

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Spécialité Biologie Animale



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème :

**Impact des huiles essentielles sur le développement
bactérien durant la conservation du sperme.**

Présenté par :
DRIF Ania et CHAFA Dyhia

Soutenues le : 02 juillet 2019

Devant le jury :

Mme Talbi.A
Mr Iguerouada. M
Mme Sad-Eddine. O

MAA
Professeur
MCA

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciement

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu de nous avoir donné la foi, la force et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur Pr. **Iguerouada.M**, pour ses conseils pertinents, sa générosité et sa disponibilité.

Veillez trouver ici le témoignage de toute notre gratitude et notre profonde reconnaissance.

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury:

***Mme Sad-Eddine**, d'avoir accepté de présider et de juger notre travail.*

***Mme Talbi**, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous tenons à remercier également le directeur de l'abattoir communal de Béjaia pour sa patience, sa sympathie.

*Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel du laboratoire de biologie animale et plus particulièrement **Benberkane.A** pour son aide, ses conseils et sa disponibilité durant la réalisation de ce travail.*

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes chères sœurs Karou, Lynda et Loulou et mon frère Nadjib, pour leur encouragement permanent et leur soutien moral.

A mes deux petits anges : Amy et Kacem.

Que ce modeste travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.

Merci d'être toujours là pour moi.

A mon cher promoteur professeur Iguerouada.M pour sa patience, ses conseils pertinents et ses encouragements.

A ma précieuse binôme Dyhia merci pour tous les souvenirs partagés, pour tous les moments inoubliables passés ensemble et ceux à venir.

A mon cher Azouaou qui a toujours été à mes côtés, dans les meilleurs moments ainsi que dans les pires, merci pour tout et bien plus encore. Que dieu te garde pour moi.

A tous ceux qui, par un mot m'ont donné la force de continuer...

Ania

Dédicaces

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail qui couronne cinq années d'études supérieures riches en rebondissements à tous ceux qui sont chers,
Au Dieux le tout puissant, qui m'a permis d'accomplir ce travail.

A ma chère mère :

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices puisse Dieux, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon encadreur Pr. IQUEROUADA. M :

un exemple de sagesse, générosité et modestie.

A mes chers frères et sœurs :

Je vous dédie ce travail en témoignage des liens solides et intimes qui nous unissent et pour vos soutiens, encouragements en vous souhaitant un avenir plein de succès et de bonheur.

Tout particulièrement ma sœur **Samia** et son époux **Nadir** ainsi leurs petit chouchou de la famille **Amayas** qui ne cessent de s'inquiéter pour moi.

Que dieux vous bénisse et vous garde l'un pour l'autre.

A ma précieuse binôme Ania ainsi qu'à toute sa famille

Tu es une belle personne, que je suis ravie de côtoyer.

A l'homme le plus cher dans ma vie,

Mon future mari **Madjid** ainsi que sa belle maman **Dahbia** et petit frère **Youdas**, que dieux vous protège.

Dyhia

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 01

Partie bibliographique

Chapitre I : Monographie des espèces étudiées .

I.	Le romarin « <i>Rosmarinus Officinalis</i> ».....	03
I.1.	Définition et répartition.....	03
I.2.	Classification botanique	03
I.3.	Principales utilisation du romarin	04
II.	Huile essentielle de romarin (<i>Rosmarinus Officinalis</i>).....	04
III.	L'armoise blanche « <i>Artemisia Herba Aalba</i> ».....	05
III.1.	Description de la plante et répartition.....	05
III.2.	Classification botanique	05
IV.	l'huile essentielle de l'armoise.....	06

Chapitre II : Les huiles essentielles .

I.	Définition	07
II.	Le rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	07
III.	Composition chimique	07

IV.	Méthodes d'extraction des huiles essentielles	08
V.	Méthodes d'analyse	08
VI.	bio activité des huiles essentielles	09
VII.	Toxicité des huiles essentielles.....	09
VIII.	L'encapsulation des huiles essentielles (solubilisation).....	09
VIII.1.	Définition.....	10
VIII.2.	Les complexes cyclodextrines-Huiles essentielles.....	10

Chapitre III : La cryoconservation.

I.	Définitions.....	11
I.1.	Le sperme.....	11
I.2.	Les spermatozoïdes.....	11
II.	Les étapes de la conservation.....	11
II.1.	La collecte du sperme.....	12
a.	Le sperme éjaculé.....	12
b.	Le sperme épидидymaire.....	12
II.2.	Analyse de la qualité du sperme récolté	12
II.3.	La dilution	13
II.3.1.	Propriétés et composition des milieux de dilution	13
II.3.2.	Nature des milieux de dilution.....	13
a.	Les dilueurs à base de lait.....	13
b.	Les dilueurs à base du jaune d'œuf.....	14

II.4. Techniques de conservation.....	14
II.4 .1. La conservation à court terme.....	14
II.4.2. La conservation à long terme.....	14

Chapitre IV : Le stress oxydatif

I. Stress oxydatif.....	16
I.1.Définition	16
I.2. Origine du stress :.....	16
I.3.Les espèces oxygénées réactives (EOR).....	16
I.4. Les antioxydants.....	17
II. Stress oxydatif-sperme.....	17
II.1. La peroxydation lipidique.....	18

