heures passaient à préparer ce mémoire.

A tous mes amies et collègues de ma promotion Ines, Isma, Asma, Madina et la liste est encore longue, pour avoir rendu ces années d'études plus agréable et moins pénible.

DEDICACE :

JE DEDIE AVEC SINCERITÉ CE MODESTE TRAVAIL :

A **mes parents** pour leur soutien surtout à **ma maman** pour tous les sacrifices qu'elle a fait, son amour, sa tendresse, ainsi que sa présence quand ça allait mal, j'ai l'honneur d'être ta fille j'espère que tu sois fière de moi.

A **ma grand-mère** pour être la source de mes efforts, mon bonheur, que dieu te procure bonne santé et te garde pour nous.

A **mon grand-père** qui me manque énormément, que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

A **mon fiancé** « **Islam** » pour son amour, son soutien morale, sa joie, son encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordée.

A **mes sœurs** « **Amira , Sabrina** » et **mon beau frère** « **Reda** » pour l'amour qu'ils me réservent, je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A mon **petit neveu** « **Fadi** » que j'aime énormément.

A mes **chères tantes** : « **Sakina, Naima, Rebiha, Chafiaa, Nadia** »

A mes **chers oncles** : « **Rabah, Brahim, Ismail, Soltane, Amine** »

A mes **chères cousine** : « **Anfel, Loubna** »

A **mon binôme** « **Zakari** » pour tous les moments où je voulais abandonner et qu'il était là pour me rassuré.

A toute **mes amies** : « **Nesrine, Zahra, Yasmine, Ines, Isma** » pour tous les souvenirs, les bons moments, cette année n'aurait pas été possible sans vous.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE 1 : RAPPELS

Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle chez le chien

I.1. Introduction.....	2
I.2. Anatomie	2
I.2.1 Section glandulaire.....	2
a- Testicule.....	2
I.2.2 Section tubulaire	3
a- Les épидидymes.....	3
b- Les canaux déférents.....	4
c- La prostate	4
d- L'urètre	4
e- Les glandes de Littré	4
f- Le pénis	5
I.3 Élaboration du sperme	6
I.4 Contrôle hormonal de la reproduction	7

Chapitre 2 : La semence canine

II.1. la semence canine.....	9
II.2. Composition de la semence canine	10
II.2.1. Le liquide séminal.....	10

II.2.2. Le spermatozoïde.....	10
II.3. Récolte de la semence de chien	11
II.3.1. Récolte manuelle	11
II.4. Examen de la semence canine.....	13
II.4.1. Les examens utilisés en routine	13
II.4.1.1. Le spermogramme.....	13
a- Le volume	13
b- L'aspect	14
c- Le PH	14
d- Mobilité.....	14
e- Numérotation	16
f- La vitalité.....	17
II.4.1.2. Le spermocytogramme.....	17
a-Evaluation au microscope.....	18
II.4.1.3. Autres test utilisé	20
a- Evaluation de l'intégrité membranaire	20
b- Evaluation de l'état de capacitation.....	20
II.4. Cryoconservation de la semence canine	20
II.4.1. Définition.....	20
II.4.2. Le dilueur	21
II.4.2.1. Caractéristiques et rôles des dilueurs.....	21
II.4.2.2. Composition du dilueur	22
II.4.3. Etape de la cryoconservation.....	23
II.4.3.1. Centrifugation.....	23
II.4.3.2. Les étapes de la dilution	23
II.4.3.3. Concentration optimale des spermatozoïdes	23

II.4.3.4. L'équilibration.....	24
II.4.3.5. Le conditionnement	24
II.4.3.6. La congélation.....	24
II.4.3.7. La conservation.....	25
II.4.3.8. La décongélation.....	25

CHAPITRE 3 : Le pollen

III.1. Définition du pollen.....	26
III.2. Historique du phoenix dactylifera L	26
III.3. Caractéristique du pollen de phoenix dactylifera L	27
III.4. Composition chimique du pollen de phoenix dactylifera L	27
III.5. Vertu du pollen dans la cryoconservation de la semence.....	29
III.6. Lien entre stress oxydatif et cryoconservation.....	30

CHAPITRE 4 : Le stress oxydatif

IV.1 Définition.....	30
IV.2 Type de stress oxydatif.....	30
IV.3 Dommages oxydatifs des macromolécules	31
IV.4 Les antioxydants.....	32
-Vitamine C... ..	33
- Vitamine E	33
- Vitamine A	33
- Les polyphénols et flavonoïdes.....	33

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODE.....

I-Introduction	34
II- Matériel.....	35

III- Méthode	35
1- Méthode de prélèvement	35
2- Examen de la semence	36
3- Préparation des dilueurs	36
4- Ajout du pollen.....	37
5- Conditionnement	39
6- Décongélation	39
7- Analyse de la semence après décongélation.....	39
PARTIE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION	40
-Matériel et méthode	40
1- Nature des données	40
2- Critères d'inclusion et d'exclusion	40
3- Extraction et classification des données.....	41
I- Etude des effets néfastes de la cryoconservation sur les spermatozoïdes	42
II- Etude de l'effet du pollen de palmier dattier sur les paramètres spermatiques.....	44
III- Evaluation de l'activité antioxydante du pollen de Phoenix Dactliféra L	46
IV- Effet antioxydant du selenium et de la vitamine E	49
V- Intérêt de la vitamine E pour une conservation optimale de la semence	52
VI- Effet de la vitamine C sur la conservation de la semence canine	54
VII- Etude de l'effet antioxydant de la vitamine A	56
Conclusion.....	59

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Anatomie du testicule de chien	3
Figure 2 : Schéma de l'appareil génital mâle in situ.....	5
Figure 3 : Les différentes étapes de la spermatogenèse.....	7
Figure 4 : Le contrôle hormonal de la fonction de reproduction mâle	8
Figure 5 : Organisation interne du spermatozoïde	11
Figure 6 : Ensemble tube stérile gradué et cône en plastique souple utilisé pour récolter chaque phase de l'éjaculat.....	12
Figure 7 : Méthode de comptage sur une cellule de Thoma.....	17
Figure 8 : Exemples d'anomalies morphologiques de la queue de spermatozoïde	19
Figure 9 : Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac®	19
Figure 10 : Structure du pollen (phœnix dactylifera .L).....	26
Figure 11 : Carte de répartition du genre Phoenix.....	26
Figure 12 : Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène	31
Figure 13 : préparation de la semence	38
Figure 14 : Courbes des variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extraits et BH.....	46
Figure 15 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à T°= 4°C dans les 07 milieux utilisés, analysés à différents temps T0, T1, T2, T3.....	51
Figure 16 : Image des résultats de la technique TUNEL.....	55

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I : Description des trois phases de l'éjaculat du chien	9
Tableau II : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV	15
Tableau III : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	18
Tableau IV : composition chimique approximative (100 g poids frais) de pollen de palmier dattier	27
Tableau V : composition en vitamine du pollen de palmier dattier	27
Tableau VI : composition en minéraux (mg/100g poids sec) de pollen de palmier dattier	28
Tableau VII : composition en acide aminé essentielle (g/100g de poids sec) du pollen de palmier dattier.....	28
Tableau VIII : composition en acide gras (%) du pollen de palmier dattier.....	28
Tableau IX : Composition des dilueurs de réfrigération, congélation et de décongélation utilisés en routine au PBRC.....	36
Tableau X : Composition des dilueurs de réfrigération, congélation et de décongélation ayant 3 concentrations différentes de pollen	37
Tableau XI : Comparaison des concentrations moyennes en éléments trace, éléments minéraux et le malondialdéhyde entre les témoins et les patients oligozoospermiques, asthénospermiques et tératospermiques	43
Tableau XII : comparaison des paramètres de la semence chez les hommes infertiles avant et après le traitement au pollen de palmier dattier	44
Tableau XIII : effet du pollen de palmier dattier sur les caractéristiques des spermatozoïdes chez le rat.....	45
Tableau XIV : Pourcentages d'inhibition de l'extrait méthanolique de pollen.....	46
Tableau XV : Pourcentages d'inhibition de l'extrait chloroformique de pollen	47

Tableau XVI : Pourcentages d'inhibition de BHT	47
Tableau XVII : paramètre de la semence des groupes "control" et "expérimentale" avant et après traitement.....	51
Tableau XVIII : paramètre des spermatozoïdes des groupes "control" et "expérimental" avant et après traitement	51
Tableau XIX : résultat de l'analyse de la semence, du taux sérique et séminal du MDA et du taux sériques de lycopène, bêta-carotène et vitamine A chez les hommes infertiles et normospermique	57

LISTE DES ABREVIATIONS :

PH : Picohenry

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

LH : Luteinising Hormone

FSH: Follicula Stimulating Hormone

ABP : Androgen Binding Protein

IGF : Insulin Growth Factor

TGF : Transforming Growth Factor

CASA : Computer-Aided Semen Analysis

SQA : Sperm Quality Analyzer

SMI : Sperm Motility Index

TRIS : Tri-hydroxy-méthyl-aminométhane

ADN : Acide dèsoxyribonucléique

EOR : Espèces xygénées Réactives

ATP : Adenosine triphosphate

RL : Radical libre

ROS : Reactive oxygen species

PBMC : Plateforme Biotechnologique de Reproduction des Carnivores

TUNNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferas-mediated dUTP nick-end labeling

MDA : Malondialdéhyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

BHT : Hydroxytoluène

VIT E : Vitamine E

TBARS : Thiobarbitoric Fluorimetric Assay

HPLC : High-performance Liquid Chromatography

RESUME

L'objectif de ce présent manuscrit est de regrouper dans un même travail les données sur les techniques de récolte et de conservation du sperme chez le chien et de mettre en évidence le rôle que peut jouer le pollen de palmier dattier dans la cryoconservation de la semence canine à fin d'améliorer le protocole utilisé dans la Cryopréservation du sperme.

Une méta-analyse a été réalisée pour déterminer les effets des composantes de pollen palmier dattier et simuler son action dans l'amélioration de la qualité de la cryoconservation. Les résultats montrent que le pollen de Phoenix dactylifera L pourrait diminuer les dégâts causés par la cryoconservation à travers ses différents composants.

En effet il a été démontré que la diminution rapide de la température produit un stress oxydatif pouvant endommager la morphologie des spermatozoïdes et diminuer leur mobilité voir provoquer leur mort cellulaire.

La composition en vitamine A C et E fait du pollen de Phoenix Dactylifera L un important antioxydant, le pollen de palmier dattier ou ses composants pris un à un peuvent alors jouer un rôle dans la diminution des effets néfastes du stress oxydatif.

De ce fait, son utilisation lors du processus de congélation de la semence pourrait alors être envisagée.

Mots clefs : semence canine, cryoconservation, pollen de palmier dattier, antioxydant, stress oxydatif, paramètre spermatique.

ملخص

الهدف من هذه المذكرة هو الجمع في نفس العمل بين البيانات الخاصة بتقنيات جمع وحفظ السائل المنوي للكلاب وإبراز الدور الذي يمكن أن يلعبه طلع النخيل في الحفاظ على السائل المنوي بالتبريد. و هذا لتحسين البروتوكول المستخدم في الحفظ بالتبريد للحيوانات المنوية. تم إجراء التحليل البعدي لتحديد تأثير مكونات حبوب الطلع ومساهمتها في تحسين جودة الحفظ بالتبريد. أظهرت النتائج أن حبوب لقاح النخيل يمكن أن تقلل الضرر الناجم عن الحفظ بالتبريد من خلال مكوناتها المختلفة في الواقع، لقد ثبت أن الانخفاض السريع في درجة الحرارة ينتج عنه إجهاد تأكسدي يمكن أن يضر بمورفولوجيا الحيوانات المنوية ويقلل من حركتها أو حتى يتسبب في موت خلاياها. إن تركيبته من الفيتامينات تجعل حبوب طلع النخيل أحد مضادات الأكسدة الهامة، ويمكن أن تلعب حبوب لقاح النخيل أو مكوناتها التي يتم تناولها واحدة تلو الأخرى دورًا في تقليل الآثار الضارة للإجهاد التأكسدي لذلك يمكن النظر في استخدامه أثناء عملية تجميد السائل المنوي

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي للكلاب، الحفظ بالتبريد، حبوب لقاح النخيل، مضادات الأكسدة، الإجهاد التأكسدي، معاملة الحيوانات المنوية.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to bring together in a single work the representations of male physiology and the techniques of sperm collection and conservation in the canine species and to highlight the role that date palm pollen can play in the cryopreservation of canine semen. The aim is to improve the protocol used in semen cryopreservation.

A meta-analysis was carried out to determine the effects of the components of date palm pollen and to simulate its action in improving the quality of cryopreservation. The results show that *Phoenix dactylifera* pollen could decrease the damage caused by cryopreservation through its different components.

Indeed, it has been shown that the rapid decrease in temperature produces oxidative stress that can damage the morphology of spermatozoa and reduce their mobility or even cause their cell death.

The vitamin A C and E composition makes *Phoenix Dactylifera L* pollen an important antioxidant, date palm pollen or its components taken one by one can then play a role in reducing the harmful effects of oxidative stress.

Therefore, its use during the semen freezing process could then be considered.

Keywords : canine semen, cryopreservation, date palm pollen, antioxidant, oxidative stress, sperm parameter.

INTRODUCTION GENERALE :

La cryoconservation de la semence correspond à la préparation d'un échantillon de semence en vue de sa conservation à des températures allant jusqu'à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant une durée indéterminée. Elle permet le maintien de la semence dans des conditions stables et la préservation de son pouvoir fécondant à travers le temps. **(Marc, 2015)**

La première procédure de cryoconservation de semence a vu le jour 1949 et a été mise au point par Polge et son équipe. Cependant, la congélation de la semence de l'espèce canine n'a pas connu le même essor que celle des espèces de rentes mais s'est développé récemment suite à l'intérêt croissant des éleveurs pour son utilisation lors d'insémination artificielle. **(Fuertes, 2008)**

Contrairement à d'autres espèces, l'éjaculat des chiens ne résiste pas bien à la congélation. En effet, la cryoconservation peut causer de nombreux dégâts au niveau de la mobilité, de la morphologie et de la concentration des spermatozoïdes, la dissémination du potentiel génétique par cette méthode reste donc limitée dans l'espèce canine. **(Briffaut, 2007)**

C'est à cause de cela que les résultats obtenus avec de la semence congelée sont moins bons que lors d'IA avec du sperme frais cependant cette technique dégage de nombreux avantages tels que l'affranchissement des distances géographiques ou encore la diminution du risque de transmission de maladies sexuellement transmissibles. **(Marc, 2015)**

La semence canine est un sujet qui fait l'objet de nombreuses recherches notamment dans l'amélioration de la composition des milieux de congélation. Des études récentes ont montré l'intérêt des composants du pollen de palmier dattier dans l'amélioration des paramètres spermatiques. **(Affoun, 2017)**

En effet, le pollen de palmier dattier a longtemps été utilisé dans la médecine traditionnelle arabe comme complément alimentaire pour améliorer la fertilité chez les femmes et les hommes. En outre, il pourrait améliorer la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes grâce à sa forte composition en antioxydant qui permet de diminuer les effets néfastes causés par le stress oxydatif.

L'objectif de notre travail est donc de déterminer si l'ajout de pollen de palmier dattier au milieu de réfrigération et congélations donne des résultats satisfaisant lors de la conservation de la semence canine.

PARTIE 1 :

RAPPELS

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle chez le chien

I.1. Introduction :

L'anatomie génitale du mâle dans sa complexité doit remplir trois fonctions : tout d'abord de produire les spermatozoïdes, puis d'élaborer le sperme, et enfin de déposer celui-ci dans les voies génitales femelles.

Pour cela on divise classiquement l'anatomie des organes génitaux mâles en trois sections :

- Une section glandulaire formée par les testicules.
- Une section tubulaire formée par les épидидymes et canaux déférents.
- Une section urogénitale formée par les glandes annexes et le pénis. **(Delompré, 2011)**

I.2. Anatomie

I.2.1. Section glandulaire : Testicules

Chez le chien, les testicules sont des organes pairs mesurant trois à quatre centimètres de longueur sur trois centimètres de largeur. Ils pèsent une vingtaine de grammes chez un chien de grande race. Leur taille est proportionnelle au poids du chien. Les testicules ont une forme globuleuse, presque sphérique. Ils sont situés en région périnéale basse dans le scrotum.

Les testicules sont constitués d'un parenchyme testiculaire parcouru par une structure fibreuse appelée l'albuginée et sont entourés d'une séreuse. Le parenchyme testiculaire se divise en lobules au sein desquels cheminent les tubes séminifères, lieu d'élaboration des gamètes mâles. Les tubes séminifères convergent pour donner le rete testis. Entre les tubes séminifères, se trouve le tissu interstitiel. **(Barone, 1978 ; Collin, 2003)**

La paroi des tubes séminifères est constituée de cellules de Sertoli et de cellules germinales en différenciation. Les cellules de Sertoli assurent la protection et la nutrition des cellules germinales ainsi que la production de fluide tubulaire et d'oestrogènes. Parallèlement, les cellules germinales subissent la spermatogenèse.

Le tissu interstitiel des testicules correspond à un tissu conjonctif lâche qui comprend des éléments vasculaires, lymphatiques et nerveux. Il contient également les cellules de Leydig

qui assurent la synthèse des hormones sexuelles mâles, principalement la testostérone.
(Setchell, 1991)

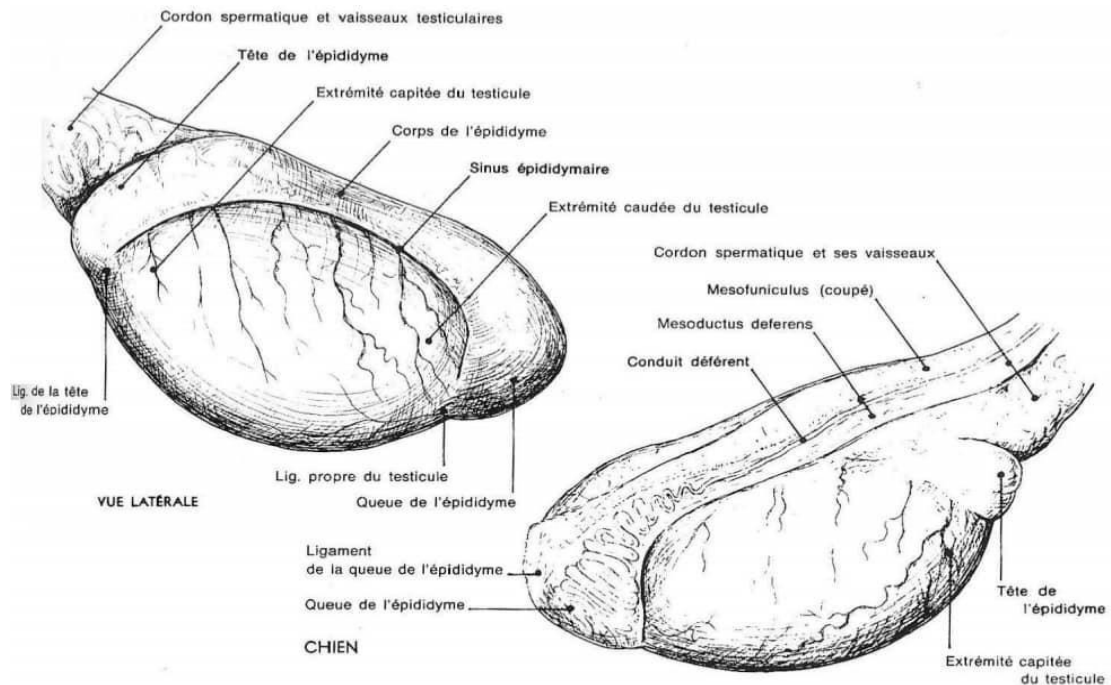


Figure 1 : Anatomie du testicule de chien. (Barone, 2001)

I.2.2. Section tubulaire :

a. Les épидидymes

Il s'agit du système de stockage, de maturation et de transport des spermatozoïdes qu'il reçoit des canalicules efférents au niveau de l'extrémité capitée du testicule (Barone, 1978).

