République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences

En Sciences Vétérinaires

Thème :

Optimisation de la conservation du sperme aviaire dans les élevages de reproducteurs : Analyse, Conservation et Insémination

Présentée par : Leg-hel TOUAZI

Soutenue le : 30/09/2019

Les membres du jury :

Mme Hacina AIN BAAZIZ	Professeur	ENSV d'Alger	Présidente
Mr Mokrane IGUER-OUADA	Professeur	Université de Béjaia	Rapporteur
Mr Ali LAMARA	Professeur	ENSV d'Alger	Examinateur
Mr Hama BENBAREK	Professeur	Université de Mascara	Examinateur
Mr Faissal GHOZLANE	Professeur	ENSA d'Alger	Examinateur

Année universitaire : 2018/2019

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences

En Sciences Vétérinaires

Thème :

Optimisation de la conservation du sperme aviaire dans les élevages de reproducteurs : Analyse, Conservation et Insémination

Présentée par : Leg-hel TOUAZI

Soutenue le : 30 / 09 /2019

Les membres du jury :

Mme Hacina AIN BAAZIZ	Professeur	ENSV d'Alger	Présidente
Mr Mokrane IGUER-OUADA	Professeur	Université de Béjaia	Rapporteur
Mr Ali LAMARA	Professeur	ENSV d'Alger	Examinateur
Mr Hama BENBAREK	Professeur	Université de Mascara	Examinateur
Mr Faissal GHOZLANE	Professeur	ENSA d'Alger	Examinateur

Année universitaire : 2018/2019

Dédicace

Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux

« Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est Toi L'Omniscient, le Sage » : Sourate 2, Verset 32 (Saint Corant).

Une pensée pieuse a la mémoire de Mon père,
Votre absence restera parmi nos plus grandes peines. Ce travail vous est dédié en témoignage de mon profond respect pour votre âme et en reconnaissance à votre affection. Que Dieu vous accorde la paix éternelle et vous accueille dans paradis

A la mémoire de mes grands parents
Puisse Dieu le tout puissant vous accueille dans son vaste paradis

A ma mère pour son amour généreux,
Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fier de l'éducation que vous m'avez donnée. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie

A mon épouse :
J'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension, encouragement et soutien sans faille tout au long de cette aventure. Tu as toujours été là pour me soutenir, chose qui m'a tant apporté et aidé. Trouve à travers ce modeste travail, la récompense de tes sacrifices et de ta patience.

A mes enfants,
J'espère que ma thèse sera pour vous une source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre. Que Dieu vous protège et vous garde en bonne santé.

A mes frères et sœurs,
Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.
Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu 'il faut pour vous combler.

A mes chèrs petits neuveux et nièces,
Que Dieu vous garde en bonne santé, éclaire votre route et vous aide à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A ma belle famille,
Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand respect et mon estime envers vous.
J'implore DIEU le tout puissant qu'il vous apporte bonheur et santé

A monsieur, IGUER-OUADA Mokrane,
Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail. Veuillez trouver l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce modeste travail.

Mes sentiments de reconnaissance vont en premier lieu à l'endroit de mon Directeur de thèse le ***Professeur Mokrane Iguer-ouada***,
Qui m'a accompagné dans ce long parcours, de l'encadrement en PFE, en passant par le Magister et nous y voilà en thèse. Ces quelques mots ne seront pas suffisants pour exprimer toute ma gratitude pour votre soutien, votre investissement, vos conseils précieux, votre disponibilité tout au long de ce travail entamé il y a de cela plusieurs années. Je vous remercie également pour votre capacité à prendre du recul et à répondre de manière perspicace aux questions posées, qu'elles soient scientifiques, professionnelles ou personnelles. Au-delà d'un excellent directeur de thèse, je suis très heureux d'avoir rencontré une personne avec de grande qualité humaine qui a su être à l'écoute tout le temps. Un très grand Merci pour avoir contribué à ma formation en partageant toute ses connaissances et être supervisé pendant ses années passées au sein de votre équipe.

A Mesdames et Messieurs les membres du Jury
Pour avoir accepté de consacrer un peu de votre temps pour juger mon travail.

A Monsieur **Ali LAMARA**, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Nous lui adressons, ici, l'expression de notre profond remerciement.

A Mme **Hacina AIN BAAZIZ** professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Monsieur **Hama BENBAREK**, professeur à l'université de Mascara, Monsieur **Faissal GHOZLANE**, professeur à l'ENSA d'Alger
Qui ont accepté de faire partie de ce jury de thèse,
Sincères remerciements

Au Docteur **Fatmi Sofiane**, de l'université de Béjaïa,
Qui nous a tant aidé et supervisé avec une attention particulière la préparation des complexes cyclodextrines. Nos Sincères remerciements.

Au Docteur **Benhania karim**, du Centre Nationale de Recherche en Biotechnologie
Pour son aide et assistance dans la réalisation des tests du stress oxydatif. Nos Sincères remerciements.

Au Docteur **Moula nassim**, de l'université de Liège-Bélgique,
Tu m'as tant soutenu, conseillé et aidé à tout point de vue et à tout moment. Merci beaucoup pour tes conseils et analyses en statistique. Un grand merci pour ton assistance lors des préparations des posters et des publications. Nos Sincères remerciements pour tes contributions.

Au Docteur **Bellik yuva,** de l'université de Borj Bouarrerij
Pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils scientifiques, et ses relectures surtout pour la partie biochimie. Nos Sincères remerciements.

Au Docteur **Aberkane Boubakeur,** de l'université de Bouira
Pour sa disponibilité, ses conseils, son apport dans la rédaction de la thèse. Nos Sincères remerciements.

A l'ensemble de l'équipe du Laboratoire Associé en Ecosystèmes marins et aquacoles, je pense particulièrement au Dr **KHELLOUF Allaeddine** et à l'ingénieur du laboratoire. Merci pour votre participation à l'amélioration de la qualité de ce travail. Nos sincères remerciements

A mes **amis**
J'adresse, en signe de fraternité, mes remerciements les plus chaleureux à mes amis que je ne peux tous citer, pour leur aide si précieuse et leur encouragement au cours des moments les plus difficiles. Je pense particulièrement à **YAHI Krimou** et **SADOUDI Ahmed**. Merci pour votre soutien permanent, Voyez en cette thèse un signe de ma reconnaissance.

Mes derniers remerciements s'adresseront à toutes les personnes que j'ai oublier dans les lignes précédentes.

Résumé
Pendant la conservation du sperme à 4°C, la membrane plasmique du spermatozoïde du coq est susceptible au choc au froid et à la peroxydation des lipides (LPO). L'objectif de ce travail était de développer de nouvelles approches de conservation de la semence du coq, avec une protection simultanée contre le choc au froid et la peroxydation des lipides. L'approche consiste à supplémenter alternativement le milieu de conservation par des huiles essentielles (romarin et armoise) ou par les complexes cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL) et cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E). Les cyclodextrines vont permettre d'augmenter la solubilité du cholestérol et de la vitamine E, et augmenter ainsi leurs effets. L'objectif étant de protéger la mobilité des gamètes et lutter contre le stress oxydatif évalué par le statut antioxydant total et le dosage du malondialdéhyde (MDA), un marqueur de la peroxydation des lipides membranaires. L'analyse qualitative par CG/SM des deux huiles essentielles a montré chémotype camphre avec 31.9% de la composition totale pour l'armoise et 18,88% pour le romarin. Les résultats ont montré que la supplémentation avec les HE du romarin et de l'armoise améliore significativement les paramètres de mobilité (totale et progressive), et les différentes vitesses (VCL, VSL, VAP) ainsi que l'ALH et la BCF après 6, 24 et 48h de conservation à 4°C, avec une augmentation de la capacité antioxydante totale et une baisse du niveau de la peroxydation lipidique. Les doses de 8,7 et 87µg/ml semblent les plus appropriées, alors qu'un effet spermicide est observé à la dose de 870µg/ml. Le second objectif de notre travail, était de déterminer l'impact de la vitamine E incorporée dans la méthyl β-cyclodextrine seule, et l'association du cholestérol et de la vitamine E pré-chargés dans la méthyl β-cyclodextrine (CD-Vit E), sur le sperme conservé à 4°C pendant 48h. Les résultats ont montré une amélioration significative ($P < 0.05$) de la mobilité totale, mobilité progressive, la VCL, VSL, VAP, ALH et BCFpar rapport aux, contrôle (Tris) et le milieu commercial (IMV). Les résultats ont montré aussi, que l'association de la CD-Vit E et le cholestérol pré-chargé dans la méthyl β-cyclodextrine (CD-CHL) induit un effet hautement significatif ($P < 0.05$) dans la préservation de la mobilité totale, mobilité progressive, fonctionnalité de la membrane et les différentes vitesses (VCL, VSL, VAP) après 6, 24 et 48h de conservation du sperme à 4°C, comparativement à la CD-Vit E seule. Les résultats montrent ainsi l'impact positif de l'utilisation concomitante de la vitamine E et du cholestérol solubilisés dans la cyclodextrine pour lutter simultanément contre le choc thermique et le stress oxydatif.

Abstract
During sperm preservation at 4 ° C, the plasma membrane of the rooster spermatozoa is susceptible to cold shock and lipid peroxidation (LPO). The aim of this work was to develop new approaches to the conservation of rooster semen, with simultaneous protection against cold shock and lipid peroxidation. The approach consists of alternately supplementing the preservation medium with essential oils (rosemary and mugwort) or with the cyclodextrin-cholesterol (CD-CHL) and cyclodextrin-vitamin E (CD-Vit E) complexes. The objective is to protect gamete mobility and fight against oxidative stress assessed by the total antioxidant status and the malondialdehyde (MDA) assay, a marker of membrane lipid peroxidation. The qualitative analysis by GC / MS of the two essential oils showed camphor chemotype with 31.9% of the total composition for mugwort and 18.88% for rosemary. The results showed that supplementation with rosemary and sagebrush HE significantly improves mobility parameters (total and progressive), and different speeds (VCL, VSL, VAP) as well as ALH and BCF after 6 months. , 24 and 48h storage at 4 ° C, with an increase in total antioxidant capacity and a decrease in the level of lipid peroxidation. Doses of 8.7 and 87 µg / ml seem the most appropriate, whereas a spermicidal effect is observed at a dose of 870 µg / ml. The second objective of our work was to determine the impact of vitamin E incorporated in methyl β-cyclodextrin alone, and the combination of pre-loaded cholesterol and vitamin E in methyl β-cyclodextrin (CD-Vit E), on sperm preserved at 4 ° C for 48h. The results showed a significant improvement ($P < 0.05$) in total mobility, progressive mobility, VCL, VSL, VAP, ALH and BCF compared to, control (Tris) and commercial (IMV). The results also showed that the combination of CD-Vit E and pre-loaded cholesterol in methyl β-cyclodextrin (CD-CHL) induces a highly significant effect ($P < 0.05$) in the preservation of total mobility. , progressive mobility, membrane functionality and different speeds (VCL, VSL, VAP) after 6, 24 and 48h sperm preservation at 4 ° C, compared with CD-Vit E alone. The results thus show the positive impact of the concomitant use of solubilized vitamin E and cholesterol in cyclodextrin to simultaneously combat heat shock and oxidative stress.

ملخص

خلال الاحتفاظ بالخلايا المنوية في 4 درجات مئوية يتعرض الغشاء الخلوي لصدمات حرارية و لظواهر أكسدة الجزيئات الدسمة المكونة لها. الهدف من هدا البحث العلمي هو إيجاد طرق جديدة للحفاظ على الحيوانات المنوية للديك بالحماية الآنية ضد الصدمات التي تحدث في الدرجات الحرارية المنخفضة و ضد ظواهر الأكسدة. قررنا أن نضيف إلى محاليل الحفاظ على الخلايا المنوية زيوت أساسية لنبتتين هما إكليل الجبل والشيح. كما قررنا أن نضيف مركبات من سيكلودكسترين-كولستيرول و سيكلودكسترين فيتامين واو . السيكلودكسترين ستؤدي إلى الزيادة من ذوبان الكوليستيرول والفيتامين واوبالتالي الزيادة في مفعولها. و هكذا يتم الحفاظ على حركة الخلايا المنوية و محاربة الأكسدة التي قيست عبر حالة الأكسدة العامة و نتائج أكسدة دهون الغشاء الخلوي. أظهرت النتائج أن الزيوت مكونة أساسا من الكافور بنسبة 31.9 بالمائة عند الشيح 18.88 بالمائة عند إكليل الجبل. أظهرت النتائج أيضا أن الزيوت الأساسية حافظت على حركة الخلايا المنوية وسرعتها بعد 6 و 24 و 48 ساعة في 4 درجات حرارية مع زيادة المقاومة ضد الأكسدة و نقصان أكسدة الغشاء الخلوي. التركيزان 8.7 و 87 مكرو غرام\مل أظهرا النتائج الايجابية بينما ماتت كل الخلايا عند التركيز 870 مكرو غرام\مل. كما أن سيكلودكسترين-كولستيرول و سيكلودكسترين فيتامين واو أظهرت نتائج أكبر من المحاليل المسوقة و خاصة عندما يضاف الاثنين معا. بهده الطريقة أظهرت هده النتائج إمكانية المحاربة في آن واحد ضد صدمات الحرارة وظواهر الأكسدة المربوطة بنقصان الإخصاب عند الحيوانات.

Liste des abréviations et des sigles

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

ABTS : 2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline acide 6-sulfonique)

ADN : Acide nucléique désoxyribose

AGPI : Acides Gras Polyinsatures

ALH : Amplitude Lateral of the Head (movement latéral de la tête)

AQS : Analyseur de la qualité du sperme

ATP : Adénosine triphosphate

BCF : Beat Cross Frequency (fréquence de battement transversal)

CASA : Computer Aided Sperm Analysis

CA : Comet assay

CAT : Catalase

CD : Cyclodextrine

CD-CHL-Vit E : Cyclodextrine-Cholestérol-Vitamine E

CD-Vit E : Cyclodextrine-Vitamine E

CHL : Cholestérol

CPG : Chromatographie en phase Gazeuse

DNPH : dinitrophényl hydrazine

EROs : espèces Réactives de l'Oxygène

GPX : glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH : glutathion réduit

H : Heure

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

IA : Insémination artificielle

LIN : Linearity (linéarité)

LPO : Peroxydation des lipides

M : Mole

MDA : Malondialdéhyde

mg : Milligramme

ml : Mililitre

Mob T : mobilité totale

Mob P : mobilité progressive

MPVI : Membrane périvitelline interne

PBS : phosphate buffer saline

SCSA : Sperm chromatin structure assay (SCSA)

SOD : Superoxyde dismutase

Spz : Spermatozoïdes

TAC : Capacité antioxydante totale)

TBA : Acide thiobarbiturique

TRIS : Tris (hydroxymethylaminomethane)

VAP : Velocity Average Path (vitesse de trajectoire moyenne)

VCL : Velocity CurviLinear (vitesse curviligne)

Vit E : Vitamine E

VSL : Velocity Straight Linear (vitesse linéaire droite)

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'appareil génital du coq (d'après Hodges, 1974)

Figure 2 : Diagramme de la spermatogenèse. Le nombre et la durée des divisions spermatogoniales ne sont pas connues chez le coq. Les étapes ultérieures de la spermatogenèse se déroulent sur une durée totale de 13 à 14 jours (d'après de Reviers, 1988).

Figure 3 : Ultrastructure du spermatozoïde de coq (d'après De Reviers, 1988)

Figure 4 : Représentation d'une membrane cellulaire (Amann et Pickett, 1987)

Figure 5 : Représentation schématique des VAP, VCL et VSL (Source de Select Breeders services, cité par Nguyen, 2015).

Figure 6 : Produits intermédiaires réduits de l'oxygène : le radical superoxyde ($O_2^{-\cdot}$),, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),, le radical hydroxyl ($^{\cdot}OH$), respectivement, issus des quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène.

Figure 7 : le rôle physiologique et pathologique des ROS (Kothari et al., 2010).

Figure 8 : Cellule de mallassez avec les dimensions du quadrillage.

Figure 9 : *Artemisia herba-alba* dans son milieu naturel au début de la saison de fleuraison

Figure 10 : Feuilles et fleurs du Romarin

Figure 11 : Photo du système d'analyse CASA

Figure 12 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoise A (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 13 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoise R (870 µg /ml), R5 (87 µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 14 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité Totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le milieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E) et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 15 : Effets des différents traitements à 0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoise A (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 16 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle du romarin R (870 µg /ml), R5 (87 µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 17 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes du coq dans le milieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E) et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

Figure 18 : La moyenne (± S.E) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec de l'armoise A (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) à 0, 6 et 24h. Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation.

Figure 19 : La moyenne (± S.E) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec de l'armoise R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml) à 0, 6 et 24h. Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation.

Figure 20 : La moyenne (± ES) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dans milieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E) et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05).

Figure 21 : Moyenne (± ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après 6h de conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans les groupes supplémentés avec de l'armoise, A (870 µg /ml), A5 (87µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) et les groupes supplémentés avec le romarin, R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation.

Figure 22 : Moyenne (± ES) de la capacité antioxydante totale (CAT) après 6h de conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans les groupes supplémentés avec de l'armoise, A (870 µg /ml), A5 (87µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) et les groupes supplémentés avec le romarin, R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères d'analyse de mobilité massale chez les oiseaux domestiques (d'après Petitjean, 1965 cité par Nguyen, 2015).

Tableau 2 : Les principales espèces réactives (Halliwell, 1996).

Tableau 3 : Composition des huiles essentielles d*'Artémisia herba alba* identifiés par GC/MS

Tableau 4 : Composition des huiles essentielles de *R. officinalis* identifiés par GC/MS

Sommaire

Introduction générale....1

Chapitre 1 : La reproduction des oiseaux domestiques

1. Introduction....6
1.1 Anatomie de l'appareil génital male....6
1.1.1 Les testicules....6
1.1.2 Le tractus génital....7
1.1.3 La spermatogenèse....8
1.1.3.1 Le spermatozoïde....9
1.1.3.2 Plasma séminal....11
1.1.3.3 Membrane plasmique....11
1.1.3.4 Composition lipidique du spermatozoïde aviaire....13
1.2 Méthodes d'évaluation du spermatozoïde....14
1.2.1 La concentration....14
1.2.2 Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes aviaires....15
1.2.2.1 Méthode classique....15
1.2.2.2 Nouvelles méthodes....16
1.2.3 Autres méthodes d'évaluation du sperme aviaire....18
1.2.3.1 Evaluation de la morphologie....18
1.2.3.2 Evaluation de la viabilité....19
1.2.3.3 Membrane plasmique et intégrité structurale....19
1.2.3.4 La cytométrie en flux....20
1.2.3.5 Activité métabolique du sperme....20
1.2.3.6 Interaction sperme ovule....20
1.2.3.7 Intégrité génétique du sperme....21

Chapitre 2. Conservation du sperme aviaire

1. Introduction....23
1.1 Stockage su sperme à l'état liquide (4°C)....23
1.3 Les dilueurs de semences....25
1.3.1 Effets du cholestérol....25
1.3.2 Les cyclodextrines....26
1.3.2.1 Définition....26

1.3.2.2 Propriété de complexation des CDs 26
1.3.2.3 Les cyclodextrines modifiées 27
1.3.2.4 Traitement du sperme par les β-cyclodextrines méthylées 27

Chapitre 3 : Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles **29**
1.1 Caractères physico-chimiques des huiles essentielles 29
1.2 Les composants chimiques des huiles essentielles 29
1.3 Rôle des huiles essentielles dans la plante 30
1.4 Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles 30
1.5 Compositions chimiques des huiles essentielles 30
1.5.1 Les chémotypes 31
1.5.2 Facteurs influençant la composition des huiles 31
1.5.3 Méthodes d'extraction des huiles essentielles 32
1.5.4 Méthodes d'analyses des huiles essentielles 32
1.5.5 Activités biologiques des huiles essentielles 33
1.5.5.1 Activités antioxydantes 33
1.5.5.2 Autres activités 34
1.5.5.3 Utilisation des HE du romarin et de l'armoise blanche 34

Chapitre 4 : le stress oxydatif

Chapitre 4 : le stress1. Le stress oxydatif 36
1.1 Les espèces réactives de l'oxygène 37
1.2 Les espèces azotées actives 37
1.3 Les cibles des ERO 38
1.3 Le rôle physiologique des radicaux libres au niveau du spermatozoïde 40
1.4 Concept antioxydant en reproduction aviaire 41
1.4.1 Le stress oxydant et la reproduction aviaire : rôle des antioxydants 41
1.4.2 Les défenses antioxydantes 42
1.4.2.1 Antioxydants enzymatiques 42
1.4.2.1.1 Superoxyde dismutase (SOD) 42
1.4.2.1.2 Glutathion peroxydase GPX 43
1.4.2.1.3 La catalase 43
1.4.2.2 Les antioxydants non-enzymatiques 43
1.4.2.2.1 La vitamine E 43
1.4.2.2.1 La vitamine C 44

1.4.3 Evaluation du stress oxydant 44
1.4.3.1 Mesure directe des radicaux libres 44
1.4.3.2 Mesure des dommages radicalaires 45
1.4.3.2.1 Mesure de la peroxydation lipidique 45
1.4.3.2.2 Mesure de l'oxydation des protéines 45
1.4.3.2.3 Capacité antioxydante totale 46
1. Matériel et méthodes 47
1.1 Animaux 47
1.1.1 Collecte et dilution de la semence 47
1.1.2 Calcul de la concentration 48
1.2 Matériel végétal 49
1.2.1 Armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) 49
1.2.2 Romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) 50
1.3 Extraction de l'huile essentielle 51
1.3.1 Analyse de l'huile essentielle 51
1.4 Préparation des complexes de cyclodextrines 52
1.4.1 Préparation du complexe méthyl-β-cyclodextrine–vitamine E 53
1.5. Analyse de la qualité des spermatozoïdes 54
1.5.1 Mobilité et paramètres cinématiques 54
1.6 Mesures du statut oxydatif 55
1.6.1 Préparation des échantillons 55
1.6.2 Test de peroxydation lipidique (LPO) 55
1.6.3 Capacité Antioxydante Totale 56
1.7 Analyses statistiques 57

Résultats 47
1. Composition chimique des huiles essentielles **58**
1.1 Composition de l'Armoise blanche 58
1.2 Composition du Romarin 58
1.3 Paramètres de mobilité 61
1.3.1 Mobilité totale 61
1.3.1.1 *Artémisia herba alba* 61
1.3.1.2 *Rosmarinus officinalis* 62
1.3.1.3 Complexes cyclodextrines 63
1.4 Mobilité progressive **64**
1.4.1 *Artémisia herba alba* 64

1.4.2 *Rosmarinus officinalis* 65
1.4.3 Complexes cyclodextrines 66
1.5 Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF) **67**
1.5.1 *Artémisia herba alba* 67
1.5.2 *Rosmarinus officinalis* 68
1.5.3 Complexes cyclodextrines 68
1.6 Peroxydation des lipides **71**
1.7 Capacité antioxydante totale 72

Discussion **74**
Conclusion **83**
Bibliographie **86**

Introduction générale

Dans l'élevage avicole moderne, la fertilité est d'un intérêt majeur pour la rentabilité économique, principalement en raison de son effet sur le nombre de poussins éclos par femelle de départ. En élevage chair, les reproducteurs (parentaux) sont sélectionnés génétiquement pour de meilleurs rendements en viande inversement corrélés aux performances de reproduction. La forte vitesse de croissance semble avoir un impact négatif sur la fertilité, comme en témoigne le déclin de la capacité de fertilité des reproducteurs (Barbato, 1999). La diminution de la fertilité se produit souvent durant la deuxième moitié d'élevage (40 semaines environ), liée principalement aux mâles.

La viande et les œufs de volailles font partie des denrées d'origine animale les plus largement consommés à l'échelle de la planète. Aujourd'hui, il est important d'augmenter la production (viande et œuf) pour répondre à l'accroissement de la demande liée à la croissance démographique, à l'urbanisation et à l'augmentation des revenus dans les pays en développement. Les poulets dominent la consommation mondiale de viande car leur viande est bon marché, pauvre en matières grasses et ne fait l'objet de presque aucune restriction religieuse ou culturelle. Les technologies de reproduction assistée, telles que l'insémination artificielle (IA), contribuent à augmenter la production de volaille, puisqu'elles permettent une utilisation plus large de coqs génétiquement supérieurs avec des performances de production élevées (Benoff et al., 1981). En effet, grâce à l'IA, la fécondité peut être maintenue à des niveaux élevés (Brillard et McDaniel, 1986).

La réussite de l'IA dépend du respect des différentes étapes, allant de la collecte des mâles, l'évaluation, la dilution, le stockage de la semence, et enfin l'insémination de la femelle. Les taux de fertilité obtenus après IA vont dépendre de la qualité de la semence inséminée. En effet, le sperme aviaire présente un inconvénient majeur puisque sa fécondité chute considérablement 15 minutes après la collecte (Blesbois et brillard, 2007). En pratique, l'insémination ne doit pas dépasser les 30 minutes après la collecte de la semence, car la qualité du sperme est le facteur déterminant de la fertilité et de l'éclosion des œufs, et reste la source principale de rentabilité de l'élevage avicole (Mohan et al, 2018). Ainsi, l'évaluation de la qualité du sperme avant l'insémination est essentielle, afin de ne garder que les meilleurs reproducteurs dans les élevages mais aussi pour ajuster les doses d'inséminations.

La concentration du sperme du coq varie de 3 à 7.10^6 spermatozoïdes/ml (Etches, 1996). Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées, jouant un rôle crucial dans la transmission de l'ADN paternel et dans l'activation de l'ovocyte au cours de la fécondation. Les spermatozoïdes aviaires sont différents de ceux des mammifères, avec une forme filiforme, une tête beaucoup plus longue que large, et un volume cytoplasmique inférieur à celui des mammifères (Long, 2006 ; Santiago-Moreno et al., 2016). La membrane du spermatozoïde aviaire par sa composition diffère de celle des mammifères. En effet, elle contient une proportion élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la fraction phospholipidique, une teneur en protéine plus faible, un ratio cholestérol/phospholipides (C/P) plus faible et une grande fluidité et flexibilité membranaire à des températures physiologiques (Cerolini et al, 1997 ; Douard et al., 2000 ; Cerolini et al., 2006).La richesse de la membrane en AGPI rend les spermatozoïdes susceptibles à la peroxydation lipidique (Cerolini et al, 1997), notamment durant les étapes de la conservation *in vitro* (Wishart, 2009). Cette peroxydation est encore plus marquée si les quantités en antioxydants endogènes sont insuffisantes pour contrecarrer les effets délétères des espèces oxygénées réactives (EORs) sur la membrane cytoplasmique (Wishart, 2009). Dans ces conditions, un système de défense antioxydant performant reste un élément clé dans le maintien de la qualité du sperme (Surai et al, 2016a).

Le maintien des spermatozoïdes à des températures basses induit une transition de phase (choc thermique) de la membrane plasmique, pouvant entraîner des lésions irréversibles dans la composition de la membrane lipidique (Amann et Pickett, 1987). La susceptibilité au choc thermique du spermatozoïde dépend du ratio cholestérol/phospholipides (C/P), les espèces dont la membrane spermatique présente un taux élevé en C/P comme l'homme et le lapin, sont plus résistantes avec moins de dommages au niveau membranaire (Darin-Bennett et White, 1977 ; Watson, 1981; White, 1993). Dans cette situation, le cholestérol ne subissant pas de transition de phase, interagit avec les phopholipides membranaires et maintient la stabilité et la fluidité membranaire à basse température (Drobnis et al, 1993). Le cholestérol joue aussi un rôle important dans la perméabilité membranaire, avec diminution des transferts d'eau, maintenant ainsi l'intégrité membranaire des cellules pendant les variations osmotiques durant la conservation (Glazar et al., 2009; Aksoy et al., 2010).

Dans ces conditions de choc thermique que subit par la cellule, le stress oxydatif vient s'associer pour attaquer le spermatozoïde, notamment au niveau de la membrane plasmique (Partyka et al. 2012). Le stress oxydatif correspond à une agression des cellules par les espèces

réactives de l'oxygène (EROs), produites en excès et provoquant des dommages au niveau que l'ADN, des protéines et des lipides membranaires (Thomson et al., 2009 ; Shiva et al., 2011). La membrane du spermatozoïde aviaire est composée majoritairement d'AGPI indispensables à la fluidité membranaire (Blesbois et al., 1997 ; Kelso et al., 1997). En raison de cette proportion élevée en AGPI, la membrane reste une cible privilégiée des attaques par les EROs (Surai et al., 1997), avec comme conséquences une détérioration du sperme pendant le stockage (Surai et al., 1998). Dans ce contexte, plusieurs stratégies sont utilisées pour combattre le choc au froid et le stress oxydant pendant la conservation du sperme.

Le cholestérol a été particulièrement rapporté comme un facteur clé pour lutter contre le choc au froid. Etant hydrophobe et peu soluble dans l'eau, il ne peut donc se dissoudre convenablement dans un dilueur afin d'être directement incorporé à la semence. Récemment, les cyclodextrines ont été utilisées pour arracher et insérer du cholestérol dans la membrane cellulaire, par l'augmentation de la solubilité du cholestérol (Moce et al, 2010a). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques dont l'extérieur est hydrophile et l'intérieur hydrophobe, capables d'encapsuler des composés hydrophobes tels que le cholestérol (Moce et al., 2010a ; Purdy et Graham, 2004) et la vitamine E (Benhenia et al, 2016) pour les rendre solubles. Lorsque le cholestérol est couplé à la cyclodextrine, le complexe permet l'incorporation efficace du cholestérol dans les membranes cellulaires.

Lorsque le cholestérol est couplé à la cycodextrine (CLC), le complexe empêche le réarrangement des phospholipides et augmente la fluidité de la membrane pendant la conservation à basse température (Blommaert et al., 2016). De nombreuses études ont montré la capacité des cyclodextrines chargées de cholestérol à augmenter la viabilité des spermatozoïdes après la cryoconservation chez plusieurs espèces comme le bovin (Ezz et al., 2017; Purdy et Graham 2004; Rajoriya et al., 2016, Yadav et al., 20017), cheval (Blommaert et al., 2016; Moore et al., 2005), petits ruminants (Moce et al., 2010b ; Naseer et al., 2015, Benhenia et al., 2016 ; Khellouf et al, 2018), le chien (Belala et al, 2016 ; Khan et al., 2017), lapin (Nabi et al., 2017), et le coq (Chuaychu-noo et al., 2017 ; Partyka et al., 2018). En règle générale, les concentrations de 1 à 5 mg de CLC pour 120 millions de spermatozoïdes améliore considérablement les capacités de fécondation du sperme traité chez différentes espèces (Moce et al., 2010a; Moore et al., 2005; Purdy et Graham, 2004).

Une autre approche qui consiste en la supplémentation des milieux de conservation par des antioxydants pour combattre le stress oxydatif, est largement étudiée. La vitamine E a montré un intérêt dans la lutte contre les effets néfastes des EORs sur la cellule spermatique (Blesbois et al., 1993 ; Breque et al., 2003 ; Dimitrov et al., 2007 ; Surai et al., 2006). La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble présent dans la membrane cellulaire, et dont le rôle principal est de rompre la chaine d'oxydation par le piégeage des radicaux peroxydes qui propagent la peroxydation des lipides (Surai et al., 2006 ; Voljc et al., 2011). La vitamine E joue aussi un rôle de stabilisateur de la membranaire, qui est fondamental pour la cellule spermatique (Rengaraj et Hong, 2015 ; Tufarelli et Laudadio, 2016). En effet, l'addition au milieu de conservation de la vitamine E et du sélénium, permet de contrecarrer l'action des radicaux libres sur la cellule spermatique (Blesbois et al, 1993 ; Dimitrov et al, 2007), et de même, l'incorporation de la vitamine E dans l'alimentation des volailles, a montré une nette amélioration de la qualité spermatique (Surai et al, 1998 ; Breque et al, 2003 ; Surai et Fisinin, 2014). Etant hydrophobe, la vitamine E et le cholestérol présentent une faible solubilité dans les milieux de conservation, limitant ainsi leurs effets bénéfiques sur la cellule. Cependant, avec l'intermédiaire des cyclodextrines, la solubilité et l'effet complémentaire de ces deux molécules sont remarquablement augmentés (Benhenia et al., 2016, Khellouf et al., 2018). Cette approche qui consiste à associer la cyclodextrine, le cholestérol et la vitamine E n'est pas encore explorée à notre connaissance chez le coq.

Ces dernières années, nous observons aussi un intérêt particulier pour l'utilisation des molécules naturelles et des extraits de plantes pour leurs effets bénéfiques sur la reproduction et la fertilité de la volaille (Cross et al., 2007 ; Radwan Nadia et al., 2008 ; Mangiagalli et al., 2010). Les substances naturelles permettent particulièrement de renforcer la capacité de défense antioxydante (Rosato et al, 2012). L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle, du fait de leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles est une pratique très ancienne de par le monde (Bag et Chattopadhyay, 2015 ; Bakkali et al., 2008 ; Sharifi-Rad et al., 2018,). L'intérêt croissant pour l'utilisation de produits naturels, et en particulier les huiles essentielles (HE), qui sont des métabolites secondaires, découle de leurs nombreux effets biologiques tels qu'antibactériens (Boutabia et al., 2016 ; Outaleb et al., 2015), antiviraux (koch et al., 2008), antifongiques (Mahboubi et Kazempour, 2015) et antioxydants (Frankel et al., 1996 ; Outaleb et al., 2015 ; Raskovic et al., 2014). En industrie alimentaire, il existe aujourd'hui une demande accrue pour les antioxydants naturels. Ces produits sont utilisés pour leurs sécurités et pour leurs

implications dans les mécanismes de défenses corporels contre les maladies cardio-vasculaires, le cancer, l'arthrite, l'asthme et le diabète. Par ailleurs, la sécurité des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), est contesté à présent. Ces molécules synthétiques sont soupçonnées d'être cancérigènes et responsables de lésions hépatiques (Wang et al., 2000). De ce fait, le consommateur a tendance à limité et éviter l'utilisation des additifs de synthèse dans les produits alimentaires. Depuis déjà plusieurs années, le romarin est utilisé dans l'industrie alimentaire comme alternative aux additifs chimiques dans les préparations de la volaille, de l'agneau, du veau, des fruits de mer, et salades (Djenane et al., 2002 ; Moino et al., 2008).

Bien que la recherche sur l'activité antioxydante des HE du romarin et de l'armoise blanche ont fait l'objet de plusieurs études, il n'existe aucune publication à notre connaissance sur l'intérêt de ces HE dans la conservation du sperme aviaire *in vitro*. Ainsi, dans le présent travail, nous nous sommes intéressées à ces deux HE en raison essentiellement de leurs activités antioxydantes. Chez plusieurs espèces animales, la supplémentation alimentaire en HE a montré un intérêt dans la protection et l'amélioration des paramètres spermatiques (Liu et al, 2017 ; sebai et al, 2015 ; Ben slima et al, 2013 ; Köse et al, 2011). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur les effets de l'ajout de HE dans le milieu de conservation du sperme. Chez l'homme, des effets contraceptifs des HE ont été rapportés dans la littérature (*Trachyspermum ammi*, Paul et Kang, 2012 *; Thymus mumbianus*, Chikhoune et al, 2015). Chez le porc, les effets des HE sur la conservation du sperme ont également été explorés (*Thymbra capitata* (L.) Cav et *Rosmarinus officinalis* (L.), Elmi at al, 2017 ; *Thymus munbyanus* ; Elmi et al, 2019). Il en ressort de l'examen de la littérature, que seuls les effets spermicides sont rapportés *in vitro* dans la conservation du sperme.

A la lumière de cet ensemble de données, les objectifs fixés par le présent travail sont : 1) étudier l'impact d'une supplémentation des milieux de conservations par les HE de l'armoise blanche (*Artémisia herba alba*) et du romarin (*rosmarinusofficinalis*), sur les paramètres de mobilité du sperme du coq, après une conservation à 4°C pendant 48 heures. Pour ces mêmes milieux, nous allons quantifier la peroxydation des lipides membranaires et de la capacité antioxydante totale du sperme conservé. 2) étudier l'impact de l'association cyclodextrine-vitamine E (CDVitE), et du complexe Cyclodextrine-cholestérol-vitamine E (CDCholVitE) sur les paramètres de mobilité du sperme du coq après conservation à 4°C pendant 48 heures.

Chapitre 1 : La reproduction des oiseaux domestiques

1. Introduction

Les oiseaux sont des ovipares homéothermes à fécondation interne. Cette oviparité s'accompagne de nombreuses spécificités qui placent la reproduction des oiseaux dans une classe à part au sein des vertébrés. Chez les oiseaux, la détermination sexuelle repose sur le système ZZ : ZW. Le chromosome W est porté par la femelle, ce sont donc elles qui sont hétérogamétiques tandis que les mâles sont homogamétiques. C'est donc une situation inverse à celle rencontrée chez les mammifères où c'est le gamète femelle qui détermine le sexe chez les oiseaux.