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	19
I.1. Extraction des huiles essentielle	19
I.2.L'encapsulation des huiles essentielles	20
I.3.Etude de l'effet des huiles essentielles	21
I.3.1. Préparation des milieux de conservation.....	21
I.3.2. La collecte du sperme épидидymaire.....	22
I.3.3.Traitement et conservation.....	23
II. Analyse de la qualité du sperme	24

II.1. Analyse de la mobilité	24
II.2. Analyse de la vitalité.....	25
II.3. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	26
II.4. L'effet des huiles essentielles sur le développement bactérien.....	28
II. Résultats et discussion.....	29
II.1. Le rendement d'extraction	29
II.2. Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la mobilité.....	30
a. L'armoise	31
b. Le romarin	32
II.3. Effet de l'HE de l'Armoise sur l'intégrité membranaire des spermatozoïdes.....	34
a. L'armoise.....	34
b. Le romarin	35
II.4. Effet de l'huile essentielle de l'Armoise sur la peroxydation lipidique.....	36
a. L'armoise	36
b. Le romarin	36
II.5. L'effet des huiles essentielles sur le développement bactérien.....	37
a. L'huile essentielle de l'armoise.....	37
b. L'huile essentielle du romarin.....	39

Conclusion et perspectives.....	41
---------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

TableauI :	Les concentrations en HE utilisées pour l'analyse de la mobilité.....	22
TableauII :	Les paramètres de mobilité spermatique mesurées par le CASA pour chaque spermatozoïde.....	24
TableauIII :	Les concentrations en HE utilisées pour le test TBARS.....	27
TableauVI :	Rendement d'extraction en huiles essentielles.....	29
TableauV :	Effet de l'HE de l'armoise sur le développement bactérien.....	38
TableauVI :	L'effet de l'HE du romarin sur le développement bactérien.....	39

Liste des figures

Figure1 :	Le romarin (Google image)	03
Figure2 :	L'armoise blanche de la région de Biskra (Bezza et al, 2010)	05
Figure3 :	Structure d'un spermatozoïde (Fawcett, 1975)	11
Figure4 :	Montage d'extraction par Hydrodistillation.....	20
Figure5 :	Dissection du testicule et séparation de l'épididyme.....	22
Figure6 :	Collecte de sperme épидидymaire par la méthode « <i>retrogarde-flushing</i> »	23
Figure7 :	Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA (Luconi et al, 2006).....	25
Figure8 :	Lame Makler.....	25
Figure9 :	Analyse de la mobilité par le système « CASA ».....	25
Figure10 :	Les spermatozoïdes gonflés (vivants=verts) et non gonflés (morts=rouges).....	26
Figure11 :	Evaluation de la peroxydation lipidique.....	27
Figure12 :	matériel utilisé pour le test microbiologique.....	28
Figure13 :	Histogrammes représentant les vitesses (VSL), (VCL) et (VAP) des spermatozoïdes conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE de l'armoise en fonction du temps.....	32
Figure14 :	Histogramme représentant les vitesses(VSL), (VCL) et (VAP) des spermatozoïdes conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE du romarin en fonction du temps.....	33
Figure15 :	Histogramme représentant le pourcentage de spermatozoïdes vivants à 4°C dans différentes concentrations de l'He de l'armoise en fonction du temps.....	34
Figure16 :	Histogramme représentant le pourcentage de spermatozoïdes gonflés conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'He du romarin en fonction du temps.....	35
Figure17 :	Histogramme représentant les concentrations des MDA exprimées par l'absorbance dans le culot et le surnageant.....	36
Figure18 :	Histogramme représentant l'absorbance des MDA dans le culot et le surnageant.....	36
Figure19 :	Effet de l'He de l'armoise sur le développement bactérien.....	38
Figure20 :	Effet de l'He du romarin sur le développement bactérien.....	39

Liste des abréviations

- CASA : Computer Assisted Sperm Analysis.
- HE : huile essentielle.
- ml : Millilitre.
- μl : Microlitre.
- g : gramme.
- S: Seconde.
- H: Heure.
- VSL: Straight Line Velocity.
- VCL: Average of Curvilinear Velocity.
- VAP: Average of Path Velocity.
- $^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius.
- SPZ : Spermatozoïde.
- T: Temps
- Tris : Hydroxyméthyleaminométhane.
- Pipes : L'acide pipérazine-N.
- % : Pourcentage.
- HOST : Test Hypo Osmotique.
- CPG : Chromatographie à phase gazeuse.
- ROS : Espèces réactives de l'oxygène.
- IA : Insémination artificielle.
- JO : Jaune d'œuf.
- FIV: Fécondation in vitro.
- LDL: low density lipoprotein.
- CD : cyclodextrine.
- CD-ROM : cyclodextrine-romarin.
- CD-ARM : cyclodextrine-armoïse.
- EOA: espèces oxygénées réactives.
- μm : Micromètre.
- SO : Stress oxydatif.
- ADN : L'acide désoxyribonucléique.