Enfermé dans une tunique albuginée recouverte de séreuse, l'épididyme s'étend jusqu'à l'extrémité caudée. Il est classiquement divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue de l'épididyme. (Barone, 1978 ; Collin, 2003)

La tête de l'épididyme est composée de canalicules, issus du rete testis. Ces canalicules s'anastomosent ensuite pour former un canal épидидymaire unique, constituant le reste de l'organe.

Les substances sécrétées par l'épithélium épидидymaire permettent aux spermatozoïdes d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant. La queue de l'épididyme assure le stockage des spermatozoïdes, dont la survie est permise par les sécrétions épидидymaires et la mise en anaérobiose. (Setchell, 1991)

b. Les canaux déférents

Chaque canal déférent fait suite au conduit épидидymaire correspondant et chemine de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre. La paroi de ces canaux est composée de fibres musculaires lisses, de fibres élastiques et d'une muqueuse.

Les canaux déférents permettent de transporter les spermatozoïdes et les sécrétions épидидymaires jusqu'à l'urètre lors de l'éjaculation. **(Vaissaire, 1977)**

I.2.4. Section uro-génitale :

a. La prostate

La prostate est une glande située en position rétro-péritonéale. Elle enserre l'urètre au niveau du col de la vessie. Elle est constituée d'un corps bilobé et d'une partie disséminée. Le corps de la prostate mesure deux à trois centimètres chez un chien de taille et d'âge moyen. **(Collin, 2003)**

Cette glande joue un rôle primordial dans l'élaboration du sperme. Les sécrétions prostatiques représentent les trois quart du volume spermatique. Les rôles de ces sécrétions sont multiples : effet tampon contre le pH vaginal, action bactériostatique, participation à la fin de la maturation des spermatozoïdes, propriétés immunosuppressives dirigées contre les éléments du tractus génital femelle. **(Fontbonne, 1992 ; Johnston et al, 2001b)**

b. L'urètre

L'urètre est un conduit génito-urinaire qui chemine de la vessie à l'extrémité du gland du pénis. Il se divise en trois parties : une partie prostatique, une partie pelvienne et une partie pénienne, et il est constitué d'une tunique musculaire, de tissu érectile et d'une muqueuse.

L'urètre a pour rôle l'acheminement des spermatozoïdes, des sécrétions épидидymaires et prostatiques jusqu'à son ostium externe, situé à l'extrémité du gland du pénis. **(Vaissaire, 1977)**

c. Les glandes de Littré

Les glandes de Littré sont situées le long de l'urètre pénien. Elles élaborent, en association avec la muqueuse uréthrale, la phase uréthrale ou préspermatique de l'éjaculat. **(Vaissaire, 1977)**

d. Le pénis

Le pénis est situé en région sous-pubienne. Sa partie terminale est protégée par un repli cutanéomuqueux : le prépuce.

Le pénis est constitué de l'urètre pénien, de tissus érectiles (les corps caverneux et le corps spongieux du gland), de muscles (bulbo-spongieux, ischio-caverneux et rétracteur du pénis) et d'un os pénien.

Il s'agit de l'organe copulateur mâle. Suite à la stimulation des zones érogènes, les fibres parasympathiques, issues du centre médullaire sacré, provoquent la vasodilatation des artères des tissus érectiles ce qui engendre l'érection.

Parallèlement, les fibres somatiques du nerf hypogastrique induisent la contraction du muscle ischio-caverneux qui empêche le retour veineux et permet le maintien de l'érection.

Dans un second temps, les influx nerveux provenant des fibres somatiques et orthosympathiques provoquent la stimulation des glandes annexes et la contraction des fibres musculaires lisses et striées de l'ensemble de l'appareil génital ce qui permet l'éjaculation.

L'éjaculat comporte trois phases émises successivement : la phase urétrale ou préspermatique, la phase spermatique ou épидидymaire et la phase prostatique. (Vaissaire, 1977)

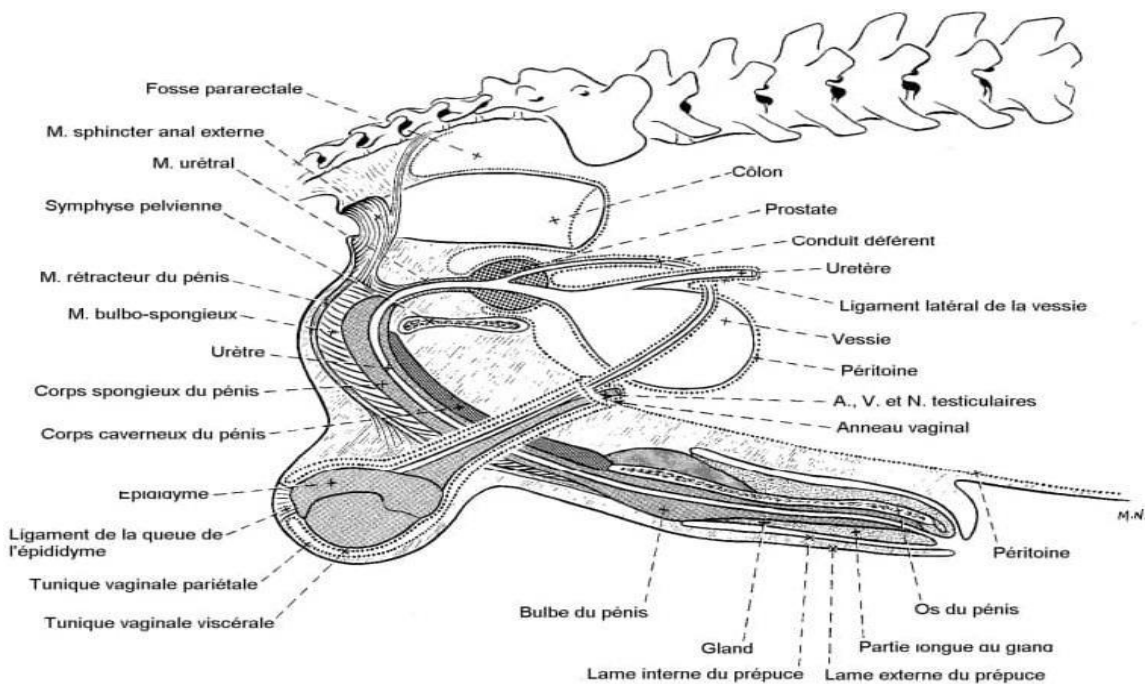


Figure 2 : Schéma de l'appareil génital mâle in situ. (Evans, 1993)

I.3 Élaboration du sperme

Les chiens sont, selon les races, pubères entre 7 et 18 mois ; les chiens de petite taille étant généralement pubères plus précocement que ceux de grande taille. **(Delompré, 2011)**

L'élaboration du sperme s'effectue en plusieurs phases : tout d'abord la spermatogenèse à l'issue de laquelle sont produits les spermatozoïdes puis la phase de maturation des spermatozoïdes et enfin les sécrétions des glandes accessoires qui s'y ajoutent.

La spermatogenèse a lieu dans les testicules de la puberté jusqu'à la fin de vie de l'animal, par vagues régulières. L'andropause n'existe donc pas dans l'espèce canine bien qu'il existe un certain nombre de facteurs pouvant influencer sur la spermatogenèse. Elle s'effectue en plusieurs étapes :

- Dès la vie fœtale, les cellules souches appelées gonocytes vont donner des spermatogonies. Ces dernières constituent le pool de cellules germinales ;
- A partir de la puberté ces spermatogonies, appelée spermatogonies A, vont se multiplier à de nombreuses reprises, de ces mitoses certaines cellules vont rester des spermatogonies A afin de conserver un pool de cellules constant et les autres vont donner des spermatogonies B qui vont subir une différenciation allant aboutir à la formation de spermatozoïdes. Cette phase est appelée phase de prolifération
- La division des spermatogonies B va aboutir à la formation d'un nombre important de spermatocytes. Celles-ci vont ensuite subir la méiose en deux étapes, division réductionnelle (passage de cellules à $2n$ chromosomes à cellules à n chromosomes) puis division équationnelle (passage de cellules diploïdes à des cellules haploïdes), et ainsi donner des spermatides. On parle donc de phase de méiose.
- Les spermatides vont évoluer en spermatozoïdes à l'issue de plusieurs remaniements structurels tels que la réorganisation du noyau, le développement de l'acrosome et l'assemblage des structures de la queue. C'est la phase de différenciation.
- La spermatogenèse se termine par la phase de spermiation qui correspond à la libération des spermatozoïdes dans le tube séminifère.

La durée complète d'un cycle est constante, 55 jours chez le chien.

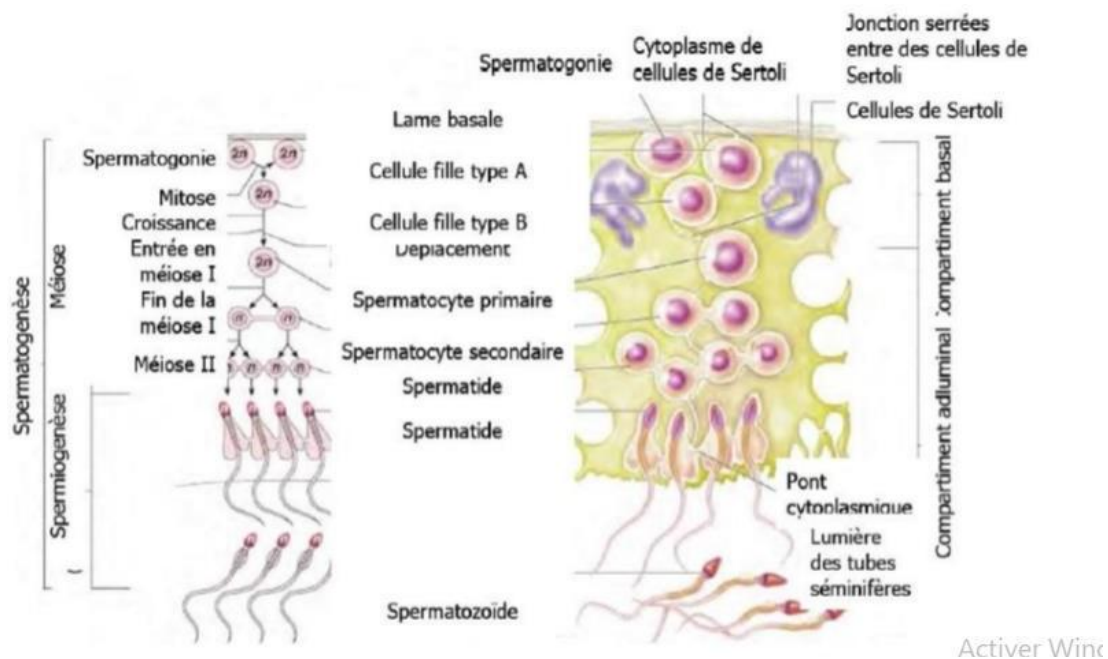


Figure 3 : Les différentes étapes de la spermatogénèse. (Senger, 2012)

Lors de l'éjaculation le sperme est dit « élaboré ». La semence émise peut se diviser en trois fractions chronologiques. La première fraction est appelée fraction urétrale, elle est de très faible volume (2mL maximum). Puis suit la seconde fraction appelée fraction spermatique, cette fraction est très riche en spermatozoïdes et constitue un volume plutôt faible (3.5mL maximum). Enfin la troisième fraction, appelée fraction prostatique, la plus volumineuse (30mL maximum), qui grâce à son grand volume va permettre d'augmenter la pression dans le vagin de la chienne et ainsi favoriser la migration des spermatozoïdes vers l'utérus. (Delompré, 2011)

I.4 Contrôle hormonal de la reproduction

Les testicules possèdent donc deux fonctions essentielles :

- une fonction exocrine : l'élaboration des gamètes mâles
- une fonction endocrine : la production d'hormones sexuelles responsables du développement et du maintien des caractères sexuels mâles.

Ces deux fonctions s'effectuent sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus sécrète de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui stimule la sécrétion de LH (Luteinising Hormone) et de FSH (Follicula Stimulating Hormone) par l'hypophyse. (Setchell, 1991)

La LH va promouvoir la production des hormones œstrogène et testostérone en agissant sur les cellules de Leydig dans les testicules.

La FSH agit en stimulant la production de plusieurs molécules par les cellules de Sertoli: l'ABP (androgen binding protein), molécule intervenant dans le transport de la testostérone et les facteurs paracrines IGF (insulin growth factor), TGF, inhibine et activine. L'IGF, l'activine et la testostérone stimulent la spermatogenèse ; à l'inverse l'inhibine, le TGF et les œstrogènes inhibent la spermatogenèse dès lors qu'elles se retrouvent en trop grande proportion.

Chaque étage de ce système hormonal est soumis à des rétrocontrôles. Des rétrocontrôles positifs d'un coté avec l'activine qui va renforcer la libération de FSH et l'œstradiol qui va renforcer la libération de LH.

Des rétrocontrôles négatifs de l'autre coté avec l'inhibine qui va inhiber la libération de FSH et la testostérone qui inhibe celle de GnRH. **(Delompré, 2011)**

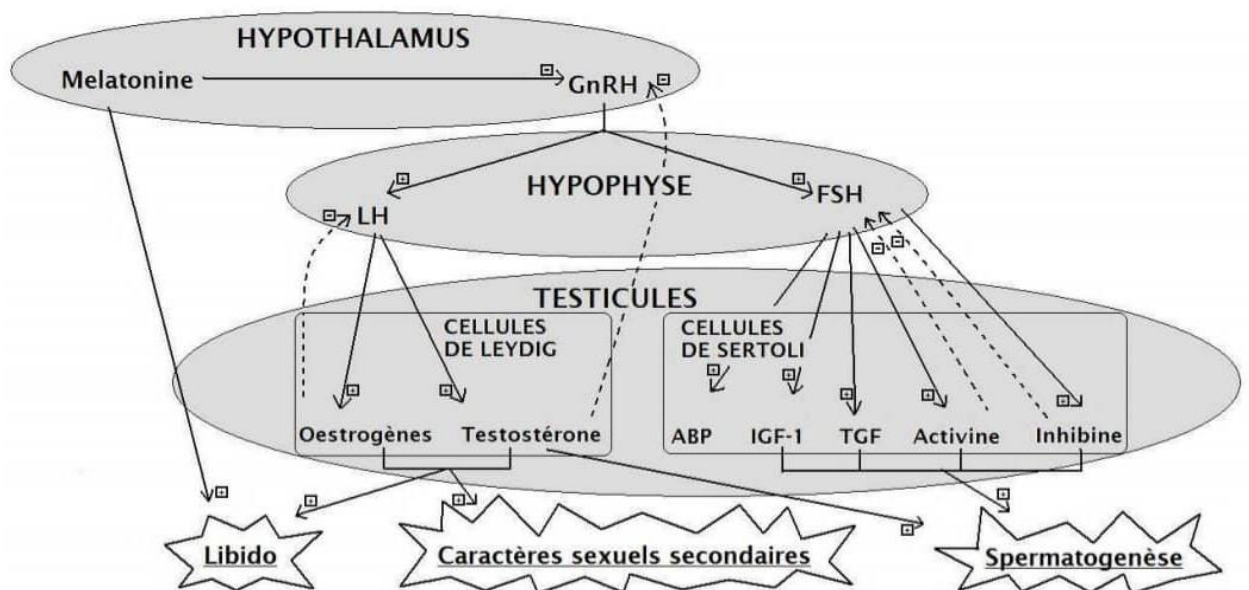


Figure 4 : Le contrôle hormonal de la fonction de reproduction mâle. **(Delompré, 2011)**

Chapitre 2 : La semence canine

II.1. la semence canine :

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation. (Prings, 1998)

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (Johnston *et al*, 2001b). L'éjaculat de chien est composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume. (Fontbonne et Dumont, 1992)

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.