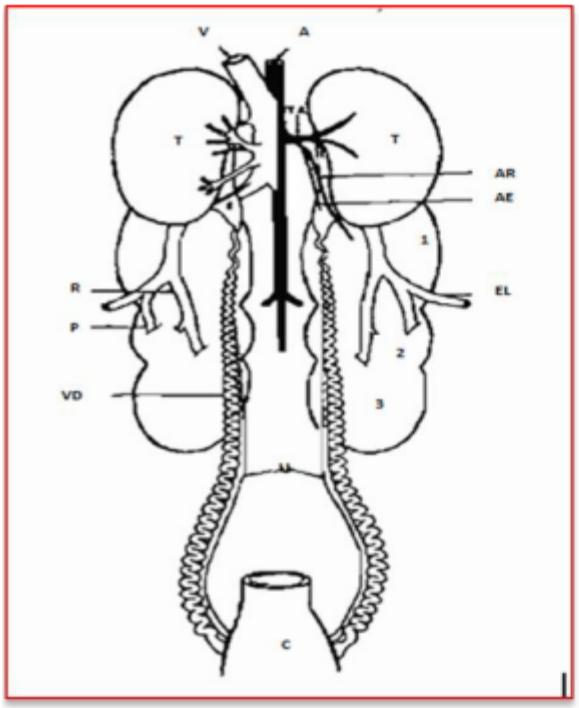
1.1 Anatomie de l'appareil génital male

Les organes sexuels mâles sont internes chez les oiseaux et contrairement à ce que l'on observe chez la plupart des mammifères, les testicules ne migrent pas et demeurent donc sur leur site d'origine embryologique (Barrie, 2007). La spécificité la plus marquante est que la spermatogenèse se produit à la température interne de l'abdomen, soit environ 41°C (de Reviers, 1988). L'appareil génital des mâles peut être divisé en trois unités morphologiques qui sont les testicules, les voies déférentes et l'appareil copulateur. La fonction principale du mâle reproducteur est donc la production de la semence, et dans le cas de la reproduction naturelle, le cochage de la femelle. Un mâle sexuellement actif peut produire jusqu'à 3 x 10^9 SPZ par jour, ceci équivaut à 35000 SPZ/seconde. Cette production intense est assurée par le testicule qui assure la fonction de spermatogénèse mais aussi la fonction endocrine (Etches, 1996).

1.1.1 Les testicules

Chez les oiseaux, les testicules sont situés dans la cavité abdominale, en position cranio-ventrale par rapport aux reins. La spermatogenèse se déroule à la température centrale de l'animal (41-43°C) (Etches, 1996). Ils ont à peu près la forme d'un haricot. Ils sont suspendus à la paroi dorsale de la cavité abdominale par un ligament, le mésorchium, près de l'aorte et de la veine cave (Figure 1). Bien que les deux testicules soient positionnés de manière symétrique par rapport au plan médian, ils sont souvent de taille asymétrique. Le testicule gauche est généralement plus grand que le droit chez de nombreuses espèces d'oiseaux (Barrie, 2007). A l'approche de la maturité sexuelle, le poids testiculaire passe de 2-4 g à 25-35 g, alors que le testicule gauche est souvent augmente (Etches, 1996). La taille des testicules des oiseaux adultes varie en fonction des espèces, des individus et de la saison (de Reviers, 1996). Le

testicule est enveloppé par une tunique protectrice, l'albuginée, et relié à l'appareil copulateur par un canal déférent, le mâle est dépourvu de glandes annexes (prostate, vésicules séminales, etc.) (Etches, 1996). Le parenchyme testiculaire est constitué de deux parties bien distinctes : les tubes séminifères qui produisent les spermatozoïdes et le tissu intertubulaire (interstitiel), qui est en partie responsable de la fonction endocrine des testicules.



A : aorte
V : Veine cave postérieure
TA : artère testiculaire
AR : artère rénale
AE : artère épididymaire
T : testicules
E : épididyme
C : cloaque
R : veine rénale
P : veine porte rénale
EI : veine iliaque externe
1, 2, 3 : partie antérieure, moyenne et caudale du rein
VD : canal déférent
U : uretère

Figure 1 : Schéma de l'appareil génital du coq (d'après Hodges, 1974)

1.1.2 Le tractus génital

Le tractus génital chez les oiseaux est assez réduit. Il ne contient pas de glande accessoire différenciée et l'organe copulateur est réduit voir absent. Au moment de l'accouplement, les deux cloaques des deux sexes s'éversent lors de l'accouplement. Les spermatozoïdes produits au niveau des tubes séminifères sont évacués vers le canal épididymaire via le rete testis. L'épididyme produit une quantité de fluide séminal., et l'ensemble avec les spermatozoïdes sont déversés dans le canal déférent qui mesure environ 12 à 15 cm. Ce dernier joue le rôle de réservoir pour le stockage de spermatozoïdes puisque l'épididyme est rudimentaire. Les canaux déférents se terminent par une vésicule spermatique au niveau de la paroi latérale du segment intermédiaire du cloaque, l'urodéum. Chacune des deux vésicules spermatiques se termine par

une papille éjaculatrice à structure de pénis. La progression des spermatozoïdes s'effectue par péristaltisme puisque le canal déférent possède une couche musculaire. Chez le coq, il existe un phallus non protrusible qui s'éverse partiellement au moment de la miction et la défécation. La tumescence du pénis est le résultat d'un flux lymphatique et d'une stase lymphatique due à un corps vasculaire élastique paracloacal (Etches, 1996).

1.1.3 La spermatogenèse

Le processus de transformations subies après la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatozoïdes est appelé spermatogenèse. Elle a lieu dans l'épithélium séminifère des deux testicules (gauche et droit) logés à l'intérieur de la cavité abdominale chez les oiseaux. Comme chez les mammifères, ces transformations font intervenir les cellules somatiques de l'épithélium séminifère, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, qui sont sous contrôle des hormones gonadotropes hypophysaires. Chez le coq, la durée de la spermatogenèse est d'environ 14 jours (de Reviers, 1975). La spermatogenèse se déroule en trois phases : les mitoses spermatogoniales permettant le renouvellement des cellules souches (spermatogonies), la méiose permettant la réduction du nombre de chromosomes (2n à un stock final de n chromosomes) et, une dernière étape la spermiogénèse, qui consiste en les changements morphologiques permettant le passage des spermatides en spermatozoïdes (Figure 2**)**. La mise en place de la spermatogenèse est un processus précoce chez les oiseaux, dès le stade embryonnaire, puis au stade jeune immature, les cellules germinales primordiales se multiplient pour donner naissance aux premières spermatogonies. Après une période de latence pendant le jeune âge, la spermatogenèse termine sa mise en place "qualitative", c'est à dire la production des premiers spermatozoïdes.

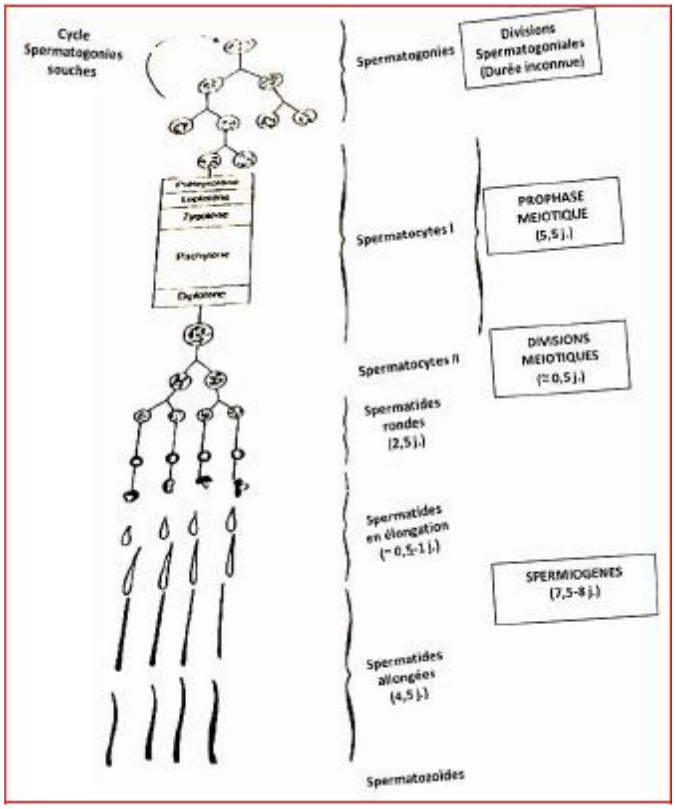


Figure 2: Diagramme de la spermatogenèse. Le nombre et la durée des divisions spermatogoniales ne sont pas connues chez le coq. Les étapes ultérieures de la spermatogenèse se déroulent sur une durée totale de 13 à 14 jours (d'après de Reviers, 1988).

1.1.3.1 Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est produit par spermatogenèse au niveau des tubules séminifères des testicules. Le spermatozoïde aviaire est une cellule haploïde hautement différenciée, mesurant environ 100 µm de longueur et environ 0,5 µm à leur point le plus large. Il présente une forme filiforme et comporte trois parties : une tête, une pièce intermédiaire et un flagelle. Le spermatozoïde aviaire contient peu de cytoplasme et possède une forte proportion de membranes cellulaires et subcellulaires. Leur protéome contient environ 822 protéines (Labas et al., 2015). La tête contient un noyau (haploïde), coiffée d'un acrosome et une faible quantité de cytoplasme (Figure 3). Chaque compartiment du spermatozoïde jour un rôle important dans le processus de fécondation de l'ovocyte. L'acrosome petit (2,5 µm de long, 0,5 de large) et conique, contient la vésicule acrosomique, qui constitue un réservoir de calcium, et des enzymes protéolytiques responsablent de l'hydrolyse de la membrane périvitelline interne (MPVI) de l'ovocyte au moment de la fécondation (Brown et Hartree, 1976 ; Bakst et Howarth, 1977). En

dessous de l'acrosome, le noyau mesure 0,5x6 µm chez le coq (Lake, 1978), également filiforme est entouré d'une double membrane nucléaire, est très condensé. La condensation extrême du noyau est une garantie pour la protection de ce dernier avant qu'il ne soit intégré à l'ovocyte. La pièce intermédiaire (5-6 µm de long chez le coq) est située juste en dessous du noyau. Elle est composée de deux centrioles (proximal et distal), et l'ensemble est entouré d'une gaine de mitochondries au nombre de 30 chez le coq et la dinde, produisant de l'énergie et contribuant à la mobilité des gamètes (Korn et al., 2000). Cette mobilité est indispensable dans un premier temps pour accéder aux sites de stockages de spermatozoïdes, à la fécondation par la suite et la réaction acrosomique (Korn et al., 2000). Le flagelle est le compartiment responsable de la mobilité du spermatozoïde mesurant entre 70 et 90 µm chez le coq et le dindon (Korn, 2000). Il est le plongement du centriole distal de la pièce intermédiaire à laquelle sont rattachés les deux filaments centraux du complexe axonémal. L'axonème lui, est constitué d'un doublet central et de neuf doublets de microtubules périphériques. Le flagelle est sans doute la partie la plus énergivore du spermatozoïde puisqu'il est responsable de sa mobilité lors de la remontée jusqu'au site de fécondation et ensuite lors de la réaction acrosomique (Fawcett, 1970).

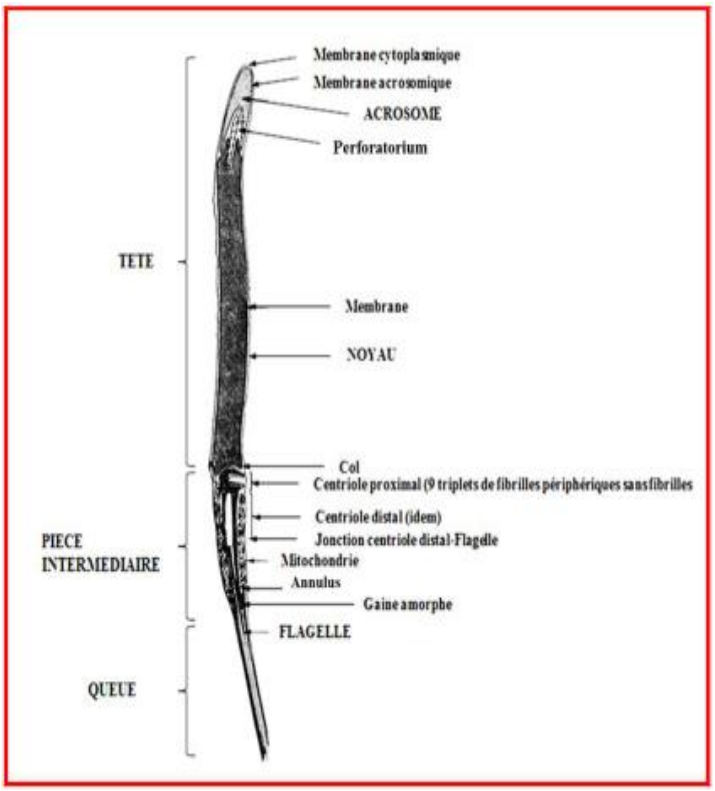


Figure 3: Ultrastructure du spermatozoïde de coq (d'après De Reviers, 1988)

1.1.3.2 Plasma séminal

A l'éjaculation, les spermatozoïdes sont dilués dans le plasma séminal. En absence de glande annexe chez le coq, il semble que les cellules qui tapissent les voies déférentes participent à son élaboration (De Reviers, 1988). Le pH du plasma séminal est neutre ou légèrement basique 7.2 chez le coq, alors que la pression osmotique est comprise entre 300 et 400 mOsm (Etches, 1996) soutenue par une forte concentration en acides aminés comme le glutamate. Le plasma séminal est riche en lipides, avec des concentrations élevées en cholestérol et phospholipides issus des nombreuses vésicules lipidiques et de lipoprotéines (HDL, VHDL) (Blesbois et Hermier 1990, Douard et al., 2000). Le plasma séminal est utile pendant l'éjaculation, puisqu'il stimule la mobilité des spermatozoïdes pendant leur parcours dans les voies génitales mâles. Par ailleurs, son utilisation lors de conservation *in-vitro* donne des résultats contrastés aussi bien chez les mammifères (Maxwell, 1999) comme chez les oiseaux (Ashizawa et Wishart, 1987 ; Blesbois et de Reviers, 1992 ; Mohan et al., 1995), il est éliminé avant leur stockage dans les glandes utéro-vaginales (Blesbois et De Reviers, 1992, Etches, 1996).

1.1.3.3 Membrane plasmique

Les membranes biologiques sont des structures continues délimitant deux compartiments aqueux, relativement imperméables aux molécules hydrophiles. D'un point de vue structural, les membranes sont constituées de lipides assemblés en bicouche, associés à des protéines et des polysaccharides (figure 4). Les protéines et les lipides sont constamment animés de mouvements (mosaïque fluide). Les lipides les plus représentés qui sont les phospholipides et le cholestérol, peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique (Amann et Pickett, 1987). La membrane plasmique intervient dans la régulation des fonctions spermatiques par la création d'un gradient ionique avec de très nombreux rôles dans les échanges entre les milieux intra et extracellulaires. Elle intervient donc dans la régulation des flux cellulaires, dans la transduction de signaux extérieurs, et dans les voies de signalisation cellulaires permettant aux cellules de s'adapter à leur environnement (Hammerstedt et Graham, 1992). De ce fait, l'évaluation de son intégrité semble être une composante importante dans l'évaluation de la qualité de la semence. La membrane plasmique du spermatozoïde est divisée en différents domaines membranaires hétérogènes, dont la composition lipidique et protéique

est très variable, mais indispensable pour chaque étape de la fécondation (Hammerstedt et Graham, 1992).

Durant la conservation à de basses températures, les phospholipides membranaires subissent une transition de phase passant de la phase dite liquide à la phase cristalline (Mazur, 1984). De cette situation, résulte une diminution des mouvements des lipides au niveau de la membrane, un réarrangement des lipides et protéines membranaires conduisant à une instabilité et pertes des fonctions membranaires (Hammerstedt et al., 1990). Une fois dépassé la phase de transition, la membrane se fragilise, se rigidifie et devient vulnérable aux différents dommages. En effet, des réarrangements des lipides et protéines se produisent au moment du refroidissement, mais ces derniers peuvent ne pas retrouver la situation initiale après réchauffement des spermatozoïdes, entrainant un dysfonctionnement cellulaire voir la mort cellulaire.

La fluidité membranaire est liée en partie au ratio molaire cholestérol/phospholipide de la membrane plasmique. La concentration en cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes varie d'une espèce à l'autre. En effet, certains spermatozoïdes sont plus sensibles que d'autres aux basses températures, et qui serait dû à la composition en lipides des membranes. Les spermatozoïdes humains et du lapin avec des ratios élevés (0.99 et 0.88 respectivement), sont plus résistants au refroidissement que ceux du coq, du taureau et du bélier par exemple. La teneur élevée en cholestérol rend les membranes plus fluides et subissent moins de dommages comparativement aux membranes spermatiques des espèces avec un faible ration cholestérol/phospholipide (taureau : 0,45, coq : 0,30, étalon: 0,23) (Darin-Bennett et White, 1977, Parks et Lynch, 1992).

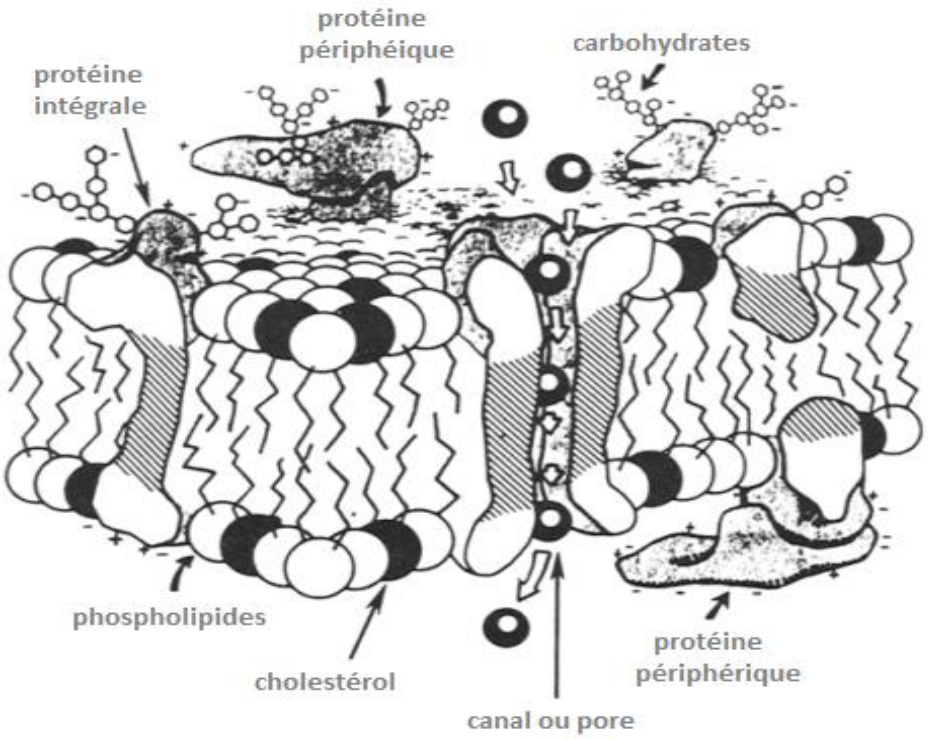


Figure 4 : Représentation d'une membrane cellulaire (Amann et Pickett, 1987)

a. Les principaux lipides membranaires

La distribution des lipides est asymétrique au sein des deux feuillets membranaires. Trois catégories majeures de lipides composent les membranes : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols. Les glycérophospholipides où phosphoglycérides, constituent 40 à 60% de la fraction totale des lipides membranaires. Les sphingolipides représentent 10 à 20 % mol des principaux lipides membranaires (Munro, 2003**)**, et présentent une composition similaire à celle des glycérophospholipides, sauf que le glycérol est remplacé par une molécule de sphingosine. Le troisième groupe qui est les stérols est représenté essentiellement par le cholestérol chez les mammifères.

1.1.3.4 Composition lipidique du spermatozoïde aviaire

La composition en lipides du sperme du coq est un facteur déterminant de sa qualité et de son pouvoir fécondant (Cerolini et al., 1997a). La membrane du spermatozoïde aviaire est composée majoritairement d'acides gras polyinsaturés (AGPI) C20-22, qui sont les constituants majeurs des phospholipides membranaires (Blesbois et al., 1997 ; Kelso et al., 1997). Ces AGPI sont indispensables à la fluidité membranaire ainsi qu'à la régulation des mouvements

cellulaires, du métabolisme lipidique et des capacités de fusion nécessaires aux mécanismes de fécondation (Stubbs et Smith, 1984). A l'inverse des mammifères, les spermatozoïdes d'oiseaux domestiques contiennent de très faibles proportions d'acides gras AGPIn-3, et des proportions élevées d'acides gras n-6 (Blesbois et al., 1997 ; Cerolini et al., 1997b). En raison de cette proportion élevée en AGPI, le sperme aviaire est sensible à la peroxydation lipidique (Surai et al., 1997), ce qui pourrait entraîner une détérioration du sperme pendant le stockage (Surai et al., 1998).

1.2 Méthodes d'évaluation du spermatozoïde

Le développement des techniques de collecte et d'insémination artificielle (IA) chez la volaille à partir des années 1930 a permis des avancées dans le domaine de la manipulation du sperme aviaire pendant les étapes de collecte, de stockage et d'analyse avant l'insémination des femelles (Lake, 1995). La réussite de cette dernière dépendra de la maitrise des différentes étapes allant de la collecte de la semence, stockage à court terme (réfrigération) et à long terme (cryoconservation), mais également par un classement des reproducteurs en fonction de la qualité de leur semence. La collecte du sperme des mâles, doit être réalisée avec une précaution particulière afin d'éviter toute contamination par les urates, les fèces et le sang.

1.2.1 La concentration

La concentration des spermatozoïdes est un paramètre direct de qualité, il est estimé après avoir suffisamment dilué la semence. La concentration doit être connue avant l'insémination afin de déterminer le taux de dilution nécessaire avant utilisation. Elle est mesurée par diffusion de la lumière dans un photomètre, un colorimètre ou un spectrophotomètre. La densité optique étant corrélée avec la concentration de spermatozoïdes estimée à l'aide d'un hématimètre (Bakst et cecil, 1997). La concentration spermatique varie en fonction des espèces, de 4-5.10^9 spermatozoïde/ml chez le coq et de 6-8.10^9 spermatozoïdes/ml chez le dindon. Cependant, le volume récolté par coq est de l'ordre de 300µl à 1.5ml par éjaculat, et environ 200µl à 1ml par dindon. Il existe plusieurs cellules de comptages : Makler, Neubauer et Malassez. Ces différentes cellules donnent des résultats assez fiables si la technique est effectuée soigneusement (Mahmoud et al., 1997).

1.2.2 Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes aviaires

1.2.2.1 Méthode classique

L'évaluation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles par microscope est l'essai le plus utilisé en laboratoire, et reste un critère largement utilisé en aviculture. L'examinateur après observation direct donne un jugement sur la qualité de mobilité de plusieurs millions de spermatozoïdes en mouvement. L'examen de la mobilité consiste en deux types d'évaluation, une estimation de la mobilité massale (mouvements de l'ensemble des spermatozoïdes) avec une graduation sur une échelle allant de 0 (absence totale de mouvement) à 9 (mobilité vigoureuse) (Nguyen,2015), et par une évaluation individuelle des spermatozoïdes qui consiste à déterminer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles oscillants et progressifs. Pour une fiabilité des résultats, il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration optimale à l'aide d'un dilueur de semence qui soit identique à celui utilisé durant l'IA. La semence retenue pour un programme d'insémination doit avoir une note de mobilité de 4 à 9 (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Critères d'analyse de mobilité massale chez les oiseaux domestiques (d'après Petitjean, 1965 cité par Nguyen, 2015).

Notes	Caractéristiques de l'échantillon
0	Échantillon ne présentant que des spermatozoïdes immobiles.
1	Présence de quelques spermatozoïdes agités (oscillation sur place).
2	Présence d'une proportion importante de spermatozoïdes agités sans déplacement notable.
3	Quelques spermatozoïdes se déplacent lentement.
4	Quelques spermatozoïdes sont immobiles, d'autres sont agités sur place alors que d'autres sont mobiles. L'aspect général détermine une mobilité moyenne.
5	Comme le 4, mais la proportion de spermatozoïdes mobiles est supérieure à la moyenne. La mobilité est assez bonne mais pas homogène dans tous les différents champs observés. Souvent, on note la présence de spermatozoïdes agglutinés.
6	La quasi-totalité des spermatozoïdes se déplacent, la mobilité est bonne et d'aspect plus homogène dans tous les différents champs observés.
7	Comme le 6, mais amorces de mouvements de vagues lents dans tous les différents champs observés.
8	La mobilité est très bonne, les vagues se manifestent de façon énergique et prennent l'aspect de tourbillons.
9	La mobilité est excellente, les vagues et les tourbillons sont très rapides.

1.2.2.2 Nouvelles méthodes

Devant les nombreux problèmes rencontrés en utilisant les méthodes traditionnelles, plusieurs approches sont actuellement proposées pour mieux objectiver l'analyse spermatique. Les nouvelles méthodes visent à mieux évaluer la concentration, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes. En plus de ces paramètres, l'exploration des capacités fonctionnelles des gamètes est à présent possible. Le système d'analyse automatisée (CASA : Computer Assisted Semen Analysis) est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations exactes, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population globale (Graham et Moce, 2005 ; Amann et Waberski, 2014).

L'analyse semi-quantitative du sperme représente une des alternatives pour l'estimation parallèle de la concentration et de la mobilité spermatiques. Parmi ces méthodes, on retrouve l'AQS (analyseur de la qualité du sperme). Cet appareil permet de générer un index de mobilité du sperme qui prend en considération la concentration et la qualité de la mobilité des spermatozoïdes. L'avantage que représente l'AQS est de permettre d'apporter, en plus des examens traditionnels une valeur quantitative qui permet de juger d'une manière fiable la qualité générale du sperme. L'AQS présente plusieurs avantages, les plus importants sont la rapidité de l'analyse (moins de 40 secondes par échantillons) et la simplicité de son utilisation. Le principe de l'AQS consiste à mettre du sperme dilué dans un capillaire en verre, une cellule photoélectrique examine un champ précis pendant 40 secondes afin de détecter les variations de la densité optique causées par la mobilité du sperme. L'AQS affiche ensuite une valeur prédictive de la qualité de l'échantillon analysé (McDaniel et al., 1997 ; McDaniel et al., 1998).

Le système CASA détecte les mouvements de spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde dans l'espace et dans le temps. Plusieurs paramètres ainsi peuvent être calculés par ce système informatique (**Figure 5**) :

- Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (Mob T : Total Spermatozoal Motility) et le pourcentage de mobilité progressive (Mob P : Progressive Spermatozoal Mobility)
- La vitesse moyenne en ligne droite (VSL : Straight-Line Velocity), qui considère la distance en ligne droite entre la tête du spermatozoïde au début de l'analyse et sa position à la fin du temps écoulé.
- La vitesse curviligne (VCL : Curvilinear Velocity) est la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue par le spermatozoïde.
- La vitesse de trajet (VAP) est la vitesse ou position moyenne des spermatozoïdes (µm/s) le long d'un chemin de 5 points mathématiquement lissés où les spermatozoïdes se déplacent au fil du temps
- L'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (ALH: Amplitude of Lateral Head Displacement)
- La fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (BCF : Beat Cross Frequency).

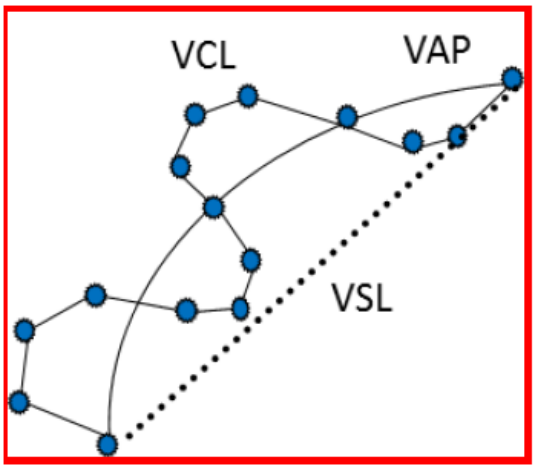


Figure 5 : Représentation schématique des VAP, VCL et VSL (Source de Select Breeders services, cité par Nguyen, 2015).

1.2.3 Autres méthodes d'évaluation du sperme aviaire

1.2.3.1 Evaluation de la morphologie

La morphologie du spermatozoïde aviaire est assez particulière (longs et étroits), son évaluation peut servir comme indicateur de certains désordres de la spermatogenèse. Des anomalies morphologiques du spermatozoïde du coq ont été rapportées dans la littérature. La classification retenue consiste en le classement des anomalies en fonction de la région anatomique du défaut, tête, acrosome, pièce intermédiaire où flagelle (Alkan et al., 2002). La présence de 15% de spermatozoïdes anormaux dans un échantillon de sperme n'influe pas négativement sur la fertilité (Clark, 1984), alors que des taux variables en spermatozoïdes anormaux ont été rapportés avec 24,1% chez les dindes, et entre 46 et 48,3% chez le coq (Siudzińska et Lukaszewicz, 2008).

Une meilleure estimation de la morphologie dépendra du type de coloration utiliséé, du colorant lui-même et de la préparation (Bilgili et al., 1985). Plusieurs techniques de coloration sont utilisées pour mettre en évidence des anomalies morphologiques. Les colorations les plus communément utilisées en laboratoire sont la coloration à l'éosine-nigrosine et l'aniline bleu-éosine pour évaluer simultanément la viabilité. Les spermatozoïdes normaux et vivants possédant une membrane plasmatique intacte empêchent l'entrée de l'éosine. Les spermatozoïdes endommagés vont concentrer l'éosine et prendront une couleur rouge au

microscope (Lake, 1978 ; Lukaszewicz et al., 2008). Dans l'espèce aviaire (coq et dinde), le colorant le plus utilisé est composé de : 17.35 g de glutamate de sodium, de 1.28 g de citrate de potassium, de 8.51 g d'acétate de sodium, 0.68 g de chloride de magnésium dilué dans un litre d'eau distillée, et enfin 5 g de nigrosine et 1 g d'éosine qui seront dissout dans 100 ml du mélange précédent (Bakst et Cecil, 1997).

1.2.3.2 Evaluation de la viabilité

L'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes est un critère important dans l'évaluation qualitative du sperme collecté, surtout dans le cadre d'un plan d'insémination artificielle pour la détermination des doses adéquates à inséminées. Il existe plusieurs techniques de colorations pour l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes, la plus couramment utilisée est la coloration à l'éosine-nigrosine comme mentionné ci-dessus (Bakst et Cecil, 1997). Récemment, de nouvelles méthodes utilisant des molécules fluorescentes ont vu le jour. Deux grandes catégories de molécules peuvent être distinguées, celles diffusant dans les cellules mortes et celles diffusant dans les cellules vivantes. Les colorations les plus couramment utilisées pour identifier les cellules mortes sont : les colorations au bisbenzimide comme l'Hoechst 33258 (Hamori, 1980), et le Propidium iodide (Garner et al., 1995). Pour ce qui est des molécules diffusant dans les cellules vivantes, on retrouve le SYBER-14 (Garner et al., 1995), souvent il est utilisé l'association SYBER-14 et Propidium iodide (Chalah et Brillard, 1998).

1.2.3.3 Membrane plasmique et intégrité structurale

L'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique est primordiale pour une meilleure évaluation de la semence. En effet, la membraneplasmique est composée d'une bicouche lipidique, enveloppant le spermatozoïde et jouant de nombreux rôles dans les échanges entre les milieux extra et intra cellulaires. La morphologie cellulaire du spermatozoïde semble être une caractéristique qualitative importante du sperme. Ce paramètre est un élément de prédiction du pouvoir fécondant du spermatozoïde, basé sur une corrélation entre la fertilité et les différentes catégories de spermatozoïdes (Lukaszewicz et al.,2008). La morphologie des spermatozoïdes peut également servir d'indicateur de certains troubles de la spermatogenèse (Bilgili et al., 1985). Aujourd'hui il existe plusieurs techniques de colorations pour tester l'intégrité membranaire. Ces derniers sont classés en deux catégories. La première consiste à marquer les cellules mortes (altération de la membrane), comme l'éosine, la négrosine, les

flurochromes et l'iodure de propidium (IP). La seconde classe comprend les colorants supra vitaux tels que les fluorochromes Hoechst 342 ou SYBR-14 qui pénètrent dans toutes les cellules. Associés à des colorants, ils permettent de distinguer les cellules viables (membrane cellulaire intègre) de cellules non viables (Colenbrander et al., 2003 ; Neild et al., 2000). Enfin, le test hypo-osmotique peut être utilisé pour évaluer l'intégrité de la membrane cellulaire. Ce test consiste à mettre les cellules dans des conditions hypo-osmotiques afin de mettre en évidence une fragilité de la membrane après conservation *in vitro.*

1.2.3.4 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux peut être un moyen très intéressant pour l'estimation du pouvoir fertilisant des spermatozoïdes, elle offre l'avantage d'être une technique rapide et précise. Le principe de la cytométrie de flux est d'analyser et de trier les cellules mises en suspension dans un liquide. Dans une population de cellules spermatiques, cette technique permet l'estimation de plusieurs caractères incluant, la viabilité cellulaire, l'intégrité de l'acrosome et la fonction mitochondriale (Graham, 2001; Graham et Moce, 2005). La viabilité cellulaire est estimée par le marquage du sperme au propidium iodide (PI), sonde fluorescente au contact de l'ADN. Les cellules avec des dommages de la membrane cytoplasmique vont laisser passer le PI qui se fixe sur l'ADN, et produire une fluorescence après excitation (Harrison et Vickers, 1990).

1.2.3.5 Activité métabolique du sperme

L'activité métabolique du sperme est mesurée à l'aide de sels de tetrazolium. Cette activité est mesurée par la capacité de réduction de l'enzyme oxydoréductase du sperme des volailles qui réduit le sel de tetrazolium en formazan coloré en rouge. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 700 g pendant 10 minutes, et l'absorbance du surnageant est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 520 nm, plus les valeurs d'absorbance seront élevées plus la qualité du sperme est meilleure (Chaudhuri et al., 1988).

1.2.3.6 Interaction sperme ovule

La rencontre sperme ovule au niveau infundibulaire à lieu approximativement 15 minutes après l'ovulation. A ce moment, les spermatozoïdes interagissent avec la couche périvitelline interne qui est la couche la plus externe à ce stade-là, ensuite il y'a libération des enzymes

acrosomiales avec hydrolyse et formation de pores au niveau de la couche dans lesquelles les spermatozoïdes avancent pour aller au contact de l'ovule. La majorité de ces pores se retrouvent autour du disque germinal, où leur nombre est 20 fois plus fréquent que dans d'autres régions de la couche périvitelline chez la poule (Bramwell et al., 1995), et chez la dinde (Wishart, 1997). Cette particularité physiologique est exploitée dans l'évaluation de la qualité de la semence. Le principe de la technique consiste à mettre dans une solution de NaCl 1% pour quelques secondes l'ovule d'un œuf fraîchement pondu afin de retirer l'albumen. Le réactif de Schiff est déposé sur la membrane après une brève suspension avec de la formaline 20%. Les spermatozoïdes sont comptés par observation au microscope (grossissement 100x). Une autre technique plus performante est décrite par Barbato et al.,1998. Le principe de cette technique est le suivant : isoler une partie de la couche périvitélline du jaune d'œuf qui va être lavée au PBS. La membrane est fixée à température ambiante en y ajoutant une solution de 1 µg de 4,6 diamino-2 phenylindole / ml de PBS. Une lamelle est ensuite appliquée et l'excès d'eau enlevé. Un photomicroscope est utilisé pour observer les spermatozoïdes à fluorescence bleue en utilisant une longueur d'onde de 350 nm. Cette technique présente un inconvénient par apport à la précédente qui est le coût très élevé de l'équipement nécessaire. Khetal nadjia

1.2.3.7 Intégrité génétique du sperme

Bien que l'intégrité génétique du sperme n'affecte pas la capacité à féconder l'ovule, il peut cependant empêcher le développement normal du zygote. Il existe, *in vitro*, plusieurs tests d'évaluation de la capacité du génome paternel à assurer le maintien du développement embryonnaire (Eid et al., 1994). En pratique, les tests les plus utilisés sont le Comet assay (CA) et le sperm chromatin structure assay (SCSA). Le CA est un essai microscopique où le sperme est fixé sur un gel d'agarose, lysé, soumis à une électrophorèse puis par épifluorescnece après coloration au bromide d'éthidium, une distinction facile peut se faire entre l'ADN simple brin et l'ADN double brin présentant des dommages. Le sperme avec des dommages d'ADN plus importants présente de larges zones de migration par apport au sperme avec peu de dommage (Evenson et Wixon, 2006 ; Fraser et Strzezek, 2005). L'essai SCSA, évalue le niveau du dommage de l'ADN après dénaturation de celui-ci à un pH basique. Après une coloration avec de l'acridine orange, l'ADN endommagé prend la couleur orange alors que l'ADN non endommagé prend la couleur verte. Le ratio orange sur le vert de chaque spermatozoïde est calculé par cytométrie de flux (Evenson et Wixon, 2006). L'avantage que présente le SCSA par

apport à d'autres essais, réside en la facilité et la rapidité de sa réalisation, et permet aussi une évaluation objective.