- C° : Degré Celsius.
- SPZ : Spermatozoïde.
- AGPI : acides gras polyinsaturés.
- MDA : malondialdéhyde.
- TBA : l'acide thiobarbiturique.
- TCA : l'acide trichloroacétique.
- nm : nanomètre.

Introduction

La cryoconservation se définit comme l'utilisation de basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intacte leur structure et leur fonction.

La conservation de la semence fraîche à 4°C réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leur réserve énergétique et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement. En revanche, des altérations membranaires sont observées, ce qui les rend plus vulnérables aux éléments toxiques, notamment le stress oxydatif, ainsi qu'une perte de motilité spermatique (**Decuadro-Hansen, 2004**). Il devient ainsi indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la conservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces agressions délétères (**Mazur, 1984**).

Dans ce sens, Les huiles essentielles qui sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes aromatiques (**Kalemba et Kunicka, 2003**) peuvent être très efficaces contre une grande variété d'oxydants et de micro-organismes. En effet, ces mélanges de composés volatils exercent différentes actions biologiques sur les humains et les animaux (**Adorjan et Buchbauer, 2010**) et des études récentes ont montré qu'elles présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens (**Baser et al, 2002**) (**Dorman et Deans, 2000**) et antioxydants (**Elmi et al, 2017**).

Notre choix est porté sur l'armoise blanche et le romarin, car elles sont très répandues en Algérie et largement utilisées en médecine traditionnelle, leurs huiles essentielles attirent l'intérêt de plusieurs recherches vu le nombre de leurs propriétés biologiques intéressantes. Le but de la présente étude est d'assurer une meilleure conservation de la semence ovine à 4°C en utilisant les huiles essentielles de l'Armoise et du Romarin et évaluer leurs effets sur la conservation des caractéristiques du sperme d'une part et leurs impacts sur le développement bactérien, d'autre part.

Les huiles essentielles étant des substances peu solubles, nous nous sommes aussi intéressés à leurs effets après solubilisation par les cyclodextrines afin d'augmenter leur effet biologique, La première partie de ce mémoire est dédiée à l'étude bibliographique avec un

premier chapitre consacré à la cryoconservation du sperme, un deuxième au stress oxydatif, le troisième aux huiles essentielles et enfin la monographie des plantes étudiées.

La deuxième partie est réservée à l'expérimentation divisée en deux parties à savoir matériels et méthodes, résultats et discussion et conclusion.

Chapitre I : Monographie des espèces étudiées.

I. Le romarin « *Rosmarinus Officinalis* »

I.1. Définition et répartition :

Le Romarin, « *Rosmarinus Officinalis* », plante commune à l'état sauvage, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on le trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (**Fatik Bekkara et al, 2007**). Le romarin tire son nom du latin *Rosmarinus*, qui signifie « *rosée de mère* », reconnu pour saveur piquante et parfumée assez prononcée (**Wicht et Anton, 2003**) (figure1)

Cette plante appartient à la famille des Labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sousarbrisseau ou herbacée. Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, friables et coriaces, les fleurs d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année ; Communément appelé "*El-Halhali*", le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire. L'activité anti-oxydante du romarin est connue depuis environ 30 années (**Nassu et al, 2003**) due à certains composés (le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide bétulinique, le rosmaridiphénol et le rosmanol) (**Jones, 1998**), (**Thoresen et al 2003**). En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité anti-oxydante la plus élevée (**Wang et al, 2008**)

I.2. Classification botanique :

Selon la classification de **Quezel et Santa, (1963)**, le romarin appartient à :

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre: *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.



Figure1 : Le romarin « *El-Halhali* »

(Google image)

A l'état sauvage, le romarin se rencontre sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, de préférence sur sols calcaires et jusqu'à 2000 m d'altitude. Le milieu a une forte influence sur le développement de cette plante. Le romarin est une plante héliophyte ; il nécessite une sécheresse estivale accusée et un ensoleillement important et nécessite un hiver doux (**Fadi, 2011**).

I.3. Principales utilisation du romarin :

Le romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol, L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (**Heinrichet al, 2006**).

II. L'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*)

C'est la plante la plus aromatique et médicinale utilisée dans le monde entier, en raison de son huile essentielle et ses composés phénoliques (**Rozman et al, 2009**). La dernière recherche liée à l'huile essentielle de romarin a porté principalement sur son effet antibactérien (**Jiang et al,2011**), antifongique (**Soylu et al,2010**), insecticide (**Zoubiri, Baaliouamer, 2011**), anticancéreux (**Degner et al,2009**) astringent, antiseptique, carminatif, antiviral, anti-inflammatoire et antioxydant (**Barni et al, 2012**).

La microencapsulation de l'huile de romarin améliore l'activité fonctionnelle des substances volatiles à haute rétention (1,8-cinéol, camphre, et pinène) (**Barros Fernandes, 2014**). La composition chimique d'huile de romarin encapsulée reste inchangée (**Fernandes et al, 2013**).