(Fontbonne et Dumont, 1992)

	Origine	Aspect	Volume	pH	Composition
Phase Pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 -6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide Prostatique
Phase spermatique	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion Epididymaire
Phase postspermatique	Prostatique	Clair	4 à 30 mL et plus	6.5 -7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide Prostatique

II.2. Composition de la semence canine :

II.2.1. Le liquide séminal :

II.2.1.1. Définition :

Le liquide séminal est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles. **(Prings, 1998)**

II.2.1.2. Rôles :

Le rôle majeur du liquide séminal est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes qui en étaient largement dépourvus lors de leur stockage dans l'épididyme. De plus, la dilution des gamètes dans le plasma séminal permet l'activation de leur motilité progressive ainsi qu'un transfert facilité des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle lors de l'éjaculation. **(Dacheux et al. 2001)**

Le plasma séminal joue également le rôle de substance tampon pour les spermatozoïdes. Son pH est légèrement alcalin, entre 7,2 et 7,8, et permet de neutraliser l'environnement acide du vagin. **(Prings, 1998)**

II.2.2. Le spermatozoïde :

Le spermatozoïde correspond au gamète mâle, il transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. Il s'agit d'une cellule de petite taille mais longuement flagellée et mobile. **(Ponthier et al. 2014 ; Barone 2001)**

Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères peut se diviser en deux parties : la tête qui comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire ou « coiffe » et le noyau cellulaire et la queue appelée flagelle qui comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale et constitue la partie la plus longue du spermatozoïde. La tête et la queue sont unies par un col, ou pièce connective, très bref. **(Barone, 2001)**

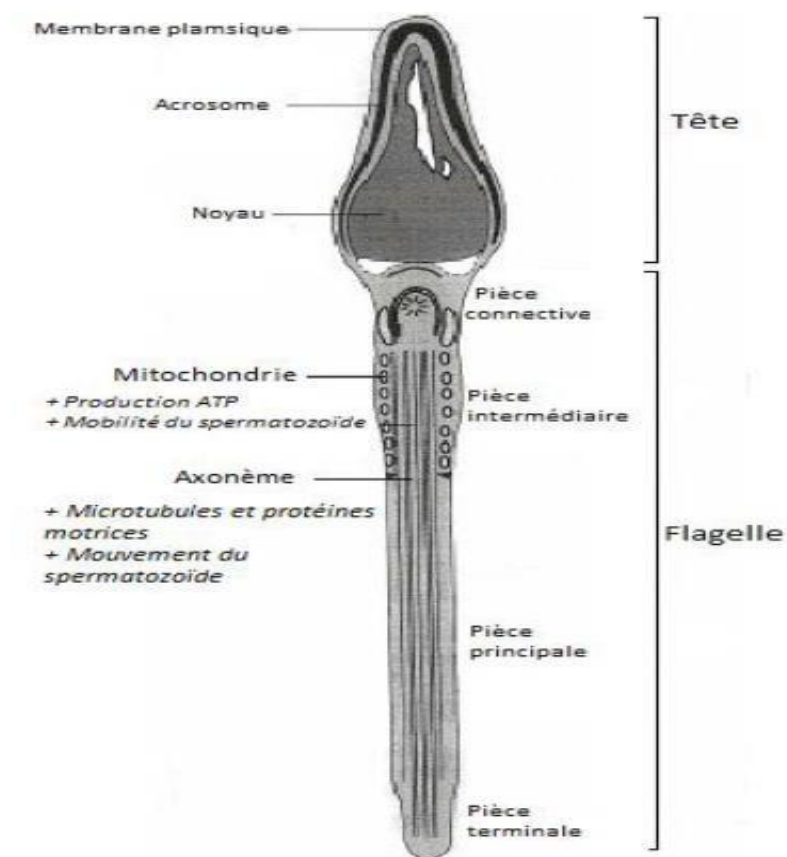


Figure 5 : Organisation interne du spermatozoïde. (Dadoue, 2001)

II.3. Récolte de la semence de chien :

II.3.1. Récolte manuelle :

La méthode de récolte manuelle par masturbation est utilisée uniquement dans l'espèce canine et constitue la méthode de choix pour cette espèce. Elle permet une récupération facile de la semence et l'obtention d'une semence de meilleure qualité et en plus grande quantité que lors de l'utilisation d'un vagin artificiel, autre méthode utilisée chez le chien et décrite plus loin. En effet, il a été montré un effet délétère du latex du vagin artificiel sur la semence canine et, de plus, la récolte par masturbation manuelle est celle qui mime au mieux l'accouplement naturel. (Noakes et al. 2009)

La plupart des publications sont univoques sur la technique à utiliser et ce qui suit constitue un résumé des références bibliographiques suivantes : (Johnston, 1991), (Linde-Forsberg, 1995), (Freshman, 2002), (Feldman et Nelson, 2004a), (Kutzler, 2005).

II.3.1.2. Matériel :

Le matériel nécessaire se compose, en général, de trois tubes stériles gradués sur lesquels sont placés trois cônes en plastique souple ou vagins artificiels. Chaque ensemble est utilisé pour récolter chacune des trois phases de l'éjaculat.

Avant utilisation, les cônes et les tubes doivent être réchauffés à 37°C pour le confort de l'animal et pour éviter aux spermatozoïdes un choc thermique trop important.



Figure 6 : Ensemble tube stérile gradué et cône en plastique souple utilisé pour récolter chaque phase de l'éjaculat. (Cliché CERCA)

II.3.1.3. Technique :

Avant la récolte, il est utile de faire uriner l'animal afin de minimiser le risque de contamination du sperme par l'urine.

La récolte se pratique le plus souvent au sol, le manipulateur se plaçant à genoux à côté du chien. Pendant que celui-ci s'intéresse à la femelle, le manipulateur commence à masser énergiquement les bulbes érectiles à travers le prépuce. Lorsque le pénis et les bulbes érectiles commencent à enfler, la verge est décalottée jusqu'en arrière des bulbes érectiles. Le manipulateur exerce alors une striction du pénis en arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index d'une de ses mains et introduit le pénis dans le premier cône de l'autre main. Généralement, le chien présente des mouvements du bassin et commence à éjaculer la

première phase. Lorsque les mouvements du bassin diminuent, le manipulateur doit changer de cône, tout en maintenant une pression en arrière des bulbes érectiles, car l'émission de la seconde phase débute. Le chien essaye alors de « descendre » du bras du manipulateur en levant un des postérieurs, il faut aider l'animal en ce sens et retourner le pénis à 180° vers l'arrière pour mimer le déroulement normal d'une copulation. Le manipulateur se place donc derrière l'animal pour récolter la fin de la seconde phase. Le dernier changement de cône se fait lors du passage à l'émission de la phase prostatique qui est mis en évidence par une courte pause, par les contractions péniennes et par la production d'un liquide translucide. Il n'est pas utile de récolter la totalité de la troisième phase, celle-ci étant d'un volume important et émise sur un temps plus ou moins long.

Les tubes contenant la semence doivent être maintenus à 37°C ou, à défaut, à température ambiante en attendant l'analyse du sperme et son utilisation.

II.4. Examen de la semence canine :

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle.

(Eilts, 2005a)

L'évaluation de la semence fraîche a pour but d'évaluer le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation. **(Pena, 2004)**

II.4.1. Les examens utilisés en routine :

II.4.1.1. Le spermogramme :

C'est l'étude du sperme au sens strict. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité sont analysés.

(Fontbonne et Dumont, 1992)

II.4.1.1.1. Le volume :

La mesure du volume donne quelques indications ; si celui-ci est trop faible, il se peut que la phase spermatique n'ait pas été entièrement. **(Fontbonne et Dumont, 1992)**

Si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post-spermatique a un volume beaucoup plus important que celui des autres phases. De plus, le volume de l'éjaculat dépend également de la taille du chien, de son âge et de la fréquence de

ses éjaculations. Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. **(Johnston et al., 2001b)**

Pour chaque phase de l'éjaculat, le volume peut être compris entre :

- 1 et 5 ml pour la première phase,
- 1 et 3 ml pour la seconde phase,
- 1 et 40 ml pour la troisième phase. **(Linde-Forsberg, 1995)**

II.4.1.1.2. L'aspect :

Normalement, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble. Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries. **(Johnston et al. 2001).**

Des colorations anormales de l'une ou de plusieurs phases peuvent être observées :

- une coloration jaunâtre, évoquant une contamination par de l'urine ou du pus.
- une coloration verdâtre, mettant en évidence la présence de pus.
- une coloration rougeâtre, suggérant un saignement prostatique ou pénien. **(Freshman, 2002)**

II.4.1.1.3. Le PH :

Le pH doit être compris entre 6.4 et 6.8. Il est important d'effectuer cette analyse lors d'asthénozoospermie afin d'écartier une affection de la prostate, de l'urètre ou de la vessie. **(Fontbonne et Dumont, 1992)**

II.4.1.1.4. Mobilité :

II.4.1.1.4.1. Examen au microscope :

Pour examiner la mobilité des spermatozoïdes au microscope, il faut observer une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle. Idéalement, l'observation doit se faire sur un microscope muni d'une platine chauffante à 37°C pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement.

En général, cette évaluation ne nécessite pas de dilution. Toutefois, si la semence est trop concentrée, une dilution peut être réalisée avec du fluide prostatique, un dilueur ou une solution saline isotonique.

Une évaluation de la mobilité de masse au grossissement x100 peut être réalisée en première intention afin d'apprécier l'agglutination, les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note est alors affectée à l'échantillon en fonction des mouvements observés.

Une évaluation de la mobilité individuelle au grossissement x40 permettra de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ayant des mouvements fléchant (c'est-à-dire ayant des mouvements rapides et en ligne droite). Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (**Linde-Forsberg, 1995**).

Même si cette évaluation est simple, rapide et peu onéreuse, elle est très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (30 à 60 %). Les biais seront tout de même réduits si elle est toujours effectuée par la même personne expérimentée.

Tableau 2 : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV. (**Guigardet, 1997**)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

II.4.1.1.4.2. Evaluation automatisé :

Les importantes variations liées à l'évaluation subjective de la mobilité des spermatozoïdes ont incité les chercheurs à développer des systèmes d'évaluation objectifs et standardisés, les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA (Computer-Aided Semen Analysis). Ces derniers permettent d'obtenir de nombreux paramètres objectifs en évaluant un très grand nombre de spermatozoïdes en très peu de temps.

Deux systèmes sont actuellement disponibles pour l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes dans l'espèce canine.

Le système Hamilton-Thorne a été validé pour son utilisation chez le chien par **IGuerouada et Verstegen (2001a)**. Il s'agit d'un analyseur d'images qui permet d'obtenir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, la vitesse moyenne, la vitesse de déplacement curvilinéaire, la vitesse de déplacement en ligne droite, la linéarité, l'amplitude et la fréquence du déplacement latéral de la tête, l'amplitude et la fréquence des battements flagellaires.

Le SQA (Sperm Quality Analyzer) a également été validé pour son utilisation dans l'espèce canine par **IGuerouada et Verstegen (2001b)** et par **RIJSSEJAERE et al . (2002)**. Une cellule photométrique détecte les variations de densité optique dans un tube capillaire contenant un échantillon de la phase spermatique. Ces variations sont converties en un index de mobilité du sperme ou SMI (Sperm Motility Index). Selon la valeur de cet index, dépendant de la concentration en spermatozoïdes mobiles, le sperme peut être classé en trois catégories :

- sperme de qualité médiocre : $SMI < 100$.
- sperme de qualité moyenne : $100 < SMI < 250$.
- sperme de bonne qualité : $SMI > 250$.

L'intérêt du SQA est son coût relativement faible par rapport aux autres systèmes CASA. Son inconvénient est qu'il sature au-dessus de 150 à 200 millions de spermatozoïdes par millilitre, certainement à cause de l'impossibilité de mouvements des spermatozoïdes dans le tube capillaire à cette concentration. (**FUERTEs, 2008**)

II.4.1.1.5. Numérotation :

II.4.1.1.5.1. Evaluation au microscope :

En routine, la numération s'effectue à l'aide d'une cellule hématimétrique : cellule de Thoma ou de Malassez. La dilution d'une fraction de la phase spermatique avec une solution hypertonique (chlorure de sodium à 3 %) est une étape préalable qui permet d'immobiliser les spermatozoïdes. En général, une dilution au 1/100^{ème} est réalisée. Une goutte de semence diluée est déposée entre lame et lamelle sur une cellule de Thoma ou de Malassez et les spermatozoïdes sont dénombrés en fonction de la technique relative à chaque type de cellule. Selon le type de cellule utilisée, la dilution réalisée et le volume de la phase spermatique, la valeur calculée est extrapolée pour obtenir le nombre total de spermatozoïdes en millions.

Le nombre total de spermatozoïdes varie entre 200 millions et plusieurs milliards en fonction de l'âge, de la race et de l'activité sexuelle de l'animal. (**Fuertes, 2008**)

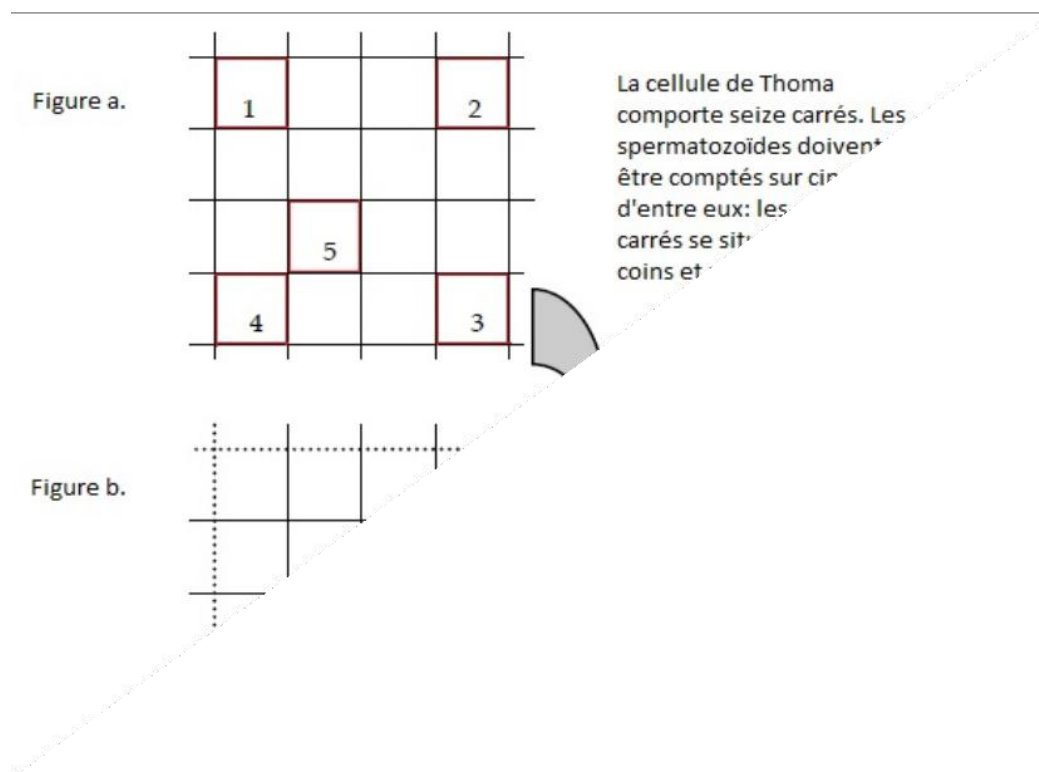


Figure 7 : Méthode de comptage sur une cellule de Thoma. (**Briffaut, 2007**)

II.4.1.1.5. La vitalité :

La vitalité est le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence. L'éosine-nigrosine est un colorant permettant d'évaluer la vitalité. En effet, il permet de différencier les spermatozoïdes morts qui seront colorés en rose des spermatozoïdes vivants qui eux resteront incolores. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci. (**Fontbonne, 1995**)

II.4.1.2. Le spermocytogramme :

Le spermocytogramme est l'étude de la morphologie des spermatozoïdes. Elle s'effectue sur un étalement de semence colorée au microscope optique en contraste de phase.

Les anomalies morphologiques peuvent être classées de différentes façons :

- en fonction de leur localisation sur le spermatozoïde : anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire ou de la queue.

- en anomalie primaire ou secondaire selon leur origine : les anomalies primaires trouvent leur origine au cours de la spermatogenèse alors que les anomalies secondaires apparaissent lors du stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme ou les voies urétrales hautes.

- en anomalie mineure ou majeure : les anomalies majeures se trouvent souvent associées à une baisse de la fertilité et les anomalies mineures provoquent une diminution de la fertilité seulement si elles sont suffisamment nombreuses. **(Ponthier et al, 2014), (Brito, 2007), (Pena, 2004)**

Tableau 3 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes **(Rigal, 2008)**

Anomalies du flagelle	Flagelle replié Flagelle rudimentaire ou cassé Flagelle enroulé Gouttelette cytoplasmique distale
Anomalies de la pièce intermédiaire	Pièce intermédiaire dédoublée Déformations de la pièce intermédiaire Gouttelette cytoplasmique proximale
Anomalies de la tête	Tête piriforme Tête repliée Tête décapitée Tête ronde

II.4.1.2.1. Evaluation au microscope :

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope optique, avec un objectif à immersion au grossissement x1000. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés **(Marc, 2015)**.

Les colorants utilisables pour observer la morphologie des spermatozoïdes sont l'éosine-nigrosine, l'éosine-bleu d'aniline, le Giemsa, le Diff Quik®, le Spermac® ... **(Marc, 2015)**.

- Eosine Nigrosine :

L'éosine-nigrosine permet de reconnaître les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur réaction acrosomique et qui ne sont donc plus fertiles. En effet, l'acrosome des spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique sera colorée. (Eilts, 2005a)

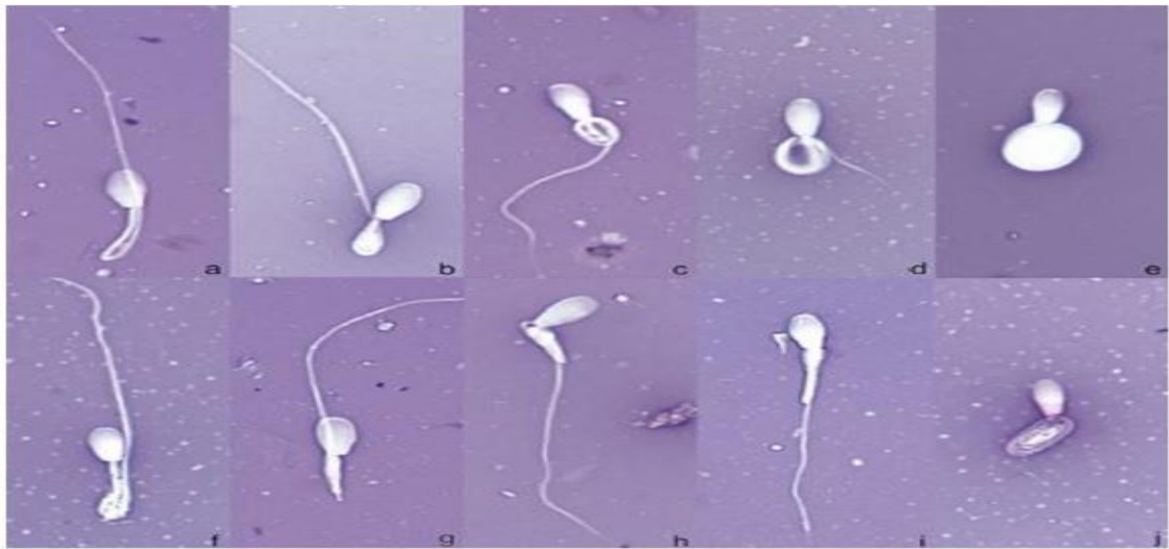


Figure 8 : Exemples d'anomalies morphologiques de la queue de spermatozoïde. Coloration à l'éosine nigrosine. Courbure dans la région distale de la pièce intermédiaire associée le plus souvent à une gouttelette cytoplasmique distal (a,b). Courbure ou enroulement de la pièce intermédiaire (c à e). Courbure/ enroulement de la pièce intermédiaire ou de la queue associée à une rupture des fibres de l'axonème (f à j). (Brito, 2007)

- Le spermac :

Cette coloration permet d'apprécier les anomalies morphologiques classiques mais aussi les spermatozoïdes ayant effectué la réaction acrosomique. (Cabannes, 2008)