Chapitre 2. Conservation du sperme aviaire

1. Introduction

Il existe plusieurs procédures de traitement du sperme aviaire fraichement collecté avant son utilisation (avec ou sans dilution). En pratique d'élevage, la qualité du sperme peut être évaluée ou non après le prélèvement, et le sperme peut être immédiatement inséminé (généralement en une heure) ou dilué et stocké pour quelques heures à quelques jours (Wishart, 2009). Pour une période de conservation plus longue, le sperme peut être congelé pour préserver les spermatozoïdes plus longtemps. La qualité de la semence est un facteur principal pour la réussite de l'insémination artificielle.

Les taux optimaux en fertilité chez la femelle sont obtenus avec l'utilisation du sperme frais non dilué dans la demi-heure qui suit la récolte (Blesbois et Brillard, 2007 ; Blanco et al., 2009). En élevage avicole industriel, l'insémination est couramment pratiquée avec du sperme fraîchement collecté. La supplémentation du sperme aviaire récolté par un dilueur approprié, est indiquée pour la conservation à court terme à 4°C pendant quelques jours (Donoghue et Wishart, 2000).

1.1 Stockage su sperme à l'état liquide (4°C)

La conservation du sperme à l'état liquide consiste à maintenir les spermatozoïdes à des températures basses, sans atteindre un seuil de température négatif. L'objectif étant de permettre de rallonger la durée de conservation des spermatozoïdes, tout en préservant leur capacité fécondante. Le passage de la température corporelle à 4°C pendant la conservation, permet de réduire le métabolisme du spermatozoïde et par conséquent des économies en réserves énergétiques (Giesen et Sexton, 1983). La baisse de la température de stockage doit se faire progressivement (0.5°C/min) afin d'éviter un choc thermique appelé (choc dû au froid), qui affecte principalement les membranes plasmique, acrosomique et mitochondriale des spermatozoïdes (Wishart, 1984 ; Parks et Graham, 1992). La conservation du sperme à 4°C permet également une meilleure longévité des spermatozoïdes comparativement à la conservation à des températures de 22°C à 37°C, qui sont favorables aux développement bactérien (Bouchard et al., 1990; Soler et al., 2003).

Cependant, même en conditions optimales de stockage, la fonctionnalité et la viabilité du sperme diminuent lentement au cours des premières 48 heures de stockage *in vitro* (Donoghue et Walker-Simmons, 1999). La baisse de la viabilité du spermatozoïde, s'accompagne d'une perte des principaux phospholipides de la membrane plasmique (Blesbois et al., 1999; Douard

et al., 2003), d'une perturbation de l'acrosome et enfin d'une fragmentation de l'ADN (Kotlowska et al., 2007). Afin de pallier aux difficultés liées à la conservation du sperme aviaire à 4°C, l'amélioration des méthodes de stockage à court terme, sont nécessaires pour accompagner le développement de la pratique de l'IA en aviculture. En effet, le sperme aviaire une fois dilué peut être conservé pendant 24h sans perdre sa capacité de fécondation (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008). Pour cela, l'utilisation d'un dilueur approprié est indispensable pour le maintien de la viabilité et de la fertilité des spermatozoïdes pendant des périodes de conservations plus longues. Les dilueurs utilisés dans la recherche mais aussi dans le commerce, doivent avoir une composition compatible avec le plasma séminal afin de remplir leur rôle du maintien en vie des spermatozoïdes. Les différents paramètres à prendre en considérations sont :

La dilution : La dilution du sperme aviaire est très importante, étant donné que ce dernier est de nature visqueuse et très concentré, pouvant aller jusqu'à 6 (coq) et 12 (dinde) milliards de spermatozoïdes/ml (Lake, 1995). La composition des dilueurs est basée sur la composition biochimique du sperme du coq et celui du dindon (Donoghue et Wishart, 2000). Le taux de dilution optimal varie en fonction de la durée de la durée de conservation. Ce taux varie d'un minimum de deux volumes de sperme pour un volume de dilueur (2/1), jusqu'à un maximum de trois volume de dilueur pour un volume de sperme (Sexton, 1977, 1978 et 1982). La dilution du sperme permet de réduire non seulement les facteurs délétères présents dans le plasma séminal (fèces, urates, catabolites du spermatozoïde), mais renforce également les effets protecteurs de différents éléments naturellement présents dans les éjaculats (Blesbois, 2012).

Le pH : le pH optimal pour le sperme aviaire est celui proche de la neutralité, alors qu'un pH de 6 à 8 est toléré par le spermatozoïde du coq (Siudzinska et Lukaszewicz, 2008). En effet, Lake et Ravie, (1979) ; ont obtenus les meilleurs résultats de maintien de viabilité du sperme conservé à ph 6.8 ou 7.1, alors qu'un pH de 5.8 est délétère à la survie des spermatozoïdes. Le pH du milieu affecte le métabolisme et la motilité du spermatozoïde, c'est la raison pour laquelle la variation du pH au sein du milieu de conservation doit être limitée par un tampon.

L'osmolarité : les spermatozoïdes de coq gardent leur pouvoir fécondant avec une osmolarité adéquate de 325 à 350 mOsmol/kg. Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de Tris ou de citrate de sodium. En conditions hypo-osmotique, des dommages irréversibles sont constatés au niveau de la membrane et de la pièce intermédiaire suite au gonflement du spermatozoïde (Bakst, 1980).

Les substrats énergétiques : juste après la récolte, le spermatozoïde contient très peu de réserves énergétiques intracellulaires. Cependant, il peut utiliser les substrats du milieu extra-cellulaire. Les substances utilisées sont : le glucose, le fructose, et les acides gras qui permettent le maintien du métabolisme énergétique et par conséquent de la viabilité des spermatozoïdes.

1.3 Les dilueurs de semences

Les dilueurs sont souvent des solutions aqueuses qui servent à augmenter le volume initial d'un éjaculat afin de pouvoir ajuster les concentrations de conservations souhaitées. L'efficacité d'un dilueur dépend de sa composition. En effet, il doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes (glucose ou fructose), conserver un pH optimum (Tris, Hepes), une osmolarité physiologique (NaCl, KCl), empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et faciliter l'ajout d'agents cryoprotecteurs dans le cas de la cryoconservation (Gadea, 2003).

1.3.1 Effets du cholestérol

La membrane du spermatozoïde est constituée de lipides (phospholipide et cholestérol) organisés en bicouche et de protéines. A la température du corps, la membrane est dans un état «fluide» dans lequel les phospholipides et les protéines peuvent se déplacer latéralement dans la membrane (Amann et Pickett 1987). Pendant la phase de refroidissement, les membranes subissent non seulement une transition de phase mais également des pertes lipidiques. Les pertes de lipides peuvent être à l'origine de rupture membranaire, un réarrangement de lipides et protéines mais aussi la mort cellulaire (Chakrabarty at al., 2007). La capacité de la membrane à résister aux dommages du refroidissement et au changement osmotique est en relation avec la composition de la membrane en cholestérol et phospholipides (Watson, 2000). Le rapport cholestérol/phospholipide membranaire joue un rôle important dans la capacité des spermatozoïdes à résister aux dommages de la conservation pendant la réfrigération et la cryoconservation (Darin-Bennett et White, 1977).

Les spermatozoïdes humains sont caractérisés par un rapport cholestérol/phospholipide (C/P) très élevé de l'ordre de 0,99 (Darin-Bennett et White, 1977), et par conséquent ne subissent pas de transition de phase (Drobnis et al., 1993). Ceci s'explique par le fait que le cholestérol ne subissant pas de transition de phase interagit avec les phopholipides

membranaires et maintient la stabilité et la fluidité membranaire à basse température (Drobnis et al., 1993). Le ratio C/P est très variable entre les spermatozoïdes de plusieurs espèces domestiques (lapin : 0,88, bouc : 0,59, rat : 0,55, taureau : 0,45, bélier : 0,37), et les spermatozoïdes avec un faible ratio C/P, présentent une faible résistance au choc au froid pendant la conservation (Darin-Bennett et White, 1977 ; Watson, 2000). Il serait donc envisageable, pour les spermatozoïdes avec un ratio C/P faible, une supplémentation en cholestérol de leurs membranes avant la conservation qui pourrait réduire les dommages osmotiques lors du refroidissement (Purdy et Graham, 2004; Moore, et al., 2005; Moce et Graham, 2006; Peris, et al., 2007; Moce, et al., 2010a). Les spermatozoïdes de coq ont un faible ratio (C/P) qui est de l'ordre de 0,3.

1.3.2 Les cyclodextrines

1.3.2.1 Définition

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon. Les CDs les plus utilisées se composent de 6, 7 ou 8 unités α-D-glucopyranose reliées entre elles par des liaisons α-1,4. Elles sont dénommées respectivement α-CD, β-CD et ϒ-CD, et leur découverte par Villiers (Crini, 2014) remonte à 1891. Les CDs présentent une forme en cône tronqué présentant une cavité interne lipophilique (hydrophobe) et une surface externe hautement hydrophile (Dodziuk, 2006). La particularité structurale des cyclodextrines leurs confèrent la possibilité de former des complexes d'inclusion avec un nombre de molécules. Elles sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse de composés en formant des complexes d'inclusion. Possédant une cavité plutôt hydrophobe, les cyclodextrines peuvent encapsuler des substances ou des parties de molécules à caractère lipophile. Le complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules, où la molécule de CD admet à l'intérieur de sa cavité le substrat ou « invité » sans qu'aucune liaison covalente ne s'établisse (Laza-Knoerr et al., 2010).

1.3.2.2 Propriété de complexation des CDs

Les propriétés des CDs d'inclure des molécules dans leurs cavités sont largement exploitées dans plusieurs domaines : pharmacologie (Loftsson et Brewster, 1996), biologie (Moce et al., 2010a), cosmétique (Buschmann et Schollmeyer, 2002), nutrition et en chimie

principalement pour augmenter la solubilité des molécules hydrophobes telles que les stérols (Moce et al., 2010a ; Zidovetzki et Levitan, 2007) et les vitamines lipophiliques (Lopez-Nicolas et al., 2013). La complexation des molécules invitées dans la cavité des CDs présente plusieurs avantages :

- Une meilleure protection contre la dégradation causée par les UV et l'oxydation
- L'amélioration de la dissolution et de la solubilité du soluté et l'augmentation de sa biodisponibilité (dans le cas de principes actifs)
- Garder la stabilité et l'activité des substrats (Buschmann et Schollmeyer, 2002 ; Loftsson et Brewster, 1996).

1.3.2.3 Les cyclodextrines modifiées

Malgré l'accommodation des β-CDs pour la majorité des molécules invitées, elles présentent tout de même une relative solubilité. Pour cela, des modifications de structures ont étaient apportées aux CDs dans les objectifs sont : a) augmenter la solubilité aqueuse des CDs; b) augmenter leur capacité de complexation; c) accroître leur affinité pour une molécule donnée; d) introduire des groupements spécifiques facilitant la complexation; e) diminuer les dégâts provoqués au niveau des membranes cellulaires (Del valle, 2004). Le greffage de groupements méthyles améliore notablement la solubilité des β-CDs dans l'eau, avec une bonne capacité d'inclusion pour les produits faiblement solubles dans l'eau (Loftsson et Duchene, 2007).

1.3.2.4 Traitement du sperme par les β-cyclodextrines méthylées

Au cours de la dernière décennie, l'enrichissement des dilueurs de la semence de plusieurs espèces animales avec la cyclodextrine chargée en cholestérol, est largement utilisée dans plusieurs laboratoires afin de stabiliser la structure et le fonctionnement de la membrane lors de la conservation du sperme. En effet, l'encapsulation du cholestérol par la CD empêche le réarrangement des phospholipides, et augmente la fluidité de la membrane pendant la conservation à des températures basses (Blommaert et al., 2016).

L'incubation du sperme avec le complexe méthyl-β-CDs–cholestérol (CD-CHL) a permis d'incorporer le cholestérol dans les membranes des spermatozoïdes (Moore et al., 2005,

Pamornsakda et al., 2011 ; Nishijima et al., 2014 ; Purdy et Graham, 2004) grâce aux liaisons non covalentes entre CD et le cholestérol qui se cassent facilement permettant la libération de cholestérol au niveau membranaire. Cette disponibilité du cholestérol au niveau de la membrane est utilisée comme un moyen pour combattre le choc au froid du sperme. Chez le coq, le traitement du sperme avant la congélation avec CD-CHL a un impact positif sur la mobilité, la viabilité et l'intégrité de la membrane du sperme après le processus de congélation-décongelation (Chuaychu-noo etal., 2017 ; Partyka et al., 2018). En générale, les concentrations en CDs utilisées varient entre 1 et 5 mg de pour 120 x 10^6 spermatozoïdes (Moce et al., 2010b).

Les CDs naturelles et modifiées sont largement utilisées pour former des complexes avec les vitamines lipophiliques particulièrement la vitamine E (α-tocophérol) (CD-Vit E). Ce complexe CD-Vit E augmenté la solubilité de la vitamine E et sa stabilité E en protégeant la contre la photodégradation. De plus, l'inclusion de vitamine E dans les CDs n'influence pas sur son activité antioxydante. Le complexe méthyl-β-cyclodextrine-Vitamines E (M-β-CD-Vit E) amélioré aussi la solubilité et la biodisponibilité de la vitamine E. M-β-CD-Vit E est utilisé dans les tests d'évaluation de la capacité totale antioxydante des molécules. De plus, Les CD-Vit E pourraient servir dans les industries alimentaires et cosmétiques pour prolonger la stabilité à l'oxydation des aliments, mais aussi en dermatologie pour soigner la peau contre l'oxydation (Lopez-Nicolas et al., 2013 ; Koontz et al., 2009; Regiert, 2005).

Chapitre 3 : Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont le produit de la distillation obtenues de végétaux à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, voire résinoïdes. Elles sont très odorantes, volatiles, et souvent colorées (Burt, 2004). Les HE sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils (Kalemba et Kunicka, 2003). La composition phytochimique des HE dépend de la nature de la plante et le sol dans lequel la plante va croître, le temps de récolte, la partie de la plante, la préparation de l'échantillon, ainsi que la méthode d'extraction.

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence, 17 500 espèces aromatiques. La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 0.1% à 1‰. Il existe cependant quelques exceptions : ex. Badiane de Chine, où la teneur en essence est supérieure à 5%; « clou de girofle » qui renferme plus de 15% d'essence (Paris et Hurabielle, 1981; Guignard, 2000).

1.1 Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Les huiles essentielles présentent une densité inférieure à celle de l'eau avec un indice de réfraction élevé. Elles sont sensibles à l'oxydation, et leur conservation exige de l'obscurité et de l'humidité (Gharib et al., 2016).

1.2 Les composants chimiques des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est complexe, on y retrouve couramment plus de 300 composés, parmi lesquels nombre de familles chimiques. Ces molécules volatiles appartiennent pour la grande majorité à la famille des terpénes (mono et sesquiterpènes) (El Asbahani et al., 2015). Les composés terpéniques largement répandus dans le règne végétal sont classés selon leurs fonctions (alcools, cétones, aldéhydes, éthers-oxydes), et leur structure (linéaire ou cyclique). Seuls les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent être extraits par distillation

(Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Une deuxième classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des dérivés du phénylpropane (composés aromatiques)

1.3 Rôle des huiles essentielles dans la plante

La fonction biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent méconnue. Il est toutefois vraisemblable qu'elles ont un rôle écologique. Elles jouent un rôle aussi bien dans le domaine des interactions végétales (agentsallélopathiques, notamment inhibiteur de germination) que dans celui des interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs (Bruneton, 1999). Leur présence dans les racines (vétiver, gingembre), les écorces (cannelle), le bois (santal) correspond à un effet antiseptique vis-à-vis des parasites présents dans le sol ou attaquant le bois (Guignard, 2000). En plus de ces fonctions, il a été suggéré que le lieu de la sécrétion (ou l'excrétion) auprès de la surface d'un organe, indique que l'huile essentielle a une fonction qui règle le taux de transpiration.

1.4 Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Les huiles essentielles présentent une densité inférieure à celle de l'eau avec un indice de réfraction élevé et sont douées de pouvoir rotatoire ; seules trois huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : ce sont les huiles essentielles de Cannelle, de Giroflier, de Sassafras. Les huiles essentielles sont sensibles à l'oxydation, et leur conservation exige de l'obscurité et de l'humidité (Gharib et al., 2016).

1.5 Compositions chimiques des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est complexe, on y retrouve couramment plus de 300 composés, parmi lesquels nombre de familles chimiques. Ces molécules volatiles appartiennent pour la grande majorité à la famille des terpènes (mono et sesquiterpènes) (El Asbahani et al., 2015). Les composés terpéniques largement répandus dans le règne végétal sont classés selon leurs fonctions (alcools, cétones, aldéhydes, éthers-oxydes), et leur structure (linéaire ou

cyclique). Seuls les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent être extraits par distillation (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Une deuxième classe de composés volatils fréquemment rencontrée est celle des dérivés du phénylpropane (composés aromatiques).

1.5.1 Les chémotypes

La composition d'une HE de plusieurs échantillons d'une même espèce peut présenter des profils chimiques (chémotypes) différents. "Chémotype" est un mot dérivé de chimiotype, correspondant au composant majoritaire dont l'action est influencée et complétée par des molécules secondaires (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Par exemple, la verbénone est absente dans quelques HE de romarin par contre dans d'autres, elle représente plus de 20 % de l'essence. De même, le 1,8-Cinéole est détecté avec des teneurs pouvant passer de 1 à 45% (Angioni et al., 2004 ; Flamini et al., 2002). Ainsi, les huiles essentielles du romarin sont classées en fonction de leur chémotype. Cette classification capitale permet de sélectionner les HE pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace.

L'huile essentielle de romarin du Liban (Diab et al., 2002) est caractérisée par le 1,8-Cinéole (≈20%), et l'α-pinène (≈18,8 – 38,5 %). Celle de l'Inde (Jaganmohan et al., 1997) par le 1,8-Cinéole (30 %), et le camphre (≈30 %), tandis que celle provenant du Japon (Masatoshiet Hiroaki, 1997) est caractérisée par des teneurs élevées en 1,8-Cinéole (≈ 50 %) et de faibles teneurs en α-pinène et en camphre (≈ 10 %). En Algérie, Benhabiles et Aït Ammar (2001), dans une étude sur la composition de deux espèces de romarin provenant de l'Est Algérien, trouvèrent deux chémotypes différents : Rosmarinus eriocalyx à type eucalyptol (1,8-Cinéole = 42,8 %) et Rosmarinus officinalis à type β-Caryophyllène (13,9 %), camphre (12,1 %) et bornéol (10,1 %). Outaleb et al., (2015), ont étudié les huiles essentielles de trois échantillons récoltés dans trois ville du centre algérien et les résultats obtenus montrent la prédominance de l'α-pinène (24.7-51.0 %), le limonène (4.5-14.3 %) et le camphre (7.8-13.8 %), alors que le troisième échantillon présentait un chémotype camphre avec 32.0 %, camphène (22.0 %) et α-pinène (20.9 %).

1.5.2 Facteurs influençant la composition des huiles

La diversité moléculaire et le rendement en HE résultent de multiples facteurs interactifs, lesquels dérivent des conditions écosystémiques de la plante et des conditions d'extraction.

Plusieurs facteurs pouvant influencer la composition chimique et le rendement de l'HE ont été étudiés par plusieurs équipes. La saison (Jordan et al., 2006), la situation géographique : altitude, pression et précipitations (Abu-Darwish et Abu-Dieyeh, 2009 ; Zaouali et al., 2005), la durée d'ensoleillement, la composition du sol, le génotype, la période de récolte (Gharib et al., 2016), le moment de la récolte, le cycle lunaire et le moment de la journée (Naghdi Badi et al., 2004), la transformation post-récolte dont la méthode de séchage, le lieu de séchage et la méthode d'extraction sont autant de facteurs susceptibles d'exercer des modifications chimiques sur les HE (Gharib et al., 2016).

1.5.3 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les rendements de l'extraction des HE sont très faibles, ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle (El-asbahani 2015). Ce principe est utilisé avec trois procédés différents : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entrainement à la vapeur d'eau. Ce dernier procède à l'extraction sans contact direct entre la plante et l'eau, avec une durée d'extraction moins longue à l'origine d'une réduction des altérations chimiques (Masango, 2005). De nouvelles techniques ont vu le jour, avec comme objectif de réduire le temps d'extraction, la consommation d'énergie et l'utilisation de solvant. Les techniques d'extractions à l'eau subcritique et au CO_2 supercritique semblent ainsi les plus prometteuses, notamment d'un point de vue environnemental (Herrero et al., 2006).

1.5.4 Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Les pharmacopées recommandent différents essais pour l'analyse des HE soit : évaluation de la miscibilité à l'éthanol, mesures physiques (indice de réfraction, angle de rotation optique, densité relative, parfois point de solidification), détermination des indices d'acide, d'ester, de carbonyle, éventuellement la recherche des huiles grasses et des huiles essentielles résinifiées, détermination du résidu d'évaporation, etc… Elles exigent également l'analyse des HE par une technique chromatographique. L'analyse chromatographie permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention. La séparation des composés volatils s'effectue en général par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour les composés pas ou peu

volatiles. Récemment, La CPG couplée à la SM (spectromètre de masse) est la technique de routine la plus utilisée. Cette dernière permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Evans et Haken, 1989).

1.5.5 Activités biologiques des huiles essentielles

Les substances élaborées par les plantes aromatiques, comme d'ailleurs la plupart des substances d'origine végétale, sont douées de diverses propriétés biologiques et fonctions.

1.5.5.1 Activités antioxydantes

De nombreuses plantes aromatiques présentent un potentiel antioxydant grâce à leurs huiles essentielles riches en phénylpropanoides (Bunrathep et al., 2007) capable de piéger les radicaux libres. Parmi les plantes aromatiques à fort pouvoir antioxydant, on peut citer : la sariette, la marjolaine, le clou de girofle, le piment, le gingembre, le curcuma, le romarin, la sauge, le thym et l'oignon (Teuscher et al., 2004).

Le potentiel antioxydant des molécules phytochimiques consiste à piéger et à neutraliser les formes toxiques de l'oxygène en les réduisant par transfert direct d'électron ou d'hydrogène sur leur dernière couche électronique (Ghedira, 2005). De ce fait, ces molécules interfèrent et bloquent la propagation de la réaction radicalaire en chaîne grâce à leur caractère réducteur en devenant, elles-mêmes, des radicaux phénoxyls assez stables grâce au phénomène de résonance. Par ailleurs, ces mêmes molécules peuvent assurer indirectement une protection, par l'activation des systèmes des défenses enzymatiques endogènes antioxydants ou par l'activation des systèmes de défenses non enzymatiques. Plus encore, par la modulation des processus de la signalisation cellulaire telles que l'activation du facteur NF-κB, de la liaison de l'AP-1 à l'ADN, de la biosynthèse du glutathion, de la voie PI3-kinase/Aktles, des protéines MAPK (ERK, JNK et P38), et la translocation du NrF2 dans le noyau (Chen et al., 2000; Shen et al., 2007).

1.5.5.2 Autres activités

En phytothérapie, les huiles essentielles sont aussi utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes (Boutabia et al., 2016 ; Burt, 2004, Outaleb et al., 2015). En effet, les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures. Les HE possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

D'autres part, la principale activité de certaines plantes aromatiques consiste à stimuler physiologiquement les sécrétions enzymatiques des glandes salivaires ; les sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que l'excrétion biliaire, ce qui se traduit globalement par un effet stimulant sur la digestion (Lubinic, 2003). Les plantes aromatiques exercent encore diverses activités biologiques tels que : activités antimutagènes (Marzouk et al., 2006), activités anti-tumorales (Nieto et al., 2011), antiangiogénique et neuroprotecteur (Kayashima et Matsubara, 2012), hépatoprotecteur (Rašković et al., 2014), contre la maladie d'Alzheimer (Habtemariam, 2016) et l'effet carminatif (Teuscher et al., 2004).

1.5.5.3 Utilisation des HE du romarin et de l'armoise blanche

Plusieurs recherches réalisées sur les effets des huiles essentielles du romarin montrent clairement des propriétés antibactériennes et antioxydantes (Frankel et al., 1996 ; Outaleb et al., 2015 ; Raskovic et al., 2014). En effet, l'huile essentielle du romarin peut être utilisée par voie externe (Dias et al., 2000),par la voie interne comme diurétique et emménagogue (Haloui et al., 2000) et come anti-carcinogénique (Offord et al., 1995). Calabres et al. (2000), démontrèrent la capacité des extraits de romarin a protégé la peau des lésions cutanées induites par les radicaux libres.

Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des HE dans le domaine alimentaire. Le romarin avec ses effets antioxydants, est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments (Kadri et al., 2011 ; outaleb et al., 2015). D'autre part, l'armoise blanche (Artémisia herba alba) est utilisée en médecine traditionnelle pour faciliter la digestion, calmer les douleurs abdominales et certains malaises du foie et possède également des propriétés antidiabétique (Khlifi et al., 2013 ; Jaouadi et al., 2014).

Chapitre 4 : le stress oxydatif

1. Le stress oxydatif

Le dioxygène est un élément essentiel à la survie des organismes aérobies car il intervient durant la phosphorylation oxydative, processus cellulaire qui aboutit à la formation d'ATP (adénosine triphosphate). En parallèle à la formation de l'ATP, des radicaux libres peuvent être produits au sein des mitochondries. Le dioxygène intervient à la fin de ce processus en tant qu'accepteur final d'électrons. Ainsi, la réduction mono-électronique du dioxygène en eau se fait en quatre étapes (**Figure 6**). Cependant la réduction reste incomplète, 1% à 4% d'oxygène fuit la chaîne de transport d'électrons sous la forme d'O2.–. Ce dernier est produit au niveau du complexe I et du complexe III, et la majeure partie de l'O2.–est converti par la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) dans la matrice mitochondriale en H2O2 qui diffuse ensuite facilement à travers les membranes mitochondriales. Le H2O2 est réduit en H2O et en O2 par la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase. Par ailleurs, le H2O2 réagit avec les métaux de transition particulièrement Fe2+ (réaction de Fenton) pour former le radical hydroxyle (OH.) (Gardès-albert et al., 2003 ; Lushchak, 2014).

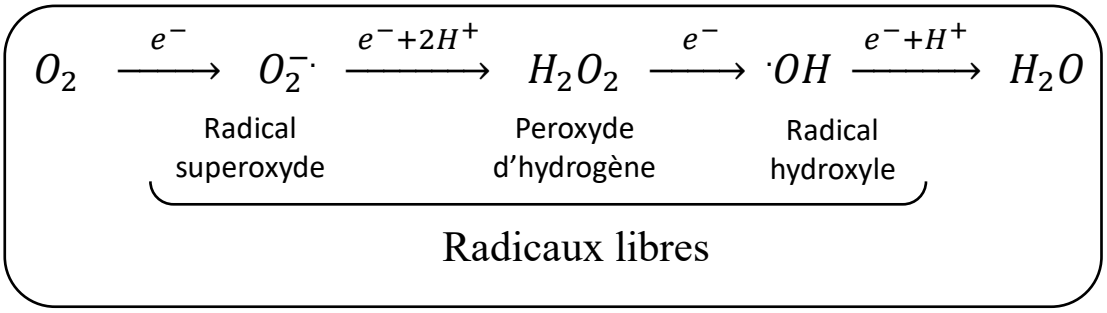


Figure 6 : Produits intermédiaires réduits de l'oxygène : le radical superoxyde ($O_2^{-\cdot}$),, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl ($^{\cdot}OH$), respectivement, issus des quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène.

Aujourd'hui, les termes antioxydants, stress oxydant, radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène, sont des termes familiers tant dans le monde scientifique que dans le grand public. Chez l'homme, la dérégulation des processus physiologiques et l'exposition à des facteurs externes comme la pollution, la consommation d'alcool et de tabac et les radiations peuvent entrainer une production excessive d'espèces oxygénées réactives (EROs) que les cellules ne peuvent contrôler (Phaniendra et al., 2015). A ce moment-là, la balance EROs/antioxydants est

en faveur des EROs et prend le nom de stress oxydant (Sies, 1991). Toutefois, un radical libre peut être dérivé de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (RNS)

1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

a. L'anion superoxyde

L'anion radicalaire superoxyde (O2•-) est le principal radical libre produit par la cellule dans une situation de stress oxydant (**Tableau 2**). Il est moyennement dangereux puisqu'il est incapable de traverser les membranes biologiques (Mandelker, 2008). Il est produit dans la mitochondrie au cours de la respiration cellulaire qui permet la formation d'ATP et la réduction du dioxygène en eau. Il peut aussi être produit par des enzymes telles que la xanthine oxydase, les cyclo- et lipo-oxygénases ou encore la NADPH oxydase.

b. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas une espèce radicalaire. Il est formé par la dismutation spontanée ou enzymatique de l'anion superoxyde. Les effets délétères de cette molécule viennent du fait qu'elle intervient dans la formation d'espèces très réactives. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène est la source de la formation de radicaux hydroxyles.

c. Le radical hydroxyle (HO°)

Le radical hydroxyle est l'une des espèces réactives les plus nocives. Dès lors qu'il est formé, ce radical est capable de s'attaquer sans spécificité aux macromolécules biologiques (Mandelker, 2008).

1.2 Les espèces azotées actives

Les espèces radicalaires comportant de l'azote sont appelées, espèces azotées réactives. Elles sont dérivées du monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) *via* les systèmes enzymatiques (l'oxyde nitrique synthase ou NOS en anglais : *nitrique oxide synthase*). Le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), est synthétisé à partir d'une molécule d'oxygène, et d'un atome d'azote obtenu de l'acide aminé L-arginine. En réaction avec l'oxygène ou l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le $NO^{\cdot}$ peut former respectivement le dioxyde d'azote ($NO_2^{\cdot}$) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) qui sont plus réactifs (Marnett *et al.* 2003).

Tableau 2. Les principales espèces réactives (Halliwell, 1996).

Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	
Radical	**Non-radical**
Superoxyde $O_2^{-\cdot}$ Hydroxyl $^{\cdot}OH$ Peroxyl $RO_2^{\cdot}$ Alkoxyl $RO^{\cdot}$ Hydroperoxyl $HO_2^{\cdot}$	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Acide hypo-chlorure $HOCl$ Ozone O_3 Oxygène singulet O^-
Espèce réactives de l'azote (RNS)	
Radical	**Non-radical**
Oxyde nitrique $NO^{\cdot}$ Dioxyde de nitrogène $NO_2^{\cdot}$	Nitrosyl NO^- Acide nitrous HNO_2 Nitroxyde NO Dinitrogène tetroxide N_2O_4 Dinitrogène trioxyde N_2O_3 Peroxynitrie $ONOO^-$ Acide peroxynitrous $ONOOH$ Cation nitronium, Nitryl NO^+ Alkyl peroxynitites $ROONO$

1.3 Les cibles des ERO

Les ERO sont produites au sein de divers compartiments cellulaires comme les peroxysomes, le réticulum endoplasmique ou encore la mitochondrie qui est responsable de la production de 90% des ERO (Lushchak, 2014). A l'état physiologique, les ERO participent dans la régulation des processus cellulaires, et la survie de ces cellules est liée au maintien de l'homéostasie redox. Cependant, la dérégulation des processus physiologiques peut entrainer une production excessive d'ERO que les cellules ne peuvent contrôler (Phaniendra et al., 2015).

a. Oxydation des lipides

L'oxydation des lipides ou peroxydation lipidique, correspond à la détérioration oxydative de doubles liaisons d'acides gras insaturés. Les lipides membranaires, en particulier les acides gras polyinsaturés, sont sensibles aux attaques des EORs. Cette réaction a lieu en

trois étapes (initiation, propagation et terminaison) et présente la particularité d'être auto-catalytique car une fois initiée, elle se propage et s'accélère seule (Wheatley, 2000). Au niveau cellulaire, tous les composants de la cellule sont affectés, particulièrement, les membranes plasmiques, mitochondriales et lysosomales. La peroxydation lipidique induit ainsi une perturbation dans la structure et la composition de la membrane cellulaire qui se manifeste le plus souvent par une augmentation de la perméabilité membranaire, la fluidité, et la modification du transport des ions et par conséquent l'inhibition de processus métaboliques (Catala, 2012). A la fin de la cascade de réaction chimique, il résulte la formation de plusieurs molécules, dont le malondialdéhyde (MDA). Ce dernier, peut interagir avec l'acide thiobarbiturique est former un composé fluorescent, attribuant ainsi le nom du test de mesure des MDA de TBARS (substance réagissant avec l'acide thiobarbiturique) (Michel et al., 2008).

b. Oxydation des acides nucléiques

L'oxydation de l'ADN est un facteur d'instabilité majeur du génome. Les radicaux hydroxyles sont à l'origine de la majorité des dommages oxydatifs de l'ADN (Phaniendra et al., 2015). Des modifications des bases azotées, en particulier la guanine peuvent être observées. Cela aura comme conséquence un non appariement, ou blocage total de la réplication de l'ADN (Halliwell, 1999). Ces lésions multiples, allant des cassures simples et double brin peuvent être la conséquence de l'oxydation des bases azotées (Kryston et al., 2011). Les EROs peuvent aussi s'attaquer à l'ARN qui est plus vulnérable que l'ADN, avec comme conséquence l'altération de la traduction et donc de la synthèse de protéines (Li et al., 2014).

Les conséquences des EROs sur l'ADN peuvent être fatales à l'échelle de l'organisme mais aussi au niveau cellulaire. En effet, l'oxydation de l'ADN participe à la mutagénèse, à l'arrêt des divisions cellulaires, à l'arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription/traduction, et enfin à une mort cellulaire (Dizdaroglu et jaruga, 2012).

c. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines peut avoir lieu à deux niveaux différents : celui qui casse les liaisons peptidiques et modifie la chaine peptidique et celui qui modifie les peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Le radical hydroxyle est particulièrement capable de former de radicaux peroxyles, qui peuvent entraîner la fragmentation des protéines (Höhn et

al., 2013). Ces modifications conduisent à une dénaturation ou altération de la structure des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de l'activité enzymatique, augmentation de la sensibilité aux protéases, et la perte de fonction des récepteurs et des protéines de transport (Stadtman et levine, 2006).

1.3 Le rôle physiologique des radicaux libres au niveau du spermatozoïde

Le spermatozoïde en conditions physiologiques produits des EORs. La production de ces espèces réactives en faible quantité, est nécessaire à différentes fonctions spermatiques (**Figure 7**) comme l'activation de la motilité, la capacitation, la réaction acrosomique et l'hyperactivation (Kothari et al., 2010). Chez les mammifères, les EORs interviennent durant le transit épididymaire par le remodelage des membranes et une condensation nucléaire (de Lamirande et O'Flaherty, 2008). Au niveau du tractus génital femelle, les EORs jouent un rôle primordial dans le processus de capacitation, l'acquisition d'une mobilité hyperactive, de la réaction acrosomique, et enfin la fusion avec la zone pellucide indispensable à la fécondation (Shiva et al., 2011; Methorst et Huyghe 2014).

Pendant le processus de capacitation, une quantité importante de cholestérol est extraite de la membrane du spermatozoïde (Shadan et al., 2004). L'efflux du cholestérol de la membrane plasmique, peut être expliqué par l'action des EORs qui oxydent le cholestérol entrainant la formation d'un groupement hydroxyle hydrophile sur sa partie hydrophobe. Cela peut induire une faible attraction du cholestérol pour la membrane plasmique et donc son retrait de la bicouche lipidique (Silva et Gadella, 2006; Brouwers et al., 2011).