III. L'armoise blanche « *Artemisia herba-alba* » :

III.1. Description de la plante et répartition :

Le genre *Artemisia* comprend quelque 400 espèces, réparties sur les cinq continents. En Algérie, il est présenté par dix espèces dont certaines sont rares et d'autres très répandues (**Abdelguerfi, 2003**). *Artemisia herba-alba*, également connue sous le nom d'absinthe du désert (en arabe : *shih*), appartenant à la famille des Astéracées est un arbuste nain pérenne qui pousse dans les climats arides (Moyen-Orient et Afrique du Nord) (**Belhattab et al.2014**), riche en huiles essentielles, cette espèce a des vertus purgatives évidentes jouant

un grand rôle dans le contrôle des vers intestinaux, en particulier des ovins, mais pouvant également entraîner la mort de jeunes agneaux (**Le Floc'k, 1983**).

Elle a été utilisée, tout d'abord, comme aromatisant dans le thé et le café, puis elle est devenue une panacée dans la médecine traditionnelle arabo musulmane (**Baba Aissa, 1999**) (**Abu-Irmailehand et Afifi, 2003**).

Traditionnellement utilisée pour traiter les désordres gastriques ainsi que pour son activité antihelminthique, elle présente aussi un caractère vermifuge très prisé pour le bétail (**Nabli, 1989**) et pour les nomades du désert (**Bailey et Danin, 1981**).

En Algérie on trouve l'armoise dans les zones steppiques (hauts plateaux) elle se répand sur une longueur de 1200 km allant de la frontière tunisienne jusqu'à la frontière marocaine (**Bezza et al, 2010**). (Figure2)

III.2. Classification botanique : (Quezel et Santa, 1963)

L'armoise appartient à :

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia herba-alba*



Figure2 : L'armoise blanche de la région de Biskra
(**Bezza et al, 2010**).

IV. L'huile essentielle de l'Armoise :

Les HE de l'armoise blanche ont fait l'objet de plusieurs études en Algérie (**Vernin, Merad, 1994**) (**Vernin et al, 1995**) (**Bezza et al, 2010**) (**Lakehal et al, 2016**). En effet, l'HE contenue dans les feuilles du genre *Artemisia* est connue pour ses propriétés régulatrices du cycle menstruel et comme remède de beaucoup de maladies telles que le diabète, la bronchite, les abcès et la diarrhée (**Akrout, 2001**). En outre, de nombreux chercheurs ont rapporté diverses activités biologiques et / ou pharmacologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* en tant qu'agent antimicrobien, antioxydant (**Rafiq et al, 2016**), (**Younsi et al, 2017**), anti-

leishmanien (**Hatimi et al, 2001**), anthelminthique et antispasmodique (**Mohamed et al, 2010**).

La caractérisation chimique de l'HE d'armoise blanche, provenant de plusieurs régions du monde, a déjà été étudiée, L'huile présentait une composition variable selon les facteurs géographiques et la génétique des populations, les composés les plus abondants semblent être l' α -thujone, la β -thujone, la chrysanthénone et l'acétate de trans-sabinyle (**Younsi et al, 2017**) Pour l'HE d'*Artemisia herba-alba* provenant d'Algérie, on note essentiellement la présence de camphre, d' α - et de β -thujones, d'eucalyptol et de dérivés chrysanthenyles (**Dob, Benabdelkader,2006**),(**Vernin et al,1995**).Cependant, selon **Ghanmi et al, (2010)**, l'huile essentielle de l'armoise présente une variation saisonnière de ses composants actifs.

Chapitre II : Les huiles essentielles

I. Définition :

Les huiles essentielles(HE), sont des mélanges complexes de composés volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Elles sont caractérisées par une tache translucide sur du papier qui ne persiste pas très longtemps comparativement aux huiles fixes (**Gainard, 2016**). Elles sont dotées de plusieurs activités biologiques et écologiques (**Elmi et al, 2017**).

Pour **Bruneton (1999)**, les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont « des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation ».

Les HE peuvent être localisées aussi bien dans les fleurs, les feuilles, les fruits, que dans les écorces, les graines ou les racines...elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en poches ou en canaux sécréteurs (**Bernard et al, 1988**).

II. Rôle des huiles essentielles chez les plantes :

Pour **Cseke et Kaufman, 1999**, les huiles essentielles par définition sont des métabolites secondaires produites par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation ; d'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Belaiche, 1979**)

III. Composition chimique :

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses, Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

Selon **Sutour, (2011)**, Il existe naturellement d'autres corps entrant en faibles proportions dans la constitution de certaines HE : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles, flavonoïdes, etc.

IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles s'extraitent par distillation (hydro distillation simple ou distillation à vapeur saturée), pression, enfleurage ou au moyen d'un solvant, selon la partie de la plante utilisée et la fragilité de l'huile (**Bremness, 1998**), (**Bruneton, 1999**). La méthode pratiquée est très importante pour rapporter une huile essentielle capable de produire la saveur et l'odeur de la plante la plus naturelle, avec un changement chimique minimal des composés présents dans l'huile obtenue (**Herminia, 1999**). Il y a aussi d'autres procédés plus développés : hydro distillation par micro-ondes sous vide et hydro diffusion. Mais la composition des huiles est qualitativement différente de celles obtenues par les procédés classiques (**Bruneton, 1999**).