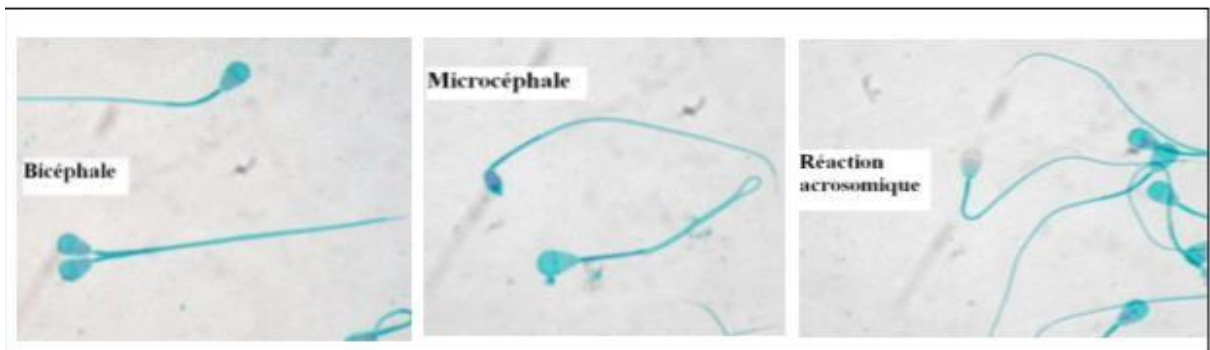


Figure 9 : Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac® : spermatozoïde bicéphale, microcéphale et spermatozoïde ayant effectué la réaction acrosomique. (CERCA, 2007)

II.4.1.3. Autres test utilisé :

a. Evaluation de l'intégrité membranaire :

- Test hypo-osmotique :

Le test hypo-osmotique permet de vérifier la fonctionnalité de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Dans un milieu hypo-osmotique, les spermatozoïdes, dont la membrane plasmique est fonctionnelle, vont se gorger d'eau et montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement de celui-ci. Si la membrane plasmique est endommagée, elle ne permettra pas la pénétration et la rétention d'eau dans les spermatozoïdes et ces derniers vont conserver leur morphologie. Après dilution dans une solution hypo-osmotique et incubation, une goutte de semence est placée entre lame et lamelle et 100 à 200 spermatozoïdes sont observés au microscope au grossissement x40. Le pourcentage de spermatozoïdes incurvés ou gonflés est calculé. Ce pourcentage est inversement proportionnel au pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane plasmique endommagée (**England et Plummer, 1993**).

b. Evaluation de l'état de capacitation :

Les spermatozoïdes capités peuvent également être détectés par les systèmes CASA puisqu'ils présentent une vitesse curvilinéaire et une amplitude du déplacement latéral de la tête augmentées et une linéarité diminuée. (**Pena, 2004**)

II.4. Cryoconservation de la semence canine :

II.4.1. Définition :

Depuis plusieurs années, la conservation de la semence et l'insémination artificielle se sont développées et intéressent de plus en plus d'éleveurs canins. (**Fuertes, 2008**)

La cryoconservation correspond à la préparation de cellules ou de tissus en vue de leur stockage à une température inférieure à -80°C. Cette procédure permet la conservation de ces cellules ou tissus pendant de nombreuses années et leur utilisation après réchauffement à la température ambiante. (**Day et Stacey, 2007**)

La congélation de la semence permet aussi de conserver pendant une durée indéfinie le potentiel génétique d'un animal. Elle offre ainsi la possibilité de transmettre ce potentiel à la descendance lorsque l'animal ne pourra plus reproduire, suite à des affections pathologiques ou à la vieillesse, ou après sa mort. (**Fuertes, 2008**)

La congélation permet également de transporter la semence sur de longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle, ce qui est particulièrement stressant pour

l'animal et donc néfaste au bon déroulement de l'accouplement et de la fécondation.
(Fuertes, 2008)

II.4.2. Le dilueur :

Pour protéger et nourrir les spermatozoïdes durant la congélation, un milieu particulier est utilisé : le dilueur. (Fuertes, 2008)

Ce milieu de congélation, permet de conserver la semence en gardant les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Il permet également d'ajuster la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes. (Marc, 2015)

II.4.2.1. Caractéristiques et rôles des dilueurs :

Un dilueur doit :

- être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spermatozoïdes,
- avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation,
- avoir un pouvoir anti-oxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- avoir une activité antimicrobienne,
- posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes (England, 1993).

Le rôle du dilueur est d'aider à la stabilisation de la membrane des spermatozoïdes. Pendant la congélation, la cellule subit des changements de volume qui peuvent être mortels s'ils dépassent les limites osmotiques de la cellule. La glace se forme initialement dans le milieu extracellulaire et entraîne la sortie d'eau de la cellule d'où sa déshydratation. L'ajout de dilueur, et notamment des agents cryoprotecteurs qu'il contient, modifie la perméabilité de la membrane à l'eau, ce qui limite les variations de volume et le stress osmotique (Eilts, 2005b); (Rota et al; 2006).

II.4.2.2. Composition du dilueur :

- 1. Cryoprotecteurs :** Ces substances ont pour rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau.

- **Le glycérol** : est le plus utilisé des cryoprotecteurs de part le monde. Il possède une action à la fois intra- et extra-cellulaire.

Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes, ce qui diminue le risque de perforation des membranes. Dans le milieu extra-cellulaire, le glycérol diminue le seuil de congélation de l'eau extra-cellulaire.

Les dilueurs canins actuels contiennent une concentration en glycérol allant de 3 à 9 % sans qu'une concentration optimale n'ait été reconnue (**Fuertes, 2008**).

2. Protecteurs membranaires :

- **Le jaune d'œuf** : est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation (**England, 1993**).

Le plus souvent, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20 %.

3. Substances tampon :

Le métabolisme des spermatozoïdes engendre une acidification du milieu extra-cellulaire ce qui est toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes (**England, 1993**).

Des substances tampon doivent donc être utilisées afin de maintenir le pH autour de la neutralité. **Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane** ou **TRIS** est le plus communément employé, en association avec de **l'acide citrique monohydraté**. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible.

4. Substances nutritives :

Afin de fournir suffisamment d'énergie aux spermatozoïdes, des sucres sont rajoutés.

Ces derniers permettent de maintenir la pression osmotique du milieu et possèdent une action cryoprotectrice (**Fuertes, 2008**).

Il a été démontré que les spermatozoïdes peuvent métaboliser le glucose et le fructose, deux composés présents dans le liquide séminal (**Rigau et al, 2001**).

Les sucres présents dans les dilueurs seront donc le fructose ou le glucose.

5. Antibiotiques :

Le sperme n'étant pas stérile et le dilueur pouvant être un bon milieu de culture, des antibiotiques sont utilisés pour lutter contre la prolifération bactérienne.

En général, **la dihydro-streptomycine** et **la benzyl-pénicilline** sont utilisées car elles sont bien tolérées par les spermatozoïdes (**Le blanc, 2004**).

II.4.3. Etape de la cryoconservation :

II.4.3.1. Centrifugation :

La centrifugation permet de séparer le liquide séminal et les spermatozoïdes. Avant celle-ci, il est préférable d'ajouter du dilueur afin de protéger les spermatozoïdes.

Sirivaidyapong et al. (2001) ont montré qu'un excès de fluide prostatique a un effet délétère sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes après décongélation et que la centrifugation de la semence avant dilution est préférable.

De nombreuses études se sont accordées pour dire que la durée et la force de centrifugation optimale, c'est-à-dire causant le moins de dommages possibles, était de 600xg pendant 10 minutes (**Barrier-Battut, 2013**) ; (**Neto et al; 2013**).

Nous avons donc décidé d'intégrer cette étape dans notre protocole de congélation.

II.4.3.2. Les étapes de la dilution :

La dilution peut être réalisée en une ou plusieurs étapes. **Pena et Linde-Forsberg (2000a)** ont comparé une dilution en une étape (avant équilibration) et une dilution en deux étapes (avant équilibration et juste avant congélation). Dans leur étude, la dilution en deux étapes s'est avérée plus performante en termes de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation qu'une dilution en une seule étape.

Dans nos travaux nous allons pratiquer une dilution à 2 étapes.

II.4.3.3. Concentration optimale des spermatozoïdes :

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation.

Pena et al. (2001) ont montré que les concentrations de 200 millions de spermatozoïdes permettent d'obtenir une longévité plus importante après décongélation que des concentrations de 400, 100 et 50 millions de spermatozoïdes par ml (**Fuertes, 2008**)

Ainsi nous utiliserons une concentration de 200 millions de spermatozoïdes.

II.4.3.4. L'équilibration :

L'étape d'équilibration correspond à une réfrigération préalable de la semence à +4°C avant la congélation proprement dite, elle fait suite à l'étape de centrifugation.

Okano suggèrent que l'étape d'équilibration permettrait des remaniements membranaires ainsi que le passage membranaire d'ions, à l'origine d'une meilleure résistance à la congélation (Silva et al. 2006) ; (Okano et al. 2004).

- **Durée de l'équilibration :**

Le temps nécessaire de maintien de la semence à +4°C avant la congélation, c'est-à-dire la durée de l'étape d'équilibration, est sujette à discussion. Cette durée influencerait la qualité de la semence et sa fertilité après décongélation. Le temps d'équilibration couramment utilisé varie entre 1 et 3 heures (Gérard et al. 2008).

Le temps d'équilibration que nous allons appliquer sera de 1 heure 30.

II.4.3.5. Le conditionnement :

Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable (Fuertes, 2008).

Le conditionnement de la semence canine se fait dans des paillettes.

Les paillettes sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton, et dont la contenance peut être de 0,25 mL, 0,5 mL ou 2,5 ml (Fuertes, 2008).

II.4.3.6. La congélation :

La congélation correspond à la mise des paillettes dans l'azote,

Elle s'effectue en 2 étapes : d'abord par refroidissement dans des vapeurs d'azote à -70°C puis immersion dans l'azote liquide à -196°C.

Burgess et son équipe ont étudié l'impact des différentes étapes de la cryoconservation sur les spermatozoïdes. Ils ont démontré qu'après l'étape d'équilibration et l'étape décongélation-décongélation, Les dommages membranaires observés tel que des gonflements, des ondulations, des interruptions et des vésiculations de la membrane plasmique ont sensiblement augmenté de même que les altérations de l'acrosome.

Suite à l'équilibration, les paillettes dont la température est de +4°C sont placées dans la cuve d'azote liquide, au-dessus de la surface du liquide où les paillettes recevront les vapeurs d'azote à +4°C. Ceci afin de ne pas provoquer de choc thermique pouvant endommager les cellules de spermatozoïdes.

La température commence à diminuer jusqu'à atteindre les -110°C à une vitesse de 60°C degré par minute. Puis, la vitesse passera à 20-30 °C par minute jusqu'à atteindre la température de -140°C.

Le passage de -140°C à -169°C se fera par immersion des paillettes dans l'azote liquide.

II.4.3.7. La conservation :

La semence congelée a pour avantage d'être conservé pendant une durée indéfinie. Les paillettes sont conservées dans des tanks contenant de l'azote liquide.

II.4.3.8. La décongélation :

- Température et temps de décongélation :

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent.

La décongélation se fait en plongeant les paillettes congelée directement dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes.

- Le dilueur de décongélation

Un dilueur de décongélation peut être ajouté à la semence après la décongélation. L'ajout du dilueur doit se faire de façon lente afin que les spermatozoïdes ne passent pas d'un milieu hypertonique à un milieu isotonique trop rapidement, ce qui pourrait les endommager par choc osmotique (**Pena et Linde-Forseberg, 2000a**).

En ce qui concerne le taux de dilution à utiliser, deux études ont montré qu'une dilution de la semence décongelée par un volume de dilueur équivalent à 2 fois ou à 4 fois le volume de la semence est plus performante que l'absence de dilution ou qu'une dilution par un volume de dilueur équivalent à celui de la semence. (**Pena et Linde-Forsberg, 2000**) (**Pena et al ., 2001**).

Suite à la décongélation, un une analyse par CASA devrait être réalisé afin d'étudier la qualité de la semence après le processus de cryoconservation.

Les résultats attendus ne devront pas être inférieurs à 50% de spermatozoïdes viable.

CHAPITRE 3 : Le pollen

III.1. Définition du pollen :

On parle de pollen, lors de la dissémination et de la reproduction des plantes à fleurs. Les pollens sont de minuscules particules, produites par les anthères et contenant les gamètes mâles, souvent appelés grains de pollen. Etymologiquement, ce mot provient de polynos, mot grec signifiant poussière, farine. (Dulucq et Tulon, 1998)

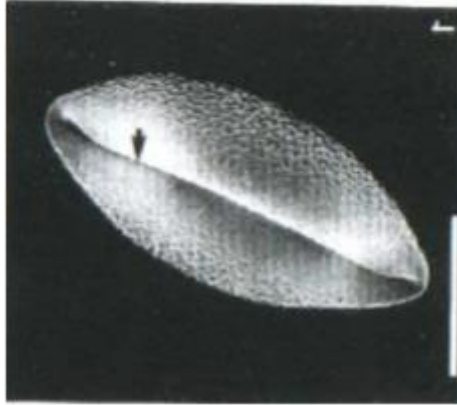


Figure 10 : Structure du pollen (*Phoenix dactylifera* L.) (Boughediri, 1991)

III.2. Historique du phoenix dactylifera L :

Le dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est exploité puis cultivé depuis plusieurs millénaires au Moyen-Orient et dans le nord de l'Afrique. (Munier;1973. Barrow;1998. Zohary et al; 2012) Il s'agit d'une plante pérenne dioïque, dont les pieds femelles sont pollinisées à la main en culture. C'est « l'arbre » emblématique des régions arides et semi-arides de l'Ancien Monde.

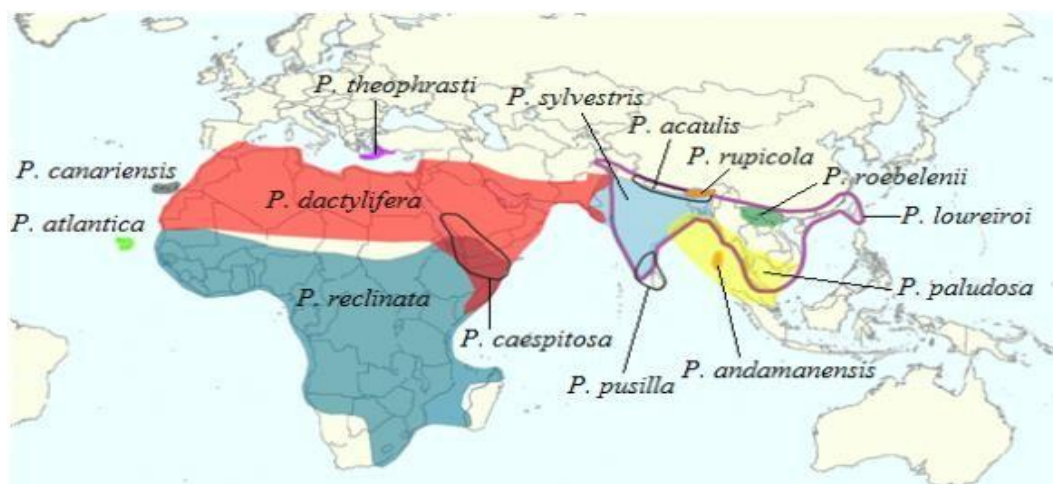


Figure 11 : Carte de répartition du genre Phoenix. (Gros-Balthazard et al; 2013).

III.3. Caractéristique du pollen de phoenix dactylifera L:

Les caractéristiques du pollen de palmier dattier Sont : (Boughediri; 1994)

-Il est de forme ellipsoïdale

-Il est de type hétéro polaire monocolpé

-Il possède une ouverture en forme de sillon longitudinal

-Les mensurations sont : grande largeur équatoriale (L), de 21.95 à 27.40 μm ; petite largeur équatoriale (l), de 11.60 à 13.88 μm

L'ensemble de caractères à utiliser dans l'estimation de la qualité des pollens sont :

- Pourcentages de viabilité, des grains vides, et des grains anormaux, telles que les déformations de l'ouverture et l'ouverture de l'extrémité aperturale
- Etat cellulaire (bicellulaire)
- Etat de turgescence

III.4. Composition chimique du pollen de phoenix dactylifera L :

Les tableaux sous-dessous résument la composition de pollen de *Phoenix dactylifera*

Tableau 4 : composition chimique approximative (100 g poids frais) de pollen de palmier dattier. (M.M. Hassan; 2011)

Parmeter	Palm pollen grains
Moisture (%)	28.80
Ash (%)	4.57
Crude fiber (%)	1.37
Crude fat	20.74
Crude protein (%)	31.11
Carbohydrate (%)	13.41

Tableau 5 : composition en vitamine du pollen de palmier dattier. (M.M. Hassan; 2011)

Vitamines	Palm pollen grains
A (IU/100 g)	7708.33
E (IU/100 g)	3030.92
C (mg/100 g)	89.09

Tableau 6 : composition en minéraux (mg/100g poids sec) de pollen de palmier dattier.
(M.M. Hassan; 2011)

Mineral	Palm pollen grains
Boron (B)	309.4
Zinc (Zn)	284.0
Selenium (Se)	305.0
Iron (Fe)	241.0
Molybdenum (Mo)	302.2
Copper (Cu)	319.6
Manganese (Mn)	284.0
Cobalt (Co)	305.4
Nickel (Ni)	302.4

Tableau 7 : composition en acide aminé essentielle (g/100g de poids sec) du pollen de palmier dattier. (M.M. Hassan; 2011)

Amino acid	Palm pollen grains
Essential amino acids	
Isoleucine (Ile)	1.49
Leucine (Leu)	3.34
Lysine (Lys)	2.95
Phenylalanine (Phe)	1.63
Threonine (Thr)	1.72
Valine (Val)	1.81
Histidine (His)	1.61
Methionine (Met)	0.11

Tableau 8 : composition en acide gras (%) du pollen de palmier dattier
(M.M. Hassan; 2011)

Fatty acid	Palm pollen grains
Myristic acid (C14 :0)	13.33
Palmitic acid (C16 :0)	34.45
Linoleic acid (C18 :2)	14.24

III.5. Vertu du pollen dans la cryoconservation de la semence :

Le pollen de palmier dattier a longtemps été utilisé dans la médecine traditionnelle arabe comme complément alimentaire pour améliorer la fertilité chez les femmes et les hommes.