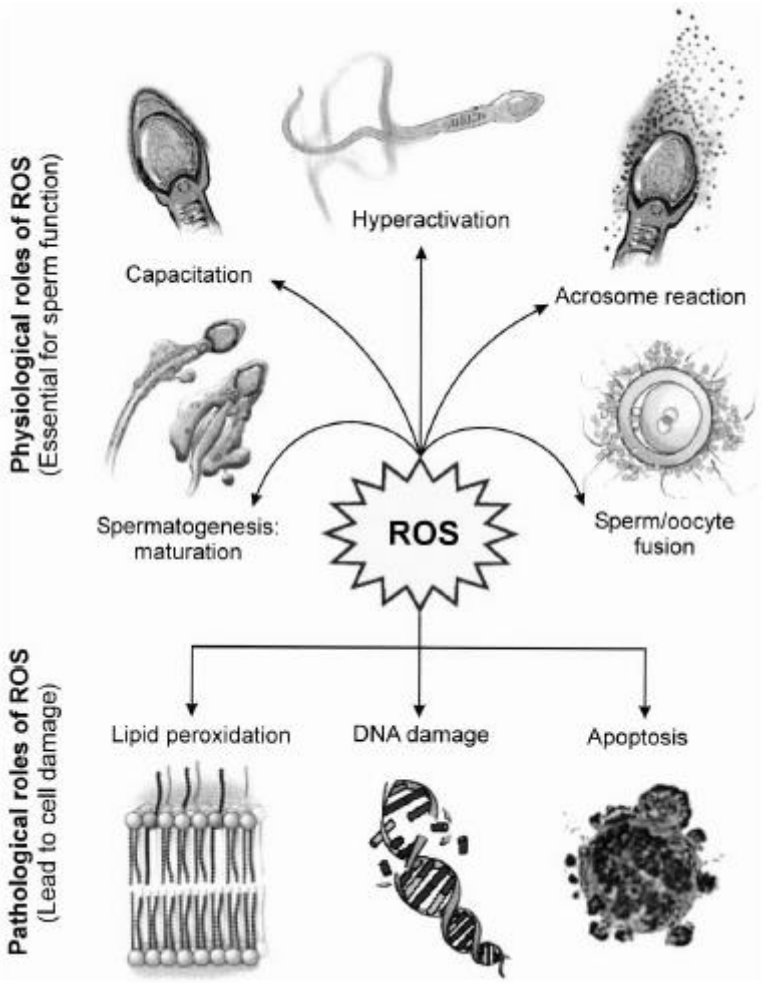


Figure 7 : le rôle physiologique et pathologique des ROS (Kothari et al., 2010).

1.4 Concept antioxydant en reproduction aviaire

1.4.1 Le stress oxydant et la reproduction aviaire : rôle des antioxydants

Les spermatozoïdes aviaires sont uniques par leur structure et leur composition. En effet, la composition lipidique de la membrane est caractérisée par une proportion extrêmement élevée en acides gras polyinsaturés à longue chaine dans la fraction phospholipidique du spermatozoïde. Cette proportion élevée d'AGPI est nécessaire pour le maintien des propriétés membranaires spécifiques (fluidité, flexibilité, etc.) (Donoghue et Donoghue, 1997; Zaniboni et al., 2006). Cependant, cette situation rend le spermatozoïde susceptible à la peroxydation lipidique et aux EOR (Aitken et al., 1989 ; Kelso et al., 1996 ; Agarwal et Prakaran, 2005). Pour cette raison, un statut de défense antioxydante est la clé pour le maintien de l'intégrité membranaire, la mobilité et le pouvoir fécondant du spermatozoïde. Dans les circonstances

physiologiques, il existe un équilibre entre la génération des EOR et les antioxydants. L'augmentation de la production des EOR associée à une baisse du pouvoir antioxydant entraîne un stress oxydatif. Les antioxydants peuvent éliminer, piéger les EOR, comme ils peuvent s'opposer à leur action (Agarwal et Prakaran, 2005).

Chez les volailles, le système antioxydant est organisé sur trois niveaux : Le premier niveau est basé sur l'activité de la SOD, de la glutathion peroxydase (GSH-Px) et de la catalase. Elles sont responsables conjointement de la prévention de la formation des radicaux. Le second niveau de défense comprend les vitamines A et E, l'acide ascorbique, l'ubiquinol, l'acide urique et les caroténoïdes, et dont le rôle consiste à bloquer la propagation de la réaction radicalaire en chaîne grâce à leur caractère réducteur. Enfin, un troisième niveau de défense basé sur l'activité enzymatique spécifique, qui consiste à réparer voir éliminer des molécules endommagées. Ce troisième niveau fait intervenir des lipases, des peptidases et d'autres enzymes (Panda et Cherian, 2014 ; Surai, 2016b).

1.4.2 Les défenses antioxydantes

L'organisme a développé des mécanismes de défense antioxydante qui peuvent être enzymatique ou non-enzymatique. Les deux systèmes luttent contre la toxicité des EOR en piégeant, et en minimisant la formation de EOR se protéger des effets délétères du stress oxydant. Une production excessive des EOR associé à une baisse du système de défense antioxydant (enzymatique et non enzymatique), crée un déséquilibre entre la production des EORs et leur élimination par le système de défense (Storey, 1996). D'après Halliwell (1996), les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :Le piégeage direct des EOR, l'inhibition des enzymes responsables de la production des EOR et la protection par les systèmes de défense antioxydants.

1.4.2.1 Antioxydants enzymatiques

1.4.2.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est l'une des enzymes cellulaires les plus importantes. Elle assure la première ligne de défense contre le stress oxydant. Chez la volaille, la SOD prévient la peroxydation des lipides au niveau des tissus embryonnaires et au niveau des membranes du spermatozoïde. Elle joue aussi un rôle important dans la lutte contre le stress oxydatif en production intensive, en relation avec les changements de la température ambiante dans les élevages (stress thermique

ou stress du froid). La SOD joue également un rôle lors de la toxicité et des conditions de productions difficiles (Surai, 2016a).

1.4.2.1.2 Glutathion peroxydase GPX

La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme séléno-dépendante, dont il existe plusieurs isoformes, réparties différemment dans la cellule. Elle catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et lipidiques (ROOH) respectivement en eau et alcool (ROH). Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite (GSH) (Deaton et Marlin, 2003). La glutathion réductase (GR) a pour rôle de régénérer le GSH.

1.4.2.1.3 La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes, et en faible quantité dans le cytosol. Elle assure la transformation et la détoxification du H_2O_2 en H_2O et O_2. Contrairement à la GPX, l'affinité de la CAT pour l'H_2O_2 est élevée seulement lorsque la teneur en peroxyde d'hydrogène est élevée (Matés, 2000).

1.4.2.2 Les antioxydants non-enzymatiques

1.4.2.2.1 La vitamine E

La vitamine E est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Il existe au moins huit formes de vitamine E dont la plus active est l'α-tocophérol. Le caractère hydrophobe de la vitamine E permet son insertion dans les membranes riches en acides gras polyinsaturés. Elle permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire en réagissant avec les radicaux peroxyls (ROO•), empêchant ainsi la propagation en chaine de la peroxydation lipidique (Panda et Cherian, 2014), et prévient les dommages tissulaires causés par les EOR, particulièrement les membranes riches en AGPI (Voljc et al., 2011). La vitamine E est longtemps reconnue comme vitamine anti-stérilité. Elle a été découverte pour la première fois dans le sperme aviaire en 1981. Dans le but d'améliorer les capacités de reproduction des coqs reproducteurs, la supplémentation alimentaire en vitamine E est généralisée en élevage. La supplémentation de l'aliment des reproducteurs avec 200mg/kg de vitamine E, améliore

considérablement les concentrations de cette vitamine au niveau du sperme (Surai et al., 1997). Il a été démontré que l'augmentation de la quantité de vitamine E dans le sperme entraîne une réduction significative de la sensibilité à la peroxydation lipidique (Lin et al., 2005).

1.4.2.2.1 La vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant hydrosoluble qui est normalement synthétisé par les volailles. Elle joue un rôle important dans la protection de divers substrats biologiques comme l'ADN, les protéines et les acides gras. L'incorporation de la vitamine C dans l'alimentation de la volaille est recommandée pour atténuer le stress d'élevage, en supposant que, pendant que la volaille subit un stress, les besoins en vitamine C dépassent les capacités de synthèses (Gous et Morris, 2005). Dans une étude réalisée par Nowaczewski et Kontecka (2005), il a été montré que l'acide ascorbique contribuait à 65% de la capacité antioxydante du plasma séminal. Lors de l'oxydation de la vitamine C, elle passe à une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyle) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E pour la prévention de la peroxydation lipidique (Amini et al., 2015).

1.4.3 Evaluation du stress oxydant

Il est admis aujourd'hui que le stress oxydatif est une cause majeure de l'infertilité masculine, la mesure des radicaux libres dans le sperme devient nécessaire pour le diagnostic des problèmes de l'infertilité. Le stress oxydant peut-être évalué par trois grandes voies d'approches (Kohen et al., 2002) : la mesure de la production des EOR, la mesure des paramètres antioxydants et la mesure des marqueurs du dommage radicalaire (protéines, lipides et acides nucléiques).

1.4.3.1 Mesure directe des radicaux libres

La chimiluminescence est une méthode qui permet de mesurer la lumière produite par la décomposition de radicaux libres. C'est une méthode qui quantifie les EOR intra et extracellulaire. En pratique, cette méthode mesure plutôt la lumière produite par réaction des radicaux libres avec des sondes lucigéniques comme le luminol ou la lucigénine (Aitken et al., 2004). La réaction de EOR avec ces sondes conduit à la production d'un signal qui est converti en un signal électrique et mesuré par luminomètre (Agarwal et al., 2004). Les méthodes de

chimiluminescence sont en général extrêmement sensibles et permettent de mesurer facilement des faibles niveaux de lumière.

1.4.3.2 Mesure des dommages radicalaires

1.4.3.2.1 Mesure de la peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides suite au stress oxydant, engendre un certain nombre de produits de dégradation des lipides et des lipoprotéines. La peroxydation lipidique par les radicaux libres est simple à mesurer lors de l'étude du stress oxydant. Les diènes conjugués et les aldéhydes sont les paramètres les plus importants dans le sang (Moore et al., 1998).

Pour des raisons de spécificité de l'analyse, les aldéhydes sont les plus indiqués pour la mesure de la peroxydation lipidique. Le malondialdéhyde est le marqueur le plus utilisé pour la peroxydation des lipides (Aitken et al., 1993). Le dosage du MDA qui est le plus utilisé, peut être spécifique en utilisant la HPLC avec détection fluorimétrique (Richard et al., 1992). Le MDA pourrait aussi être déterminé indirectement à partir du dosage d'autres aldéhydes : c'est ce qu'on appelle le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Del Rio et al., 2005). La méthode des TBARS repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre la malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm. Cette réaction avec le TBA mesure aussi bien le MDA, les peroxydes lipidiques, et les produits d'auto-oxydation des acides gras et d'autres substances qui donnent naissance au MDA (Gutteridge et al., 1974). La détermination du TBARS apparaît comme un test donnant des résultats globaux de la peroxydation lipidique, tandis que le dosage spécifique de la MDA concerne l'une des molécules finales formée au cours du stress oxydant (Lefévre et al., 1998).

1.4.3.2.2 Mesure de l'oxydation des protéines

Les protéines comme les lipides sont aussi la cible de réactions oxydatives, et peuvent ainsi subir des modifications sous l'action des EOR qui peuvent se manifester par l'apparition de groupements carbonylés. En pratique, la réaction avec le dinitrophényl hydrazine (DNPH) est utilisée pour la détection des groupements carbonylés au niveau des protéines oxydées. En présence du DNPH, les dérivés carbonylés peuvent être dosés dans les échantillons biologiques

par spectrophotométrie, HPLC, ou grâce à l'utilisation d'anticorps mono-ou polyclonaux (Dalle-Donne, 2003).

1.4.3.2.3 Capacité antioxydante totale

La mesure de la capacité antioxydante totale (TAC) du plasma séminal donne une mesure indirecte du stress oxydatif. Le test TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) est le plus populaire. Le principe de cette méthode est d'enregistrer la consommation par dosage colorimétrique du radical ABTS$^{\bullet+}$[2,2'-azinobis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique)], suite à l'addition d'une solution contenant l'antioxydant. Le radical ABTS$^{\bullet+}$ est relativement stable avec une forte absorption dans l'intervalle 600-750 nm, produisant ainsi une substance colorée qui peut être mesurée par spectrophotométrie. La concentration ABTS$^{\bullet+}$ consommée durant la réaction avec l'échantillon est déterminée et exprimée en equivalent Trolox (équivalent hydrophile de l'α-tocophérol), ce qui correspond à la concentration de Trolox donnant la même capacité antioxydante qu'un mM du composé testé (Roginsky et Lissi, 2005).

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

Ce travail de recherche a été réalisé au niveau du laboratoire de biotechnologies de reproduction de l'université d'Abderrahmane Mira (Béjaïa) sur plusieurs périodes allant de 2013 à 2017. Le présent travail a été réalisé en ayant deux expérimentations distinctes. La première a pour objectif, dans une première étape, l'étude des effets des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artémisia herba alba*), et du romarin (*rosmarinus officinalis*) sur les paramètres de mobilité du sperme du coq, après une conservation à 4°C pendant 48 heures. La deuxième étape consiste en la quantification de la peroxydation des lipides membranaires et de la capacité antioxydante totale du sperme conservé après 6 et 24 h à 4°C. Dans la deuxième expérimentation, l'objectif fixé est l'étude de l'impact de l'association cyclodextrine-vitamine E (CDVitE), et du complexe Cyclodextrine-cholestérol-vitamine E (CDCholVitE) sur les paramètres de mobilité du sperme du coq après conservation à 4°C pendant 48 heures.

1.1 Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la législation régissant le traitement éthique des animaux. Des coqs reproducteurs de la souche commerciale chair Hubbard âgés entre 35 et 55 semaines ont été utilisés durant l'expérimentation. Les animaux ont été logés en cages individuelles classiques, sous 14 h d'éclairement quotidien, nourris avec un aliment commercial standard à raison de 155 g/jour/animal.

1.1.1 Collecte et dilution de la semence

Les coqs sont soumis à des collectes de semences bi-hebdomadaires par massage dorso-abdominal comme décrit en 1937 par Burros et Quinn. Cette une technique pratiquée par deux personnes en prenant soin de ne pas stresser l'animal. Pour l'analyse du sperme, les éjaculats collectés sont d'abord mélangés en pools, puis traités par les milieux de conservation et enfin analysés. Afin de minimiser le stress des animaux et obtenir une semence de qualité, la collecte est réalisée par un même opérateur et toujours dans les mêmes conditions. Des précautions ont été prises durant la collecte pour éviter toute contamination par les liquides du cloaque. Juste après la collecte de la semence, le pool est dilué par un facteur de 1/1 (v/v) à température ambiante (18-22°C) dans deux milieux : le milieu commercial IMV (Aigle France), et le Tris dont la composition est la suivante : 2.42 g Tris (hydroxymethylaminomethane) + 1 g fructose

+ 1.38 g acide citrique + 100 mg pénicilline + les traitements dans 100 ml d'eau distillée. Après l'estimation de la qualité et de la concentration du sperme, la quantité de dilueur à apporter est calculée pour obtenir une concentration finale de 2.10^{9} spz/ml. Les échantillons sont maintenus à une température de 4°C aussitôt dilués.

1.1.2 Calcul de la concentration

L'appréciation de la concentration est primordiale afin de pouvoir déterminer le facteur de dilution. Le comptage avec une cellule de comptage (hématimètre), donne avec précision la concentration spermatique si elle est soigneusement effectuée. Le principe est de compter le nombre exact de cellules spermatiques présentes dans un volume déterminé d'une solution de dilution connue à l'aide d'un quadrillage tracé sur la lame de Mallassez (**Figure 8**). Le quadrillage est constitué de 10 bandes verticales de 0,25 mm de largeur et de 10 bandes horizontales de 0,20 mm de largeur formant ainsi 100 rectangles dont les dimensions sont les suivantes :

Longueur = 0,25 mm

Largeur = 0,20 mm

Profondeur = 0,20 mm

Le volume total de la cellule est donc de 1 mm3.

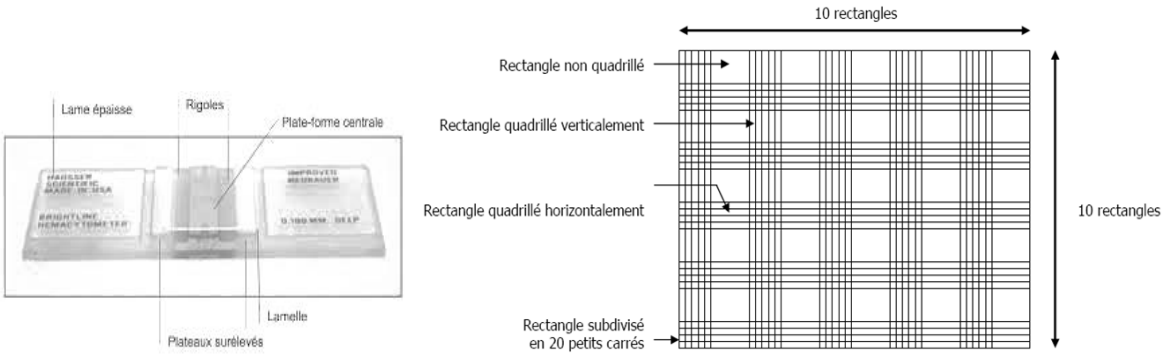


Figure 8 : Cellule de Mallassez avec les dimensions du quadrillage.

Les étapes du comptage à l'hématimètre sont les suivantes :

- La dilution de la semence par un facteur de 1000 dans du sérum physiologique formolé (3.7%).
- Adhésion de la lamelle sur les deux côtés de la grille après humidification des deux plateaux latéraux
- Dépôt d'une petite quantité de la solution sans bulle d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Par le phénomène de capillarité, la gouttelette se répartit entre lame et lamelle. Laisser reposer quelques minutes afin que les spermatozoïdes sédimentent sur le fond de la lame.
- Le comptage est réalisé avec un microscope avec un objectif 40
- Calcule du nombre de spermatozoïdes dans vingt petits carreaux, et la concentration sera calculée en appliquant la formule suivante :

La concentration = (N° de spermatozoïdes) / (N° de carreaux) × 100 × 103 × le taux de dilution. Cette technique est précise, simples et ne nécessitent pas un matériel sophistiqué. Cependant, elle demande beaucoup de temps et elle ne peut donc être mise en œuvre dans les conditions de routine dans un centre d'insémination artificielle (IA).

1.2 Matériel végétal

1.2.1 Armoise blanche (Artemisia herba-alba)

L'armoise blanche (*Artemisia Herba Alba*) est une plante spontanée appartenant à la famille des Asteraceae (**Figure 9**). C'est une plante essentiellement fourragère, très appréciée par le bétail comme pâturage d'hiver. Elle présente une odeur caractéristique de l'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent. Plusieurs noms sont attribuées à l'espèce *Artemisia herba-alba*; thym des steppes, absinthe du désert. En Algérie, *Artemisia herba alba*, connue sous le nom de « chih », couvre près de six millions d'hectares dans les steppes, elle se présente sous forme de buissons blancs, laineux et espacés (Bouzidi, 2016).

Les échantillons de la partie aérienne (tiges et feuilles) d'*Artemisia herba-alba* ont été récoltés durant le mois d'avril 2015, dans la région d'El-Euche, dans la Wilaya de Bordj Bou Arreridj, Algérie. Les plantes récoltées ont été séchées à l'ombre pendant 10 jours.

Figure 9 : *Artemisia herba-alba* dans son milieu naturel au début de la saison de floraison

1.2.2 Romarin (Rosmarinus officinalis L.)

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un arbrisseau de la famille des Labiées, répandu sur toutes les rives de la méditerranée (**Figure 10)**. En Algérie, le romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national. Aujourd'hui, plusieurs recherches réalisées sur les effets des huiles essentielles du romarin montrent clairement des propriétés antibactériennes et antioxydantes (Frankel et al., 1996 ; Outaleb et al.,2015 ; Raskovic et al., 2014).

Les échantillons de la partie aérienne (tiges et feuilles) du Romarin (*Rosmarinus officinalis .L*) ont été récoltés durant le mois d'avril 2015, dans la région d'El-Euche, dans la Wilaya de Bordj Bou Arreridj, Algérie. Les plantes récoltées ont été séchées à l'ombre pendant 10 jours.

Figure 10 : Feuilles et fleurs du Romarin

1.3 Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Les distillations ont été réalisées par ébullition pendant trois heures. Les extraits bruts de chaque huile ont été conservés à 4°C dans des fioles scellées hermétiquement jusqu'à utilisation ultérieure.

1.3.1 Analyse de l'huile essentielle

L'identification des composés actifs de l'huile essentielle de l'armoise a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse de type HP Agilent 2890 couplée à la spectrométrie de masse 6890 (CPG/SM), équipée d'une colonne capillaire de silice fondue (HP-5MS, Longueur : 30 m, Diamètre interne : 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm). La température de l'injecteur a été maintenue à 250°C et l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (0,5 ml / min) avec un volume d'injection de 0,2 µl et le rapport de division est ajusté à 1/20. La température du four a été programmée à partir de 60 (8 min) à 280°C à raison de 2°C/min et ensuite maintenue de façon isotherme à 280°C pendant 10 min. Le mode d'analyse : numérisé, la température de l'interface: 280°C, le type d'ionisation: électronique, l'intensité du filament: 70eV, type d'analyseur de masse: quadripôle, la température source: 230°C, vide: 65m torr.

Dans le présent travail, les deux huiles essentielles (armoise et romarin) ont été analysées et l'identification des composés actifs a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse de type HP Agilent 2890 couplée à la spectrométrie de masse 6890 (CPG/SM), équipée d'une colonne capillaire de silice fondue (HP-5MS, Longueur : 30 m, Diamètre interne : 0.25 mm, épaisseur du film 0.25 µm). La température de l'injecteur a été maintenue à 250°C et l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (0.5 ml / min) avec un volume d'injection de 0.2 µl et le rapport de division est ajusté à 1/20. La température du four a été programmée à de 60 à 280°C à raison de 2°C/min et ensuite maintenue de façon isotherme à 280°C pendant 10 min. Le mode d'analyse numérisé, la température de l'interface: 280°C, le type d'ionisation: électronique, l'intensité du filament: 70eV, type d'analyseur de masse: quadripôle, la température source: 230°C, vide: 65m torr.

Expérimentation1 : Etude de l'impact des huiles essentielles de l'armoise blanche et du romarin sur le sperme du coq conservé à 4°C pendant 48 heures

Le pool de sperme, constitué à partir de plusieurs éjaculats, est dilué V/V dans le milieu Tris : 3,028 g de Tris (hydroxyméthylaminométhane) + 1,25 g de fructose + 1,70 g d'acide citrique + 800 U.I./ml de pénicilline G sodique + 1 mg/ml de sulfate de streptomycine dans 100 ml d'eau distillée. Les HE (romarin et armoise) sont diluées dans le même tampon Tris, ayant servi pour le sperme pur, pour obtenir des milieux appelés A pour armoise et R pour romarin. Trois concentrations sont obtenues pour les deux huiles, 870 µg /ml (A : armoise, R : romarin), 87 µg /ml (A5 : armoise, R5 : romarin) et 8.7 µg /ml (A10 : armoise, R10 : romarin). Ensuite, 100 µl de sperme dilué sont ajoutés à 400 µl de chaque préparation en HE (1/4, V/V). Le sperme dilué dans le milieu Tris sans supplémentation en HE et le milieu commercial IMV (IMV, France) sont considérés comme témoins.

1.4 Préparation des complexes de cyclodextrines

La méthyl β-cyclodextrine de par sa structure est la cyclodextrine la plus indiquée pour le traitement de la semence en raison de sa meilleure affinité pour le cholestérol (Semalty, 2014). La préparation du complexe méthyl-β-cyclodextrine cholestérol (CD-CHL) a été réalisée comme décrit par Purdy et Graham (2004). Le principe consiste à dissoudre dans un tube à essai en verre, 1 g de méthyl-β-cyclodextrine dans 2 ml de méthanol. Un deuxième tube à essai en verre a été utilisé pour dissoudre 200 mg de cholestérol dans 1 ml de chloroforme. Une portion de 0,45 ml de la solution de cholestérol a été ajoutée à la solution de cyclodextrine. Le mélange

obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été éliminé par évaporation rotative (sous vide) et le résidu a été conservé dans un dessiccateur. Le complexe méthyl-β-cyclodextrine–vitamine E (CDVit E) a été préparé avec un rapport molaire 1:1 (méthyl-β-cyclodextrine : α-tocophérol) par un procédé de co-évaporation. La méthyl-β-cyclodextrine (309,11 mg) et l'α-tocophérol (100 mg) ont été dissous dans 50 ml d'éthanol. Le mélange obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessiccateur jusqu'à son utilisation (Koontz et al., 2009).

Le complexe méthyl-β-cyclodextrine cholestérol (CD-CHL) a été préparé comme décrit précédemment par Purdy et Graham (2004). Dans un tube à essai en verre, 1 g de méthyl-β-cyclodextrine a été dissout dans 2 ml de méthanol. Dans un deuxième tube à essai en verre, 200 mg de cholestérol ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. Une portion de 0,45 ml de la solution de cholestérol a été ajoutée à la solution de cyclodextrine. Le mélange obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessicateur.

1.4.1 Préparation du complexe méthyl-β-cyclodextrine–vitamine E

La co-évaporation est la procédure utilisée pour la préparation du complexe méthyl-β-cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E). Au cours de la préparation un rapport molaire 1:1 (méthyl-β-cyclodextrine : α-tocophérol) est urilisé. La méthyl-β-cyclodextrine (309,11 mg) et l'α-tocophérol (100 mg) ont été dissous dans 50 ml d'éthanol. Le mélange obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessiccateur jusqu'à son utilisation (Yurtdas, 2011).

Expérimentation 2 : Etude de l'impact du complexe cyclodextrine-vitamine E tout seul ou associé au complexe cyclodextrine-cholestérol (nouvelle approche) sur le sperme du coq conservé à 4°C

Les milieux de conservation sont composés du milieu Tris supplémenté par le complexe vitamine E seul (CD-Vit E) ou en association avec le complexe cholestérol (CD-CHL-Vit E). 100 µl de sperme dilué sont ajoutés à 400 µl de chaque complexe. Les concentrations finales dans 1 ml étaient pour CD-Vit-E: 3,02-1mg et CD-CHL-Vit E (CD-CHL = 9.17-0.83mg) + CD-Vit E 3,02-1 mg. Le sperme dilué dans le milieu Tris sans aucune supplémentation et le milieu commercial IMV (IMV, France) sont considérés comme témoins.

1.5. Analyse de la qualité des spermatozoïdes

1.5.1 Mobilité et paramètres cinématiques

Les différents paramètres de mobilité spermatique ont été évalués à l'aide d'un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain) (**Figure 11**). Une chambre de comptage Makler® est chargée avec 5 µL de sperme qui sont analysés sous microscope à contraste de phase (Nikon E200®-LED microscope, Japon) où les images sont capturées à l'aide d'une caméra vidéo (Caméra Digital Basler A312fc, Allemagne) au grossissement 10x (contraste de phase négatif). Un minimum de trois champs microscopiques sont choisis au hasard pour chaque échantillon, et pour chaque analyse un minimum de 200 spermatozoïdes mobiles sont analysés. Les paramètres mesurés sont : le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (Mob T %) : le pourcentage de spermatozoïdes progressifs (Prog T %), la vitesse curviligne (VCL µm/s), la vitesse en ligne droite (VSL µm/s), la vitesse de trajet (VAP µm/s), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH µm) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz). Les différentes mesures sont effectuées à 0, 6 et 24 h de conservation au réfrigérateur à 4°C.

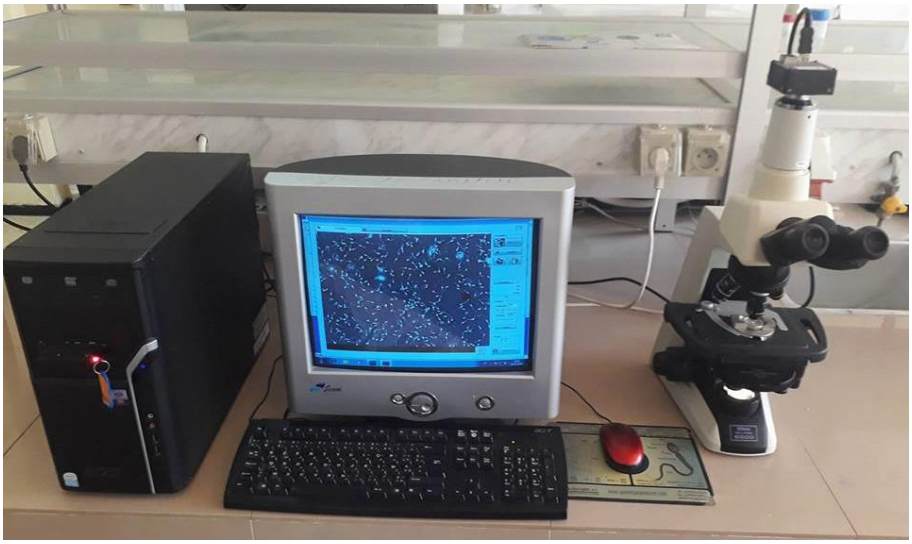


Figure 11 : Photo du système d'analyse CASA

1.6 Mesures du statut oxydatif

1.6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de sperme sont prélevés et transportés directement au laboratoire à une température de 4°C et à l'obscurité dans des emballages isothermes (glacière).Un volume de 500 µl de chaque échantillon de sperme (100.10^6 spz/ml) est centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est utilisé pour la mesure de la capacité antioxydante totale, tandis ce que le culot du sperme, après trois lavages successifs par remise en suspension dans 1 ml de PBS, est utilisé pour la mesure de la peroxydation lipidique. Après le troisième lavage, les spermatozoïdes ont été mis en suspension dans 500 µl de PBS pour obtenir la même concentration de départ ($100x10^6$spz). La lyse cellulaire est réalisée par la sonication à l'aide d'un sonicateur (Sonics Vibra cellulaire VCX-750), à 20 kHz pendant 15 secondes sur la glace. La procédure de sonication a été répétée six fois pendant 15 secondes, dans un récipient de glace. La solution de sperme lysée a été ensuite utilisée pour mesurer la peroxydation lipidique

1.6.2 Test de peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation lipidique a été déterminée par la mesure de la concentration en malondialdéhyde. Le MDA, qui est un produit final de la peroxydation des lipides, a été

quantifié en utilisant le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode décrite par Buege et Aust (1978). Un volume de 500 µl du sperme soniqué est déprotéinisée par l'ajout de l'acide trichloracétique (30%), puis incubée à 0°C pendant 120 min, suivie d'une centrifugation (3000 rpm pendant 10 min à 4 °C). A 1ml du surnageant, a été ajouté 0,25ml de TBA à 1% (dissous dans 0,05mol/l de NaOH) et 0,075ml d'EDTA (0,1mol/l) puis chauffé à 95°C pendant 60min pour induire la libération des MDA. Une couleur rose-orangée proportionnelle à la teneur en MDA suite à la réaction TBA-MDA est observée. Après l'arrêt de la réaction dans de l'eau glacée, les échantillons sont centrifugés à 18000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré est mis dans un tube en verre. La teneur de la solution en MDA est mesurée par spectrophotométrie à 532 nm à 25°C, et l'absorption de chaque échantillon est exprimée en nmol/ 10^8spz par l'équation suivante :

$$[\ ]\ \text{MDA nm} = \frac{\text{Abs}}{1.56} \times 10\ \text{nmol / ml} \quad \text{ou} \quad 10^8\text{spz}$$

1.6.3 Capacité Antioxydante Totale

Pour évaluer le statut antioxydant total des spermatozoïdes, le surnageant de la première centrifugation de chaque échantillon a été récupéré et conservé à -80°C. Après décongélation, la capacité du (milieu de congélation ou bien contenu intra-cytoplasmique) à piéger l'ABTS^{*+} [2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline acide 6-sulfonique)] a été comparée au standard, soit le Trolox (Re et al., 1999).

Le statut antioxydant total des spermatozoïdes a été mesuré en utilisant le test de décoloration du radical libre ABTS (2,2'- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid diamonium salt. L'ABTS^{*+}, un radical cation, a été généré en mélangeant 7mM de la solution d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium avec incubation du mélange pendant 12-16h à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'absorbance de la solution d'ABTS^{*+} a été ajustée à 0,700 ± 0,020 par une solution tampon. Une lyse totale des spermatozoïdes est réalisée à l'eau distillée et 20 µl de cette suspension ou du Trolox sont mélangés avec 1980 µl de la solution ABTS^{o+} à 20µl de chaque hémolysât (concentration finale 1-6 mM), la lecture a été prise 6 minutes exactement après le mélange initial. Le pourcentage d'inhibition à 734 nm a été calculé et exprimé en équivalent millimolaire de Trolox :

Y (%) = [(A_0-A_s) / A_0] x100 dans laquelle A_0 est l'absorbance de contrôle et A_s est l'absorbance de l'échantillon. A_0 étant l'absorbance de l'incubation de 1980 µl de l'$ABTS^{*+}$ avec 20 µl de l'eau distillée.

1.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System). L'analyse de la variance a été réalisée selon la procédure GLM (General Linear Models Procedure). Les effets des différents traitements sur les paramètres spermatiques (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH et BCF) ont été estimés en utilisant le modèle linéaire fixe suivant :

$Yijkl= \mu + Ai+ Bj+ (AB)ij+ eijk$

Y = VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH et BCF ;

µ = moyenne générale ;

Ai= effet fixe du milieu (i = 1 à 5: A, A5, A10, IMV et Tris) ;

Ai= effet fixe du milieu (i = 1 à 4: R, R5, R10 et Tris) ;

Ai= effet fixe du milieu (i = 1 à 4: CDVitE, CDCholVitE, IMV et TRIS) ;

Bj = effet fixe du temps (j = 1 à 3 :0, 6 et 24 heures) ;

(AB)ij= effet de l'interaction de milieu et du temps ;

eijk= effet résiduel aléatoire.

Les moyennes moindres carrées des paramètres spermatiques (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH et BCF) des différents temps d'étude ainsi que leur erreur standard ont été calculées à différents temps.

Résultats

1. Composition chimique des huiles essentielles

L'identification des substances actives d'une huile essentielle reste très complexe et soumise à de nombreuses variables. De ce fait, la recherche avec exactitude des constituants phytochimiques d'une huile essentielle est indispensable, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle.

1.1 Composition de l'Armoise blanche

La composition chimique de l'huile essentielle de l'armoise blanche, l'indice de rétention ainsi que les pourcentages des différents composés sont énumérés dans le **Tableau 3**. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) de l'huile essentielle des parties aériennes de l'armoise blanche, a permis d'identifier 36 composés correspondant à 99.15% de la surface des pics totaux. Les constituants majeurs de l'huile sont le camphre (31.9%), l'α-pinène (13.16%), le camphène (12.69%), β-pinène (5.56%), cyclohexène (6.34%), bornéol (3.51%) et 1,8-cinéole (3.72%).

L'huile essentielle de l'armoise blanche étudiée dans ce travail, peut être considérée comme un chémotype à camphre, puisque ce dernier présente le pourcentage le plus élevé dépassant les 31 %. En tenant compte des composant majoritaires identifiés dans l'huile essentielle, des différences de composition sont à signalées en comparaison à d'autres résultats obtenus dans d'autres régions du pays (Bouzidi et al, 2016).

1.2 Composition du Romarin

L'analyse qualitative par CG/SM des huiles essentielles du romarin nous a permis d'identifier 25 composés. Les pourcentages de ces derniers avec les indices de rétention correspondant pour chacun sont représentés dans le **Tableau 4**. Les résultats obtenus montrent que cette huile est formée principalement du camphre (18.88%), camphène (5.17%), 1,8-cinéole (7.85%), β-thujène (13;66%), α-thujène (4.87%), chrysanthenone (12.05%) and β-cubenène (7.97%). Ces composés majoritaires sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance avec des quantités relativement faibles comme le sabinène (1.37%), α-pipène (1.4%), α-Terpinene (0.54%), terpineol (0.9%), pinocarvone (1.37%), γ-élémène (1.71%),...etc. Les composants majeurs identifies pour cette huile semblent être des monoterpènes oxygénés, cette plante peut donc être considérée comme chémotype camphre.