Deux procédés sont principalement employés et font l'objet d'une monographie à la Pharmacopée : l'hydrodistillation/distillation à la vapeur d'eau et l'expression à froid. (**Pierron, 2014**).

V. Méthodes d'analyse :

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (**Lakhdar, 2015**).

Des nouvelles techniques de séparation, en particulier la chromatographie en phase gazeuse (CPG), sont les mieux adaptées à l'analyse des constituants volatils dans les extraits aromatiques. La CPG peut être couplée à des méthodes spectrales, telles que l'infra-rouge ou la spectrométrie de masse qui est de loin la plus utilisée (**Figueredo, 2007**).

VI. Bio-activité des huiles essentielles :

Plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles : cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique, antimicrobienne, anti-inflammatoire (**Bruneton, 1999**), antioxydant (**Dorman et al 2000**), acidifiante, tonocardiaque, fluidifiante du sang, antivenimeuse, antispasmodique, pouvoir de protéolyse rapide (**Bernadet, 2000**) Le pouvoir antiseptique des huiles essentielles, s'exerce à l'encontre de bactéries pathogènes variées, y compris de souches habituellement antibiorésistantes. Certaines huiles sont également actives sur des champignons responsables de mycoses et sur des levures (par exemple *Candida*) (**Bruneton, 1999**).

VII. Toxicité des huiles essentielles :

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus soit aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou aux doses massives de L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine (**Eisenhut, 2007**), (**El Elkolli, 2008**).

VIII. L'encapsulation des huiles essentielles (Solubilisation) :

Les HE sont lipophiles, non miscibles à l'eau et en même temps, ils sont sensibles à la modification chimique sous l'effet de certains facteurs externes tels que : la température, Lumière, l'oxygène, etc. Afin de réduire ces faiblesses, l'incorporation de ces huiles dans un système d'encapsulation pourrait être une bonne approche pour préserver leurs composés et maintenir leurs caractéristiques biologiques et fonctionnelles. Les huiles essentielles sont encapsulées selon différentes techniques : émulsification, l'enrobage en lit d'air fluidisé, inclusion moléculaire, séchage par pulvérisation, lyophilisation, co-cristallisation, extrusion, etc (**Zuidam, Heinrich, 2010**).

VIII.1. Définition :

Généralement, l'encapsulation est définie comme un processus visant à piéger une substance (un agent actif) dans une autre substance (matériau de la paroi). La substance encapsulée peut aussi être appelée le noyau, la phase active, interne ou la charge utile. La substance qui encapsule est souvent appelée le revêtement, la membrane, l'enveloppe, la capsule, le matériau de support, la phase externe ou la matrice (**Wandrey et al, 2009**) (**Fang et Bhandari, 2010**).

C'est une technologie spécifiquement adaptée à fournir des composés à haute valeur ajoutée, capable de stabiliser et de contrôler la libération de composés extraits à partir des fruits, des légumes ou autres (c'est-à-dire des composés bioactifs antioxydants, des vitamines, des acidulants, des parfums, des arômes, des enzymes, des cellules microbiennes et autres). C'est une pratique courante dans la conservation ou l'amélioration de la bioactivité des extraits naturels (**Nikmaram et al, 2017**) utilisée dans divers domaines y compris en pharmacutique.

L'encapsulation des huiles est définie comme un processus dans lequel les gouttelettes de l'huile bioactive sont entourées d'un matériau d'enrobage, ou noyées dans une matrice homogène ou hétérogène, pour donner de petites capsules ayant de nombreuses propriétés utiles (**Sagalowicz et al, 2010**).

VIII.2. Les complexes cyclodextrines-huiles essentielles :

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques dérivés d'amidon. Ils contiennent six, sept ou huit unités de glucopyranose et sont nommés respectivement α -CD, β -CD et γ -CD. L'orientation spatiale des unités de glucopyranose forme un cône tronqué avec un espace intérieur hydrophobe et une surface extérieure hydrophile. L'encapsulation d'huiles essentielles sur CD est basée sur l'inclusion de molécules hydrophobes dans l'espace intérieur du polymère avec la formation d'un complexe d'inclusion hydrosoluble (**Wang et al, 2011**) (**Peggy et al, 2010**). Cette technique protège l'huile essentielle de la lumière, de l'air et de l'humidité qui peuvent conduire à l'oxydation ou la volatilisation réduisant ainsi les activités biologiques des HE. De plus, elle augmente la solubilité de l'huile dans l'eau, empêche sa libération à un stade indésirable et facilite sa manipulation (**Liolios et al. 2009**).

Chapitre III : La cryoconservation

I. Définitions :

I.1. Le sperme :

C'est un fluide organique expulsé du corps lors de l'éjaculation contenant les spermatozoïdes sécrétés par les organes sexuels males (**Girod et Czyba, 1997**).

Les spermatozoïdes représentent 10 % et le liquide séminal 90% du volume de l'éjaculat (**Jumeau., 2015**). Il varie d'une espèce à une autre et dans la même espèce sa mobilité est différente d'un individu à un autre, avec des volumes et des concentrations différentes.