En outre, il pourrait améliorer la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes grâce à sa forte composition en antioxydant qui permet de diminuer les effets néfastes causés par le stress oxydatif. (*Affoun, 2017*)

Il est reconnu que le stress oxydatif produit des effets délétères sur les fonctions des spermatozoïdes, ceci se caractérise par la dégradation des lipides membranaires ce qui augmente la perméabilité de la membrane et expose le spermatozoïde aux agressions extérieures, diminution de la motilité des spermatozoïdes, ainsi que la détérioration du génome du spermatozoïde. (**BenAli et Al, 2012**)

In vitro, l'addition de vitamine A, C ou E -principaux composants du pollen de palmier dattier- au milieu de préparation des spermatozoïdes permet de réduire les dommages oxydatifs causés par la centrifugation. (**Aitken et Clarkson; 1988**) Ceci se traduit par une augmentation de leur capacité à fusionner avec les ovocytes dépellucidés (**Aitken et coll., 1989a**) et même d'améliorer leur taux de liaison à la zone pellucide. (**Kessopoulou et coll., 1995**)

L'ajout de tels antioxydants, seuls ou en combinaison, serait associée à une diminution du stress oxydatif dans le sperme. (**Donnelly et coll., 1999b**)

D'autre part, les minéraux, en particulier le zinc et le sélénium sont eux aussi reconnus pour leur capacité diminution du stress oxydatif. (**Boulanger, 2005**)

- **Lien entre stress oxydatif et cryoconservation :**

Plusieurs études ont rapporté que le processus de congélation/décongélation altère la mobilité des spermatozoïdes et la qualité de l'ADN par la création d'un état de stress oxydant et probablement par induction de l'apoptose. (**Mseddi et al, 2012**)

Ces études montrent donc l'effet délétère de la congélation sur le sperme et incite à l'amélioration des techniques de cryoconservation adoptées.

Chapitre IV : Le stress oxydatif

IV.1. Définition :

Le stress oxydant défini comme un déséquilibre entre la production des substances oxydantes qui sont principalement des dérivés réactifs de l'oxygène et les capacités antioxydantes d'un système (**Barouki, 2006**). Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état prooxydant (**Goudable et al., 1997**). Il déclenche des pathologies nombreuses comme l'athérosclérose, le cancer, les maladies inflammatoires et l'infertilité masculine. (**Saglam et al., 2007; Mancini et al., 2008 in Ait baziz et Chemali, 2017**)

IV.2. Type de stress oxydatif :

1- Les espèces oxygénées réactives (EOR) :

L'oxygène est indispensable à la vie des animaux, des plantes et de certains microorganismes vivants en aérobie. En effet, il est essentiel pour la production d'énergie sous forme d'ATP qui est réalisée par des mécanismes d'oxydo-réduction, c'est à dire de transfert d'un ou plusieurs électrons d'une molécule à l'autre. Lors de ces différentes réactions, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène. Lorsqu'un nombre impair d'électrons est transféré sur celui-ci, il est transformé en dérivés de l'oxygène appelés radicaux libres oxygénés ou espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont toxiques pour l'organisme. Ces radicaux libres oxygénés sont des molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés. (**Halliwell et al., 1994**)

Les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules ont très longtemps été vues comme les produits toxiques du métabolisme, pouvant altérer les constituants lipidiques, protéiques ou l'ADN de la cellule. (**Beaudeau et al., 2006**)

Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyde (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). (**Goudable et al., 1997**)

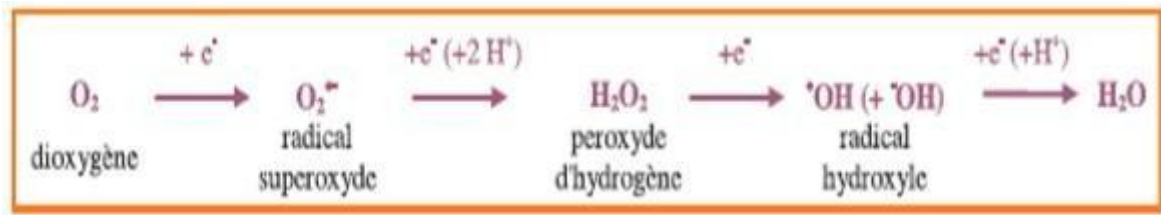


Figure 12 : Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène.

(Gardès-Albert *et al.*, 2003)

2- Les radicaux libres :

Un radical libre (RL) est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (demi-vie courte) (Ortiz *et al.*, 2013). Les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Afanas'ev, 2009). A des concentrations physiologiques, les RLs jouent des rôles dans la signalisation, la migration et la différenciation cellulaire (Ziech *et al.*, 2010 in Trabsa, 2015), mais à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort cellulaire et l'apoptose (Salido et Rosado, 2009 in Trabsa, 2015).

IV.3. Dommages oxydatifs des macromolécules :

Les ROS, peuvent endommager les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides quand ils sont présents en concentrations élevées, menant aux menaces de santé graves. (Moukette *et al.*, 2015)

a- Les dommages oxydatifs aux protéines :

L'oxydation des protéines provoque la fragmentation au niveau des résidus d'acides aminés, la formation des réticulations protéine-protéine, et l'oxydation des structures protéiques qui conduit finalement à une perte de fonction. (Zegarac *et al.*, 2017)

Les protéines qui sont sensibles à l'oxydation incluent les phosphatases, les kinases, les facteurs de transcription et les enzymes métaboliques. (Deavall *et al.*, 2012)

b- Les dommages oxydatifs de l'ADN :

Les ROS peuvent causer des dégâts oxydatifs à l'ADN nucléaire. L'attaque sur l'ADN aboutit à l'oxydation de désoxyribose. (Sharma *et al.*, 2012). Le OH et O₂ sont les principaux ROS affectant directement l'ADN. (Avery, 2011)

L'ADN mitochondrial est particulièrement vulnérable à une attaque par les ROS, en raison de sa proximité aux complexes. Les dommages de l'ADN mitochondrial sont vastes, même dans les conditions normales, et les mutations se produisent cinq à dix fois plus que le taux observé dans l'ADN nucléaire. **(Burton et al, 2011)**

c- Peroxydation lipidique :

La première indication des effets néfastes des EOR sur les spermatozoïdes a été montrée en 1979 **(Jones et al., 1979)**. Ces auteurs ont observés une corrélation entre la peroxydation lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes humains et la perte sévère de leur motilité, L'exposition des gamètes mâles aux EOR induit une perte de leur motilité qui est directement corrélée au niveau de peroxydation lipidique de la membrane des spermatozoïdes. **(Gomez et al., 1998)**

Cette peroxydation lipidique par exposition des gamètes mâles aux ERO ne modifie pas seulement la motilité des spermatozoïdes mais agit également sur l'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique des spermatozoïdes. **(Aitken et al.,1989)**

IV.4. Les antioxydants :

(Vansant, 2004 in Mohammadi, 2013) définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS.

Il existe deux sources de défenses antioxydantes: l'une est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et catalase),ou de protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine et albumine) et quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants **(Rock, 2003)**. L'autre source est exogène et est apportée par l'alimentation sous formes de fruits et légumes riche en vitamines C, E, caroténoïdes et flavonoïdes. **(Percival, 1998 ; Pincemail et Defraigne, 2004)**

- **Source exogène :**

- **Vitamine C :**

Elle a un rôle antioxydant, car elle réagit avec l' $O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$. Elle permet de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant (**Lutsenko et al., 2002**). Elle agit également sur certains hydroperoxydes lipidiques réduisant ainsi la peroxydation lipidique. La vitamine C permet également de régénérer la vitamine E qui a un rôle antioxydant plus important. (**Poljsak et al., 2005**)

- **Vitamine E :**

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui a des propriétés anti oxydantes en conjugaison avec la vitamine C et le glutathion. Celle-ci est capable d'interagir avec l' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , et $^{\cdot}OH$. La vitamine E joue son rôle d'antioxydant principalement dans les membranes biologiques (**Tappel et al., 1972**). Notamment au niveau de la membrane mitochondriale qui contient de forts taux de vitamine E et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant. (**Davi et al., 1999**)

- **Vitamine A :**

La vitamine A appelée également rétinol et ses précurseurs comme le β -carotène sont liposolubles. Dans l'organisme. Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, et ce processus est accéléré par la lumière et la chaleur. Elles sont liposolubles et leur rôle principal est la protection des membranes cellulaires en réduisant la peroxydation lipidique. Elles agissent en captant les radicaux libres et les EOR. (**Burton et Ingols, 1984**)

- **Les polyphénols et flavonoïdes :**

Les polyphénols sont synthétisés par les plantes, et constituent un groupe important de substances naturelles présentes dans le règne végétal. Ils présentent une activité antioxydante et fournissent ainsi aux cellules de notre organisme une protection contre les agressions oxydatives. (**Massaux, 2012**)

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents. Ils sont généralement des puissants antioxydants. Les flavonoïdes sont capables de piéger les RL directement, par le don d'un atome d'hydrogène. (**Procházková et al, 2011**)

PARTIE 2 :

LE MATERIEL ET

LES METHODES

I. Introduction :

Lors de la congélation, les spermatozoïdes sont soumis à des conditions défavorables qui peuvent entraîner des dommages et qui nuisent à leur pouvoir de fécondation.

De nombreuses expériences ont été réalisées par le passé afin d'améliorer le protocole de congélation dans le but de diminuer les pertes en spermatozoïdes.

L'objectif de notre étude est de déterminer si l'intégration d'une solution à base de pollen de palmier dattier à la composition des dilueurs de congélation et de décongélation était techniquement possible et si la qualité de la semence après décongélation est significativement altérée ou non par ce protocole par rapport à la technique de congélation réalisée en routine au sein de la plateforme biotechnologique de reproduction des carnivores.

Deux principales raisons ont motivé le choix d'ajouter une solution de pollen à la composition de notre dilueur :

- L'utilisation thérapeutique récente du pollen dans les traitements liés à l'infertilité humaine et animale.
- La composition chimique du pollen de palmier dattier riche en antioxydants reconnu pour leur action anti-infertilité.

Les paramètres pris en compte afin d'étudier l'efficacité de notre dilueur en comparaison avec le dilueur témoin après décongélation sont :

- La numération des spermatozoïdes.
- La concentration des spermatozoïdes.
- La mobilité des spermatozoïdes.

L'évaluation de ces différents paramètres se fera par le système automatisé CASA (Computer-Aided Semen Analysis).

Si les résultats s'avèrent probants, cela pourrait constituer une avancée dans le monde de la reproduction canine assistée.

En raison de la pandémie du coronavirus et les mesures de confinement prises afin de diminuer le risque de transmission du covid-19, nous n'avons pas pu aller au bout de notre expérimentation et notre travail s'est arrêté à la préparation des dilueurs utilisés.

Néanmoins, nous allons vous décrire notre protocole d'expérimentation tel que nous l'avions préparé. Puis, dans la seconde partie nous allons présenter et les différents articles scientifiques publiés ayant pour thème l'amélioration de la conservation de la semence canine et critiquer les résultats auquel ils sont parvenus afin d'envisager les conclusions auquel nous serions parvenu si nous étions allé au bout de notre expérimentation.

II. Matériel :

Nous devons pour notre étude utiliser la semence d'au moins une quinzaine de chiens.

Pour chaque animal, **le nom, la race, l'âge, le propriétaire, le statut sanitaire** et celui de **fertilité** (si connu) ainsi que le **numéro de l'expérience** pour laquelle (lesquelles) la semence a été utilisée sont répertoriés

III. Méthode :

1- Méthode de prélèvement :

Nous récoltons la semence de chaque animal en récupérant la phase spermatique de l'éjaculat.

Avant utilisation, nous réchauffons les tubes et les cônes dans une étuve et nous les maintenons à une température de 37°C à l'aide d'un porte-tube métallique réchauffé dans l'étuve.

Si la semence d'un même animal doit être récolté plusieurs fois, nous effectuons les prélèvements au minimum à 48 heures d'intervalle.

2- Examen de la semence :

Nous devons d'abord estimer la qualité de la semence (le volume des phases spermatique recueillies, la couleur, la présence de sang, du mucus.....)

Puis, nous devons évaluer les paramètres spermatiques (vitalité, motilité, morphologie) par technique CASA.

3- Préparation des dilueurs :

Au cours de nos expériences, nous allons utiliser différents dilueurs qui seront divisés en 2 groupes distincts :

- Premièrement le groupe des dilueurs de réfrigération, congélation et décongélation utilisé en routine à la plateforme biotechnologique de reproduction des carnivores et que nous aurons préalablement préparés.
- Deuxièmes le groupe des dilueurs de réfrigération, de congélation et de décongélation auquel nous rajouteront une solution de pollen équivalente à trois concentration différentes (0.06, 0.25, 0.6 mg/ml). (Mahaldashtian *et al*, 2016)

Tableau 9 : Composition des dilueurs de réfrigération, congélation et de décongélation utilisés en routine au PBRC.

Composition dilueur	Réfrigération	Congélation	Décongélation
TRIS(Tri-hydroxy-méthyl-aminométhane)	3.025g	3.025g	3.025g
Acide citrique	1.7g	1.7g	1.7g
Glucose	1.25g	1.25g	1.25g
Pénicilline	0.06g	0.06g	0.06g
Déhydrostréptomycine	0.1g	0.1g	0.1g
Eau distillée	Jusqu'à 80ml	Jusqu'à 73ml	Jusqu'à 100ml
Glycérol	/	20ml	/
J'aune d'œuf	20 ml	7ml	/

Tableau 10 : Composition des dilueurs de réfrigération, congélation et de décongélation ayant 3 concentrations différentes de pollen.

Composition dilueur	Réfrigération	Congélation	Décongélation
TRIS	3.025g	3.025g	3.025g
Acide citrique	1.7g	1.7g	1.7g
Glucose	1.25g	1.25g	1.25g
Pénicilline	0.06g	0.06g	0.06g
Déhydrostréptomycine	0.1g	0.1g	0.1g
Eau distillée	Jusqu'à 80ml	Jusqu'à 73ml	Jusqu'à 100ml
Glycérol	/	20ml	/
J'aune d'œuf	20 ml	7ml	/
Solution de pollen	(0.06, 0.25, 0.6 mg/ml)	(0.06, 0.25, 0.6 mg/ml)	

4- Ajout du pollen :

- La poudre de pollen sera dissoute dans de l'eau distillé à 30 °c et placé dans un agitateur magnétique pendant 5 heures.
- Puis, elle sera filtrée et placé dans une étuve (55-60°C) pendant 24h afin de vaporiser l'eau.
- Enfin, elle sera dissoute dans une solution saline pour avoir les concentrations voulues.

Ils seront conditionnés en échantillons de 4 ml dans des tubes stériles et conservés congelés dans un congélateur ordinaire.

Quel que soit le dilueur utilisé, nous devons le décongél le jour de son utilisation en le plongeant dans un bain-marie à 37°C pendant une quinzaine de minutes.

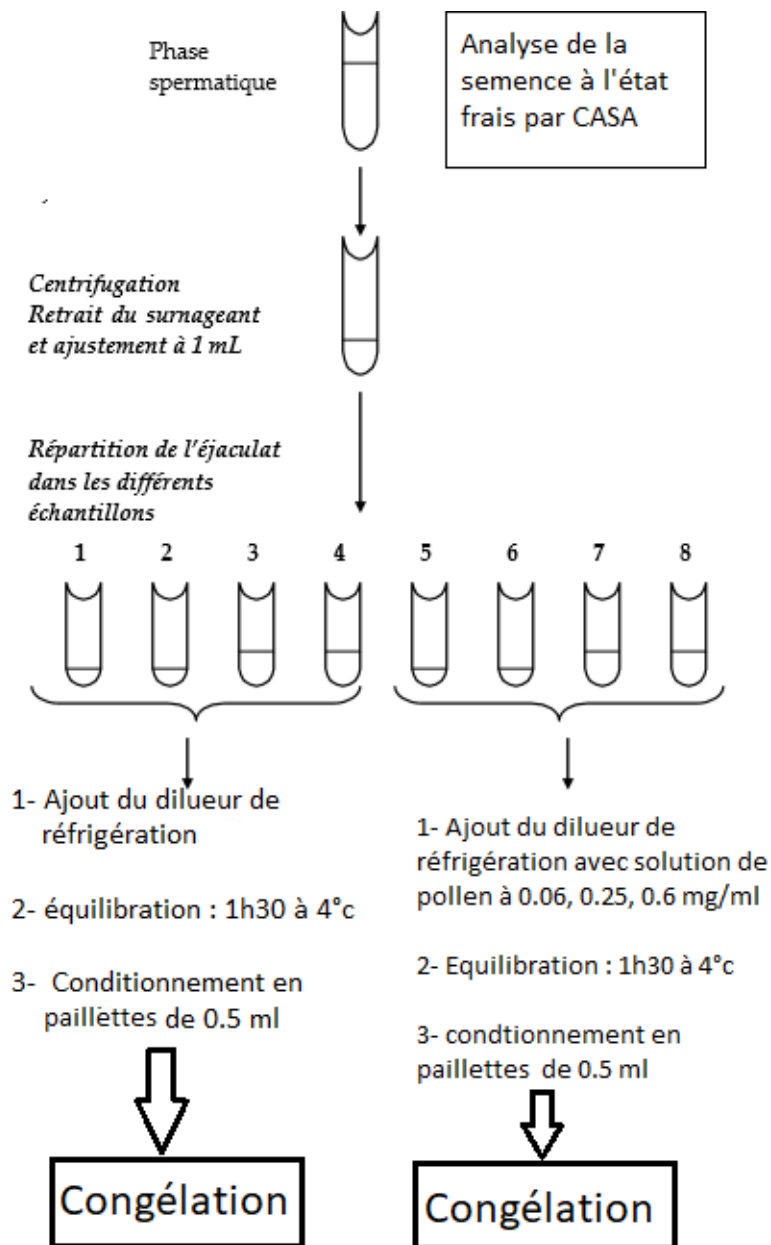


Figure 13 : préparation de la semence

5- Conditionnement :

Après la dernière étape de dilution, nous allons placer la semence dans des paillettes de 0,5mL par aspiration. Nous allons ensuite obstruer l'extrémité libre de chaque paillette à l'aide d'une poudre de PVC (polychlorure de vinyle) se polymérisant dans l'eau.

- **Les échantillons réfrigérés :**

Ils seront entreposés dans une chambre froide où la température sera maintenue à 4°C.

- **Les échantillons congelés :**

Après la fin de la durée de réfrigération, les paillettes seront placées dans des vapeurs d'azote pendant 10 minutes. Au bout de 10 minutes, nous allons plonger les paillettes dans l'azote liquide à -196°C contenu au fond du congélateur puis nous les mettrons dans les tanks d'azote liquide où nous les conserverons jusqu'à leur décongélation.

6- Décongélation :

Lors de la décongélation, nous allons plonger les paillettes dans un bain-marie à 37°C pendant une minute puis placer le contenu de chaque paillette dans un tube contenant 1 ml de dilueur de décongélation.