Tableau 3. Composition des huiles essentielles d*'Artémisia herba alba*identifiés par GC/MS

N°	Identifiant	RI	%
1	tricyclène	8.277	0.67
2	α -thujène	8.561	0.21
3	α-pinène	9.101	13.16
4	Camphène	9.935	12.69
5	β-pinène	11.492	5.56
6	β-myrcène	12.378	0.49
7	Phellandrène	13.482	0.84
8	α-terpinène	13.97	0.68
9	Benzène, 1-methyl-4	14.64	1.52
10	Cyclohexène	15.00	6.34
11	1,8-cinéole	15.11	3.72
12	cis-ocimène	15.56	0.25
13	γ-terpinène	16.90	0.87
14	α-terpinolène	18.91	1.26
15	α-bisabolol	57.13	0.32
16	Camphre	23.54	31.90
17	Camphénilol	23.61	0.24
18	Bornéol	24.91	3.51
19	Terpinène-4-ol	25.56	1.20
20	α-terpinéol	26.62	1.01
21	*cis*-sabinène hydrate	32.89	0.88
22	α -cubebene	36.89	0.32
23	α-ylangène	38.26	0.21
24	α-copaène	38.59	0.99
25	trans-caryophyllène	41.44	4.07
26	β-cubebene	41.94	0.18
27	α-humulène	43.48	1.08
28	β-farnésène	43.91	0.24
29	α-amorphène	44.99	1.01
30	γ-curcumène	45.80	0.15
31	a-curcumène	45.47	0.18
33	β-bisabolène	47.01	0.36
34	δ-cadinène	47.88	2.65
35	cis-α-bisabolène	48.98	0.14
36	Caryophyllèneoxide	51.20	0.14
Total			98.83

Tableau 4. Composition des huiles essentielles de *R. officinalis* identifiés par GC/MS

n°	Composés	RI	%
1	α-Pipène	8.881	1.409
2	Camphène	9.734	5.171
3	Verbénone	10.028	0.586
4	Sabinène	11.185	1.374
5	β-Pinène	11.329	0.254
6	*trans* β-Ocimène	12.317	0.231
7	α-Terpinene	13.937	0.54
8	1,8-Cineole	14.978	7.850
9	γ-Terpinene	16.852	0.667
10	β-Thujene	20.404	13.662
11	α-Thujene	21.113	4.875
12	Chrysanthenone	21.797	11.548
13	Camphre	23.176	18.88
14	Carvéol	23.267	0.31
15	Pinocarvone	24.221	0.618
16	α-Phellandrene	24.939	0.556
17	Terpinéol	25.460	0.904
18	Chrysanthenyl acetate	31.161	1.479
19	α-Copaene	38.554	0.517
20	*cis*-Jasmone	40.357	0.491
21	β-Cubebene	45.311	7.976
22	γ-élémène	46.145	1.719
23	δ-Cadinène	47.798	0.625
24	Spathulenol	51.090	0.158
25	1,3-Nonadiène	71.438	0.874

1.3 Paramètres de mobilité

1.3.1 Mobilité totale

1.3.1.1 Artémisia herba alba

Le pourcentage de la mobilité totale (Mob T) de l'ensemble des échantillons est représenté dans la **Figure 12**. Un effet statistiquement significatif du milieu, du temps et de l'interaction du milieu avec le temps sur la mobilité est observé (*p<0,01*) à T0 et T6. A T0, le lot A (53,11± 2,75) a montré un pourcentage de mobilité significativement plus faible que les autres lots (*P<0,005).* Comme illustré sur la figure 1, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les lots A5 (89,35 ± 0,57) et A10 (94,36 ± 0,26) à T0 (*P>0,05*). La même tendance est constatée après 6h de conservation des spermatozoïdes, la mobilité totale dans le milieu commercial (IMV) (70,51 ± 3,9) reste significativement inférieure au témoin (Tris) (87,03 ± 3,24) et aux milieux A5 et A10 (*P<0,05*) (Figure1). Après 24 h de conservation, aucune différence significative n'a été observée entre les milieux étudiés : Tris (83.93 ± 1,01), IMV (80,25 ± 1,11), A5 (88,02 ± 1,19) et A10 (83,79 ± 0,9) (*P>0,05*). Concernant le lot A, il a montré un effet spermicide avec une perte totale de la mobilité après 24h de conservation.

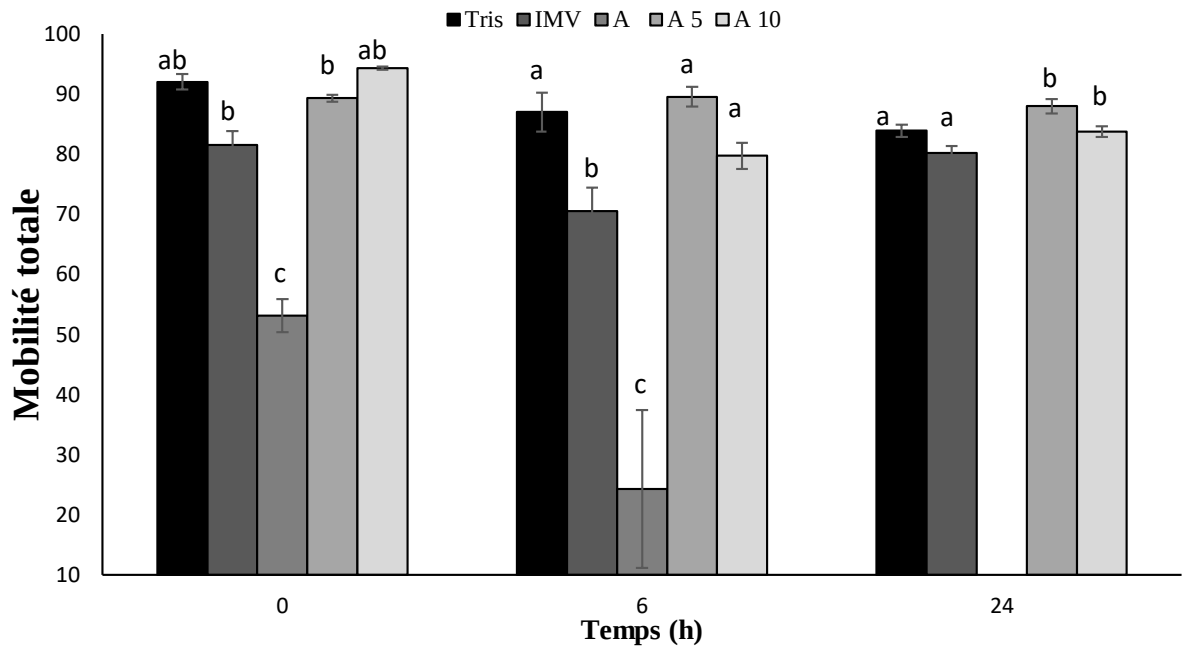


Figure 12 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoiseA (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.3.1.2 Rosmarinus officinalis

Le pourcentage de la mobilité totale (Mob T) des spermatozoïdes de l'ensemble des échantillons traités avec les HE du romarin est représenté dans la **Figure 13**. Un effet statistiquement significatif du milieu, du temps et de l'interaction du milieu avec le temps sur la mobilité est observé (*p<0,01*). A T0, aucune différence significative n'est observée parmi les traitements R5 (89.84± 3.64) et R10 (98.12± 0.16) et le groupe control Tris (92.03± 1.32). La plus forte concentration en huile essentielle du romarin (R, 870 µg /ml), a montré les taux les plus faibles en mobilité à T0 et T6, alors qu'un effet spermicide est observé après 24 heures de conservation. Après 48 h de conservation, les concentrations R5 et R10, ont montré les taux de mobilité les plus élevés avec respectivement 71.4 ± 2.05% et 74± 6.49%.

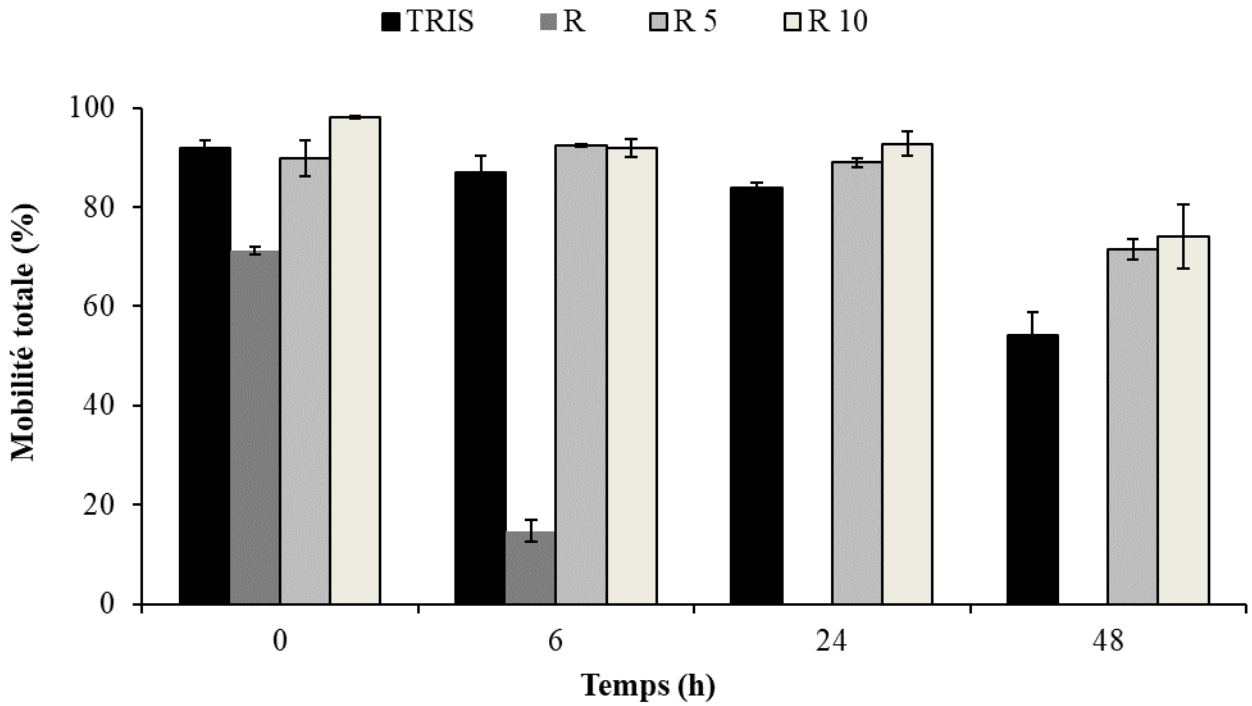


Figure 13: Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoise R (870 µg /ml), R5 (87 µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.3.1.3 Complexes cyclodextrines

La mobilité totale (MobT) de l'ensemble des échantillons analysés à différents temps (T0, 6, 24 et 48h), après la conservation à 4°C est présentée dans la **Figure14**. La mobilité totale ne présente aucune différence significative (P > 0.05) à T0 entre le contrôle (92.03±1.32 %) et les deux complexes testés (CD-VitE = 91.14±0.28% et CD-CholVitE = 93.97±1.21%). Cependant, ces trois valeurs sont significativement plus élevées (P<0.05) comparativement au milieu commercial IMV (81.52±2.29%). Après 24 h de conservation, la même tendance observée à T0 est toujours conservée. A partir de 48h de conservation, on observe une nette supériorité pour les deux complexes utilisés (CD-Vit E = 84.35±0.79% et CD-Chol-VitE = 93.97±0.69%) comparativement au témoin (Tris = 54.04±4.83%) et au milieu commercial (IMV = 76.55±2.56%).

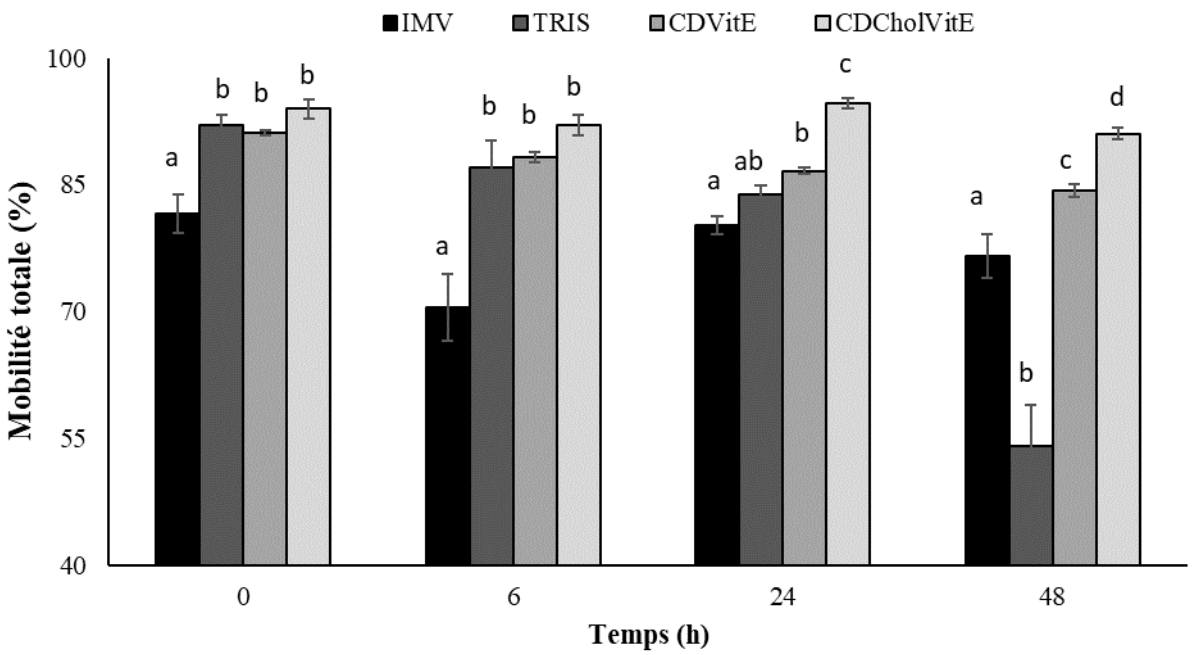


Figure 14 : Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité Totale (Mob T) des spermatozoïdes de coq dans le milieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E)et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.4 Mobilité progressive

1.4.1 Artémisia herba alba

La mobilité progressive est un facteur important pour l'estimation de la fertilité, elle essentielle pour assurer la capacitation, la réaction acrosomique et la fécondation de l'ovocyte. A T0, la mobilité des spermatozoïdes progressifs rapides (Prog T), qui prend en considération la qualité de la mobilité, est significativement plus élevée dans les milieux Tris et A10 comparée aux autres milieux (*P<0,05*) (**Figure 15**). A partir de 6h de conservation, la valeur la plus élevée est observée dans le milieu A5, mais cette dernière est statistiquement non significative par rapport aux valeurs des milieux Tris et A10 (*P>0,05*). Après 24 h de conservation, deux groupes statistiquement différents sont enregistrés (Tris et IMV vs A5 et A10, *P<0,05*).

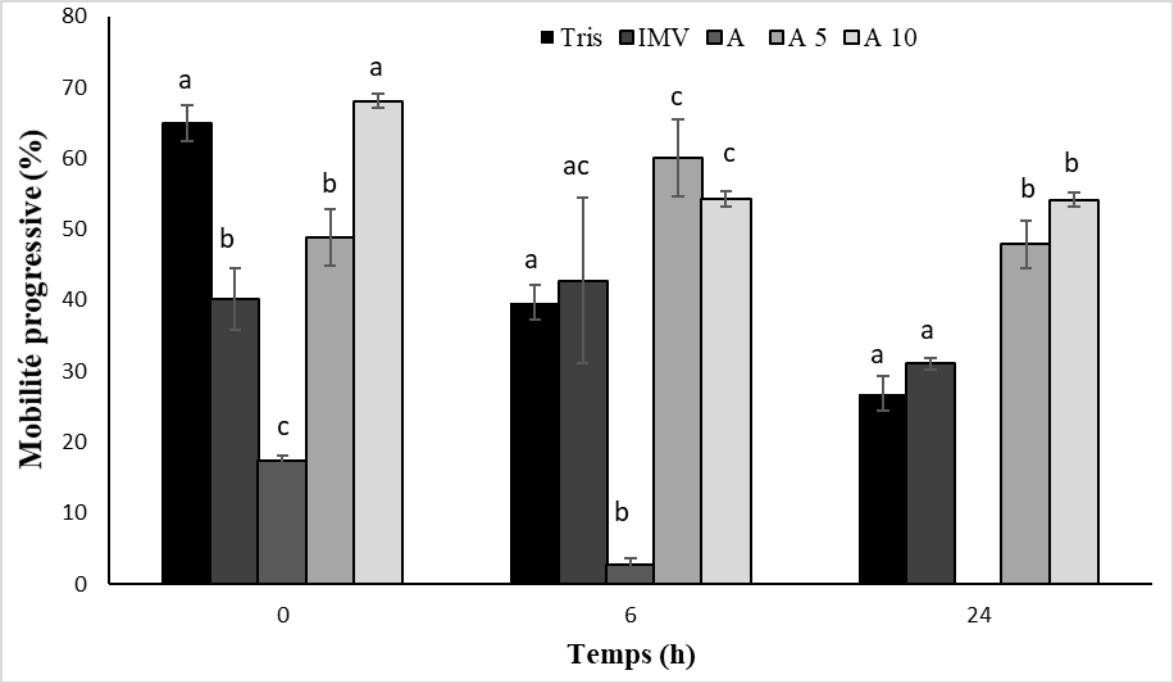


Figure15. Effets des différents traitements à 0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle de l'armoise A (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.4.2 Rosmarinus officinalis

Les valeurs de la mobilité progressive du sperme traité avec les HE du romarin sont représentées sur la **figure 16.** Le pourcentage le plus faible est obtenu avec la dose de 870 µg/ml, qui correspond à la plus forte dose utilisée dans l'expérimentation. Après 6 h de conservation, la mobilité progressive est conservée parmi les traitements R5 et R10 avec une différence significative comparativement au témoin et au groupe R10. A t 24, les pourcentages de la mobilité progressive pour les milieux R5 et R10 sont de 43.25 ± 2.43 et 63.08 ± 5.33% respectivement, contre 26.86 ± 2.36% pour le groupe control ($P < 0.05$). Après 48 h de conservation, les deux concentrations R5 (27.31 ± 1.53) et R10 (36.48 ± 9.63) ont montré des vitesses nettement supérieures ($P < 0.05$) comparativement au témoin (18.18 ± 0.68).

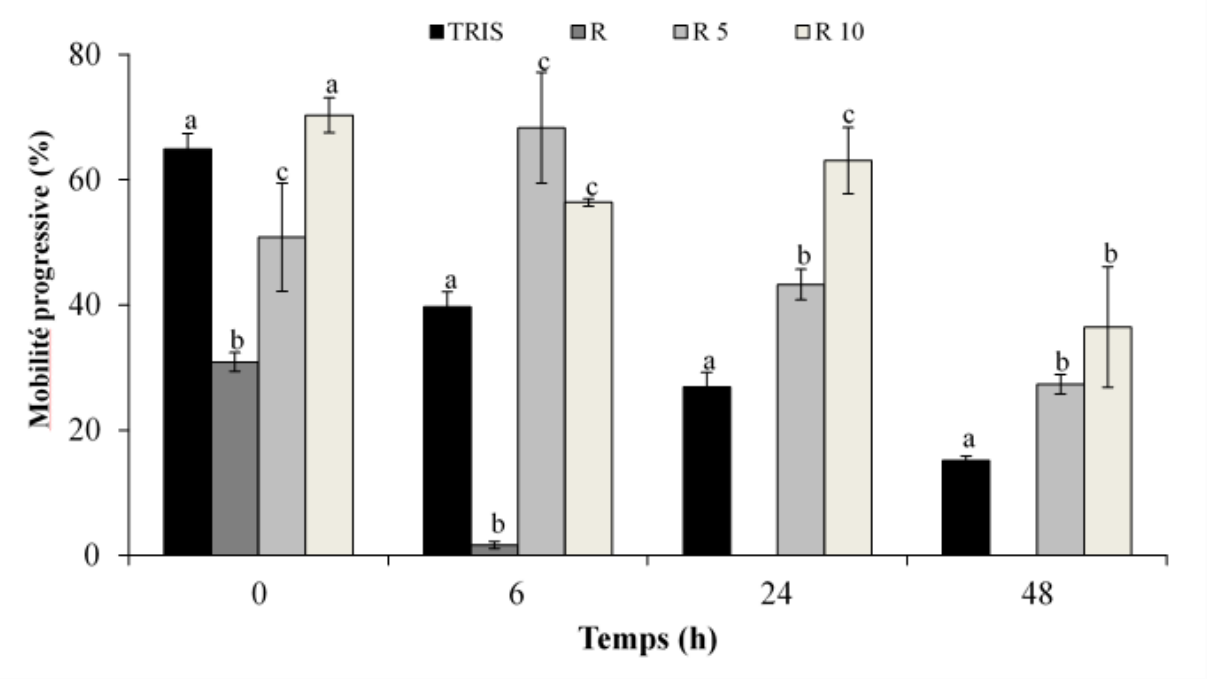


Figure 16: Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes de coq dans le groupe témoin (Tris), et les groupes supplémentés avec l'huile essentielle du romarin R (870 µg /ml), R5 (87 µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.4.3 Complexes cyclodextrines

En ce qui concerne la mobilité progressive, les profils obtenus sont presque identiques à ceux obtenus en mobilité totale (**figure 17**). A T0, la valeur la plus faible de la mobilité progressive (40.21±4.31%) est observait dans le milieu commercial (IMV), tandis ce que les deux complexes, CD-Vit E = 48.23±7.82% et CD-CHL-Vit E = 53.56±2.51% présentaient des valeurs nettement supérieures (P < 0.05). Les deux complexes utilisés dans l'expérimentation, ont montré des différences statistiquement significatives (P < 0.05) par rapport au milieu commercial (IMV) et au témoin (Tris) pour les temps 6, 24 et 48h. A T24, la mobilité progressive était de 50.8±0.66% pour CD-Vit E et 62.55±2.32% pour CD-CHL-Vit E contre 31.03±0.77% pour IMV et 26.86±2.36% pour le témoin (Tris).

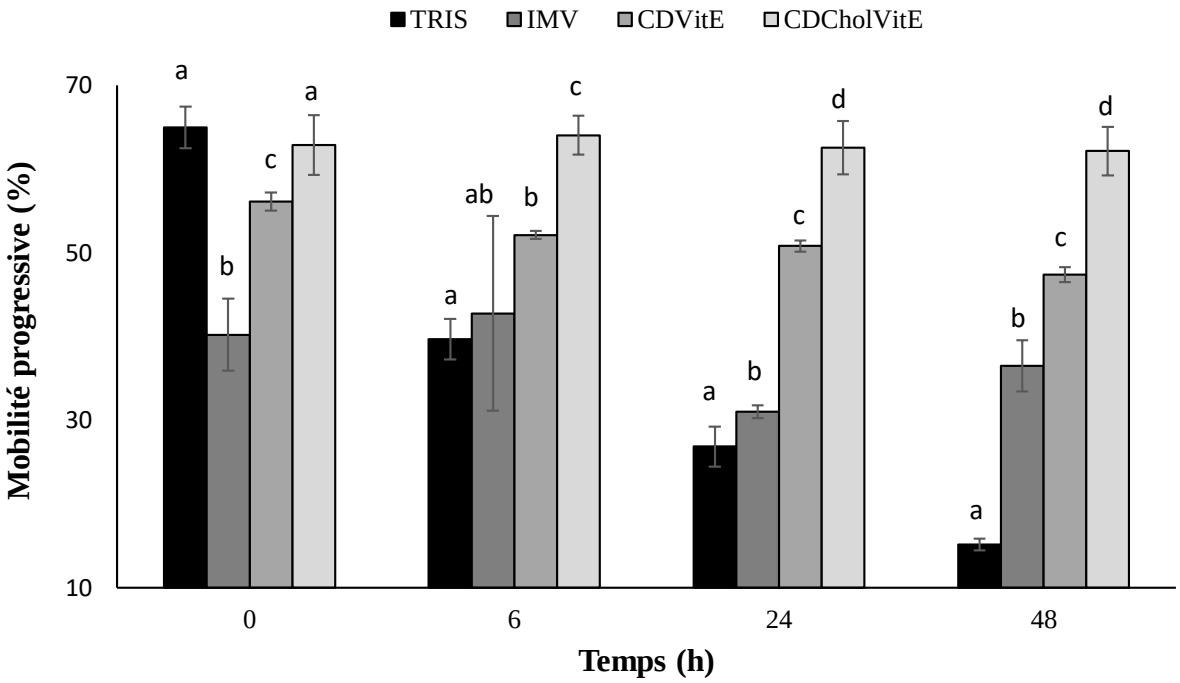


Figure 17. Effet des différents traitements à T0, 6 et 24h sur la mobilité progressive (Prog T) des spermatozoïdes du coq dans le milieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E)et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation, (moyenne ± S.E.M.).

1.5 Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF)

1.5.1 Artémisia herba alba

L'impact des différents traitements sur les paramètres cinématiques des spermatozoïdes (VCL, VSL, VAP, ALH et BCF) est représenté sur la **Figure 18**. Les valeurs les plus faibles de VCL ont été observées dans le lot traité par la plus forte concentration en armoise (A). Parmi les traitements utilisés, le traitement A5 a enregistré les valeurs les plus élevées (40,6 ± 0,56 m/s) après 6h de conservation, après 24 h, c'est la concentration la plus faible en l'huile (A10) qui montré les VCL les importantes (47,81 ± 0,7 m/s). Pour la VSL, les résultats semblent être similaires à ceux obtenus pour la VCL (**Figure 18**). Les VSL des milieux A5 et A10 sont significativement supérieures aux autres milieux après 6 h et 24 h de conservation (*P<0,05*). Concernant la VAP, les différences significatives enregistrés à T0 entre les différents milieux se maintiennent, comme indiqué dans la **Figure 18** aux temps T6 et T24

(*P<0,05*). La même tendance que la VAP est constatée pour l'ALH puisque des différences significatives enregistrées parmi les différents milieux à T0 se maintiennent à 6 et 24h (*P<0,05*). Enfin, la BCF présente elle aussi le même profil que les deux précédentes mesures (VAP et ALH), avec des différences significatives entre les différents traitements pour les trois mesures réalisées à T0, 6 et 24h (P<0,05).

1.5.2 Rosmarinus officinalis

L'impact du traitement du sperme du coq par différentes concentrations des huiles essentielles du romarin sur la VCL, VSL, VAP et BCF est présenté dans la **Figure 19**. La vitesse de chaque spermatozoïde est comprise entre 0 (spermatozoïdes immobiles) et 100 µm/s. Après 6 h de conservation, des différences hautement significatives ont été observées pour les paramètres VCL ($p < 0.01$), VSL ($p < 0.01$) et VAP ($p < 0.01$) dans le milieu R10 (8.7µg/ml) avec 57.07 ± 0.62, 14.23 ± 0.26 et 29.31 ± 0.34 µm/s, respectivement. L'impact positif des huiles sur les paramètres cinématiques, est maintenu à T24 et T48. De la même façon, l'ALH et le BCF ont montré les valeurs les plus élevées avec les traitements R5 (87 µg/ml) et R10 (8,7 µg / ml).

1.5.3 Complexes cyclodextrines

Les effets des traitements sur VCL, VSL, VAP, ALH et BCF sont présentés dans la **Figure 20**. La valeur la plus basse de VCL a été observée dans le groupe contrôle (68.97±2.51µm/s). Parmi tous les traitements, CD-CHL-Vit E a montré la valeur la plus élevée (110.47±1.91µm/s) suivi par CD-CHL (104.35±2.17µm/s) et CD-Vit E (88.82±2.21µm/s).

Concernant la VAP, les résultats étaient similaires aux tendances exprimés par VCL, sauf que le complexe CD-CHL-Vit E, a montré des valeurs (82.21±1.75 µm/s) significativement plus élevées par rapport à tous les autres traitements. En outre, VAP des complexes, CD-Vit E et CD-CHL, étaient significativement plus élevées ($P < 0.05$) que celles observées dans Vit E et CHL. Regardant VSL, exprimée comme non seulement l'aptitude des gamètes de présenter une vitesse rapide, mais aussi l'aptitude de progresser d'une manière rectiligne, les résultats ont démontré que le complexe CD-CHL-Vit E a manifesté des valeurs élevées, statistiquement différentes de tous les autres traitements.

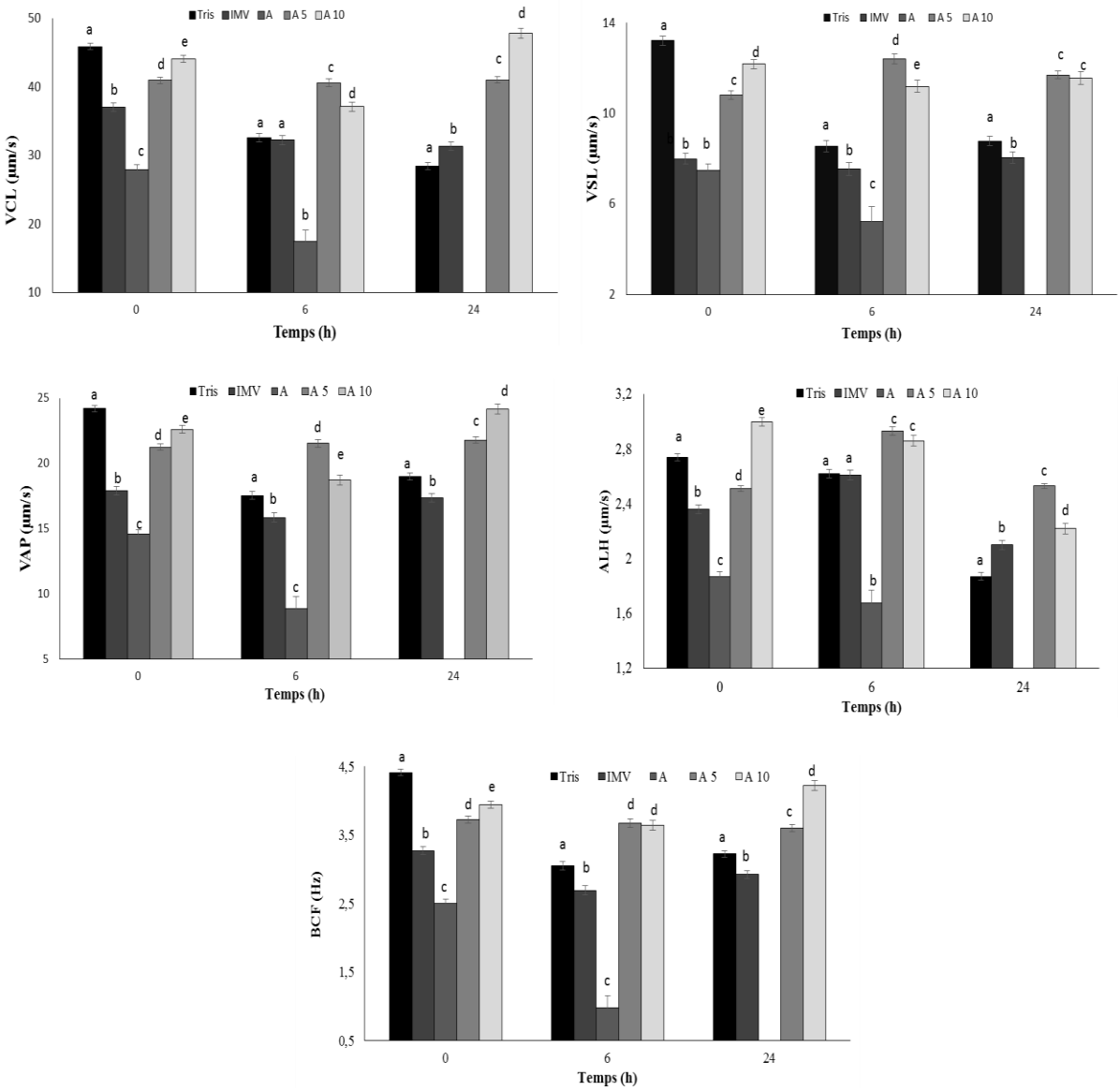


Figure 18. La moyenne (± S.E) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec de l'armoise A (870 µg /ml), A5 (87 µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) à 0, 6 et 24h. Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation.

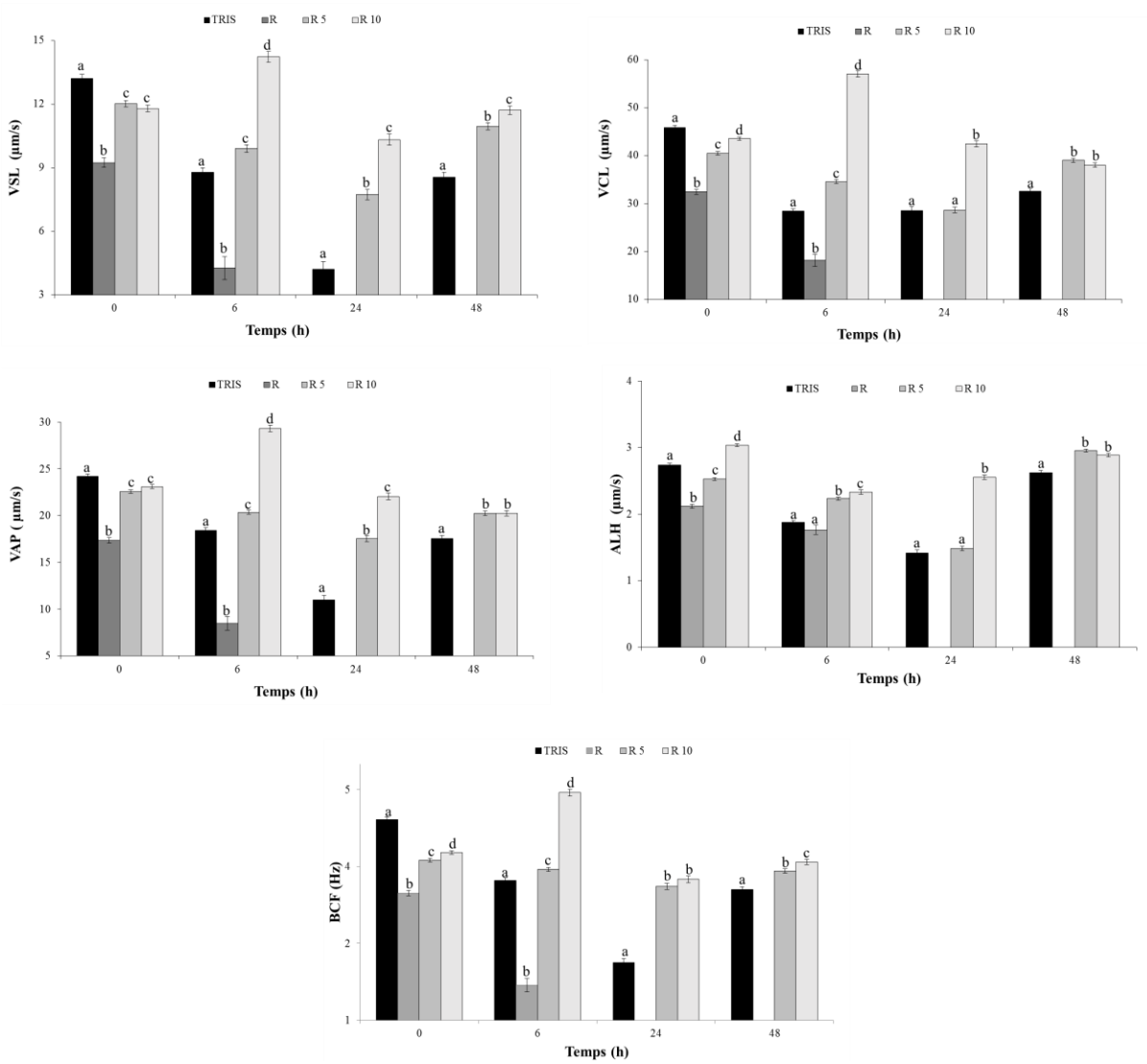


Figure 19. La moyenne (± S.E) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse en ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans le milieu commercial (IMV), et les groupes supplémentés avec de l'armoise R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml) à 0, 6 et 24h. Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation.