I.2. Les spermatozoïdes :

Les gamètes sont des cellules différenciées responsables du transport de l'information génétique dans le tractus génital femelle et de sa délivrance à l'intérieur de l'ovocyte.

Les spermatozoïdes matures de bélier sont constitués principalement de trois segments : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. La tête est composée d'un noyau dans lequel l'ADN est hypercondensé par des protamines ce qui permettra de créer une forme hydrodynamique, favorisant la mobilité et la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (**Brewer et al, 2002**) (Figure3).

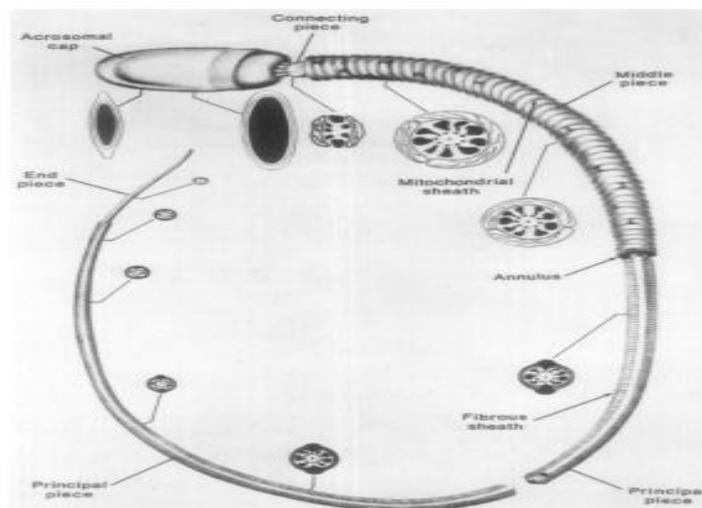


Figure3 : Structure d'un spermatozoïde (**Fawcett, 1975**).

II. Les étapes de la conservation

Selon l'agence française de normalisation (AFNOR), la semence est un produit préparé (dilué, conditionné, conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. L'ensemble des opérations de préparation de la semence peut être

comparé à une chaîne dont chaque maillon constitue un stade technologique très important (Adamou-N'diaye *et al*, 2003). Une déféction à une étape donnée porte préjudice à la qualité du produit final. Cette chaîne est chronologiquement découpée comme suit : la collecte du sperme, l'analyse du sperme récolté, la préparation de la semence, le conditionnement en doses individuelles, et la conservation à court ou à long terme.

II.1. La collecte du sperme :

a. Le sperme éjaculé :

+ Par vagin artificiel :

Elle consiste à faire éjaculer un mâle dans un vagin artificiel au moment de l'accouplement, soit sur un mannequin soit sur une femelle oestrogénisée. Après l'éjaculation, l'opérateur secoue énergiquement le vagin artificiel pour faire descendre le sperme dans le tube de collecte (Christian, 2009).

+ Par électro éjaculation :

C'est une méthode de collecte de sperme par excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs. Cette technique permet d'obtenir un sperme sans intervention des mécanismes sensoriels et psychiques de l'éjaculation. Le sperme collecté est de moins bonne qualité que celui collecté au vagin artificiel et d'une plus faible concentration (Christian, 2009).

b. Le sperme épидидymaire :

L'utilisation du sperme épидидymaire est une technique qui permet d'envisager l'utilisation d'animaux non collectables (vivants ou morts depuis quelques jours) en insémination artificielle (IA) ou en fécondation *in vitro* (FIV). La fertilité du sperme épидидymaire d'ovins diminue en fonction du temps mais est encore utilisable après 72 heures de conservation à 4°C (Guérin *et al*, 2003).

Le principe de collecte consiste à faire une microponction du canal déférent sur animal vivant ou après abattage et obtention du testicule (Deutscheur *et al*, 2007) en utilisant la méthode de rétrograde-flushing qui permet le recueil de SPZ en nombre suffisant pour plusieurs dizaines d'IA ou de FIV.

II. 2. Analyse de la qualité du sperme récolté :

Elle consiste à apprécier les caractéristiques du sperme collecté, notamment celle en relation avec le pouvoir fécondant. L'examen de l'éjaculat comprend un examen visuel

(macroscopique), un examen microscopique et une évaluation par test métabolique ou test de résistance (Konfe, 2014).

II.3. La dilution :

Selon Henzen (2010), la dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles.

II.3.1 Propriétés et composition des milieux de dilution :

Les milieux de dilution doivent répondre à un certain nombre de critères (Decuadro-Hansen, 2004)

- Avoir un pH entre 6,7–7,3 chez les mammifères domestiques et une pression osmotique de 280–400 mOsmoles.
- Contenir des éléments nutritifs pour éviter l'épuisement des spermatozoïdes (glucose, fructose, glutamine, etc.).
- Avoir des solutions tampons (Tes, Pipes, Hepes, Tris, etc.) et des ions minéraux permettant de maintenir le pH.
- Contenir des lipoprotéines animales ou végétales qui ont un rôle protecteur des membranes durant le processus de congélation–décongélation ;
- Avoir des antibiotiques destinés à contrôler la flore microbienne banale et de pathogènes opportunistes.