7- Analyse de la semence après décongélation : (CASA)

Pour les deux expériences, nous devons évaluer la **mobilité**, le **nombre** et la **morphologie** des spermatozoïdes immédiatement après décongélation et comparer les résultats entre le premier et le second groupe puis entre les sous-groupes et ainsi avoir une idée d'ensemble sur l'action du pollen dans la conservation de la semence de chien.

PARTIE 3 :

LE RESULTAT ET

LES DISCUSSIONS

Le matériel et les méthodes :

Objectif :

L'objectif de cette partie de notre travail est de déterminer la nature de la documentation que nous allons traiter ainsi que les critères pris en compte afin d'inclure ou exclure un document puis nous déterminerons les paramètres pris en compte afin de classer les données.

1- Nature des données :

Au cours de notre travail de documentation, nous avons été amenés à consulter de nombreuses sources, principalement : PubMed, google-scholar, Searchgate, ainsi que ScienceDirect.

- Afin de cibler mieux nos recherches nous avons utilisé des mots clés spécifiques à notre domaine de recherche, à savoir : semence canine, pollen de palmier dattier, Phoenix dactylifera L, vitamine A, C, et E, cryoconservation, congélation, stress oxydatif, antioxydant.

Afin d'être le mieux renseigné de l'état d'avancement des recherches et découverte scientifique ayant pour sujet l'amélioration des techniques de conservation et cryoconservation de la semence canine, nous avons mené nos recherches en langue française et bien évidemment en anglais.

Un autre aspect pris en compte fut l'année de parution de la documentation, nous avons voulu prendre en compte les publications les plus récentes afin d'être le mieux renseigné possible sur les recherches actuelles, de ce fait l'année de publication de la documentation s'étend de 2007 à 2019.

Enfin, le nombre de travaux pris en compte atteint les 11 documents.

2- Critères d'inclusion et d'exclusion :

Les critères que nous avons pris en compte afin d'inclure un document ont été qu'ils abordent :

- La cryoconservation de la semence chez les carnivores
- L'amélioration de la qualité de conservation des semences soit :
 - Par modification du protocole de congélation.
 - Par modification de la composition des dilueurs utilisés.
- La mise en évidence des lésions cellulaires causées par cryoconservation.
- Le rôle des antioxydants dans l'amélioration des techniques de conservation de la semence.
- Le rôle des différents composants du pollen de palmier dattier en tant qu'antioxydant.

De même, nous avons exclu des travaux qui :

- Utilise d'autre méthode de conservations que la cryoconservation.
- Utilise d'autre produit de conservation que les dilueurs.

3- Extraction et classification des données :

Les paramètres que nous avons recherchés dans la documentation sont :

- La technique utilisée pour la conservation
- La molécule ajoutée au dilueur
- La durée des différentes étapes de conservation.
- Les examens utilisés pour évaluer la qualité de la semence.
- les différents facteurs de conservation pris en compte

- **Le nombre de travaux traités a été de onze :**

I. Etude des effets néfastes de la cryoconservation sur les spermatozoïdes :

La congélation du sperme en vue de sa préservation est indiquée chez de nombreuses espèces et situations. Néanmoins, la cryoconservation provoque des altérations diverses des spermatozoïdes, au niveau membranaire mais aussi nucléaire, à type d'oxydation et de fragmentation de l'ADN, souvent associées à un stress oxydant et à des taux élevés de radicaux libres (RL).

- Une étude faite par **Mseddi et al en 2009** a eu pour objectif d'évaluer l'effet de la cryoconservation sur l'intégrité de l'ADN spermatique d'hommes infertiles par l'exploration des taux de fragmentation et de l'oxydation de l'ADN en cytométrie de flux.

L'étude a porté sur 15 hommes consultants pour infertilité du couple. Le sperme a été collecté par masturbation après un délai d'abstinence de 3 à 5 jours. L'analyse des paramètres spermatiques (mobilité, vitalité, numération des spermatozoïdes, morphologie et numération leucocytaire) a été effectuée avant congélation. La mobilité et la vitalité ont été également déterminées après décongélation. Le sperme a été congelé dans l'azote liquide selon un protocole utilisant un cryoprotecteur commercialisé (SpermFreeze®). Pour l'étude de l'intégrité de l'ADN, ils ont utilisé la cytométrie de flux aussi bien pour l'étude de la fragmentation de l'ADN (technique du TUNNEL) que pour la détection de la 8-oxoguanine (biomarqueur du stress oxydatif) avant et après cryoconservation durant 7 à 10 jours.

Les résultats ont montré que la cryoconservation a provoqué une chute significative de la mobilité et de la vitalité (45 ± 7 vs $30,6 \pm 12,2$ % ; $p = 0,001$ et $77,2 \pm 8,9$ vs $45,6 \pm 8,9$ % ; $p = 0,001$, respectivement). Par ailleurs, les taux de fragmentation et d'oxydation de l'ADN spermatique ont significativement augmenté après congélation ($21,3 \pm 13,7$ vs $33,1 \pm 16,6$ % ; $p = 0,002$ et $14,5 \pm 6,2$ vs $16,3 \pm 5,5$ % ; $p = 0,03$, respectivement).

- Une autre étude faite cette fois ci par **BenAli et Al en 2012** a portée sur l'analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles.

Pour ce faire, ils ont évalué le statut oxydatif spermatique de 129 sujets infertiles. Ces sujets sont caractérisés par une infertilité de durée variable. Ils ont été subdivisés en quatre groupes : des sujets normozoospermiques considérés comme témoins (n=34) ; des

asthénozoospermiques (Asthéno, n=43) ; des oligozoospermiques (Oligo, n=22) et tératozoospermiques (Térato, n=30).

Parmi les marqueurs du stress oxydatif, ils ont évalué, dans le plasma séminal, le zinc, le calcium, le magnésium et le sélénium par spectrométrie d'absorption atomique à flamme et à four. Le malondialdéhyde (MDA) est dosé par spectrofluorométrie.

Tableau 11 : Comparaison des concentrations moyennes en éléments trace, éléments minéraux et le malondialdéhyde entre les témoins (n=34) et les patients oligozoospermiques (n=22), asthénospermiques (n= 43) et tératospermiques (n= 30)

Paramètres	Témoins	oligozoospermiques	asthénospermiques	tératospermiques
Zinc (mg/ml)	144,01±42,13	120,51±25,33	122,02±34,69	126,02±24,82
Sélénium (µg/ml)	64,00±20,6	55,00±21,44	56,11±22,81	57,01±24,31
Calcium (mg/ml)	178,00±19,8	290,13±28,09	262,21±23,18	250,08±21,04
Magnésium (mg/ml)	101,21±15,81	70,53±8,11	82,09±3,06	85,03±9,78
MDA (µg/ml)	2,32±0,94	3,22±1,37	3,52±1,93	3,64±1,73

Les résultats de leur étude montrent que les concentrations séminales du zinc et du sélénium sont plus élevées chez les normozoospermiques que les concentrations de ces mêmes éléments chez les autres groupes. La concentration du MDA est plus élevée chez les trois groupes de patients : oligospermiques (3,22±1,37 µg/ml), asthénospermiques (3,52±1,93 µg/ml) et tératospermiques (3,64 ±1,73 µg/ml) par rapport aux témoins (2,32±0,94 µg/ml).

Ces études sont en accord avec plusieurs autres études qui ont rapporté que le processus de congélation/décongélation est responsable de l'apparition d'un stress oxydatif qui joue un rôle important dans l'altération des spermatozoïdes. Les radicaux libres peuvent, en effet, modifier la structure membranaire ainsi que celle de l'acide désoxyribonucléique et altérer la mobilité des spermatozoïdes.

Ces études montre donc l'effet délétère de la congélation sur les semences et incite à l'amélioration des techniques de cryoconservation adoptées.

II. Etude de l'effet du pollen de palmier dattier sur les paramètres spermatiques :

- l'étude menée par **Jharomi et al** et paru dans le Pakistan Journal of Biological Sciences en **2015** a porté sur l'effet du pollen de palmier dattier sur les paramètres des spermatozoïdes suite à une prise journalière (**Jharomi et al., 2015**).

L'étude a porté sur 40 patient âgés de 22 à 43 ans et consultant pour cause d'infertilité. Les participants atteints de cryptorchidie ou ayant une prise médicamenteuses ont été écarté de l'étude. L'âge moyen des participants était de 31.20 ± 5.15 ans.

Le traitement consiste à une prise quotidienne de 120 mg/kg de poudre de pollen de palmier dattier présent dans des capsules pendant une durée 60 jours.

La semence a été collectée manuellement après 48 h à 72 h d'abstinence. Deux collectes ont eu lieu, une première avant le début du traitement et la seconde après la fin des 60 jours de traitement.

L'analyse de la semence a été faite par spermogramme et par système CASA.

Les résultats de l'étude ont montré qu'il n'y avait pas eu de changement dans le volume de sperme obtenu. Par contre, ils ont démontré une augmentation significative dans le nombre de spermatozoïdes obtenu (augmentation de 6.5×10^6 mL), le nombre de spermatozoïdes à motilité et à motilité progressive normale et le nombre de spermatozoïdes à morphologie normale.

Tableau 12 : comparaison des paramètres de la semence chez les hommes infertiles avant et après le traitement au pollen de palmier dattier

Paramètre	Palmier dattier		Valeur de P
	Avant traitement	Après traitement	
Volume de sperme (mL)	3.54 ± 1.54	3.72 ± 1.790	0.418
Nombre de SPZ ($\times 10^4$ mL ⁻¹)	12.54 ± 5.39	19.07 ± 10.34	0.001
Mobilité des SPZ (%)	2.72 ± 1.75	5.22 ± 4.970	0.003
SPZ à morphologie normale (%)	16.45 ± 1.35	18.32 ± 2.880	<0.001
SPZ à motilité progressive (%)	16.80 ± 5.51	21.40 ± 8.610	0.001

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence le rôle que peut jouer le pollen de palmier dattier dans l'amélioration des différents paramètres des spermatozoïdes même si le pollen n'a pas influencé sur le volume de la semence.

- Une autre étude menée par **Sadeghi et al** et paru en 2014 dans le Iranian Journal of Reproductive Médecine s’est intéressé elle aussi à l’effet potentiel que pourrait avoir le pollen de palmier dattier sur les paramètre spermatique mais cette fois ci chez le rat male adulte (**Sadeghi et al., 2014**).

Pour réaliser leur étude, ils ont sélectionné 36 rats mâles adultes Sprague-Dawley pesant entre 200 et 250 grammes, puis ils les ont divisés en 6 groupes de 6 : un groupe contrôle, trois groupes ayant reçu quotidiennement 120 mg/kg, 240 mg/kg, et 360 mg/kg de pollen de palmier dattier par voie orale, les 2 derniers groupes ont reçu de l’*Astragalus ovinus* auquel ne nous intéresserons pas dans cette critique. La durée de l’expérimentation a été de 35 jours.

A la fin de cette période, les rats furent sacrifiés, les testicules retirés et l’épididyme séparé afin d’analyser son contenu. Le pourcentage de spermatozoïdes mobile a été trouvé en calculant le nombre de spermatozoïdes vivant sur le nombre de spermatozoïdes total à partir de deux échantillons d’épididyme de chaque rat. Le nombre de spermatozoïdes a été défini grâce à la chambre de comptage de Neubauer. La morphologie des spermatozoïdes anormaux a été trouvée par coloration à l’éosine-nigrosine et examiner sous microscope à grossissement 400.

Tableau 13 : effet du pollen de palmier dattier sur les caractéristiques des spermatozoïdes chez le rat

paramètres	Motilité des spermatozoides				
	mobile	Sluggish	immobile	Ratio SPZ anormaux(%)	Nombre SPZ (million/mL)
Controle	23.7±1.34	33.6±0.89	42.3±2.28	4.02±0.02	193.4±14.42
160 mg DPP	43.2±2.14	33.5±0	23.2±1.57	3.3±0.2	376.4±9.23
240 mg DPP	38.7±1.2	33.2±1.85	28.1±1.56	4.02±0.02	287.9±16.29
360 mg DPP	25.6±0.88	37.2±2.41	36.4±2.34	3.6±0.06	198.84±11.85

Les résultats du sperme épiddidyme ont montré une augmentation importante de la motilité et du nombre de spermatozoïdes lors des administrations de 120 et 240 mg/kg de pollen de palmier dattier ainsi qu’une diminution des spermatozoïdes immobiles et du nombres de spermatozoïdes anormaux à la dose de 120 mg/kg en comparaison au groupe contrôle.

En contrepartie, il n'y a pas eu de changement significatif dans ces paramètres entre la prise de 360 mg/kg de pollen de palmier dattier et le groupe contrôle.

Cette étude nous permet de mettre en évidence une fois de plus le rôle que peut jouer le pollen de palmier dattier lorsqu'il s'agit d'améliorer la qualité de la semence quel que soit l'espèce de mammifère.

III. Evaluation de l'activité antioxydante du pollen de *Phoenix Dactylifera* :

- L'étude faite par **Benzahia et Taibi** a eu pour but d'évaluer l'activité antioxydante du pollen de phoenix dactylifera en utilisant 2 extraits de pollen de palmier dattier, l'extrait méthanolique et chloroformique.

Pour réaliser leur étude, elles ont mesuré l'absorbance (ou la densité optique DO) effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. À partir des valeurs obtenues, elles ont calculé les pourcentages d'inhibition du DPPH.

Le DPPH est un composé chimique permettant de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux.

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique du DPPH, les résultats ont été comparés avec le standard qui est le BHT en calculant l'IC50

L'IC 50 est une concentration inhibitrice médiane est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique.

Tableau 14 : Pourcentages d'inhibition de l'extrait méthanolique de pollen

Concentration µg/ml	Pourcentage d'inhibition %
10	1.73
25	3.26
50	8.15
100	12.1

Tableau 15 : Pourcentages d'inhibition de l'extrait chloroformique de pollen

Concentration $\mu\text{g/ml}$	Pourcentage d'inhibition %
10	16.16
50	18.04
100	30.67

Tableau 16 : Pourcentages d'inhibition de BHT

Concentration $\mu\text{g/ml}$	Pourcentage d'inhibition %
10	5.55
25	11.11
50	39.33
100	52.27

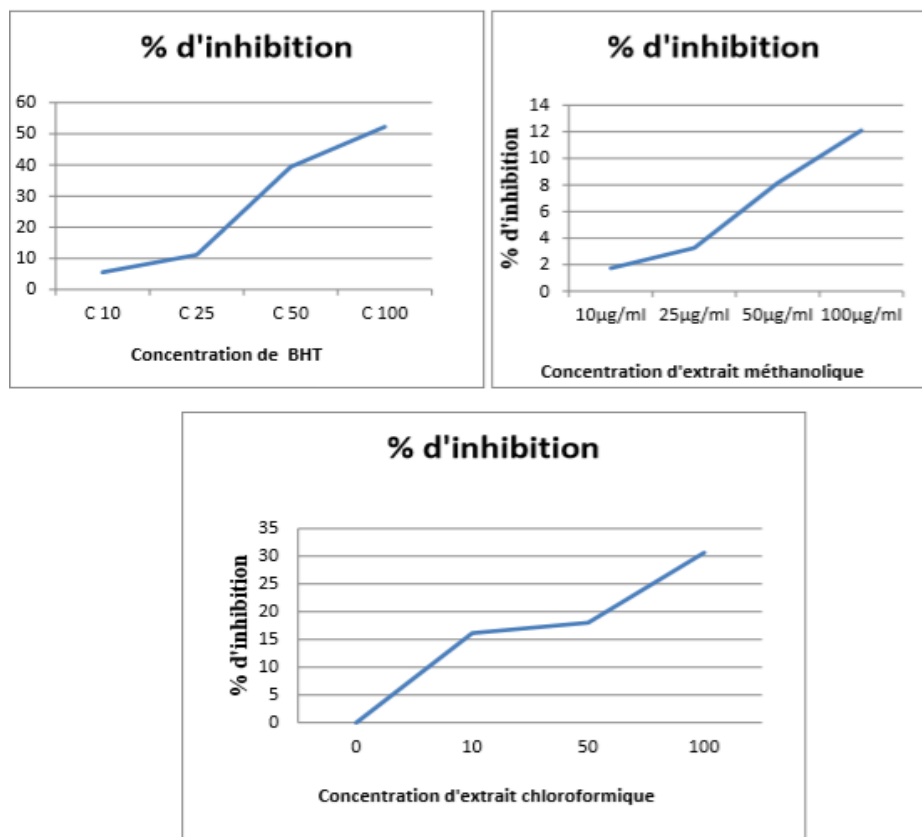
Selon les résultats obtenus :

L'extrait méthanolique est doté d'une activité antioxydante importante, leur IC50 est 14.63 $\mu\text{g/ml}$, elle est élevée que la valeur de BHT, qui est de l'ordre de 88.72 $\mu\text{l/ml}$.

L'extrait chloroformique est doté d'une activité inhibitrice importante, leur IC50 est 277.97 $\mu\text{l/ml}$, mais elle est faible lorsque la valeur de BHT est de l'ordre de 88.72 $\mu\text{l/ml}$.

Finalement, il a été conclu à partir ces résultats que l'extrait du pollen de palmier dattier a une activité antioxydante importante.

Figure 14 : Courbes des variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extraits et BHT



- Une seconde étude menée par **AFOUN et AMMOUR** s'est focalisée sur l'étude de l'activité antioxydante des alcaloïdes de phoenix dactylifera en utilisant différentes méthodes à savoir :

- **Activité scavenger du radical DPPH :**

L'activité scavenger du radical DPPH[•] est une méthode largement utilisée pour évaluer la capacité anti-radicalaire de divers échantillons (**Ebrahimzadeh et al., 2009**).

Le test d'activité scavenger du radical DPPH[•] est utilisé comme outil significatif pour identifier les antioxydants primaires qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres par un don d'hydrogène (**Ajilaetal., 2007**).

L'activité scavenger du radical DPPH[·] de *Phoenix dactylifera* a été étudiée en testant différentes concentrations : 50, 100, 200 et 300 µg/ml.

L'étude statistique des résultats a montré une différence significative entre les pourcentages d'inhibition du DPPH[·] selon l'échantillon testés ($p < 0,05$).

A la dose 300 µg/ml, l'extrait alcaloïdique de *Phoenix dactylifera* qui exerce la plus forte activité anti-radicalaire avec un pourcentage de 30.21%.

L'analyse globale des résultats a montré que les extraits dosés à 300 µg/ml ont exercés la plus forte activité d'une façon significative ($P < 0,05$). Cependant l'étude statistique n'a montré aucune différence significative entre les activités antiradicalaires vis-à-vis du DPPH[·] des extraits dosés à 50, 100 et 200 µg/ml.

IV. Effet antioxydant du selenium et de la vitamine E :

- L'étude menée par **Domosławska et al et paru en 2015** s'est intéressée à l'effet de la supplémentation en sélénium et en vitamine E sur la semence de chien ayant une fertilité diminuée.