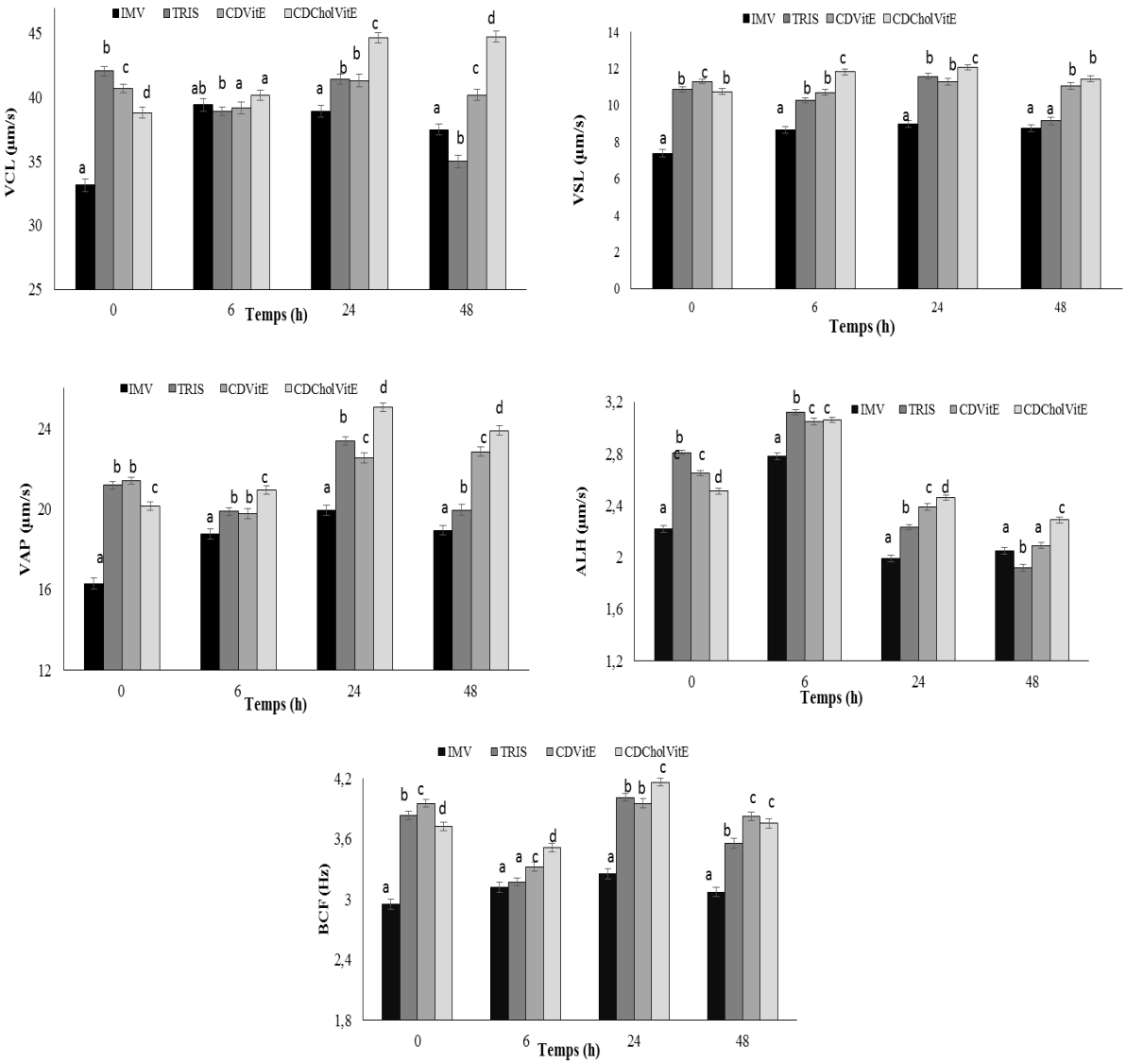


Figure 20. La moyenne (± ES) de la vitesse curviligne (VCL), la vitesse ligne droite (VSL), la vitesse de trajet (VAP), l'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (BCF/Hertz) après conservation du sperme du coq à 4°C dansmilieu commercial IMV, le groupe témoin (Tris), et les complexes cyclodextrine-vitamin E (CD-Vit E)et cyclodextrin-cholesterol et cyclodextrine-vitamin E (CD-CHL-Vit E). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05).

1.6 Peroxydation des lipides

Les taux de MDA indiquant le degré de peroxydation lipidique des membranes de spermatozoïdes conservés dans les différents traitements sont présentés sur la **Figure 21**. Après

6 h de conservation à 4°C, aucune différence significative n'est observée dans la concentration en MDA entre les lots A5, R5, le milieu commercial IMV et le lot témoin Tris. Par contre avec les lots A et R, ayant reçus les doses les plus élevées en HE, on observe des taux plus importants en MDA comparativement aux autres milieux. La même tendance est observée avec les concentrations en MDA après 24 h de conservation. En effet, les taux les plus élevés en MDA ont été observés avec les concentrations les plus importantes en HE (A et R), montrant un effet protecteur moindre sur les membranes comparativement aux milieux A5, A10, R5 et R10. Nous pouvons observer également, que la peroxydation lipidique est plus importante en utilisant le romarin.

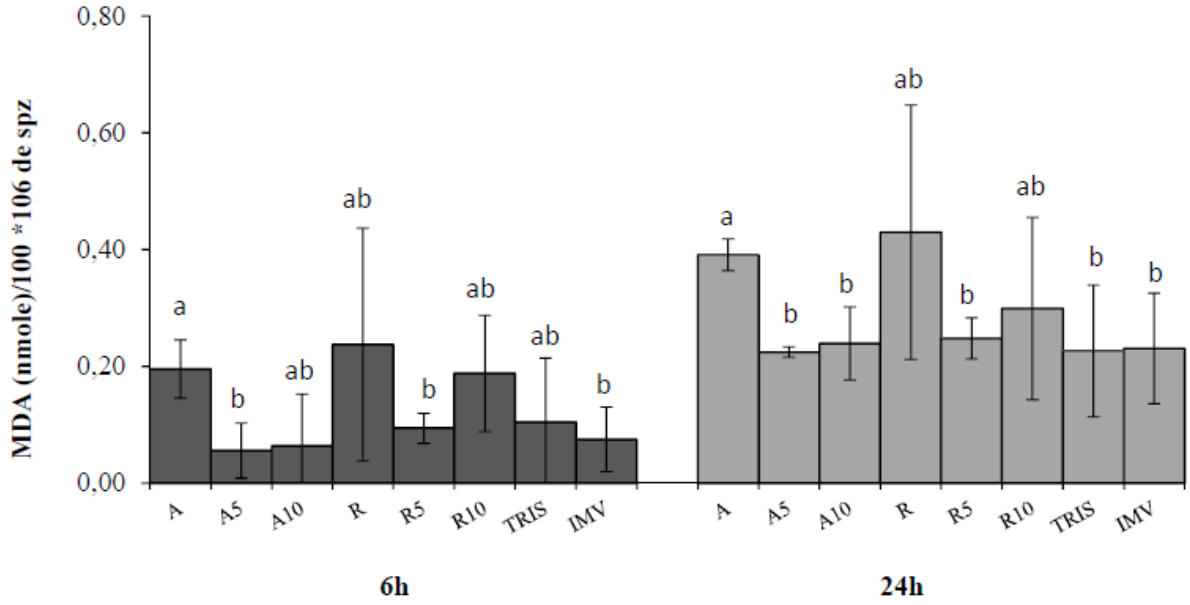


Figure 21. Moyenne (± ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après 6h de conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans les groupes supplémentés avec de l'armoise, A (870 µg /ml), A5 (87µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) et les groupes supplémentés avec le romarin, R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à (P <0,05) au même temps de conservation.

1.7 Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de chaque milieu de conservation est présentée dans la **Figure 22.** Après 6 h de conservation à 4°C, la TAC du milieu A5 (81.16±14.24 ug Eq Trolox/L) est la plus élevée comparativement aux autres lots, avec une différence statistiquement significative (P < 0.05). Après 24 h de conservation, les milieux A, A10, et R10

montraient des valeurs significativement (P < 0.05) différentes de celles observées dans les autres milieux A5 et R5. Par contre, aucune différence significative n'est constatée entre ces milieux et le contrôle (Tris).

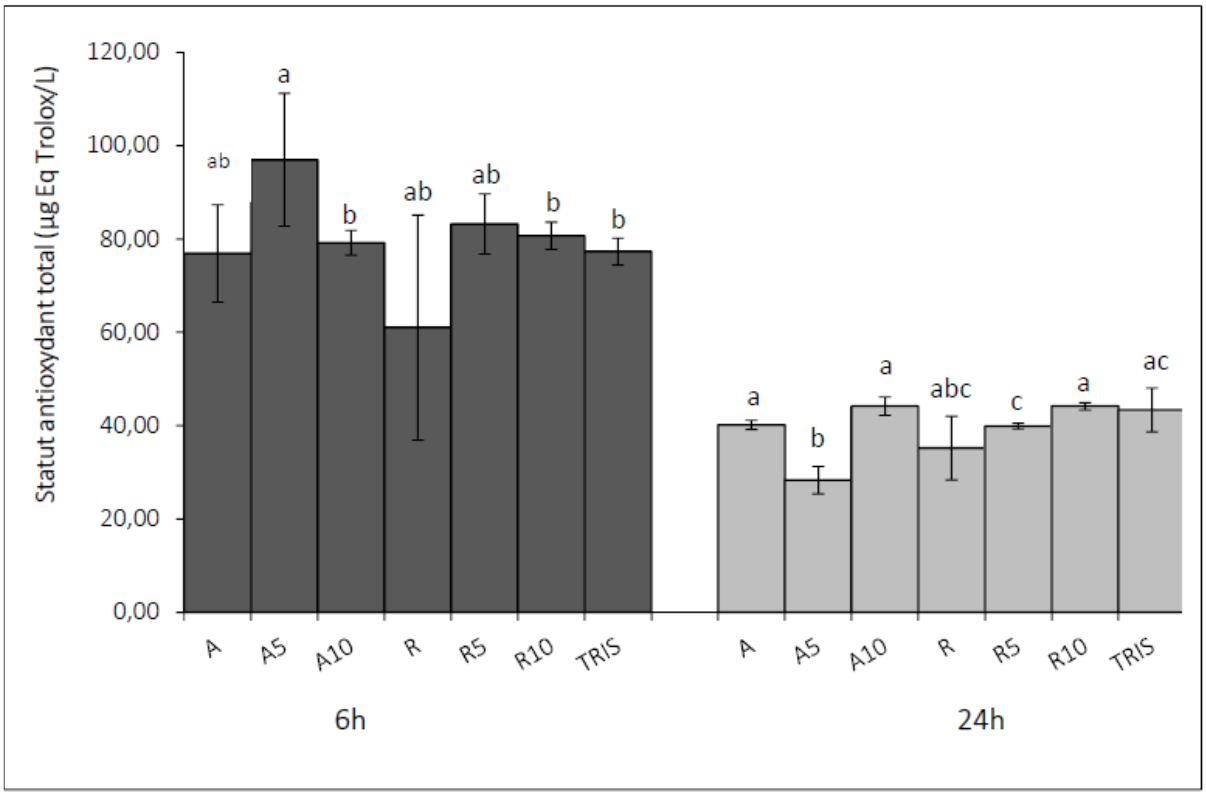


Figure 22. Moyenne (± ES) de la capacité antioxydante totale (CAT) après 6h de conservation du sperme du coq à 4°C dans le groupe témoin (Tris), dans les groupes supplémentés avec de l'armoise, A (870 µg /ml), A5 (87µg /ml) et A10 (8.7 µg /ml) et les groupes supplémentés avec le romarin, R (870 µg /ml), R5 (87µg /ml) et R10 (8.7 µg /ml). Les lettres différentes indiquent une différence significative à P <0,05 au même temps de conservation.

Discussion

Discussion

La mise au point de l'insémination artificielle chez les volailles à partir des années 1930 a permis des avancées considérables dans le domaine de la conservation *in vitro* et de l'analyse du sperme aviaire avant insémination (Lake, 1995). Concernant les spermatozoïdes aviaires, les résultats obtenus jusque-là concernent le stockage du sperme à long terme (congelé) et à court terme (liquide) à des températures avoisinant les 4°C, mais aussi l'identification des meilleurs reproducteurs à partir d'un classement sur la base de la qualité du sperme. Pour la conservation du sperme, elle engendre des dommages au niveau de la cellule spermatique par le biais du choc thermique mais aussi par le stress oxydatif. Pour pallier à cette situation, il s'impose aujourd'hui d'améliorer les dilueurs classiques pour pouvoir préserver la qualité des gamètes pendant le processus de réfrigération à 4°C. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé deux approches pour l'amélioration de la conservation du sperme du coq à 4°C. La première approche consiste à supplémenter les dilueurs par des substances naturelles (huiles essentielles), alors que la deuxième consiste à utiliser simultanément plusieurs molécules : la cyclodextrine, le cholestérol et la vitamine E.

Le sperme du coq est caractérisé par une proportion élevée en AGPI dans la fraction phospholipidique membranaire (Blesbois et al., 1997), ce qui rend le sperme susceptible à la peroxydation lipidique (Surai et al., 1997), avec des altérations notamment pendant la conservation pour une durée prolongée (plus de 6 heures) (Blesbois, 2012 ; Surai et al., 1998). Dans ces conditions de stress oxydant, la membrane du spermatozoïde du coq riche en AGPI est une cible privilégiée. En plus de la peroxydation lipidique, les ERO attaquent l'acrosome et l'ADN cellulaire (Peris et al., 2007). Il est admis que la conservation à 4°C du sperme aviaire, s'accompagne d'une perte importante en phospholipides membranaires (Douard et al., 2004). Dans ces situations, la mise au point de stratégies de lutte et d'optimisation de la conservation, trouve tout son intérêt.

L'identification des composés actifs de l'huile essentielle de l'armoise blanche par CG/SM a montré un chémotype camphre avec 31,9%. Les autres composés majoritaires sont :α-pinène (13,16%), β-pinène (5,56%), et le camphène (12,69%). Plusieurs auteurs ont rapportaient des chmotypes camphre pour l'huile essentielle de l'armoise blanche en Algérie (Houmani et al., 2004 ; Dob et Benabdelkader, 2006; Dahmani-Hamzaoui et Baaliouamer, 2010; amri et al., 2013 ; Belhattab et al., 2014 ; Bouzidi et al., 2016), mais aussi au Maroc

(Imelouane et al., 2010), et en Irak (abaas et al., 2014). Pour ce qui est de la composition de HE du romarin, l'analyse qualitative par CG/SM a permis d'identifier 25 composés. Les composés majoritaire sont essentiellement : camphre (18.88%), 1,8-cinéole (7.85%), β-thujone (13;66%), chrysanthénone (12.05%) et du β-cubenène (7.97%). Dans une étude de Zermane et al., 2016, le même chémotype camphre, a été rapporté lors de l'étude de l'analyse chimique des HE du romarin dans la région de Constantine. Par ailleurs, l'analyse des HE au Maroc, a montré des proportions élevées de α-pinène (37.40%), de 1,8-cinéole (58,7-63,7%) et de camphre (41,7-53,8%), tandis que l'huile essentielle de R. officinalis de Tunisie était plutôt riche en 1,8-cinéole, camphene et α-pinène (Smeti et al., 2013 ; Zaouali et al., 2005). La variations de la composition des huiles essentielles est attribuée au genotype de la plante et le sol dans lequel elle évolue (Angioni et al., 2004; Gharib et al., 2016), le moment de la récolte (Celiktas et al., 2007), la partie de la plante (Flamini et al., 2002), la préparation de l'échantillon et la méthode d'extraction (Boutekedjiret et al., 2004).

Les plantes médicinales, par leur potentiel antioxydant, sont utilisées pour neutraliser les radicaux libres issus des processus oxydatifs. L'armoise blanche est utilisé dans différents domaines (alimentation, pharmacie, parfumerie et aromathérapie) pour ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Djeridane et al., 2006 ; Zouari et al., 2010 ; Khlifi et al., 2013; Bouzidi et al., 2016). Dans une étude de 2016, Bouzidi et al., rapportent des effets antioxydants puissant dans l'agroalimentaire. Dans une autre étude réalisée sur des souris ayant subies des dommages oxydatifs, avec comme conséquence l'altération des paramètres spermatiques (mobilité, viabilité), Selmi et al. 2016, ont démontré que l'administration orale de l'huile essentielle d'*Artémisia herba alba* permet de prévenir ces dommages au niveau testiculaire et épididymaire avec amélioration de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes. Les auteurs ont mis en évidence, l'effet protecteur de l'huile essentielle contre la peroxydation lipidique des membranes, et une neutralisation des ERO. Les résultats obtenus dans notre étude avec les HE de l'armoise, ont montré un effet significatif sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (totale et progressive) après une conservation à 4°C pendant 48 h.

Comme pour l'armoise, les HE du romarin sont largement utilisées en industrie alimentaire, comme antioxydant (Bozin et al., 2007 ; Djeddi et al., 2007 ; Luis et al., 2007 ; Laura et al., 2010 ; Makhloufi et al., 2011 ; Slameňová et al., 2011), antimicrobien (Djeddi et al., 2007; Zaouali et al., 2010 ; Bajpai et al., 2013 ; Boutabia et al., 2016) et conservateur naturel (Burt, 2004 ; Faid et al., 1995 ; Kadri et al., 2011). Chez la volaille, Borghei-Radand et al 2017,

rapportent l'effet positif des feuilles en supplémentation alimentaire sur la qualité de la mobilité spermatique ainsi que sur la fertilité du coq. Dans une autre étude, l'ajout de 200 ng/ml de l'huile essentielle de Zataria multiflora dans le sperme du coq a permis d'améliorer la mobilité, la viabilité et l'intégrité membranaire des spermatozoïdes conservés à 4°C (Gerami Nezhad et Roostaei-Ali Mehr, 2018). Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur l'effet protecteur des huiles essentielles de *R. Officinalis* sur le spermatozoïde du coq lors d'un stockage *in vitro*.

Les résultats obtenus montrent que la qualité du sperme (traduit par la motilité progressive et les vitesses des gamètes) était significativement préservée, en particulier avec les plus faibles concentrations testées correspondant à A5, R5 et A10, R10 (87µg/ml et 8,7 µg/ml respectivement). Cependant, la dose la plus élevée utilisée durant l'expérimentation (870µg/ml), a montré un effet spermicide évident après 24 heures de stockage, pour les deux huiles testés (Armoise et romarin). Cette forte concentration, provoque probablement des altérations au niveau de la cellule spermatique comparables à celles décrites chez la bactérie (Moreno et al., 2006 ; Jordán et al., 2013 ; Satyal et al., 2017). En effet, les HE à fortes doses, peuvent perturber et désorganiser la structure lipidique de la paroi cellulaire, qui va aboutir à la destruction celle-ci (Burt, 204 ; Boutabia et al., 2016). Dans un autre contexte qui est celui de la recherche de molécules contraceptives, l'effet spermicide est évident après utilisation de plusieurs HE avec des concentrations allant de 125 à 1000µg/ml. L'effet spermicide fait suite à des dommages de différentes structures du spermatozoïde (Riar et al., 1990 ; Paul et Kang, 2011 ; Chikhoune et al., 2015 ; Türk et al., 2016 ; Gerami Nezhad et Roostaei-Ali Mehr, 201). Dans une étude réalisée sur le porc, Elmi *et al.* 2017, rapportent une altération des paramètres de mobilité des spermatozoïdes suite au traitement avec 0.8 mg/ml de l'HE de romarin. La même équipe a obtenu des résultats similaires avec les HE de Tea-tree (Melaleuca Alternifolia), puisque à partir de la dose de 0.8 mg/ml, l'ensemble des paramètres de mobilité sont altérés. Par ailleurs, l'utilisation de faibles quantités (5 à 20µg/ml) de resvératrol et de la quercétine chez le bélier, améliore la mobilité spermatique après cryoconservation (Silva et al., 2012). L'effet antibactérien de petites concentrations des HE du romarin a été rapporté par plusieurs auteurs. Chaftar et al., 2015, notent les effets positifs des concentrations de 0.07 à 1.1 mg/ml contre plusieurs souches de *Legionella pneumophila*. Jordan et al., 2013, ont obtenu un effet bactéricide sur plusieurs Gram- à des concentrations allant de 1 à 58,7 µg/ml. Outaleb et al., 2015, ont obtenus des effets antibactériens sur les gram – et gram +, avec des concentrations comprises entre 4 et 20 µg /ml.

Dans la deuxième partie de la première expérience, nous avons essayé de voir l'impact de la supplémentation du dilueur par les HE sur le degré de peroxydation lipidique des membranes de spermatozoïdes. Après 6h de conservation, les taux de MDA étaient plus faibles dans les milieux A5, A10 et R5 comparativement au lot témoin (différence non significative). Les taux les plus élevés en MDA ont été observés avec les concentrations les plus élevées utilisées en HE (870µg /ml), montrant un effet protecteur moins important sur les membranes comparativement aux doses 8.7 et 87 µg /ml. Cet état du stress oxydatif est probablement le mécanisme sous-jacent à l'origine de l'effet spermicide. Pour ce qui est de la capacité antioxydante totale, le milieu A5 après 6h de conservation, présente la valeur la plus élevée avec 81.16±14.24 ug Eq Trolox/L. Les résultats obtenus en termes de TAC élevée associée à une faible peroxydation lipidique, indique que l'utilisation des HE de l'armoise et du romarin peut être une approche efficace dans la lutte contre la peroxydation des lipides et les attaques des ERO pendant la conservation du sperme aviaire à 4°C. Cet effet protecteur contre la LPO est observée de la même manière avec la semence traitée avec CD-CHL, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Benhenia *et al.(* 2016) chez le bélier.

Nous avons exploré également une nouvelle alternative dans la préservation du sperme du coq à 4°C. L'approche consiste en une double protection de la cellule spermatique contre le choc du froid et le stress oxydatif, et ceci en utilisant simultanément le cholestérol et la vitamine E. Ces deux molécules présentent un inconvénient majeur, qui consiste en une faible solubilité dans les dilueurs classiques. Cette limite est surmontée par l'incorporation de ces molécules dans les cyclodextrines.

Au cours de la réfrigération à 4°C, la membrane du spermatozoïde du coq est exposée aux dommages du choc au froid avec une déplétion significative du cholestérol affectant ainsi l'intégrité de la membrane cellulaire, la mobilité des gamètes et les taux de fertilité. La sensibilité du sperme aviaire au choc du froid dépend du rapport cholestérol / phospholipides de la membrane cellulaire. Chez le coq, ce rapport très faible (0,30) comparé au sperme humain par exemple (0.99), explique la plus grande susceptibilité de la membrane du spermatozoïde du coq au choc du froid (Muiño-Blanco et al., 2008). La proportion élevée en AGPI dans la fraction phospholipidique membranaire rend le sperme susceptible à la peroxydation lipidique (Blesbois et al., 1997), faisant de la membrane une cible privilégiée des ERO (Peris et al., 2007). Cependant, il a été établi que la présence de cholestérol dans les milieux de conservation peut minimiser les dommages membranaires induits par le refroidissement (Darin-Bennett *et al.*

1973; Drobnis *et al.* 1993), et l'efficacité du cholestérol serait plus prononcée lors de sa solubilisation dans les cyclodextrine (Takeo et al., 2008). Les cyclodextrines agissent en augmentant le transfert de cholestérol dans la membrane du spermatozoïde (Moore et al., 2005, Pamornsakda et al., 2011) et par conséquent augmentent la résistance de la membrane plasmique au choc au froid.

De même, en raison de sa forte proportion en AGPI, la membrane du spermatozoïde du coq est la première cible des dommages causés par le stress oxydatif. La vitamine E est considérée au niveau de la membrane cellulaire, comme la première molécule antioxydante luttant contre le stress oxydatif (Surai et al., 2001) en interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides et en piégeant les ERO (Zaniboni et al., 2006). Vertuani et al. (2004), décrit au moins deux mécanismes par lesquels, la vitamine E agit comme antioxydant. Le premier consiste à piéger les EOR, alors que le second, consiste à réguler certains enzymes impliquées dans la défense antioxydante comme la SOD, la GPX, et la CAT and NADPH. Aujourd'hui, le problème de solubilité dans les milieux aqueux de la vitamine E est résolu, puisque la complexation de la vitamine E avec la cyclodextrine améliore sa stabilité et sa solubilité (Sueishi *et al.* 2012).

La supplémentation du milieu de conservation en vitamine E chargée dans la cyclodextine (CD-VitE), a amélioré les valeurs de la mobilité totale et progressive, mais également les paramètres cinématiques (VCL, VAP, ALH et BCF) après 6, 24 et 48 h de conservation à 4°C comparativement au témoin et au dilueur commercial. La supplémentation alimentaire en vitamine E, permet une amélioration de la qualité du sperme par prévention des dommages liés à l'oxydation (Eid et al., 2006). Elle permet également une réduction significative de la sensibilité à la peroxydation lipidique (Fujihara et Howarth, 1978 ; Lin et al., 2005). La vitamine E existe en quantité importante au niveau du spermatozoïde du dindon, et plutôt en quantités plus faibles chez le coq (Tufarelli et Laudadio, 2016). Une autre voie d'inhibition de la peroxydation lipidique consiste en l'incorporation directe de la vitamine E dans les diluants du sperme. Ainsi, l'ajout de 80 µg/ml de vitamine E au dilueur a permis d'améliorer le potentiel fertilisant du sperme de dinde conservé à 4°C pendant 24 heures. La vitamine E améliore la mobilité et l'intégrité membranaire du spermatozoïde, et prévient la peroxydation lipidique (Donoghue et Donoghue, 1997). Cependant, Surai et al., 2000 ; ont montré que la supplémentation alimentaire en vitamine E, avait plus d'influence sur l'inhibition de la peroxydation lipidique que l'incorporation directe de la vitamine E dans le dilueur.

Durant la dernière décennie, plusieurs travaux scientifiques sont réalisés dans le but d'améliorer l'efficacité antioxydante des dilueurs du sperme aviaire en utilisant d'autres molécules que la vitamine E. Le lycopène (caroténoïdede la tomate) augmente la viabilité des spermatozoïdes, avec une baisse de la peroxidation des lipides membranaires (Mangiagalli et al., 2010 ; Rosato et al., 2012). L'utilisation d'une plante médicinale (*Achillea millefolium*) encapsulée dans des nano-phytosomes, semble avoir des effets sur la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes (Najafi et al., 2018). Dans une autre étude, Fattah et al., 2017 ; montraient les effets positifs de la L-carnitine sur la conservation du sperme du coq à 4°C. Cependant, à notre connaissance, l'impact de la supplémentation des dilueurs avec le complexe cyclodextrine-vitamine E sur la conservation du sperme du coq, n'a pas été décrit dans la littérature. Cependant, il est à noter que le complexe d'inclusion cyclodextrine-α-tocophérol a été efficacement utilisé pour promouvoir la libération de l'α-tocophérol dans les additifs alimentaires (Ikeda et al., 2010), les excipients pharmaceutiques (Schloesser et al., 2015), et les produits cosmétiques (Watanabe et al., 2009).

A présent, il existe au moins quatre publications chez plusieurs espèces animales, montrant les effets positifs du complexe CD-VitE sur les paramètres spermatiques après conservation. En effet, les résultats obtenus chez le chien (Belala *et al*. 2016), le bélier (Benhenia et al., 2016; Khellouf et al., 2018), et le lapin (Nabi et al., 2017) montrent que le complexe CD-Vit E a amélioré les paramètres de mobilité (mobilité totale, progressive et paramètres cinématiques) avec une diminution de la LPO de la membrane des spermatozoïdes en comparaison avec la vitamine seule et les contrôles utilisés. Les résultats obtenus de ces études, suggèrent un effet similaire au cholestérol complexé avec la cyclodextrine, par l'insertion de la vitamine dans la membrane du spermatozoïde. L'association CD-CHL et CD-VitE dans le dilueur de la semence a donné des résultats plus intéressants en utilisant simultanément la vitamine E et le cholestérol, tous les deux chargés dans les cyclodextrines (CD-CHL-Vit E). Ce traitement a amélioré de manière hautement significative l'ensemble des paramètres de mobilité mesurés par le CASA après 6, 24 et 48 h de conservation, comparativement au témoin et au milieu commercial (IMV). Après 24 h de conservation à 4°C, le complexe le complexe CD-CHL-Vit E a amélioré de façon hautement significative la mobilité progressive par rapport au témoin (62.55% vs 26.86%). Les résultats obtenus avec le complexe sont probablement dû à l'effet combiné du cholestérol avec la vitamine E. En effet, la vitamine E est connue pour son effet antioxydant et stabilisant de la membrane (Panda et Cherian, G 2014 ; Urano et al., 1987, 1988) et le cholestérol qui pour contrecarrer la propagation

des ERO (Chuaychu-noo et al., 2017) et protecteur contre le peroxyde d'hydrogène (Naseer et al., 2015, Lone, 2018).

Conclusion

Conclusion

En élevage avicole moderne, la maitrise de la reproduction est un facteur capital particulièrement chez les coqs reproducteurs. Dans cette étude, nous avons fixé comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme à 4°C afin d'ouvrir des opportunités d'amélioration de la pratique d'insémination artificielle. Dans une première étape, l'approche expérimentale consistait à investiguer l'effet positif des huiles essentielles de l'armoise et du romarin sur les paramètres de mobilité et du statut oxydatif des spermatozoïdes. Dans une deuxième étape, nous avons exploré l'intérêt d'associer la vitamine E et le cholestérol, pour lutter simultanément contre le stress oxydatif et le choc thermique. Comme ces deux molécules actives sont hydrophobes, nous les avons solubilisées dans les cyclodextrines pour mieux les solubiliser, et augmenter ainsi leurs effets.

La première partie de notre travail nous a permis de mettre en évidence l'effet positif des huiles essentielles sur le maintien à des taux élevés les paramètres de mobilité spermatique (totale et progressive) ainsi que les paramètres cinématiques (VCL, VSL et VAP), l'ALH et la BCF. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt d'utiliser des concentrations adéquates en huiles essentielles de l'ordre de 8,7 à 87 µg /ml pour le romarin comme l'armoise. La mesure de la capacité antioxydante totale (TAC) des milieux de conservations après 6h de stockage, confirme le résultat obtenu pour la mobilité puisque la TAC des milieux avec la concentration 87 µg /ml est la plus élevée avec une différence statistiquement significative ($P < 0.05$). Pour la peroxydation lipidique, estimée à partir des taux de MDA, les faibles concentrations (8,7 et 87µg /ml) protègent efficacement les lipides membranaires contre les dommages du stress oxydatif.

La deuxième partie de ce travail a mis en évidence l'intérêt de la solubilisation de la vitamine E et du cholestérol dans les cyclodextrines, ceci a permis d'assurer une protection complémentaire, où le cholestérol renforce la membrane cellulaire et la vitamine E lutte contre les dommages des radicaux libres. L'association cholestérol avec la vitamine E encapsulés dans les cyclodextrines, a permis une amélioration des paramètres de mobilité du sperme pendant 48 h de stockage à 4°C. Cette nouvelle approche de conservation du sperme, ouvre des perspectives intéressantes en particulier chez le coq, dont la membrane cellulaire présente une faible proportion cholestérol/phospholipides.

Le maintien de la qualité du sperme conservé à 4°C dans les milieux testés, semble être une opportunité pour la gestion des programmes d'insémination artificielle dans les élevages

éloignés. Cependant, ces résultats devraient être confirmés par des études de fertilité en élevage pour leur donner toute leur signification. Pour les huiles essentielles, des perspectives intéressantes s'ouvrent à l'horizon, notamment par l'étude des mécanismes de protection de la cellule spermatique, les mesures que nous avons réalisées ne permettent pas d'identifier exhaustivement, les mécanismes à l'origine de cette protection. Des recherches futures, notamment pour l'effet antibactérien, méritent d'être entreprises.

Bibliographie

Bibliographie

Abaas, I.S., Hamzah, J.M., Ali, H.M., 2013. Analysis with evaluation of drying temperature on essential oil content of *Achillea fragrantissima* L. and *Artemisia herb-alba Asso*.. Int. J. Pharm. Pharm Sci. 5, 913–914.

Abu-Darwish, M. S., Abu-Dieyeh, Z.H.M. 2009. Essential Oil Content and Heavy Metals Composition of Thymus vulgaris Cultivated in Various Climatic Regions of Jordan. International Journal of Agriculture and Biology 11(1), 59–63.

Agarwal, A., Allamaneni, S. S., Said, T. M., 2004. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. Reprod Biomed Online 9, 466–468.

Agarwal, A., Prakaran, S.A., 2005. Oxidative stress and antioxidants in male fertility: a difficult balance. Iranian Journal of Reproductive Medicine 3, 1–8.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Hargreave, T.B., Irvine, D.S., Wu, F.C., 1989. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoosperm. Journal of Andrology 10, 214–220.

Aitken, R. J., Harkiss, D., Buckingham, D. W., 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev 35, 302–315.

Aitken, R. J., Baker, M. A., O'Bryan, M., 2004. Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. J. Androl. 25, 455–465.

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

Alkan, S., Baron, A., Ozdafi, O.B., Evecen, M., 2002. Morphological Defects in Turkey Semen. Turk J Vet Anim Sci26 (2002) 1087-1092.

Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine Veterinary Science 7, 145–73.

Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology 81, 5–17.

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

Amri, I., De martino, L., marandino, A., lamia, H., Mohsen, H.E., scandolera, E., De feo, V., Mancini, E., 2013. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Artemisia herba alba* growing wild in Tunisia. Nat. Prod. Commun. 8(3), 407–10.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P., 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.. J. Agric. Food Chem. 52, 3530–3535.

Ashizawa, K., Wishrt, G.J., 1987. Resolution of the sperm motility-stimulating principle of fowl seminal plasma into Ca^{2+} and an unidentified low molecular weight factor. Journal of reproduction and fertility 81(2), 495–499.

Bag, A., Chattopadhyay, R.R., 2015. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. PLOS ONE 10(7): e0131321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131321

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475.

Bakst, M.R., 1980. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. Journal of reproduction and fertility 60(1), 121–127.

Bakst, M.R., Cecil, H.C., 1997. Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. Sperm viability. I. Nigrosin/ eosin stain for determining live/dead and abnormal sperm counts. The Poultry Science Association, Inc., Savoy, Illinois, pp. 29–34.

Bakst, M.R., Howarth, B., 1977. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 17, 370–379.

Bajpai, V.K., Baek, K.H., kang, S.C., 2013. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. Food Res. Int. 45, 722–734.

Barbato, G.F., 1999. Genetic Relationships Between Selection for Growth and Reproductive Effectiveness. Poultry Science 78, 444–452.

Barbato, G.F., Crame, P.G., Hammerstedt, R.H., 1998. A practical in vitro Sperm-Egg binding essay that detects subfertile males. Biology of Reproduction 58, 686–699.

Barrie, G.M., Reproductive Biology and Phylogeny of Birds: Phylogeny, Morphology, Hormones, Fertilization, vol. 6A. Édition Jamieson, Enfield, NH: Science Publishers, 2007, 609 p.

Belala, R., Fatmi, S., Kaidi, R., Iguerouada, M., 2016. Revue de Médecine 167, 22–27.

Belhattab, R., Loubna, A., José, G., Barroso, L.G., Pedro, A., Figueiredo, A.C., 2014. Essential oil from Artemisia herba-alba Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and

comparison with an updated literature survey. Arabian Journal of Chemistry 7, 243–251.

Benhabiles, N.E.H., Aït Ammar, H., 2001. Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *Rosmarinus officinalis*. Perfumer & Flavorist 26, 40–48.

Benhenia, K., Lamara, A., Fatmi, S., Iguer-ouada, M., 2016. Effect of Cyclodextrins, Cholesterol and Vitamin E and Their Complexation on Cryopreserved Epididymal Ram Semen. Small Ruminant Research 141, 29–35.

Benoff, F.H., Rowe, K., Fuguay, J.I., Renden, J.A. Scott, A.R., 1981. Effect of semen collector on semen volume and sperm concentration in broiler breeder males. Poultry Science 60: 1062-1065.

Ben Slima, A., Ali, M.B., Barkallah, M., Traore, A.I., Boudawara, T., Allouche, N., Gdoura, R., 2013. Antioxidant properties of Pelargonium graveolens l'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. Lipids Health Dis. 7, 12–30. doi: 10.1186/1476-511X-12-30.

Bilgili, S.F., Renden, J.A., Sexton, K.J., 1985. The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. Poultry Science 64, 2358–2361.

Blanco, J.M., Wildt, D.E., Hofle, U., Voelker, W., Donoghue, A.M., 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. Theriogenology 71 (2009) 200–213.

Blesbois, E., Grasseau, I., Blum, J.C., 1993. Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4 degrees C. Theriogenology 39, 771–779.

Blesbois, E., Lessire, M., Grasseau, I., Hallouis, J.M., Hermier, D., 1997. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. Biol. Reprod. 56, 1216–1220.

Blesbois, E., 2012. Biological Features of the Avian Male Gamete and their Application to Biotechnology of Conservation. J. Poult. Sci. 49, 141–149.

Blesbois, E., Brillard, J.P., 2007. Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. Animal. 1, 1472–1481.

Blesbois, E., Hermier, D., 1990. Effects of high-density lipoproteins on storage at 4 degrees C of fowl spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 90, 473–482.

Blesbois, E., De Reviers, M., 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa stored in vitro. Journal of reproduction and fertility 95(1), 263–268.

Blesbois, E., Grasseau, I., Hermier, D., 1999. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 58C. Theriogenology 52, 325–334.

Blommaert, D., Franck, T., Donnay, I., Lejeune, J.P., Detilleux, J., Serteyn, D., 2016. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerolconcentration into the freezing medium of equine sperm. Cryobiology 72, 27–32.

Borghei-Rad, S.M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H., Ansari, M., 2017. Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. Theriogenology 101, 35–43.

Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S., 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology 34(1), 147–57.

Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., Chefrour, A., 2016. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). Bull. Soc. R. Sci. 85, 174–189.

Boutekedjiret, C., Belabbes, R., Bentahar, F., Bessière, J. M., Rezzoug, S. A., 2004. Isolation of rosemary oils by different processes. J. Essent. Oil Res. 16, 195–199.

Bouzidi, N., Mederbal, K., Bachir Raho, G., 2016. Antioxidant Activity of Essential Oil of Artemisia herba alba. J. Appl. Environ. Biol. Sci. 6(5), 59–65.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. J. Agric. Food. Chem. 55, 7879–7885.

Bramwell, R.K., Marks, H.L., Howarth, B., 1995. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. Poultry Sci. 74, 1875–1883.

Breque, C., Surai, P.F., Brillard, J.P., 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development 66, 314–323.

Brillard, J.P., McDaniels., 1986. Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. Poult Sci. 1986 Dec;65(12):2330-4.

Brouwers, J.F., Boerke, A., Silva, P.F.N., Garcia-Gil, N., Vangestel, R.A., Helms, J.B., Van De Lest, C.H.A., Gadella, B.M., 2011. Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm1. Biology of Reproduction 85(1), 128–36.