II.3.2. Nature des milieux de dilution :

a. Les dilueurs à base de lait :

Le lait est un milieu biologique de composition complexe composé de protéines, sels, glucides, lipides, vitamines, etc. (Vieira de Sa, 1990). Le pH d'environ 7,0 et la pression osmotique autour de 300 milimoles sont proches de ceux de la semence (Hafez, 1993). L'efficacité du lait en tant que milieu de dilution et conservation de la semence est due à son rôle de tampon, son action protectrice contre le choc thermique et son action antioxydante contre quelques métaux lourds (Aguinaldo, 2006). En plus, le lait apporte le lactose comme substrat énergétique aux spermatozoïdes. L'effet protecteur du lait est attribué à la caséine (fraction protéique).

Le lait de vache écrémé est, parmi d'autres, le plus utilisé pour la conservation du sperme réfrigéré à 4° ou 15° C. Il doit être chauffé à la température de 95°C afin d'inactiver la lacténine présente dans la fraction protéique car cette dernière possède des radicaux libres qui ont un effet toxique sur les spermatozoïdes (**Flipse et al, 1954**).

b. Les dilueurs à base du jaune d'œuf :

La présence de certaines protéines et lipoprotéines dans les dilueurs protège les spermatozoïdes des effets néfastes de la dilution et du refroidissement/réchauffement brutal en agissant au niveau de leurs membranes. Ainsi, l'on explique les effets bénéfiques bien connus du jaune d'œuf dont la découverte a été déterminante dans le développement de l'IA. Dans le jaune d'œuf, c'est la fraction lipoprotéique qui permet la meilleure protection (fraction LDL). L'effet du LDL sur la motilité de sperme et fertilité in vitro du sperme de taureau a été récemment rapporté (**Moussa et al, 2002**), (**Lamia, 2004**).

II.4. Techniques de conservation :

II.4.1. La conservation à court terme :

La conservation à court terme se fait à une température voisine de 5°C. Celle-ci doit cependant, pour éviter les chocs thermiques, être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de 0.5°C à 1°C par minute ce qui réduit le métabolisme des SPZ et permet ainsi d'économiser leurs réserves énergétiques et une bonne conservation de leurs mobilités. Bien diluée et convenablement refroidie, la semence peut conserver son pouvoir fécondant pendant 2 à 3 jours (**Hanzen, 2010**).

II.4.2. La conservation à long terme :

La congélation des spermatozoïdes a pour but de réduire leur métabolisme cellulaire au maximum afin d'augmenter leur durée de conservation. Cependant, l'exposition des cellules au froid leur fait courir trois types de danger : (**Graham, 2011**)

- Le choc thermique qui entraîne la dénaturation de certaines protéines.
- La cristallisation intracellulaire qui provoque des lésions des organelles.
- La déshydratation intracellulaire qui entraîne la dénaturation de certaines protéines et l'accumulation de composés toxiques.

La technique de congélation idéale devrait prévenir ces différents risques. Cependant, chaque technique de congélation va limiter certains risques, mais en promouvoir d'autres. Lors de la congélation qui consiste à faire diminuer progressivement la température, le risque de formation de cristaux intracellulaires est élevé, ce qui implique le recours à de fortes concentrations en agents cryoprotecteurs. Lors de la vitrification, qui consiste en une diminution brutale de la température, la réorganisation en cristaux n'a pas lieu, mais le risque de dénaturation des protéines est présent (**Graham, 2011**). Cette technique nécessite aussi le recours à de hautes concentrations en agents cryoprotecteurs (**Bagchi et al, 2008**) même si des publications laissent penser que non (**Nawroth et al, 2002**).

Chapitre IV : Le stress oxydatif

I. Stress oxydatif :

I.1. Définition :

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées réactives (EOR) et les défenses anti oxydantes de l'organisme, en faveur des premières (Haleng et al ,2007). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999).

I.2. Origine du stress :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/ pro oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé : « stress oxydant » (Favier, 2003).

I.3. Les espèces oxygénées réactives (EOR) :

L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, il y a formation d'espèces toxiques ayant des électrons non apparié (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxydes (ROO), alcoxydes (RO), superoxydes (O₂⁻) et hydroxydes (HO). Ces radicaux centrés sur l'oxygène sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS : Réactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne) (Novelli, 1997). Selon cet auteur, l'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène », n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), peroxyde d'azote (ONOO⁻).

Selon **Cook et al, (2003)**, Les dommages liés au stress oxydatif se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires, en effet les EOR oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN.

I.4. Les antioxydants :

Un antioxydant se définit comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd et al ,2003**),

Selon **Vansant, (2004)**, les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs.

Pour se protéger des effets délétères des EOR, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses anti oxydantes, on distingue deux sources : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C , E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoiq ue ;l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Haleng et al ,2007**).