Pour cette étude, 30 chiens mâles de race différentes et ayant un âge allant de 3 à 8 ans ont été pris en compte, tous les chiens avaient une bonne condition générale et une libido normale avec aucune changement de l'alimentation et aucune maladie pouvant entrainer une augmentation de la température.

Les chiens ont été divisés en un groupe « contrôle » et un groupe « expérimental » (n=15 pour chacun)

leur alimentation a été supplémente par une prise quotidienne de 6 µg/kg de sélénium et 5 mg/kg de vitamine E (Semevet, VetExpert[®], Poland).

La semence a été collectée par voie manuelle comme décrite par la méthode Linde-Forsberg en présence d'une femelle en chaleur à j0, 30, 60 et 90.

L'éjaculat a été collecté dans un tube préchauffé (36-38°).

Les paramètres de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes a été déterminé par le Hamilton Thorne sperm analyser.

Chaque éjaculat a été dilué à 50×10^6 spermatozoïdes/ml avec un dilueurs tris directement avant l'analyse.

Les paramètres mesuré furent la velocity average pathway (VAP), the velocity straight line (VSL), the velocity curvilinear (VCL), the amplitude lateral head (ALH), the linearity (LIN)

Le pourcentage de spermatozoïdes morts et vivants a été estimé par coloration à l'éosine – negrosine. La coloration *Diff-Quik*TM a été utilisée afin de déterminer la morphologie des spermatozoides,

Les résultats de l'étude ont montré qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans le volume de sperme collecté entre les 2 groupes et pendant toute la durée de l'étude.

Cette étude a surtout permis de mettre en évidence une augmentation significative dans le nombre de spermatozoïdes et leur concentration après 60 jours de supplémentation et au contraire une diminution dans le groupe contrôle.

Les paramètres de la mobilité (PMOT, VCL, VSL, BCF, ALH, RAPID, MEDIM, SLW, STATIC) ont eu aussi augmenté après 1 mois de supplémentation alors qu'ils n'ont pas changé dans le groupe contrôle. De même, il n'y a pas eu de différence pour MOT, STR, LIN pendant l'étude que cela soit dans le groupe supplémenté ou le groupe contrôle même si il faut noté une différence pour le paramètre MOT après 90 jours de l'étude.

Tableau 17 : paramètre de la semence des groupes "contrôle" et "expérimentale" avant et après traitement

Parameter	Unit	Day 0		Day 30		Day 60		Day 90	
		experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group	control group
Volume of the ejaculate (sperm-rich fraction)	mL	2.90 ± 1.29	2.26 ± 1.23	2.72 ± 0.98	2.08 ± 0.95	2.89 ± 1.12	2.31 ± 1.19	2.94 ± 1.05	2.36 ± 1.01
		80.56 ± 47.98 ^a	114.76 ± 81.47 ^a	100.54 ± 44.42 ^a	101.11 ± 55.44	170.78 ± 76.65 ^{ba}	76.42 ± 32.80 ^{bf}	186.82 ± 62.25 ^{ba}	77.66 ± 45.76 ^{bf}
Total sperm count	× 10 ⁶	253.24 ± 217.3 ^a	278.15 ± 233.08 ^a	283.99 ± 180.38 ^a	211.61 ± 137.34	502.51 ± 329.61 ^{ba}	183.09 ± 125.25 ^{bf}	560.05 ± 305.25 ^{ba}	192.97 ± 130.66 ^{bf}
VAP	µm/s	129.74 ± 31.76	125.81 ± 25.11	137.80 ± 21.67	132.03 ± 21.98	144.45 ± 14.35	124.81 ± 14.81	144.68 ± 13.81	129.45 ± 26.49
VSL	µm/s	112.53 ± 28.71 ^a	106.72 ± 41.96	127.14 ± 16.85	108.46 ± 48.43	136.54 ± 13.33 ^b	108.74 ± 40.46 ^f	128.14 ± 17.64	115.52 ± 36.01
VCL	µm/s	175.45 ± 45.78 ^a	167.76 ± 18.59	192.28 ± 32.40	178.37 ± 19.62	198.63 ± 28.30	173.54 ± 22.52	205.16 ± 24.85 ^b	176.91 ± 18.30 ^f
ALH	µm	4.39 ± 1.16 ^a	4.88 ± 2.17	4.70 ± 0.91	5.33 ± 1.63	4.81 ± 0.81	4.91 ± 1.79	5.04 ± 0.74 ^b	5.02 ± 1.35
LIN	%	65.73 ± 8.12	65.77 ± 19.99	65.66 ± 6.27	64.98 ± 18.18	67.26 ± 6.11	62.48 ± 21.46	66.00 ± 6.18	65.31 ± 18.19
RAPID	%	47.00 ± 24.00 ± 6.02 ^a	43.38 ± 21.00 ± 12.88	54.53 ± 25.73 ± 6.85 ^a	48.23 ± 21.84 ± 14.34	62.80 ± 19.06 ± 6.28 ^{ab}	43.00 ± 25.53 ± 16.45 ^f	65.93 ± 17.26 ± 5.88 ^{ba}	44.07 ± 25.84 ± 16.32 ^f
MEDIUM	%	15.66 ± 8.44 ^{ab}	21.30 ± 16.06 ^f	12.33 ± 6.84	16.53 ± 13.61	10.86 ± 4.40 ^a	17.38 ± 16.84	9.66 ± 3.49 ^b	17.76 ± 12.08
SLOW	%	12.66 ± 10.95 ^a	14.23 ± 9.83	8.00 ± 6.94 ^a	13.30 ± 8.44 ^f	7.26 ± 3.05 ^b	14.46 ± 12.75 ^f	7.13 ± 2.78 ^b	12.46 ± 8.96 ^f
STATIC	%								

Tableau 18 : paramètre des spermatozoïdes des groupes "control" et "expérimental" avant et après traitement

Parameter	Day 0		Day 30		Day 60		Day 90	
	experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group	control group	experimental group	control group
Live spermatozoa (%) (eosin-nigrosin)	80.26 ± 11.65 ^a	71.00 ± 13.72 ^a	85.20 ± 8.05 ^a	61.69 ± 27.67 ^f	91.93 ± 4.07 ^{ba}	61.57 ± 30.71 ^{bf}	93.06 ± 3.08 ^{ba}	59.08 ± 29.42 ^{bf}
Normal spermatozoa (%)	70.13 ± 21.72 ^a	73.62 ± 13.64 ^a	74.13 ± 12.84	66.29 ± 11.24	80.86 ± 7.35 ^a	67.00 ± 12.17 ^f	83.93 ± 6.14 ^{ab}	65.05 ± 12.68 ^{bf}
Total abnormal spermatozoa (%)	29.87 ± 21.72 ^a	26.37 ± 13.64 ^a	25.87 ± 12.84	33.70 ± 11.24	19.14 ± 7.35 ^a	33.00 ± 12.17 ^f	16.07 ± 6.14 ^{ab}	34.95 ± 12.68 ^{bf}
Major defects (%)	8.5 ± 6.46	12.00 ± 4.22 ^a	10.83 ± 6.19 ^a	20.37 ± 9.29 ^{bf}	8.20 ± 3.83 ^a	17.66 ± 7.33 ^{bf}	7.26 ± 2.78 ^a	19.70 ± 8.72 ^{bf}
Minor defects (%)	21.37 ± 17.05 ^{ab}	14.37 ± 10.52 ^f	15.04 ± 10.69 ^a	13.33 ± 5.57	10.94 ± 4.68 ^b	15.33 ± 8.03	8.81 ± 4.55 ^{ba}	15.25 ± 6.91 ^f

Les résultats du test par éosine-négresine ont démontré que le pourcentage de spermatozoïdes vivant dans le groupe expérimentale augmente alors que le pourcentage de spermatozoïde anormaux et avec des changements morphologiques mineurs a augmenté.

D'autres par, dans le groupe contrôle le pourcentage de spermatozoïdes vivants et normaux a diminué alors que dans le même temps les pourcentages des changements morphologiques des spermatozoïdes a augmenté.

Cette études nous a permis de mettre en évidence le rôle que peut jouer la vitamine E et le sélénium suite à une prise quotidienne pendant 60 jours dans l'amélioration de la concentration, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes chez des chiens en bonne santé et ayant une fertilité faible.

V. Intérêt de la vitamine E pour une conservation optimale de la semence :

- Une étude menée par **Belkacem et Mennas** a eu pour but d'étudier l'effet de la vitamine E sur les spermatozoïdes durant leur conservation.

Leur expérimentation a porté sur le sperme épидидymaire de trois testicules de bovins différents, dont les conditions d'élevage, l'âge et l'état corporelle sont inconnus.

Ils ont, afin de réaliser leur études, préparé 6 milieux de dilutions différents en plus du milieu de dilution TRIS témoins, parmi tous les dilueurs préparé nous nous sommes intéressé aux résultats de celui à base de TRIS+VITAMINE E.

La concentration finale de vitamine E après dilution du sperme a été de 2 mg/ml.

Le paramètre utilisé afin de déterminer la meilleure solution de dilution fut le pourcentage de spermatozoïde mobile.

D'une manière générale on constate que le milieu Tris (control) représente le pourcentage le plus faible en termes de mobilité (Figure 1) parmi les milieux utilisés et ce de T1→T3 avec un pourcentage qui ne dépasse pas les 20 %.

Cela s'explique probablement par le fait que les spermatozoïdes non supplémentés ont subis un stress oxydatif et que leur ressources d'antioxydants sont épuisées.

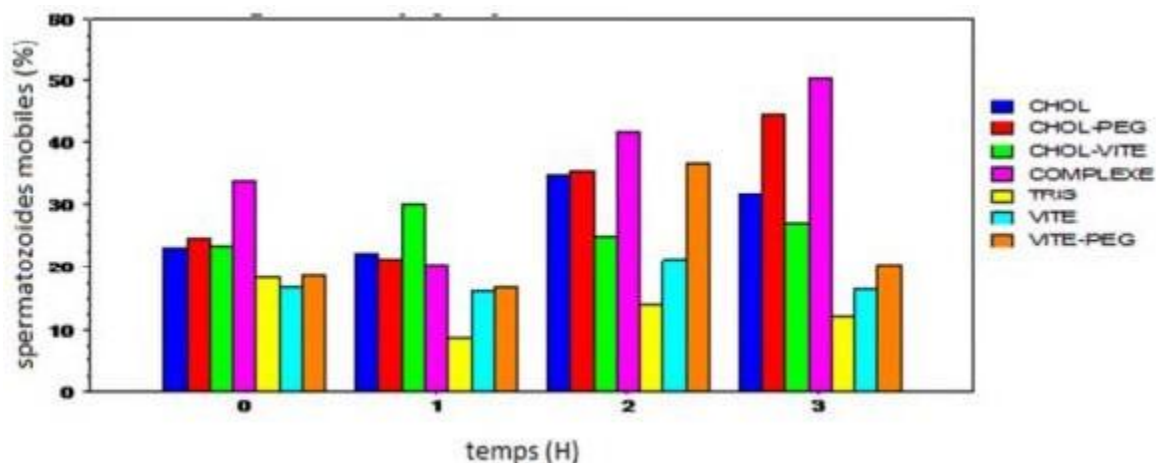


Figure 15 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à $T^{\circ}= 4^{\circ}\text{C}$ dans les 07 milieux utilisés, analysés à différents temps T0, T1, T2, T3.

Pour le milieu VIT E, la figure 1 montre qu'à T0 et T1 les valeurs des pourcentages de la mobilité comme suit : VIT E = 16,82 et 16,08% respectivement. A T2 le pourcentage de mobilité atteint son plus haut niveau à 21,2, pour ensuite chuter à T3 et retrouver les valeurs enregistrées à T0 et T1.

Le pourcentage de mobilité du milieu VIT E étant supérieur au milieu Tris (CONTROL), il montre que la vitamine E a permis de piéger les radicaux libres et de rééquilibrer la balance antioxydants/prooxydants.

La baisse du pourcentage de mobilité enregistrée à T 3 comparativement à T2 peut être expliquée par le fait que la vitamine E ne soit pas régénérée après avoir été oxydée, cela revient au fait que la régénération de la vitamine ne peut se faire que grâce à la présence de la vitamine C qui est absente dans ce milieu.

Les résultats présentés dans ce travail révèlent l'importance de la vitamine E et le rôle qu'elle joue dans la lutte contre le stress oxydatif, cependant les activités de recherche à envisager dans le futur seraient d'explorer l'intérêt d'associer la vitamine E à d'autres molécules connues pour leur action antioxydante.

VI. Effet de la vitamine C sur la conservation de la semence canine :

- L'objectif de l'étude menée par **Ceylan et Serin** en **2007** a été d'évaluer l'effet de l'addition d'acide ascorbique à différentes concentrations dans le milieu de dilution du sperme de chien au cours du stockage à 5°C pendant 72 h. Les échantillons de sperme ont été obtenus à partir de 6 chiens collectés 2 fois par semaine. L'acide ascorbique a été ajouté au milieu de dilution aux concentrations de 0.22, 0.45 et 0.90 mg/ml. Aucun antioxydant n'a été ajouté au milieu de dilution des échantillons contrôle. La motilité des spermatozoïdes, la viabilité et l'intégrité de l'acrosome des échantillons de sperme ont été évalués immédiatement après la dilution et 24, 48, et 72 h après dilution et conservation à 5°C. La motilité a été évaluée sous microscope à grossissement 200 avec maintien de la température à 37 °c. La viabilité et l'intégrité acrosomal ont été évaluées par coloration à l'éosine-nigrosine sous microscope à contraste à grossissement 1250.

L'acide ascorbique aux concentrations de 0.22, 0.45 et 0.90 mg/ml a augmenté significativement le pourcentage de spermatozoïdes viables et celui des spermatozoïdes à acrosome intact. En effet, les résultats ont montré que la perte du nombre d'acrosome intact durant la conservation ne diffère pas significativement entre les trois concentrations d'acide ascorbique et continuer d'augmenter au fil du temps. Cependant, le pourcentage d'acrosome endommagé dans les échantillons contenant 0.22, 0.45 et 0.90 mg/ml d'acide ascorbique était plus bas après 48 heures ($13.4 \pm 1.8\%$, $12.2 \pm 1.8\%$ and $12.4 \pm 1.7\%$) et 72 heures ($16.3 \pm 1.7\%$, $15.2 \pm 1.8\%$ and $15.7 \pm 1.9\%$) que les échantillons « control » ($15.5 \pm 1.7\%$ and $18.0 \pm 1.6\%$) sans acide ascorbique.

Pour ce qui est de la viabilité, les résultats de l'étude ont montré que le pourcentage de spermatozoïdes viables dilué dans les 0.22, 0.45, 0.90 mg/ml d'acide ascorbique ou dans les échantillons « contrôle) ne diffèrent pas significativement au moment de la dilution et après 24h de conservation à 5 °c. Cependant le pourcentage de spermatozoïde viable dans les échantillons contenant 0.45 mg/ml ($78 \pm 3.1\%$ et $73.9 \pm 3.5\%$ à 48 a72h) et 0.90 mg/ml ($78.9 \pm 3.5\%$ et $75.3 \pm 3.5\%$ à 48 h et 72h) étaient significativement plus élevé que le groupe « control » ($74.5 \pm 3.2\%$ and $67.8 \pm 2.9\%$).

Cependant, l'addition d'acide ascorbique au milieu de dilution n'a pas augmenté le pourcentage de spermatozoïdes motiles au cours de la période de l'étude.

En conclusion, l'addition d'acide ascorbique au milieu de dilution du sperme de chien améliore la survie et l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes mais pas le pourcentage de spermatozoïdes motiles au cours de la conservation du sperme pendant 72 h à 5°C.

- Une seconde étude, faites cette fois ci par **Mohammed et al** en 2006 a portée sur l'effet de la supplémentation en vitamine C sur un groupe d'individu infertile. Les paramètres étudiés ont été la motilité, le nombre des spermatozoïdes et la morphologie avant et après le traitement à la vitamine C.

Le groupe d'individu a inclus 13 personnes infertiles, leurs âges allaient de 25 à 35 ans et n'avaient aucune infection génitale ou varicocèle. L'analyse générale de la semence a révélé une oligospermie chez ces individus (nombre de spermatozoïdes $14.3 \pm 7.38 \times 10^6$ spz/ml, spermatozoïdes à morphologie normale $43 \pm 7.87\%$, mobilité des spermatozoïdes $31.2 \pm 9.61\%$).

Les patients ont reçu une dose de 1000 mg de vitamine c par voie orale pendant une durée de 2 mois. Les résultats ont montré une augmentation du nombre de spermatozoïdes à $32.8 \pm 10.3 \times 10^6$ spz/ml ($P < .001$). La mobilité des spermatozoïdes a quant à elle augmenté significativement à $60.1 \pm 8.47\%$ ($P < .001$). De même, le nombre de spermatozoïdes à morphologie normal a aussi augmenté à $66.7 \pm 4.77\%$ ($P < .001$).

Cette étude a permis de démontrer qu'une supplémentation en vitamine C chez les hommes infertiles peut conduire à une augmentation du nombre de spermatozoïde, de leur motilité ainsi que de leur morphologie et peut être utilisé en tant que complément permettant d'améliorer la qualité de la semence.

En conclusion, les études récentes ont prouvé que l'acide ascorbique était un important antioxydant qui pouvait jouer un rôle significatif dans l'amélioration de la qualité de la semence que cela soit par voie in vivo lors de la conception des spermatozoïdes ou lors de la cryoconservation de la semence.

VII. Etude de l'effet antioxydant de la vitamine A :

Peu de publications ont testé la supplémentation en vitamine A sur la qualité du sperme.

- L'étude menée par **Goodarzi et al en 2015** et paru dans le International Journal of Reproductive BioMedicine a permis de faire la corrélation entre les niveaux sériques et séminal de lycopène, beta carotène et le rétinol – tout trois précurseurs de la vitamine A- et les taux de dommages de l'ADN des spermatozoïdes chez les personnes normospermiques et infertiles (**Goodarzi et al., 2015**).

Pour cette étude, deux groupes d'hommes dont l'âge varié de 20 à 40 ans ont été pris en compte. Le premier contenant 71 personnes normospermiques et le second 61 personnes infertiles.

Les hommes infertiles ayant une varicocèle, cryptorchidie, infection urinaire ou rénal, chimiothérapie et les fumeurs ont été exclus de l'étude.

Le sang et la semence ont été collectés après 3 à 4 jours d'abstinence. Les leucocytes étant une source importante des ROS (**reactive oxygen species**), les échantillons contenant des leucocytes et des spermatozoïdes ont été écartés.

L'analyse de la semence a été faite par système CASA. Les échantillons de sérum et plasma séminal ont été maintenues à -70 °C jusqu'à l'analyse. La fragmentation de l'ADN a été déterminée par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) et par microscope à fluorescence à 488 nm.