Brown, C.R., Hartree, E.F., 1976. Comparaison of neutral proteinase activities in cock and ram spermatozoa and observation of pro-acrosin in cock spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 46, 155–164.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6

Bunrathep, S., Palanuvej, C., Ruangrungsi, N., 2007. Chemical compositions and antioxidative activities of essential oils from four Ocimum species endemic to Thailand. J. Health Res. 21, 201–206.

Burros, W.H., Quinn, J.P., 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science 16, 19–24.

Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int. J. Food. Micobiol. 94, 223–253.

Buschmann, H.J., Schollmeyer, E., 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. J. Cosmet. Sci. 53, 185–191. doi:10.1023/A:1011892600388.

Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Geraci, D., Morganti, P., 2000. Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. Int. J. Tissue React. 22, 5–13.

Catala, A., 2012. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “fluid Mosaic Model” to the “lipid Whisker Model.” Biochimie 94, 101–109.

Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E., Verdar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100, 553–559.

Ceroiini, S., Kelso, K.A., Noble, R.C., Speake, B.K., Ptzzi, F., Cavalchini, L.G., 1997a. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. Biol. Reprod. 57, 976–980.

Cerolini, S., Peter, S., Andre, M., Teresa, G. Ray, N., 1997b. Lipid Composition of Semen in Different Fowl Breeders. Poultry and Avian Biology Reviews 8 (314),141–148.

Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., GliozziEffect, T., 2006. of docosahexaenoic acid and a-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology 66, 877–886.

Chaftar, N., Girardot, M., Quellard, N., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frère, J., Imbert, C., 2015. Activity of six essential oils extracted from Tunisian plants against *Legionella pneumophila*. Chem. Biodivers 12, 1565–1574.

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

Chalah, T., Brillard J.P., 1998. Comparison of assessment of fowl sperm viability by Eosin-Nigrosin and dual fluorescence (Syber-14/PI).

Chaudhuri, D.G., Wishart, G.J., Lake, P., Ravie, E.O., 1988. Predicting the fertilizing ability of avian semen: a comparison of a simple colorimetric test with other methods for predicting the fertilizing ability of fowl semen. Br. Poult. Sci. 29, 847–851.

Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D., Kong, A.N., 2000. Activation of antioxidant response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. Archive of Pharmacy Research 23, 605–612.

Chikhoune, A., Stouvenel, L., Iguer-Ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Lorès, P., Wolf, J.P., Aissat, K., Auger, J., Vaiman, D., Touré, A., 2015. *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. Reprod. Biomed. Online 31, 411–420.

Chuaychu-Noo, N., Thananurak, P., Chankitisakul, V., Vongpralub, T., 2017. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. Cryobiology 74, 8–12.

Clarke, R.N., Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poultry science, 1984, 63(4): 801-805.

Colenbrander, B., Gadella, B.M., Tae, S., 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. Reprod. Domest. Anim. 38, 305–311.

Couic-Marinier F., Lobstein A., 2013b. Composition chimique des huiles essentielles. Actual. Pharm. 52 (525), 22-25.

Crini, G., 2014. Review : A History of Cyclodextrins. Chem. Rev. 114, 10940–10975. doi:10.1021/cr500081p.

Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., Acamovic, T., 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. Br. Poult. Sci. 48, 496–506.

Dahmani-hamzaoui, N., Baaliouamer, A., 2010. Chemical composition of Algerian *Artemisia herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. JEOR. 22, 514–517.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 329, 23–38.

Darin-Bennett, A., Poulos, A., White, G., 1973. "The Effect of Cold Shock and Freeze-Thawing on Release of Phospholipids by Ram, Bull, and Boar Spermatozoa." Australian Journal of Biological Sciences 26 : 1409–20.

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

Deaton, C.M., Marlin, D. J., 2003. Exercice-associated oxidative stress. Clinical Techniques in Equine Pratice 2(3), 278–291.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism Cardiovascular Diseases 15, 316–28.

Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses. Process Biochem 39(9), 1033–1046.

De Reviers, M., 1975. Le développement testiculaire du coq. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15 (4), 633–641.

De Reviers, M., 1988. Appareil génital mâle et production des spermatozoïdes. In : Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA Editions, Paris, France, 141–206.

De Reviers, M, 1996. Photopériodisme, développement testiculaire et production de spermatozoïdes chez les oiseaux domestiques. INRA Prod. Anim. 9 (1), 35–44.

Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., De carvalho, J.E., 2000. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L.. J. Ethnopharmacol. 69, 57 – 62.

Dimitrov, S.G., Atanasov, V.K., Surai, P.F., Denev, S.A., 2007. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. Animal Reproduction Science 100, 311–317.

Diab, Y., Auezova, L., Chebib, H., Chalchat, J.C., Figueredo, G., 2002. Chemical composition of Lebanese rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as a function of the geographical region and the harvest time. J. Ess. Oil Res. 14, 449–452.

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H.D., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. Chem. Nat. Compd. 43, 487–488.

Djenane, D., Sanchez-escalante, A., Beltran, J.A., Roncales, P., 2002. Ability of α-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. Food Chem. 76, 407–415.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 654–660.

Dob, T., Benabdelkader, T., 2006. Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia herba alba* Asso. Grown in Algeria. J. Essent. Oil Res. 18(6), 685–690.

Dodziuk, H., 2006. Cyclodextrins and their complexes :chemistry, analytical methods, Appliccations. Weinheim; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Donoghue, A.M., Donoghue, D., 1997. Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Poultry Science 76, 1440–1445.

Donoghue, A.M., Walker-Simmons, M.K., 1999. The influence of wheat dehydration-induced proteins on the function of turkey spermatozoa after twenty-four hours in vitro storage. Poultry Science 78, 235–241.

Donoghue, A.M., Wishart, G.J., 2000. Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science 62. 213–232.

Douard, V., Hermier, D., Blesbois, E., 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. Biol. Reprod. 63, 1450–1456.

Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Blesbois, E., 2003. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in turkeys. Theriogenology 59, 753–764.

Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Labbe, C., Blesbois, E., 2004. Impact of composition changes in the storage medium on lipids and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology 61, 1–13.

Drobnis, E. Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, T.J., Overstreet, J. W., Crowe, J.H., 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. J. Exp. Zool. 265, 432–7.

Eid, L.N., Lorton, S.P., Parrish, J.J., 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. Biol. Reprod. 51, 1232–1237.

Eid, Y., Ebeid, T., Younis, H., 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. British Poultry Science 47, 350–356.

El Asbahani, K., Miladi, W., Badri, M., Sala, E.H., Aït Addi, H., Casabianca, A., El Mousadik, D., Hartmann, A., Jilale, F.N.R., Renaud, A., 2015. Elaissari Essentials oil From extraction to encapsulation. Int J Pharm. 483(1-2), 220–43.

Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Filippini, G., Benvenuti, S., Pisi, A., Scozzoli, M., Bacci, M.L., 2017. *Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oils: In vitro effects and toxicity on swine spermatozoa. Molecules 22 (12), 2162.

Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Carnevali, G., Filippini, G., Pisi, A., Benvenuti, S., Scozzoli, M., Bacci, M.L., 2019. In Vitro Effects of Tea Tree Oil (*Melaleuca Alternifolia* Essential Oil) and its principal component terpinen-4-ol on swine spermatozoa. Molecules 24, (6), 1071.

Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Carnevali, G., Filippini, G., Pisi, A., Benvenuti, S., Scozzoli, M., Bacci, M.L., 2019. In Vitro Effects of Tea Tree Oil (Melaleuca Alternifolia Essential Oil) and its principal component terpinen-4-ol on swine spermatozoa. Molecules 24, (6), 1071.

Etches, R.J., The male. In : Reproduction in Poultry. Wallingford, London, UK, 1996, 208–233. Evans, M.B., Haken, J.K., 1989. Recent Developments in the Gas Chromatographic Retention Index Scheme. J. Chrom. 472, 93–127.

Evenson, D.P., Wixon, R., 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male fertility. Theriogenology 65, 979–991.

Ezz, M.A., Montasser, A.E., Hussein, M., Eldesouky, A., Badr, M., Hegab, A.E., Balboula, A., Zaabel, S.M., 2017. The effect of cholesterol loaded cyclodextrins on post-thawing quality of buffalo semen in relation to sperm DNA damage and ultrastructure. Reprod Biol. 17(1), 42–50.

Faid, M., Bakhy, K., Anshad, M. Tantaoui-Elaraki, A., 1995. Alomond paste: Physiochemical and microbial characterizations and preservation with sorbic acid and Cinnamon. J. Food Prod. 58, 547–550.

Fattah, A.A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., 2017. L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. Cryobiology 74, 13–18.

Favier, A., 2003. Le Stress Oxydant Intérêt Conceptuel et Expérimental Dans La Compréhension. L'actualité chimique - novembre-décembre 2003.

Fawcett, D.W., 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. Biol Reprod Suppl. 2, 90–127.

Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M., Ceccarini, l., 2002. Main Agronomic – Productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. J. Agric. Food Chem. 50, 3512–3517.

Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R., Prior, E., 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnasol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J. Agric. Food. Chem. 44, 131–135.

Fraser, L., Strzezek, J., 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. Reprod. Domest. Anim. 40, 530–536.

Gadea, J., 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Span J. Agric. Res. 1, 17–27.

Fujihara, N., Howarth, J.R.B., 1978. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. Poultry Science 57, 1766–1768.

Gardès-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 270 (11–12) 91–96.

Garner, D.L., Johnson, L.A., 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBER-14 and propidium iodide. Biol. Reprod. 53, 276–284.

Gharib, F., Ghazi, S., Aly, H., El-araby, M., Moustafa, S., 2016. Effect of soil type and water content on rosemary growth and essential oil yield. Int. J. Sci. Eng. Res. 7, 183–189.

Giesen, A.F., Sexton, T.J., 1983. Beltsville poultry semen extender. 9. Effect of storage temperature on turkey semen held eighteen hours. Poultry Science 62 (7), 1305–1311.

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

Gerami, N. F., Roostaei-Ali M.M., 2018. Effect of *Zataria multiflora* essential oil on rooster semen during storage at 4°C. I.J.V.S.T. 10 (1), 21–26.

Ghedira, K., 2005. Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois thérapeutique. Phytothérapie 4, 162–169.

Gous, R.M., Morris, T.R., 2005. Nutritional interventions in alleviating the effects of high temperatures in broiler production. World's Poultry Science Journal. Volume 61, Issue 3 September 2005, pp. 463-475.

Guignard, J.L., 2000. Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177–185.

Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Anim Reprod Sci. 68, 239–247.

Graham, J.K., Moce, E., 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology 64, 492–504.

Gutteridge, J.M., Stocks, J., Dormandy, T.L., 1974. Thiobarbituric acid - reactive substances derived from autoxiding linoleic and linolenic acids. Anal Chim Acta. 70, 107–111.

Halliwell, B.,1996. Vitamin C : Antioxidant or Pro-Oxidant I N Vivo ? Free radical research 25(5), 439–54.

Halliwell, B., 1999. Oxygen and nitrogen are procarcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. Mutat Res. 15, 37–52.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B., Lyoussi, B., 2000. Experimental diuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centaurium erythraea. J. Ethnopharmacol. 71, 465–472.

Habtemariam, S., 2016. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2016, Article ID 2680409, 14 pages.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl. 11, 73–88.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. Cryobiology 29, 26–38.

Hamori, E., 1980. Selection of viable cells with known DNA content. Cytometry 1,132–135.

Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fert. 88, 343–352.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. Food Chemistry 98 (1), 136–148.

Hodges, R.D., 1974. The reproductive system. I. The male reproductive system. Pp. 300-326. In The Histology of the Fowl. Academic Press, London.

Höhn, A., König, J., Grune, T., 2013. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. J. Proteomics 92, 132–159.

Houmani, M., Houmani, Z., Melpomeni, S., 2004. Intérêt de Artemisia herba alba Asso dansl'alimentation du bétail des steppes algériennes. Acta Bot Gall 151, 165–172.

Ikeda, Saiko et al. 2010. "Complexation of Tocotrienol with Gamma-Cyclodextrin Enhances Intestinal Absorption of Tocotrienol in Rats." Bioscience, biotechnology, and biochemistry 74(January 2017): 1452–57.

Imelouane, B., El Bachiri, A., Ankit, M., Khedid, K., Wathelet, J.P.l., 2010. Essential oil Composition and antimicrobial Activity of Artemisia Herba-AlbaAsso Grown in Morroco. Banats J. Biotechnol. 1, 48–55.

Jaouadi, I., Koparal, A.T., Bostancıoğlu, R.B., Yakoubiand, M.T., El Gazzah, M., 2014. The antiangiogenic activity of Artemisia herba-alba's essential oil and its relation with the harvest period Aust. J.Crop Sci. 8(10), 1395–1401.

Jaganmohan, R.L., Meenakshi, S., Raghavan, D., Abraham, K.O., 1997. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact of drying on its flavor quality. J. Food Qual. 21, 107–115.

Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A., 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. Ind. Crops Prod. 48, 144–152.

Jordan, M.J., Martinez, R., Goodner, K., Baldwin, E., Sotomayor, J., 2006. Seasonal Variation of Thymus Hyemalis Lange and Spanish Thymus vulgaris L. Essential Oils Composition. Industrial Crops and Products 24(3), 253–63.

Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R., 2011. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. J. Med. Plants Res. 5, 5999–6004.

Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Med Chem. 10(10), 813–29.

Kayashima, T., Matsubara, K., 2012. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 115–119.

Kelso, K.A., Cerolini, S., Noble, R.C., Sparks, N.H., Speake, B.K., 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. Journal of Reproduction and Fertility 106, 201–206.

Kelso, K.A., Cerolini, S., Speake, B.K., Cavalchini, L.G., Noble, R.C., 1997. Effects of dietary supplementation - with α-linoleic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. J. Reprod. Fert. 110, 53–59.

Khan, J., Tahir, M.Z., Khalid, A., Sattar, A., Ahmad, N., 2017. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on cryosurvival of dog spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 52, 265–268.

Khellouf, A., Benhenia, K., Fatmi, S., Iguer-Ouada, M., 2018. The complementary effect of cholesterol and vitamin e preloaded in cyclodextrins on frozen bovine semen: motility parameters, membrane integrity and lipid peroxidation. CryoLetters 39 (2), 113–120.

Khlifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013. Composition and antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba alba*, *Rutachalpensis* L. and *Peganumharmala* L. Food ChemToxicol. 55, 202–208.

Koch, C., Reichling, J., Schneele, J., Schnitzler, P., 2008. Inhibitory effect of essential oils against *Herpes simplex* virus type 2. Phytomedicine 15 (1–2), 71-78.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 30:620-50.

Koontz, J.L., Marcy, J.E., O'Keefe, S.F., Duncan, S.E., 2009. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants alpha tocopherol and quercetin. J. Agric. Food Chem. 57, 1162–1171. doi:10.1021/jf802823q.

Korn, N., Thurston, R.J., Pooser, B.P., Scott, T.R., 2000.Ultrastructure of spermatozoa from Japanese quail. Poult Sci. 79(3), 86–93.

Köse, E., Sarsilmaz, M., Meydan, S., Sönmez, M., Kuş, I., Kavakli, A., 2011. The effect of lavender oil on serum testosterone levels and epididymal sperm characteristics of formaldehyde-treated malrats. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 15, 538–542.

Kothari, S., Aaron, T., Ashok, A., Plessis, S.S., 2010. Free Radicals : Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function. Indian journal of experimental biology 48(5), 425–35.

Kotlowska, M., Dietrich, G., Wojtczak, M., Karol, H., Ciereszko, A., 2007. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. Theriogenology 67, 276–286.

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 711, 193–201.

Labas, V., 2015. Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. J Proteomics 112, 313–335.

Lake, P.E., 1978. The principles and practice of semen collection and preservation in birds. In: Symposium of Zoological Society, London, p. 43.

Lake, P.E., 1995. Historical perspective of artificial insemination technology. In: Bakst, M.R. and Wishart, G.J. 1995. (eds) Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry . Poultry Science Association, Savoy, Illinois, pp. 1–20.

Lake, P. E., Ravie, O., 1979. The effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5°C in fluids of different pH. J. Reprod. Fertil. 57,149–155.

Lamirande, E.D., O'Flaherty, C., 2008. Sperm Activation: Role of Reactive Oxygen Species and Kinases. Biochimica et biophysica acta 1784(1), 106–15. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.08.024.

Laura, P.F., Garon, M.T., Vicente, M., 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. J. Agric. Food. Chem. 58, 161–171.

Laza-Knoerr, A.L., Gref, R., Couvreur, P., 2010. Cyclodextrins for drug delivery. J. Drug Target. 18, 645–656. doi:10.3109/10611861003622552.

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Thérond, P., Torreilles, J., 1998. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. Volume 56, numéro 3, Mai-Juin.

Li, Z., Malla, S., Shin, B., Li, J.M., 2014. Battle against RNA oxidation: Molecular mechanisms for reducing oxidized RNA to protect cells. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 5, 335–346.

Lin, Y.F., Chang, S.J., Yang, J.R., Lee, Y.P., Hsu, A.L., 2005. Effects of supplemental vitamin E during the mature period on the reproduction performance of Taiwan native chicken cockerels. British Poultry Science 46, 366–373.

Liu, Q., Duan, R.J., Zhou, Y.F., Wei, H.K., Peng, J., Li, J.L., 2017. Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen antioxidant status and semen quality parameters. Andrologia 22, 1–8.

Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. J. Pharm. Sci. 85, 1017–1025.

Loftsson, T., Duchene, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int. J. Pharm. 329(1–2), 1–11.

Lone, S.A., 2018. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. Animal Reproduction Science 192, 1–5. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.009.

Long, J.A., 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? Poult. Sci. 85, 232–236.

Lopez, C. A., De Vries, A. H., Marrink, S. J., 2013. Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. Sci. Rep. 3, 2071.

Lopez-Nicolas, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F., 2014. Cyclodextrins and Antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54, 251–76.

Lubinic, E., 2003. Manuel pratique d'aromathérapie, les huiles essentielles et leur utilisation.

Luis, J.C., Perez, R.M., Gonzalez, F.V., 2007. UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. Food Chem. 101, 1211–1215.

Lukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A., Siudzinska, A., 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Res. Vet. Sci. 85 (3), 583–588.

Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem. Biol. Interact. 224, 164–175.

Mahboubi, M., Kazempour, N., 2015. The antifungal activity of Artemisia sieberi essential oil from different localities of Iran against dermatophyte. fungi. J. Mycol. Med. 25(2), 65–71. doi: 10.1016/j.mycmed.2015.02.042.

Mahmoud, A.M., Deporter, B., Piens, N., Comhaire, F.H., 1997. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. Fertil. Steril. 68, 340–345.

Makhloufi, A., Moussaoui, A., Makhloufi, L., Benlarbi, Z., Hibi, B.S., Mellouki, S., Rahal, S., 2011. Microbiological and physicochemical quality of four cultivars of dates in the region of Bechar, South-West of Algeria-optimization of conservation by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. Acta. Hortic. 994, 247–255.

Mandelker, L., 2008. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Vet. Clin. : Small Anim Practice 38, 1–30.

Mangiagalli, M.G., Martino, P.A., Smajlovic, T., Cavalchini, L.G., Marelli, S.P., 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeders. British Poultry Science 51, 152–157.

Marnett, L.J., Riggins, J.N., James, D.W., 2003. Endogenous Generation of Reactive Oxidants and Electrophiles and Their Reactions with DNA and Protein. The Journal of clinical investigation 111(5), 583–93.

Marzouk, Z., Ben Mansour, H., Charaief, I., Mosrati, R., Cheriaa, J., Neffati, A., Marzouk, B., Sfari, M., Boukef, K., Barillies, D., Ghedira, L.C. 2006. Chemical composition cdef-dvf antibacterial and antimutagenic activities of four populations of Rosmarinus officinalis L. oils from Tunisia. J. Food. Agri. Environ. 4(2), 89–94.

Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. J. Clean. Prod. 13, 833–839.

Masatoshi, H., Hiroaki, K., 1997. Repellency of rosemary oil and its components againts the Onion aphid, Neotoxoptera formosana. Appl. Entomol. Zoot. 32, 3303–3310.

Maxwell, W.M., 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. Theriogenology 52(8), 1353–1362.

Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. 247 C125–42.

McDaniel, C.D., Hannah, J.L., Parker, H.M., Schultz, C.D., Zumwalt, C.D., 1997. The relationship of the sperm motility index with rooster sperm quality and fertilizing ability. Poultry Sci. 76 (Suppl. 1), 115. (Abstr.)

McDaniel, C.D., Hannah, J.L., Parker, H.M., Smith, T.W., Schultz, C.D., Zumwalt C.D., 1998. Use of a Sperm Analyzer for Evaluating Broiler Breeder Males. 1. Effects of Altering Sperm Quality and Quantity on the Sperm Motility Index. Poultry Science 77, 888–893.

Methorst, C., Huyghe, E., 2014. Stress Oxydant et Infertilité Masculine : Physiopathologie et Intérêt Thérapeutique Des Antioxydants. Progrès en urologie 24, 4–10.

Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., Thérondet, P., 2008. "Biomarqueurs de La Peroxydation Lipidique : Aspects Analytiques." Annales de Biologie Clinique 66 (6) : 605–20.

Moce, E., Graham, J.K., 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. J. Anim. Sci. 84, 826–33. doi:/2006.844826x.

Moce, E., Blanch, E., Tomas, C., Graham, J.K., 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. Reprod Domest Anim 45 Suppl 2, 57–66.

Moce, E., Purdy, P.H., Graham, J.K., 2010b. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Anim. Reprod. Sci. 118, 236–247.

Mohan, J., Saini, M., Joshi, P., 1995. Isolation of a spermatozoa motility inhibiting factor from chicken seminal plasma with antibacterial property. Biochim. Biophys. Acta. 1245(3), 407–413.

Mohan, J., Sharma, S.K., Kolluri, G., Dhama, K., 2018. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. World's Poultry Science Journal 74 (3), 475–488.

Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology 51, 241–249.

Moore, K., Roberts, L., 1998. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res. Jun; 28 (6) :659-71.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A.A., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free. Radic. Res. 40, 223–231.

Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? Cell. Nov 14;115(4):377-88.

Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. (2008). Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. Reproduction in Domestic Animals, 43, 18–31. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x

Nabi, I.S., Fatmi, S., Zerrouki-Daoudi, N., Iguer-ouada, M., 2017. Interest of vitamin E and cholesterol preloaded in cyclodextrins on motility of cryopreserved rabbit semen. Revue Méd. Vét. 168, (4–6), 87–92.

Najafi, D., Taheri, R.A., Najafi, A., Rouhollahi, A.A., Alvarez-Rodriguez, M., 2018. Effect of *Achillea millefolium*-loaded nanophytosome in the post-thawing sperm quality and oxidative status of rooster semen. Cryobiology 82, 37–42. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.04.011.

Naghdi Badi, H.A., Yazdani, D., Mohammad Ali, S., Nazari, F., 2004. Effects of Spacing and Harvesting Time on Herbage Yield and Quality/quantity of Oil in Thyme, *Thymus vulgaris* L.. Industrial Crops and Products 19(3), 231–36.

Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, İ., Ceylan, A., Boyacıoğlu, M., Kum, C., 2015. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. Cryobiology 71, 18–23.

Neild, D.M., Chaves, M.G., Flores, M., Miragaya, M.H., Gonzalez, E., Agüero, A., 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. Andrologia 32, 351–355.

Nieto, G., Huvaere, K., Skibsted, L.H., 2011. Antioxidant activity of rosemary and thyme by products and synergism with added antioxidant in a liposome system. Eur. Food Res. Technol. 233, 11–18.

Nguyen, T.M.D., 2015. Rôle des protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinées à être cryopréservées. Thèse, Faculté des Sciences exactes et Naturelles de l'Université de Tours, 209 p.

Nishijima, K., Yamaguchi, S., Tanaka, M., Sakai, Y., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., Kitajima, S., 2014. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. Exp. Anim. 63, 149–54.

Nowaczewski, S., Kontecka, H., 2005. Effect of dietary vitamin C supplement on reproductive performance of aviary pheasants. Czech J. Anim. Sci., 50, 2005 (5): 208–212.

Offord, E.A., Mace, K., Ruffieux, C., Malnoe, A., Pfeifer, A.M.A., 1995. Rosmery components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. Carcinogenesis 16, 2057–2062.

Outaleb, T., Hazzit, M., Ferhat, Z., Baaliouamer, A., Yekkour, A., Zitouni, A., Sabaou, N., 2015. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Rosmarinus officinalis* L. extracts. J. Essent. Oil. Bear. Pl. 18, 654–665.

Pamornsakda, T., Pojprasath, T., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., 2011. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. Cryobiology 63, 90–95. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.05.006.

Panda, A.K., Cherian, G., 2014. Role of Vitamin E in Counteracting Oxidative Stress in Poultry. J. Poult. Sci. 51, 109–117.

Paris, M., Hurabielle, M., 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson 339p.

Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 38, 209–222.

Parks, J.E., Lynch, D.V., 1992. "Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes." Cryobiology 29(2): 255–66.

Partyka, A., Lukaszewicz, E.T., Nizanski, W., 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology 77(8), 1497–1504.

Partyka, A., Strojecki, M., Nizanski, W., 2018. Cyclodextrins or cholesterol-loaded-cyclodextrins? A better choice for improved cryosurvival of chicken spermatozoa. Animal Reproduction Science 193, 235–244. doi: 10.1016/j.anireprosci.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian J. Clin. Biochem. 30, 11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.

Paul, S., Kang, S.C., 2011. *In vitro* determination of the contraceptive spermicidal activity of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill fruits. N. Biotechnol. 28, 684–690.

Paul, S., Kang, S.C., 2012. Studies on the viability and membrane integrity of human spermatozoa treated with essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex turrill fruit. Andrologia 44, 117–125.

Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L., 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. Mol. Reprod. Dev. 74, 878–892.

Purdy, P.H., Graham, J.K., 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology 48, 36–45.

Radwan, N.L., Hassan, R.A., Qota, E.M., Fayek, H.M., 2008. Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. Int. J. Poult. Sci. 7, 134–150.

Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ramteke, S.S., Perumal, P., Ghosh, S.K., Singh, M., Pande, M., Srivastava, N., 2016. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 164, 72–81.

Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Ćebović, T., Vukmirović, S., Mikov, M., 2014. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement. Altern. Med., 14, 225. doi: 10.1186/1472–6882–14–225.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231–1237.

Regiert, M., 2005. Light-stable vitamin E by inclusion in gamma cyclodextrin. SOEFW Int. J. Appl. Sci.131, 10–18.

Rengaraj, D., Hong, Y.H., 2015. Effects of Dietary Vitamin E on Fertility Functions in Poultry Species. International Journal of Molecular Sciences 16, 9910–9921.

Riar, S.S., Devakumar, C., Ilavazhagan, G., Bardhan, J., Kain, A.K., Thomas, P., Singh, R., Singh, B., 1990. Volatile fraction of neem oil as a spermicide. Contraception, 42, 479–487.

Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A., 1992. Malonaldehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react thiobarbituric. Clin Chem.: 38:704-709.

Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry 92, 235–254

Rosato, M.P., Centoducati, G., Santacroce, M.P., Iaffaldano, N., 2012. Effects of lycopene on in vitro quality and lipid peroxidation in refrigerated and cryopreserved turkey spermatozoa. British Poultry Science 53, 545–552.

Santiago-Moreno, J., Esteso, M.C., Villaverde-Morcillo, S., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., López-Sebastián, A., López Goya, A., Gimeno Martínez, J., 2016.

Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. Asian. J. Androl. 18, 882–888.

Satyal, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters, R.L., Awadh, A.N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G., Setzer, W.N., 2017. Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. Foods 6(3), 20. doi: 10.3390/foods6030020.

Schloesser, A., Esatbeyoglu, T., Piegholdt, S., Dose, J., Ikuta, N., Okamoto, H., Rimbach, G., 2015. Dietary Tocotrienol/γ-Cyclodextrin Complex Increases Mitochondrial Membrane Potential and ATP Concentrations in the Brains of Aged Mice. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 1–8. doi:10.1155/2015/789710

Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Gharbi, N., Sakly, M., 2015. Protective effect of Lavandula stoechas and Rosmarinus officinalis essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. J. Med. Food. 18, 241–249.

Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Azhar, H.A., Hosni, K., Marzouki, L., Sebai, H., 2016. Antioxidant properties of Artemisia herba-alba and eucalyptus camaldulensis essentials oils on malathion-induced reproductive damage in rat. RSC Adv. 6, 110661–110673. doi: 10.1039/C6RA18268B.

Semalty, A., 2014. Cyclodextrin and phospholipid complexation in solubility and dissolution enhancement: a critical and meta-analysis. Expert Opin. Drug Deliv. 11 (8), 255–72.

Sexton, T.J., 1977. A new poultry semen extender. 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry Science 56, 1443–1446.

Sexton, T.J., 1978. A new poultry extender. 3. Effect of storage conditions on the fertility capacity of chicken semen stored at 5°C. Poultry Science 57, 285–289.

Sexton, T.J., 1982. Beltsville poultry semen extender. 6. Holding turkey semen for six hours at 15°C. Poultry Science 61, 1202–1208.

Shadan, S., James, P.S., Howes, E.A., Jones, R., 2004. Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution during Capacitation of Boar Spermatozoa. Biology of reproduction 71, 253–65. doi: 10.1095/biolreprod.103.026435.

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S.A., Iriti, M., 2018. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. Molecules 1, 22(1). pii: E70. doi: 10.3390/molecules22010070.

Shen, S.Q., Zhang, Y., Xiang, J.J., Xiong, C.L., 2007. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat

shock protein and antioxidant enzymes. World Journal of Gastroenterology 13, 1953–1961.

Shiva, M., Gautam, A.K., Verma, Y., Shivgotra, V., Doshi, H., Kumar, S., 2011. "Association between Sperm Quality, Oxidative Stress, and Seminal Antioxidant Activity." Clinical Biochemistry 44(4): 319–24.

Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J Med. 91, 31–38.

Silva, E.C.B., Cajueiro, J.F.P., Silva, S.V., Soares, P.C., Guerra, M.M.P., 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology 77 (8), 1722–1726.

Silva, P.F.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of Damage in Mammalian Sperm Cells. Theriogenology 65, 958–78.

Siudzinska, A., Lukaszewicz, E., 2008. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. J. Appl. Poult. Res. 17, 101–108.

Slameňová, D.H., Horváthová, E., Kováčiková, Z., Kozics, K., Hunáková, L., 2011. Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H2O2 and DMNQ. Food. Chem. 129, 64–70.

Smeti, S., Atti, N., Mahouachi, M., Munoz, F., 2013. Use of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils to increase the shelf life of Barbarine light lamb meat. Small. Rumin. Res. 113, 340–345.

Soler, A.J., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2003.Storage of Red Deer Epididymides for Four Days at 5 Degrees C: Effects on Sperm Motility, Viability, and Morphological Integrity. Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology 295, 188–99. doi: 10.1002/jez.a.10194.

Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins Opening Review Article. Amino Acids 25(3-4), 207–18.

Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. Biochim. Biophys. Acta. 27, 779(1), 89–137.

Sueishi, Y., Masashi, H., Naoya, I., 2012. Characterization of Inclusion Complex of Vitamin E Compound with 2,6-Di-O-Methylated B-Cyclodextrin as the Solubility Enhancer and

Its Kinetic Determination for Radical Scavenging Ability. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 72, 467–72.

Surai, P.F., Kostjuk, I., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H.C., 1997. Effect of vitamin E in the diet of laying hens on its accumulation in the egg yolk and embryonic tissues and their susceptibility to lipid peroxidation. Poultry and Avian Biology Reviews 8,166.

Surai, P.F., Cerolini, S., Wisharta, G.J., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H.C., 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Avian. Poult. Biol. Rev. 9 (l), 11–23.

Surai, P.F., Fisinin, V.I., 2014. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. Anim. Feed Sci. and Technolo. 191, 1–15.

Surai, P.F., Fujihara, N., Speake, B.K., Brillard, J.P., Wishart, G.J., Sparks. N.H.C., 2001. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. Asian-Australas J. Anim. Sci. 14(7), 1024–1050.

Surai, P.F., Brillard, J.P., Speake, B.K., Blesbois, E., Seigneurin, F., Sparks, N.H., 2000. Phospholipids fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. Theriogenology 53, 1025–1039.

Surai, P.F., Fisinin, V., Karadas, F., 2016a. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. Animal Nutrition 2 (1), 1–11.

Surai, P.F., 2016b. Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase. Anim. Nutr. 1, 1-17. doi: 10.21767/2572-5459.100008.

Takeo, T., Hoshii, T., Kondo, Y., Toyodome, H., Arima, H., Yamamura, K., Irie, T., Nakagata, N., 2008. Methyl-Beta-Cyclodextrin Improves Fertilizing Ability of C57BL/6 Mouse Sperm after Freezing and Thawing by Facilitating Cholesterol Efflux from the Cells. Biology of reproduction 78, 546–51.

Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A., 2004. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition TEC & DOC Lavoisier.6-264.

Thomson, L.K., Fleming, S.D., Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A., Clark, A.M., 2009. Cryopreservation-Induced Human Sperm DNA Damage Is Predominantly Mediated by Oxidative Stress rather than Apoptosis. Human Reproduction 24(9), 2061–70.

Tufarelli, V., Laudadio, V., 2016. Antioxidant activity of vitamin e and its role in avian reproduction. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 4(3S). ISSN N°:2320–8694.doi: 10.18006/2016.4(3S).266.272.

Türk, G., Çeribaş, A.O., Şimşek, Ü.G., Çeribaş, S., Güvenç, M., Özer K.Ş., Çiftçi, M., Sönmez, M., Yüce, A., Bayrakdar, A., Yaman, M., Tonbak, F., 2016. Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. Anim. Reprod. Sci. 164, 133–143.

Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α-tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. Biochem Biophys Res Commun 146, 1413–1418

Urano, S., Yano, K., Matsuo, M.,1988. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α-tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. Biochem Biophys Res Commun 150, 469–475

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des. 2004;10 (14) :1677-94.

Voljc, M., Frankic, T., Levart, A., Nemec, M., Salobir, J., 2011. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of α-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. Poultry Science 90, 1478–1488.

Wang, W., Weng, X., Cheng, D., 2000. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. Food Chem. 71, 45 –49.

Watanabe, Yoshiyuki, Takashi Yamashita, Marie Yamashita, and Shuji Adachi. 2009. "Suppressive Effect of α-Tocopherol Complexed with β-Cyclodextrin on the Oxidation of Methyl Linoleate." Food Science and Technology Research 15(5): 479–82

Watson, P F. 1981. The ent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation, TrAC Trends Anal. Chem. 19 617–628.

Wishart, G.J., 1984. Metabolism of fowl and turkey spermatozoa at low temperatures. Journal of Reproduction and Fertility 70, 145–149.

White, I.G., 1993. Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: A Review. Reproduction, fertility, and development 5, 639–58.

Wishart, G.J., 1997. Quantitative aspects of sperm: egg interaction in chickens and turkeys. Anim. Reprod. Sci. 48(1), 81–92.

Wishart, G.J., 2009. Semen Quality and Semen Storage. In Poultry Science Symposium Series: Biology of Breeding Poultry. CAB international. UK, 151-178.

Yadav, H.P., Kumar, A., Shah, N., Chauhan, D.S., Saxena, A., Yadav, S., Swain, D.K., 2017. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin supplementation on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. Theriogenology 96, 164–171.

Yurtdas, G., Demirel, M., Genc, L., 2011. Inclusion complexes of fluconazole with β-cyclodextrin: physicochemical characterization and in vitro evaluation of its formulation. J. Incl. Phenom. Macro. 70(3–4), 429–435.

Zaniboni, L., Rizzi, R., Cerolini, S., 2006. Combined effect of DHA and a-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. Theriogenology 65, 1813–1827.

Zaouali, Y., Messaoud, C., Ben Salah, A., Boussaid, M., 2005. Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis L*. Flavor. Fragr. J. 20, 512–520.

Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M., 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology 48, 3144–3152.

Zermane, A., Larkeche, O., Meniai, A.H., Crampon, C., Badens, E., 2016. Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO_2 using response surface methodology. C. R. Chim., Elsevier Masson 19, 538–543.

Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1768, 1311–1324.

Zouari, S., Zouari, N., Fakhfakh, N., Bougatef, A., Aydi, M.A., Neffatil, M., 2010. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chémotype of Tunisian Artemisia herba alba Asso. Journal of Medicinal Plants Research 4, 871–880.

Veterinary World, EISSN: 2231-0916
Available at www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/4.pdf

RESEARCH ARTICLE
Open Access

Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage

L. Touazi[1,2], B. Aberkane[3], Y. Bellik[4], N. Moula[5] and M. Iguer-Ouada[2]

1. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Rue Issad Abbes, Oued Smar, Algiers, Algeria; 2. Associated Laboratory in Marine and Aquaculture Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia. Algeria; 3. Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences and Earth Sciences. University of Bouira, Algeria; 4. Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of El Bachir el Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj, 34000, Algeria; 5. Department of Animal Productions, University of Liege, Faculty of Veterinary Medicine, 4000 Liege, Belgium.