Le Malondialdehyde (MDA) qui permet de mesurer la peroxydation des lipides, a été déterminé dans le sérum et le plasma séminal par TBARS (thiobarbitoric fluorimetric assay).

Le lycopène, la beta carotène et la vitamine A ont été extraits par HPLC.

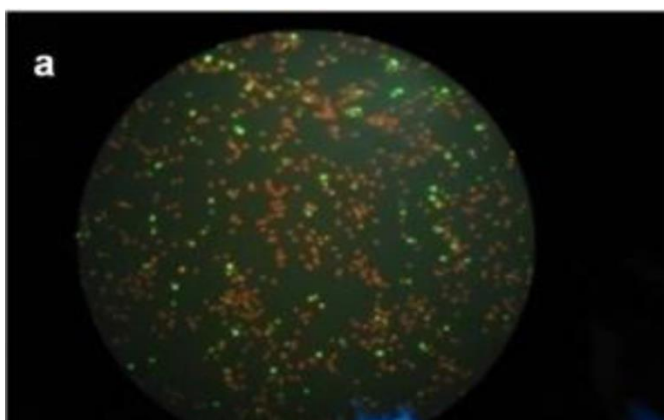
Tableau 19 : résultat de l'analyse de la semence, du taux sérique et séminal du MDA et du taux sériques de lycopène, bêta-carotène et vitamine A chez les hommes infertiles et normospermique.

Test parameter	Normospermic	Infertile	P-value
Volume (ml)	3.2±0.62	2.6±0.57	0.004
Count (10 ⁶ /ml)	75.6±12.94	53.7±28.96	<0.001
Morphology (%)	30.21±4.8	18.62±11.68	<0.001
Viability (%)	55.98±6.94	31.32±10.98	<0.001
Mobility (%)	37.86±7.35	17.69±8.96	<0.001
Serum MDA (nmol/ml)	3.49±2.71	3.8±1.60	0.426
Seminal plasme MDA (nmol/ml)	0.69±0.248	0.93±0.34	<0.001
Serum Lycopene (ppm)	0.29±0.15	0.20±0.12	<0.001
Serum beta carotene (ppm)	0.33±0.19	0.25±0.14	0.005
Serum vitamine A (ppm)	66.46±15.30	58.78±12.72	0.003

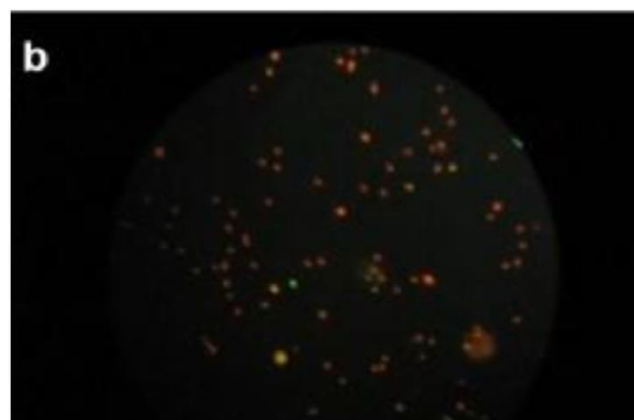
Les résultats ont permis de démontré que le taux de MDA dans le plasma séminal dans le groupe des hommes infertiles était plus élevé que chez les hommes normospermiques.

En contrepartie, les taux de lycopène, bêta-carotène et vitamine A chez les hommes infertiles étaient plus bas comparé au groupes control.

Les résultats du test TUNEL ont montré que létaux de fragmentation de l'ADN chez les hommes infertiles était plus haut que chez les hommes fertiles (18.94 ± 2.68 vs. 13.42 ± 2.14 %, $p < 0.001$).



a) Infertile



b) Normospermique

Figure 16 : Image des résultats de la technique TUNEL

Les spermatozoïdes endommagés sont colorés en vert tandis que les spermatozoïdes normaux sont colorés en rouge.

Cette étude nous a permis de démontrer la relation qui existe entre les taux sérique et séminaux du MDA, indicateurs d'un fort taux de ROS et les la vitamine A et ses précurseurs.

La vitamine A et ses précurseurs étant des antioxydants, ils peuvent être utilisés afin de diminuer le stress oxydatif et augmenter les chances de fertilité.

CONCLUSION :

La cryoconservation est une technique de conservation de la semence de plus en plus utilisée de nos jours chez l'espèce canine. Néanmoins, c'est aussi un processus entraînant de nombreux effets néfastes sur les spermatozoïdes notamment des dégâts au niveau de la membrane plasmique, des protéines et de l'ADN dû au stress oxydatif et qui peuvent nuire à la fertilité des spermatozoïdes. De nombreux protocoles de cryoconservation sont proposés dans la littérature afin de diminuer les effets négatifs. Notre travail a eu pour but d'étudier l'effet supposé du pollen de palmier dattier sur les caractéristiques des spermatozoïdes après avoir subi un stress oxydatif provoqué par la cryoconservation. D'autres parts, nous avons étudié l'impact que peut avoir les antioxydants composant le pollen de Phoenix dactylifera L sur les paramètres des spermatozoïdes. Les résultats auxquels nous sommes arrivés après revue des documentations scientifiques traitant de ce sujet ont été encourageants. En effet, nous avons pu constater que la cryoconservation a un effet délétère sur les spermatozoïdes comme l'ont démontré par le passé de nombreuses études. D'autres parts ces dégâts sont de types stress oxydatifs. Nous nous sommes alors intéressés à l'action antioxydante du pollen de palmier dattier qu'ont prouvé d'autres travaux. Nous avons enfin pu affirmer que les composants du pollen de Phoenix dactylifera L pris un à un était d'important antioxydant permettant d'expliquer l'action du pollen de palmier dattier.

Les résultats de ce travail nécessitent d'être confirmés par d'autres travaux portant à la mise en pratique du protocole envisagée dans notre étude. Si de telles études confirmaient que le pollen de palmier dattier avait un effet bénéfique sur les spermatozoïdes, il serait alors nécessaire, avant de mettre en application cette technique, de réaliser des inséminations artificielles pour déterminer si les taux de gestation et les tailles des portées obtenus seraient satisfaisants.

Il existe donc de nombreuses étapes nécessaires avant que le pollen de Phoenix dactylifera L ne soit utilisable en pratique. Mais, si tel était le cas, ce serait une grande avancée dans le monde de la reproduction canine assistée

Références bibliographiques

- **AFANASEV I.B., (2009).** Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals. CPC Press. pp: 1-71.
- **AIT BAZIZ, H. et CHEMALI , A., (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale locale. Université de Bejaïa, Bejaïa, p 18.
- **AITKEN R.J. et CLARKSON J.S. (1988)** Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 9: 367-376.
- **AITKEN R.J., CLARKSON J.S. et FISHEL S. (1989a)** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40: 183-197.
- **AITKEN, R. J., J. S. CLARKSON and S. FISHEL (1989).** "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biol Reprod* 41(1): 183-97.
- **AVERY S.V. (2011)** Les cibles moléculaires du stress oxydatif/*Biochemical Journal*; 434(2): 201- 210. Doi:10,1042 / BJ20101695.
- **BARONE R. (1978)** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951pp.
- **BARONE R. (2001)** Chapitre II : Appareil génital mâle In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Vigot. 896p.
- **BAROUKI, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement .*Médecine /science.* 22, 266-272.
- **BARRIER-BATTUT I. (2013)** Collecte et traitement de la semence d'étalon. *Equ'idée.* article 2-7
- **BARROW S; (1998)** A monograph of Phoenix L. (Palmae : Coryphoideae). *Kew bulletin* 53 : 513-575.
- **BEAUDEUX, J. L., PEYNET, J., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., THEROND, P., DELATTRE, J., LEGRAND, A. (2006).** Stress oxydant Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Annales Pharmaceutique Françaises.* 64, 373-381.

- **BOUGHEDIRI L.(1994)** Le pollen le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) approche multidisciplinaires et modélisation des différents paramètres en vue de créer une banque de pollens. *these de doctorat* ,U.P., Paris. Pp : 6 -158.
- **BOUGHEDIRI L., (1991)** Mineral composition of the exine of two male date palms (*Phoenix dactylifera L.*) Grana 30. Pp525-527.
- **BRIFFAUT Anne-Sophie (2007)** congélation de la semence canine. Détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents.
- **BRITO Leonardo F.C. (2007)** Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol. 6, n° 4, p 249- 264.
- **BURTON G.J., JAUNIAUX E. (2011)** Oxidative stress/Best Practice & Research *Clinical Obstetrics &Gynaecology*. 25(3): 287–299
- **BURTON, G. W. and K. U. INGOLD (1984)**. "beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." *Science* 224(4649): 569-73.
- **CABANNES CAROLE, ROSINE (2008)** comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. 44
- **CARINE MASSAUX (2012)**. Polyphénols : des alliés pour la santé; n°149. Pp:1
- **COLLIN B. (2003)** Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562pp.
- **COSTANTINI, F. CAPANI and C. PATRONO (1999)**. "In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation." *Circulation* 99(2): 224-9
- **DACHEUX J-L. et DACHEUX F. (2001)** L'épididyme et les glandes annexes. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Nouvelle Edition entièrement refondue. INRA Editions. Ellipses.
- **DADOUNE J-P. et DEMOULIN A. (2001)** Structure et fonction du testicule. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA Editions. Ellipses.
- **DAVI, G., G. CIABATTONI, A. CONSOLI, A. MEZZETTI, A. FALCO, S. SANTARONE, E. PENNESE, E. VITACOLONNA, T. BUCCIARELLI, F.**
- **DAY John G. et STACEY Glyn N. (2007)** *Methods in molecular biology*. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.
- **DEAVALL D.G., MARTIN E.A., HORNER J.M., ROBERTS R. (2012)** Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity/*journal of toxicology*.;13pages

- **DELOMPRE (2011)** Les chiens sentinelles du risque sanitaire d'origine environnementale : recherche de liens entre facteurs environnementaux et défauts de fertilité chez les animaux mâles 21-23
- **DONNELLY E.T., McClURE N. et LEWIS S.E. (1999b)** The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.*; 14: 505-512.
- **DULUCQ et TULON. (1998)** La palynologie et l'environnement du passé. Compte rendu de la conférence de Diot, M.F. UMR9933 du CNRS.
- **EILTS B.E. (2005b)** Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*. Vol. 64, n° 3, p 692- 697.
- **EILTS B.E. (2005)** Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691.
- **ENGLAND G. (1993)** Cryopreservation of dog semen : a review. *Journal of Reproduction and Fertility* , 47 (suppl), 243-255.
- **ENGLAND G. et PLUMMER J. (1993)** Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* , 47 (suppl), 261-270.
- **EVANS H.E.** Anatomy of the dog. 3rd Ed., Philadelphia : WB Saunders Company, 1993, 1113 pages.
- **FELDMAN E. et NELSON R. (2004a)** Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 930-952.
- **FONTBONNE A. (1992)** Physiologie sexuelle du chien mâle. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Edition, Paris, 19-26.
- **FONTBONNE A. (1995)** Infécondité du chien mâle. In : **Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elviesier, Paris, Volume 5, 1-13.**
- **FONTBONNE A., DUMONT C. (1992)** Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- **FRESHMAN J. (2002)** Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17, 104-107.
- **FUERTES Paméla, Virginie, (2008)** congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale

- **GARDES-ALBERT, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., ABEDINZADEH, Z., JORE, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'Actualité chimique. pp, 91-96
- **GÉRARD O., PONSART C., PETIT M. et HUMBLLOT P. (2008)** Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. Rencontres autour des recherches sur les ruminants. p 351–354.
- **GOMEZ, E., D. S. IRVINE and R. J. AITKEN (1998).** "Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function." Int J Androl 21(2): 81-94.
- **GOUDABLE, J ., FAVIER, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants Nutrition clinique et métabolisme, 11, 115-120.
- **GUIGARDET V. (1997)** Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome : le SPERMAC ®. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°101, 96 p.
- **HALLIWELL, B. (1994).** "Free radicals and antioxidants: a personal view." Nutr Rev 52(8 Pt 1): 253-65.
- **Hazem M.M. Hassan. (2011)** Chemical composition and nutritional value of palm pollen. Pp : 3-4
- **JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELDL.J.D.(1984)** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation ship to other semen characteristics. J.ReproFert.,70,219-225.
- **JOHNSTON S. (1991)** Performing a complete canine semen evaluation in a smallanimal hospital. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 21, 545-551.
- **JOHNSTONS.D., ROOTKUSTRITZM.V., OLSONP.N.S. (2001)** Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 287-306.
- **JOHNSTONS.D., ROOTKUSTRITZM.V., OLSONP.N.S. (2001)** Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 275-286.

- **JONES, R., T. MANN and R. SHERINS (1979).** "Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma." *Fertil Steril* 31(5): 531-7.
- **KESPOPOULOU E., POWERS H.J., SHARMA K.K. et COLL. (1995)** A double-blind randomised placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *fertil. Steril.* 64: 825-831.
- **KUTZLER M. (2005)** Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64, 747-754.
- **LEBLANC B. (2004)** Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse Méd. Vét., Alfort, n°102, 55 p.
- **LINDE-FORSBERG C. (1995)** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* , 10, 4858.
- **LUTSENKO, E. A., J. M. CARCAMO and D. W. GOLDE (2002).** "Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress." *J Biol Chem* 277(19): 16895-9.
- **MARC STEPHANIE (2015)** Actualité en cryoconservation des semences des principales espèces d'intérêt vétérinaire. 78
- **MOHAMMEDI, Z., (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Tlemcen Algérie, p 59.
- **MOUKETTE B., PIEME C.A., NYA BIAPA P.C., NGOGANG J.Y. (2015)** In vitro antioxidant and anti- lipoperoxidative activities of bark extracts of *Xylopia aethiopica* against ion-mediated toxicity on liver homogenates/*J Complement Integr Med.* 12(3):195-204. Doi: 10.1515/jcim-2015- 0002.
- **MUNIER P; (1973)** Le palmier-dattier. Paris, Maisonneuve et Larose, 221 p.
- **MURIEL GROS-BALTHAZARD, CLAIRE NEWTON, SARAH IVORRA, MARGARETA TENGBERG, JEAN-CHRISTOPHE PINTAUD et JEAN-FREDERIC TERRAL. (2013)** Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)
- **NETO, C.R., MONTEIRO G.A., SOARES R.F., PEDRAZZI C., DELL'AQUA .A., PAPA F.O., CASTRO-CHAVES M.M. et ALVARENGA M.A. (2013)** New seminal

plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. Vol. 79, n° 7, pp. 1120-1123.

- **OKANO T., MURASE T., ASANO M. et TSUBOTA T. (2004)** Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 66, n° 11, p. 1359-1364.
- **ORTIZ G.G., PACHECO-MOISES F.P., BITZER-QUINTERO O.K., RAMIREZ-ANGUIANO A.C., FLORES-AVARADO L.J., RAMIREZ-RAMIREZ V., MACIAS-ISLAS M.A. et TORRES-SANCHEZ E.D., (2013).** Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013; 1-14.
- **OTTR.S.,GOFFAUXM.,THIBIERM. (1987)** Examen morphologique des spermatozoïdes .*El.etIns.*,221,15-20.
- **PENA A. et LINDE-FORSBERG C. (2000b)** Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*,54, 703-718.
- **PEÑA A. et LINDE-FORSEBERG C. (2000a)** Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 54, n° 5, p. 703-718.
- **PENA A., JOHANNISSON A. et LINDE-FORSBERG C. (2001)** Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57(suppl), 371-376.
- **PENAMARTINEZA.I. (2004)** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim.Reprod.Sci.*, 82-83,209-224.
- **PERCIVAL, M. (1998).** Antioxidants. NUT031 1/96 Rev. 10/98.
- **PINCEMAIL J et DEFRAIGNE J O. (2004).** Les antioxydants : un vaste réseau de défense pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Institut Danone.
- **POLJSAK, B., Z. GAZDAG, S. JENKO-BRINOVEC, S. FUJS, M. PESTI, J. BELAGYI, S. PLESNICAR and P. RASPOR (2005).** "Pro-oxidative vs antioxidative properties of ascorbic acid in chromium (VI)-induced damage: an in vivo and in vitro approach." *J Appl Toxicol* 25(6): 535- 48.

- **PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. (2014)** Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.
- **PRINSG.S. (1998)** Semen. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academicpress,SanDiego,360-367.
- **PROCHAZKOVA D., BOUSOVA I., WILHELMOVA N. (2011)** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids/fitoterapia.82(4) :513-523
- **RIGAL F.B.G. (2008)** Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 99p.
- **RIGAU T., FARRE M., BALLESTER J., MOGAS T., PENA A. et RODRIGUEZ-GIL J. (2001)** Effects of glucose and fructose on mobility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology , 56, 801-815.
- **ROTA A., MILANI C., CABIANCA G. et MARTINI M. (2006)** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. Theriogenology. Vol. 65, n° 9, pp. 1848- 1858.
- **SALIDO M. et ROSADO J.A., (2009).** Apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular ca²⁺ homeostasis genes. Springer Science and Business Media, pp: 1-17.
- **SETCHELL B. (1991)** Male reproductive organs and semen. In : CUPPS P., editor. Reproduction in domestic animals. 4th ed. San Diego : Academic press, 221-245.
- **SHARMA P., JHA A.B., DUBEY R.S., PESSARAKLI M. (2012)** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions / Journal of Botany.
- **SILVA A.R., CARDOSO R.C.S. et SILVA L.D.M. (2006)** Influence of Temperature during Glycerol Addition and Post-thaw Dilution on the Quality of Canine Frozen Semen. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 41, n° 1, pp. 74–78.
- **TAPPEL, A. L. (1972).** "Vitamin E and free radical peroxidation of lipids." *Ann N Y Acad Sci* 203: 12-28.
- **TRABSA, H., (2015).** Activité et anti-inflammatoire des fraction des plantes médicinales : Sedum sediforme et Lycium arabicum.Thèse de doctorat, Universiter Ferhat Abbas Sétif 1, 115P.
- **VAISSAIRE JP. (1977)** Sexualité et Reproduction des Mammifères Domestiques et de Laboratoire. Paris : Maloine, 457 p.

- **ZEGARAC J.P., PhD. (2017)** Oxidative Stress: Effects on Lipids, Proteins, and DNA/BioAnalytical Testing and Research Laboratories. Brunswick Labs..
- **ZIECH D., FRANCO R., GEORGAKILAS A.G., GEORGAKILA S., MALAMOU-MITSI V., SCHONEVELD O., PAPP A. et PANAYIOTIDIS M.I., (2010).** The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental and carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*, 188; 334-339.
- **ZOHARY D., HOPF M; WEISS E. (2012)** Domestication of plants in the Old World. 3e édition. New York, Oxford University Press, 264 p.