Corresponding author: L. Touazi, e-mail: touazil@gmail.com

Co-authors: BA: aberkaneboubekeur@gmail.com, YB: byouba@gmail.com, NM: nassim.moula@ulg.ac.be, MI: imokrane@gmail.com

Received: 22-12-2017, **Accepted:** 06-04-2018, **Published online:** 09-05-2018

doi: 10.14202/vetworld.2018.590-597 **How to cite this article:** Touazi L, Aberkane B, Bellik Y, Moula N, Iguer-Ouada M (2018) Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage, *Veterinary World*, 11(5): 590-597.

Abstract

Aim: This study aimed to investigate the protective effect of *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oil on rooster sperm motility during 4°C short-term storage.

Materials and Methods: *R. officinalis* essential oil was analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry to identify the active components. 10 of 45-week-old Hubbard commercial broilers were subjected to biweekly semen collections during 3 weeks. At each collection, sperm was pooled and divided into four aliquots and then diluted with Tris extender supplemented with 870, 87, or 8.7 µg/ml of *R. officinalis* essential oil, identified as treatments R, R5, and R10, respectively. Tris-based extender without any supplementation was considered as a control group. Diluted sperm was then stored at 4°C in the refrigerator and analyzed at 0, 6, 24, and 48 h using a computer-assisted sperm analyzer. Different semen parameters were measured including total motility, progressive motility, gametes velocities (straight line velocity [VSL], curvilinear velocity [VCL], and average path velocity [VAP]), amplitude of the lateral head displacement [ALH], and beat-cross frequency [BCF].

Results: The phytochemical analysis of *R. officinalis* essential oil revealed the presence of 25 active components including seven major molecules: Camphor (18.88%), camphene (5.17%), 1,8-cineole (7.85%), β-thujene (13.66%), α-thujene (4.87%), chrysanthenone (12.05%), and β-cubenene (7.97%). The results showed a beneficial effect of *R. officinalis* essential oil on sperm cells motility, particularly when using the lowest concentrations, 8.7 and 87 µg/ml. Progressive motility and gametes velocities (VCL, VSL, and VAP), materializing the quality of gametes motility, showed highly statistically significant values ($p<0.01$) in 8.7 and 87 µg/ml treatments, especially from 6 h of storage at 4°C. Conversely, the highest concentration (870 µg/ml) showed harmful effects with a total spermicidal activity after 24 h of storage.

Conclusion: The current results revealed the positive impact of *R. officinalis* essential oil on rooster sperm at 4°C short-term storage probably through fighting against oxidative stress and cold shock damages.

Keywords: antioxidant, avian semen, liquid storage, rosemary essential oil.

Introduction

The recent years witnessed, in poultry, a growing interest in wide ranges of natural products and plant extracts, especially about their positive effects on reproduction and fertility outputs [1-3]. Essential oils, when used particularly *in vivo* as dietary supplementation, showed a remarkable potency in protecting and improving sperm parameters of several animal species [4-7]. However, when used *in vitro,* in humans as well in other animal species, essential evidenced spermicidal effects with impacts on gametes motility and plasma membrane integrity [8-12].

Rosmarinus officinalis is known as a rich source of polyphenols and volatile oils including molecules such as carnosic, rosmarinic acids, and camphor [13-16]. These compounds display diverse biological activities including antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties. In aged roosters, Borghei-Rad *et al*. [17] reported that dietary supplementation with rosemary leaves powder improved significantly semen quality, fertility, and hatchability through fighting oxidative stress damages. Similarly, dietary supplementation using other antioxidants, including Vitamin E, selenium, Vitamin C, and enzymatic antioxidant systems, improved significantly animal health and sperm quality [18-21].

Sperm cells are known to be more vulnerable to reactive oxygen species (ROS), generated during

Copyright: Touazi, *et al.* Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

oxidative stress, than somatic cells due to gametes cell structure and their limited contents of antioxidants. In this respect, the phospholipidic fraction of spermatozoa cell membranes [22] is the first target of ROS with negative effects on membrane fluidity and the subsequent impairment of motility, acrosome reaction, and sperm-egg interaction [23,24]. Accordingly, high membrane concentration in PUFA makes sperm cells more susceptible to lipid peroxidation, especially, during the different stages of *in vitro* storage at low temperatures compromising, thus fertility outputs [24,25].

In fact, in rooster, artificial insemination (AI) is routinely carried out after short-term storage at 4°C; however, reports evidenced that fertilizing capacity of freshly collected semen is dramatically lost after half an hour of collection [22]. Therefore, development of optimal semen extenders, including different active compounds, was considered worldwide by different research groups to protect sperm cells against motility damages. The adopted strategies consisted essentially of protecting cell membrane against cold shock and oxidative stress [26,27].

In this respect, numerous studies, using rosemary leaves extract, containing rich fractions of polyphenols, have reported positive effects on frozen semen in several species including boar [28], dog [29], and ram [30]. However, no protective effect was reported when using *R. officinalis* essential oil, and recently, Elmi *et al.* [31] observed similar motilities when comparing the control to sperm treated *in vitro* with 0.2 mg/ml of *R. officinalis* essential oil. Overall, all the reported data independently on the considered plant showed an obvious spermicidal activity.

Thus, to the best of our knowledge, no previous records reported the usefulness of essential oils as protective factors during semen preservation at low temperatures. This study aimed to investigate the interest of *R. officinalis* essential oil in the preservation of rooster sperm motility during 4°C short-term storage.

Materials and Methods

Ethical approval

The experiment was carried out in accordance with the guidelines laid down by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament for Animal Ethics Committee for the use of poultry birds.

Plant material

Aerial part (stems and leaves) of *R. officinalis* was harvested during April 2015, in the region of El-Euchre, in the Department of Bordj Bou Arreridj, located in Northeastern Algeria. The harvested plants were dried in the shade for 10 days before extraction.

Extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation process using a Clevenger's type apparatus (Clevenger, 1928). Distillations were carried out by boiling aerial plant parts for 3 h, and the essential oil was kept in air-tight sealed vials and stored at 4°C until further use.

Phytochemical identification

The identification of the active compounds of the *R. officinalis* essential oil was carried out by Agilent 2890 HP-type gas chromatography coupled to mass spectrometry (Model 6890) (GC/MS), equipped with a fused silica HP-5MS capillary column (Length: 30 m, internal diameter: 0.25 mm, and film thickness 0.25 µm). The temperature of the injector was maintained at 250°C. The carrier gas was helium (0.5 ml/min) with an injection volume of 0.2 µl, and the division ratio was adjusted to 1:20. The oven temperature was programmed from 60 (8 min) to 280°C at 2°C/min and then held isothermally at 280°C for 10 min. Analysis mode: Digitized, interface temperature: 280°C, ionization type: Electronic, filament strength: 70 eV, mass analyzer type: Quadrupole, source temperature: 230°C, and empty: 65m torr.

Animals

All experiments were conducted in accordance with the legislation governing the ethical treatment of animals. 10 of 45-week-old Hubbard commercial broiler reproductive cocks were used during the experiment. The animals were housed in conventional individual cages under 14 h of daily illumination and fed with a standard commercial food at the rate of 155 g/day/animal.

Sperm collection

The roosters were subjected to biweekly semen collections during 3 weeks by dorso-abdominal massage as described by Burros and Quinn [32] and individual ejaculates were gently mixed and pooled. To minimize animal stress, the collection was carried out by the same operator and under the same conditions. Necessary precautions were taken during collection to avoid contamination by cloaca fluids. Sperm concentration was calculated using a computer-assisted sperm analyzer (CASA) (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain).

Sperm treatment

The pooled sperm was diluted at 1/2 ratio at room temperature (18-22°C) in Tris extender (3.028 g of hydroxymethylaminomethane, 1.25 g of fructose, 1.7 g of citric acid, 800 Ul/ml of penicillin G sodium, and 1 mg/ml of streptomycin sulfate in 100 ml of distilled water) and then split into four equal aliquots. Each aliquot was diluted with Tris extender supplemented with 870, 87, or 8.7 µg/ml of *R. officinalis* essential oil, identified as treatments R, R5, and R10, respectively (26). Tris-based extender without any supplementation was considered as a control group. All samples were then stored at 4°C and analyzed at 0, 6, 24, and 48 h. The experimentation was repeated 6 times (n=6).

Sperm motility analysis

Various sperm motility parameters were analyzed using a CASA (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain). The measured parameters were: Percentage of motile

spermatozoa (Mob T %), percentage of progressive spermatozoa (Prog T %), curvilinear velocity (VCL μm/s), straight line velocity (VSL μm/s), average path velocity (VAP μm/s), amplitude of the lateral head displacement (ALH μm), and frequency to which the sperm head crosses the mean trajectory (beat-cross frequency [BCF]/Hertz).

Statistical analysis

The SAS software (SAS Institute, 2001) was used for all statistical analyses. The data were checked for normal distribution with a Shapiro–Wilk test. Treatment and time effect on each motility parameters (MobT, ProgT, VCL, VSL, VAP, ALH, and BCF) were assessed by the following general linear model:

$$Y_{ijkl}=\mu+A_i+B_j+(AB)_{ij}+e_{ijk}$$

Y=The studied motility parameters measured on the sperm;

μ=Mean;

A_i=Fixed effect of the medium (i=1-4: R, R5, R10, and Tris);

B_j=Fixed effect of time (j=1-4: 0, 6, 24, and 48 h);

$(AB)_{ij}$=Interaction between time and medium;

e_{ijk}=The residual effect.

Least-squares means and standard errors (SE) were calculated for motility parameters measurements.

Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

Results

The chemical composition of *R. officinalis* essential oil and the retention index as well as the percentages of the various compounds are listed in Table-1. 25 compounds were identified in the essential oil without fractionation. The major constituents were camphor (18.88%), camphene (5.17%), 1,8-cineole (7.85%), β-thujene (13;66%), α-thujene (4.87%), chrysanthenone (12.05%), and β-cubenene (7.97%).

Effect of storage time and sperm treatment on sperm mobility parameters

The effects of time, sperm treatment, and their interactions sperm motility are shown in Table-2. The interaction affected all the variables significantly ($p<0.001$). The total and progressive motility declined rapidly at 870μg/ml corresponding to the highest concentration of *R. officinalis* essential, especially after 6 h of storage. Similar observations are noted for the kinematics parameters (VSL, VCL, VAP, ALH, and BCF).

Percentage of total motility

Figure-1 shows the effects of different treatments on total motility during the study period. Total motility represents the percentage of total moving spermatozoa regardless of the quality of the motility. When compared to the control group (Tris), statistically significant impact was observed in the different treatments ($p<0.001$). At T0, no significant difference was observed between 87 μg/ml (R5, 89.84±3.64) and 8.7 μg/ml (R10, 98.12±0.16) treatments and the control group (Tris, 92.03±1.32). The highest concentration of *R. officinalis* essential oil (R, 870 μg/ml) showed the lowest motility percentage at 0 and 6 h and a total spermicidal effect at 24 h. After 48 h of chilling storage, 87 and 8.7 μg/ml concentrations expressed the highest motility with 71.4±2.05% and 74±6.49%, respectively.

Percentage of progressive motility

Progressive motility is a qualitative parameter representing gametes with forwarding motility (Figure-2). As for total motility (Figure-1), the lowest progressive gametes were observed in 870 μg/ml treatment corresponding to the highest essential oil concentration. From 6 h of storage, progressive motility was significantly preserved in 87 and 8.7 μg/ml treatments. After 24 h of storage, 87 and 8.7 μg/ml treatments showed 43.25±2.43 and 63.08±5.33% of progressive gametes compared to 26.86±2.36% of the control group ($p<0.05$).

Cinematic parameters (VCL, VSL, VAP, ALH, and BCF)

Cinematic parameters including velocities (VCL, VSL, and VAP), ALH, and BCF are represented in Figure-3. The velocity of individual sperm was ranged between 0 (immotile sperm) and 100 μm/s. After 6 h of storage, highly significant differences were observed for VCL ($p<0.01$), VSL ($p<0.01$), and VAP ($p<0.01$) in 8.7 μg/ml treatment with 57.07±0.62, 14.23±0.26, and 29.31±0.34 μm/s, respectively. This positive impact was maintained at 24 and 48 h. Similarly, ALH and

Table-1: Main compounds of the *R. officinalis* essential oil identified by GC/MS.

Compound	RI	%
α-Pinene	8.881	1.409
Camphene	9.734	5.171
Verbenene	10.028	0.586
Sabinene	11.185	1.374
β-Pinene	11.329	0.254
trans β-Ocimène	12.317	0.231
α-Terpinene	13.937	0.54
1,8-Cineole	14.978	7.850
γ-Terpinene	16.852	0.667
β-Thujene	20.404	13.662
α-Thujene	21.113	4.875
Chrysanthenone	21.797	11.548
Camphor	23.176	18.88
Carveol	23.267	0.31
Pinocarvone	24.221	0.618
α-Phellandrene	24.939	0.556
Terpineol	25.460	0.904
Chrysanthenyl acetate	31.161	1.479
α-Copaene	38.554	0.517
cis-Jasmone	40.357	0.491
β-Cubebene	45.311	7.976
γ-Elemene	46.145	1.719
δ-Cadinene	47.798	0.625
Spathulenol	51.090	0.158
1,3-Nonadiene	71.438	0.874

R. officinalis=*Rosmarinus officinalis*, GS–MS=Gas chromatography-mass spectrometer

Table-2: Spermatozoa mobility parameters according to the effects of storage time and sperm treatment (TRT).

Motility parameters	TRT	Storage time (ST)				SEM	p value			R^2
		0	6	24	48		TRT	ST	TRT*ST	
Mob T	R	71.24^{a}	14.68^{b}	-	-	2.83	***	***	***	0.97
	R5	89.84^{a}	92.44^{a}	88.96^{a}	71.43^{b}	2.83				
	R10	98.12^{a}	91.96^{a}	92.80^{a}	74.00^{b}	2.83				
	Tris	92.03^{a}	87.03^{ab}	83.93^{b}	54.04^{c}	2.83				
Prog T	R	30.87^{a}	1.62^{b}	-	-	4.72	***	***	***	0.90
	R5	50.82^{a}	68.32^{b}	43.25^{a}	27.31^{c}	4.72				
	R10	70.30^{a}	56.43^{b}	63.08^{ab}	36.48^{c}	4.72				
	Tris	64.94^{a}	39.87^{b}	26.86^{bc}	15.18^{c}	4.72				
VSL	R	9.24^{a}	4.27^{b}	-	-	0.39	***	***	***	0.06
	R5	12.02^{a}	9.90^{b}	7.74^{c}	10.96^{d}	0.18				
	R10	11.79^{a}	14.23^{b}	10.32^{c}	11.71^{a}	0.23				
	Tris	13.21^{a}	8.78^{b}	4.22^{c}	8.55^{b}	0.24				
VCL	R	32.48^{a}	18.17^{b}	-	-	0.92	***	***	***	0.11
	R5	40.47^{a}	34.60^{b}	28.69^{c}	39.05^{d}	0.44				
	R10	43.57^{a}	57.07^{b}	42.46^{a}	38.05^{c}	0.56				
	Tris	45.90^{a}	28.46^{b}	28.53^{b}	32.56^{c}	0.62				
VAP	R	17.35^{a}	8.47^{b}	-	-	0.47	***	***	***	0.09
	R5	22.56^{a}	20.35^{b}	17.52^{c}	20.24^{b}	0.26				
	R10	23.11^{a}	29.31^{b}	22.04^{c}	20.24^{d}	0.30				
	Tris	24.20^{a}	18.42^{b}	11.00^{c}	17.55^{d}	0.35				
ALH	R	2.12^{a}	1.76^{b}	-	-	0.05	***	***	***	0.15
	R5	2.53^{a}	2.23^{b}	1.48^{c}	2.95^{d}	0.02				
	R10	3.03^{a}	2.33^{b}	2.55^{c}	2.89^{d}	0.03				
	Tris	2.74^{a}	1.87^{b}	1.41^{c}	2.62^{d}	0.03				
BCF	R	2.98^{a}	1.18^{b}	-	-	0.09	***	***	***	0.08
	R5	3.62^{a}	3.44^{b}	3.11^{c}	3.41^{b}	0.05				
	R10	3.77^{a}	4.94^{b}	3.25^{c}	3.59^{d}	0.05				
	Tris	4.41^{a}	3.23^{b}	1.62^{c}	3.05^{d}	0.06				

Means followed by the same letter (a,b,c) in the same line are not statistically significant different (p>0.05). ***p<0.001; SEM=Standard error of mean, R^2=Coefficient of determination, VSL=Straight line velocity, VCL=Straight line velocity, VAP=Average path velocity, ALH=Amplitude of the lateral head displacement, BCF=Beat-cross frequency

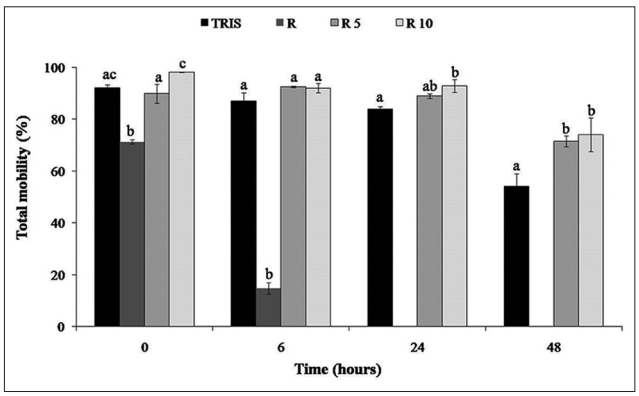


Figure-1: Total motility percentage of rooster spermatozoa in control (Tris) and *Rosmarinus officinalis* essential oil treatments R (870 µg/ml), R5 (87 µg/ml), and R10 (8.7 µg /ml) at 0, 6, 24, and 48 h of 4°C storage. Different letters indicate statistically significant difference (p<0.05). Values are represented as mean±standard error of the mean.

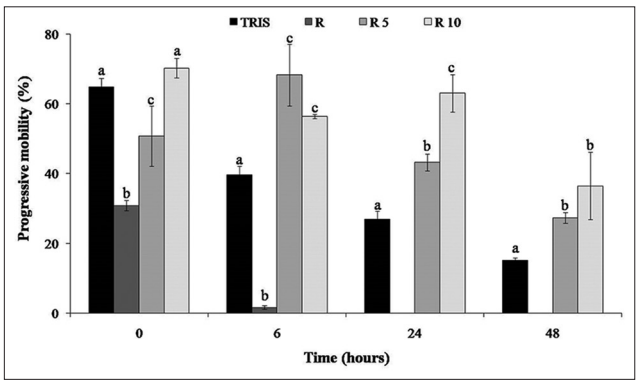


Figure-2: Progressive motility percentage of rooster spermatozoa in control (Tris) and *Rosmarinus officinalis* essential oil treatments R (870 µg/ml), R5 (87 µg/ml), and R10 (8.7 µg/ml) at 0, 6, 24, and 48 h of 4°C storage. Different letters indicate statistically significant difference (p<0.05). Values are represented as mean±standard error of the mean.

BCF showed the highest values in 87 and 8.7 µg/ml treatments.

Discussion

Nowadays, rosemary is widely used for its antioxidant activity [33-38], antimicrobial properties [38-41], and bio-preservative in the food industry [42-44]. Recently, in poultry, Borghei-Radand *et al.* [17] reported positive effects of diet supplementation using *R. officinalis* leaves on sperm motility and fertility in aging roosters. However, very few relevant data are present regarding the protective effect of *R. officinalis* essential oil on avian spermatozoa, particularly when used *in vitro*.

In this study, the chemical composition of *R. officinalis* essential oil and the effects on rooster

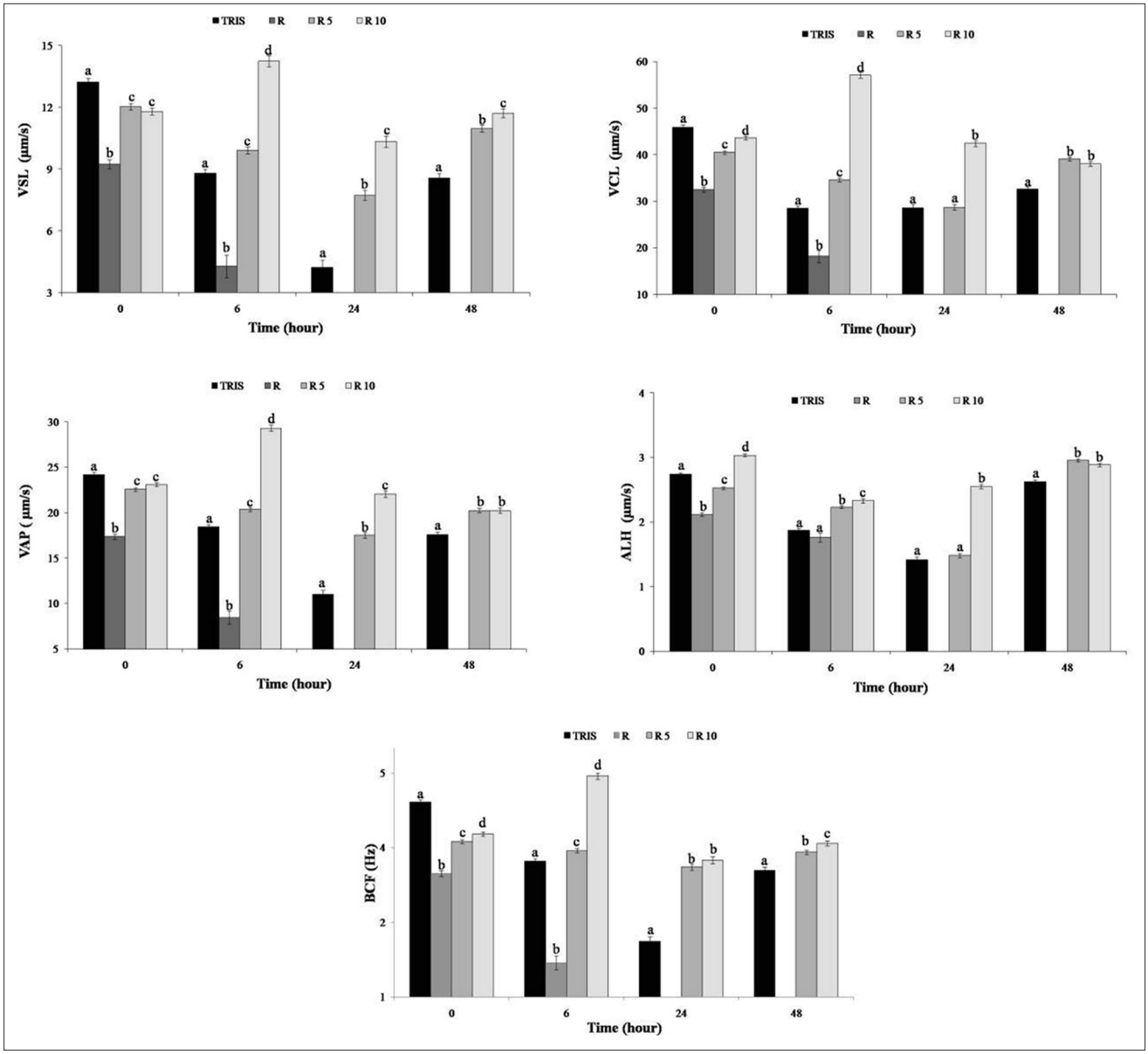


Figure-3: Curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral movement of the head (ALH), and the beat-cross frequency (BCF/Hertz) of rooster spermatozoa in the control (Tris) and *Rosmarinus officinalis* essential oil treatments R (870 µg/ml), R5 (87 µg/ml), and R10 (8.7 µg/ml) at 0, 6, 24, and 48 h of 4°C storage. Different letters indicate statistically significant difference ($p<0.05$). Values are represented as mean±standard error of the mean.

sperm motility during 4°C short-term were studied. Phytochemical screening of *R. officinalis* essential oil (using the GC–MS analysis) allowed the identification of 25 active compounds. According to the results, the major constituents were camphor (18.88%), 1,8-cineole (7.85%), β-thujone (13;66%), chrysanthenone (12.05%), and β-cubenene (7.97%). Similar results were reported by Zermane *et al.* [45] when investigating the chemical analysis of Algerian essential oil under optimal conditions. The analyzed essential oil presented some differences when compared to Moroccan *R. officinalis* essential oil. The latter showed high proportions of pinene (37-40%), cineole (58.7-63.7%), and camphor (41.7-53.8%) and *R. officinali*s essential oil from Tunisia is rich in cineole and contained usual monoterpenes [46,47]. Previous studies revealed that *R. officinalis* essential oil composition might be influenced by various factors such as the genotype of the plant, soil type, bioclimatic conditions, or the extraction method [47-49].

In the present study, the beneficial and potentially harmful effects of different concentrations of *R. officinalis* essential oil on rooster semen stored at 4°C for 48 h were investigated. The results demonstrated that semen quality (revealed through progressive motility and gametes velocities) was significantly preserved, especially with the lowest concentrations of the essential oil (87 µg/ml and 8.7 µg/ml). The highest dose (870 µg/ml) showed a complete spermicidal effect evidenced after 24 h of storage. This concentration caused alterations probably similar to those described

in bacteria [50-52]. The mechanism described in bacteria was the ability of the essential oil to disrupt and penetrate the lipid structure of the cell wall leading to the destruction of the membranes [41,42]. Chaftar *et al*. [53] reported that *R. officinalis* essential oil was active against several strains of *Legionella pneumophila* with a concentration of <0.55 mg/mL. As well, Outaleb *et al*. [54] indicated that rosemary essential oil exhibited appreciate antibacterial activities with concentrations ranging only from 4 to 20 µg/ml. Similarly, it is reported that spermicidal activity in numerous animal species is associated with considerable damages on different spermatozoa structures including cell membranes and acrosome integrity [8-12,31,55].

According to the results of this study, the use of small concentrations *in vitro* might be beneficial to rooster spermatozoa under 4°C conditions. In fact, total and progressive motility and kinematics parameters were significantly preserved in 87 and 8.7 µg/ml treatments. After 24 h of storage, the percentage of progressive gamete was 43.25 and 63.08 at 87 and 8.7 µg/ml treatments, respectively, compared to 26.86±2.36% of the control group. Elmi *et al.* [31] reported that the total and progressive motility was significantly altered from the concentration of 0.8 mg/ml of *R. officinalis* essential oil in swine spermatozoa. This concentration was almost identical to the spermicidal concentration used in our experiment (870 µg/ml). At 0.2 mg/ml, the authors observed motility values similar to those of the control group. Conversely, when used as supplementation diet, *R. officinalis* essential oil enhanced spermatogenesis and limited lipid peroxidation in quail testicular tissue [55].

Several active molecules such as 1,8-cineole, camphor, β-thujene, chrysanthenone, β-cubebene, and camphene, known for their antioxidant activity, were identified in the phytochemical analysis (Table-1). These compounds are probably involved in the observed protective effects. These findings are in accordance with previous reports using rosemary aqueous extract (polyphenols rich fraction) in boar [28,56] and buck [57]. The beneficial effects of *R. officinalis* essential oil may be related to the antioxidant activity limiting lipid peroxidation and membrane damages during the chilling storage.

Conclusion

The present work reported the usefulness of a low concentration of *R. officinalis* (8.7 µg/ml) in the preservation of rooster semen at 4°C for a period long enough to manage successfully AI practice. However, further studies are needed to understand the mechanisms of action and the real impact on fertility outputs.

Authors' Contributions

MI and LT have conceived and designed the study. LT and BA conducted the study in the laboratory. NM analyzed the data and performed statistical analysis. LT and YB drafted and revised the manuscript under the guidance of MI. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to express their deepest gratitude to the Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Algeria, for their technical support. All the authors express their sincere thanks to the staff of the Associated Laboratory in Marine and Aquaculture Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, for providing all necessary facilities to execute the research work. The authors would like to express their deepest gratitude to the Faculty of Agronomy of Setif, Algeria, for their technical support. This study was supported by internal funding.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

References

1. Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K. and Acamovic, T. (2007) The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br. Poult. Sci.*, 48: 496-506.
2. Radwan, N.L., Hassan, R.A., Qota, E.M. and Fayek, H.M. (2008) Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *Int. J. Poult. Sci.*, 7: 134-150.
3. Mangiagalli, M.G., Martino, P.A., Smajlovic, T., Cavalchini, L.G. and Marelli, S.P. (2010) Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeders. *Br. Poult. Sci.,* 51: 152-157.
4. Liu, Q., Duan, R.J., Zhou, Y.F., Wei, H.K., Peng, J. and Li, J.L. (2017) Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen antioxidant status and semen quality parameters. *Andrologia*, 22: 1-8.
5. Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Gharbi, N. and Sakly, M. (2015) Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Med. Food*., 18: 241-249.
6. Ben Slima, A., Ali, M.B., Barkallah, M., Traore, A.I., Boudawara, T., Allouche, N. and Gdoura, R. (2013) Antioxidant properties of *Pelargonium graveolens* l'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. *Lipids Health Dis.*, 12: 30.
7. Köse, E., Sarsilmaz, M., Meydan, S., Sönmez, M., Kuş, I. and Kavakli, A. (2011) The effect of lavender oil on serum testosterone levels and epididymal sperm characteristics of formaldehyde-treated male rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*., 15: 538-542.
8. Chikhoune, A., Stouvenel, L., Iguer-Ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Lorès, P., Wolf, J.P., Aissat, K., Auger, J., Vaiman, D. and Touré, A. (2015) *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod. Biomed. Online*, 31: 411-420.
9. Paul, S. and Kang, S.C. (2012) Studies on the viability and membrane integrity of human spermatozoa treated with essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex turrill fruit. *Andrologia*, 44: 117-125.
10. Paul, S. and Kang, S.C. (2011) *In vitro* determination

of the contraceptive spermicidal activity of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill fruits. *N. Biotechnol*., 28: 684-690.
11. Riar, S.S., Devakumar, C., Ilavazhagan, G., Bardhan, J., Kain, A.K., Thomas, P., Singh, R. and Singh, B. (1990) Volatile fraction of neem oil as a spermicide. *Contraception*, 42: 479-487.
12. Buch, J.G., Dikshit, R.K. and Mansuri, S.M. (1988) Effect of certain volatile oils on ejaculated human spermatozoa. *Indian. J. Med. Res*., 87: 361-363.
13. Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc*., 73: 645-652.
14. Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R. and Prior, E. (1996) Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnasol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food. Chem*., 44: 131-135.
15. Richheimer, S.L., Matthew, W.B., Greg, A.K., Michael, C.K. and David, T.B. (1996) Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc*., 73: 507-514.
16. Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Ćebović, T., Vukmirović, S. and Mikov, M. (2014) Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.*, 14: 225.
17. Borghei-Rad, S.M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H., and Ansari, M. (2017) Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology,* 101: 35-43.
18. Surai, P., Cerolini, S., Wisharta, G.J., Speake, B.K., Noble, R.C. and Sparks, N.H.C. (1998) Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian. Poult. Biol. Rev.,* 9(l): 11-23.
19. Breque, C., Surai, P.F. and Brillard, J.P. (2003) Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 66: 314-323.
20. Surai, P. and Fisinin, V.I. (2014) Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 191: 1-15.
21. Surai, P. (2016) Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase. *Anim. Nutr.*, 1: 1-17.
22. Blesbois, E. and Brillard, J.P. (2007), Specific Features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal*, 1: 1472-1481.
23. Cerolini, S., Kelso, K.A., Noble, R.C., Speake, B.K., Pizzi, F. and Cavalchini, L.G. (1997) Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol. Reprod.*, 57: 976-980.
24. Douard, V., Hermier, D., Magisteini, M., Labbé, C. and Blesbois, E. (2004) Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1-13.
25. Cerolini, A., Zaniboni, S., Maldjian, A. and Gliozzi, T. (2006) Effect of docosahexaenoic acid and a-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66: 877-886.
26. Benhenia, K., Lamara, A., Fatmi, S. and Iguer-Ouad, M. (2016) Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin e and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small. Rum. Res.*, 141: 29-35.
27. Nabi, B., Fatmi, S., Zerrouki-Daoudi, N. and Iguer-ouada, M. (2017) Interest of Vitamin E and cholesterol preloaded in cyclodextrins on motility of cryopreserved rabbit semen. *Revue. Méd. Vét.*, 168: 87-92.
28. Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martinez, F., Cano, R., De Blas, I. and Espinosa, E. (2010) Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61: 142-147.
29. González, N., Gil, L., Martinez, F., Malo, C., Cano, R., Mur, P. and Espinosa, E. (2010) Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 88.
30. Gil, L., Mascaró, F., Mur, P., Gale, I., Silva, A., González, N., Malo, C. and Cano, R. (2010) Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 91.
31. Elmi, A., ventrella, D., Barone, F., Filippini, G., Benvenuti, S., Pisi, A., Scozzoli, M. and Bacci, M.L. (2017) *Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oils: *In vitro* effects and toxicity on swine spermatozoa. *Molecules*, 22: 2162.
32. Burros, W.H. and Quinn, J.P. (1937) The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult. Sci.*, 16: 19-24.
33. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *J. Agric. Food. Chem*., 55: 7879-7885.
34. Slameňová, D.H., Horváthová, E., Kováčiková, Z., Kozics, K. and Hunáková, L. (2011) Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H2O2 and DMNQ. *Food. Chem.*, 129: 64-70.
35. Luis, J.C., Perez, R.M. and Gonzalez, F.V. (2007) UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food. Chem.*, 101: 1211-1215.
36. Laura, P.F., Garon, M.T. and Vicente, M. (2010) Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food. Chem*., 58: 161-171.
37. Makhloufi, A., Moussaoui, A., Makhloufi L., Benlarbi, Z., Hibi, Ben Nabri, S., Mellouki, S. and Rahal, S. (2011) Microbiological and physicochemical quality of four cultivars of dates in the region of Bechar, South-West of Algeria-optimization of conservation by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Acta. Hortic*., 994: 247-255.
38. Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. and Skaltsa, H.D. (2007) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.*, 43: 487-488.
39. Bajpai, V.K., Baek, K.H. and Kang, S.C. (2013) Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Res. Int.*, 45: 722-734.
40. Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. (2010) Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence of antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 3144-3152.
41. Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. and Chefrour, A. (2016) Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bull. Soc. R. Sci. Liège.*, 85: 174-189.
42. Burt, S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Micobiol.*, 94: 223-253.
43. Faid, M., Bakhy, K., Anshad, M. and Tantaoui-Elaraki, A. (1995) Almond paste: Physiochemical and microbial characterizations and preservation with sorbic acid and Cinnamon. *J. Food Prod*., 58: 547-550.
44. Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M. and Gdoura, R. (2011) Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. *J. Med. Plants Res*., 5: 5999-6004.
45. Zermane, A., Larkeche, O., Meniai, A.H., Crampon, C. and Badens, E. (2016) Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO_2 using response surface methodology. *C. R. Chim., Elsevier*

Masson, 19: 538-543.
46. Smeti, S., Atti, N., Mahouachi, M. and Munoz, F. (2013) Use of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils to increase the shelf life of Barbarine light lamb meat. *Small. Rumin. Res.*, 113: 340-345.
47. Zaouali, Y., Messaoud, C., Ben Salah, A. and Boussaid, M. (2005) Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis L*. *Flavor. Fragr. J.*, 20: 512-520.
48. Ojeda-Sana, A.M., van Baren, C.M., Elechosa, M.A., Juarez, M.A. and Moreno, S. (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31: 189-195.
49. Gharib, F., Ghazi, S., Aly, H., El-araby, M. and Moustafa, S. (2016) Effect of soil type and water content on rosemary growth and essential oil yield. *Int. J. Sci. Eng. Res.*, 7: 183-189.
50. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free. Radic. Res.*, 40: 223-231.
51. Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. (2013) Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Ind. Crops Prod*., 48: 144-152.
52. Satyal, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters R.L., Awadh, A.N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G. and Setzer, W.N. (2017) Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, 6: 20.
53. Chaftar, N., Girardot, M., Quellard, N., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frère, J. and Imbert, C. (2015) Activity of six essential oils extracted from Tunisian plants against *Legionella pneumophila*. *Chem. Biodivers*, 12: 1565-1574.
54. Outaleb, T., Hazzit, M., Ferhat, Z., Baaliouamer, A., Yekkour, A., Zitouni, A. and Sabaou, N. (2015) Composition, antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *J. Essent. Oil. Bear. Pl*, 18: 654-665.
55. Türk, G., Çeribaşı, A.O., Şimşek, Ü.G., Çeribaşı, S., Güvenç, M., Özer Kaya, Ş., Çiftçi, M., Sönmez, M., Yüce, A., Bayrakdar, A., Yaman, M. and Tonbak, F. (2016) Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Anim. Reprod. Sci*., 164: 133-143.
56. Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F. and Galé, I. (2011) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75: 1735-1741.
57. Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Abozar, N., Nabi, M.M. and Sangcheshmeh, M. (2013) Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Rumin. Res.*, 114: 120-125.

****