II. Stress oxydatif-sperme :

La production des ROS est un processus physiologique normal mais un déséquilibre entre la génération de ROS et le balayage de l'activité est nuisible au sperme et est associée à l'infertilité masculine. En effet, malgré que les ROS produits par les spermatozoïdes aient un rôle important dans des processus physiologiques normaux tels que la capacitation de sperme, réaction acrosomique, l'entretien de la capacité de fertilisation et la stabilisation des mitochondries (**Bansal et Bilaspuri, 2011**), les spermatozoïdes ont été le premier type de cellule signalé à montrer une susceptibilité potentielle au stress oxydatif.

Les spermatozoïdes sont dotés de mécanismes de défense anti-oxydants et sont susceptibles d'étouffer les EOR, protégeant ainsi les cellules gonadiques et les spermatozoïdes matures des dommages oxydatifs (**Henkel, 2011**). Cependant, dans des conditions pathologiques, la production incontrôlée de ROS dépasse la capacité antioxydante du plasma séminal, entraînant un stress oxydatif (**Trussell, 2013**) (**Henkel, 2011**). Tous les composants

cellulaires, y compris les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres, sont des cibles potentielles du stress oxydatif (**Agarwal, 2008**).

II.1. La peroxydation lipidique :

La sensibilité des spermatozoïdes des ruminants au stress oxydatif est une conséquence de l'abondance d'AGPI (acides gras polyinsaturés) dans leur membrane plasmique ce qui les rend vulnérables aux attaques de radicaux libres et aux dommages induit par la peroxydation lipidique. Il résulte de cette dernière une perte de l'intégrité membranaire, de la motilité, altération des fonctions cellulaires, des anomalies morphologiques et l'induction de l'apoptose du sperme (**Bucak ,2010**).

✚ Évaluation de la peroxydation lipidique membranaire des spermatozoïdes :

La peroxydation lipidique dans le tissu épидидymaire et les spermatozoïdes est évaluée par la mesure de la concentration des produits de la peroxydation lipidique, tels que le malondialdéhyde (MDA), qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique(TBA) pour former un composé fluorescent qui peut être quantifié par spectrophotométrie à 532 nm (**Noblanc, 2013**).

Chapitre I : Matériel et méthodes

Dans le but d'améliorer les milieux de conservation, nous avons étudié dans le présent travail, l'effet des huiles essentielles du romarin et de l'armoise sur les caractéristiques du sperme ainsi que leurs effets sur le développement bactérien lors de la conservation de la semence de bélier à 4°C.

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie physiologie animale au bloc N° 12 au sein de l'université A. MIRA / Bejaïa.

I. Matériel et méthodes :

I.1. Extraction des huiles essentielles :

✚ Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de deux espèces ; le romarin (*Rosmarinus Officinalis*) et l'armoise (*Artémisia herba alba*) et les huiles essentielles testées ont été obtenus à partir de la partie aérienne de chaque plante.

Les deux plantes sont récoltées de la région d'Akbou le 15 mars 2019 pour le Romarin et le 1^{er} avril 2019 pour l'Armoise et sont coupées et séchées à température ambiante.

✚ Méthodologie :

L'extraction des HE a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie physiologie animale de l'université de Bejaia par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger modifié (figure4).

L'opération consiste à introduire la masse végétale séchée dans un ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements lors de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon.

Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton, 1999**), Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à 4°C dans des flacons en verre opaques fermés hermétiquement jusqu'à leur usage. L'extraction a duré deux heures à partir du début d'ébullition c'est-à-dire après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur.



Figure4 : Montage d'extraction par Hydrodistillation.

✚ Le rendement d'extraction :

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction (**M'**) et la masse de la matière végétale utilisée (**M**).

Le rendement est exprimé en pourcentage, il est donné par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

Rdt : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

I.2.L'encapsulation des huiles essentielles (complexe HE-CD) :

L'encapsulation des HE des deux plantes a été réalisée par la méthode de co-évaporation en utilisant un rotavapeur.

Pour la préparation des complexes d'inclusion, le ratio utilisé est donné par la littérature et a été optimisé au niveau du laboratoire de biologie et physiologie animale :

- 300mg d'huiles essentielles de romarin/ armoise.
- 700mg de cyclodextrine.

Ces dernières sont dissoutes dans 75mL d'éthanol et la solution a été laissée sous agitation pendant 24h à l'abri de la lumière.

- Un séchage à 50° C pendant 60min a été effectué à l'aide d'un rotavapeur.
- La poudre obtenue a été recueillie et stockée dans des flacons hermétiques à 4°C jusqu'à une analyse ultérieure.

I.3. Etude de l'effet des huiles essentielles sur les paramètres spermatiques :

✚ Matériel de laboratoire :

Le matériel utilisé pour réaliser l'ensemble des analyses est le suivant :

Becher, tubes à essai, barreaux magnétiques, bec-benzen, filtre-seringue, embouts, endorphs, lame bistouri, boîtes de pétris, râtaux, milieux de culture et réactifs, micropipettes, papier absorbant ; papier aluminium, ciseaux, gants en latex, des œufs, l'eau physiologique, eau distillée.

Appareillage : étuve, réfrigérateur, spectrophotomètre, centrifugeuse, sonicateur, Balance électronique.

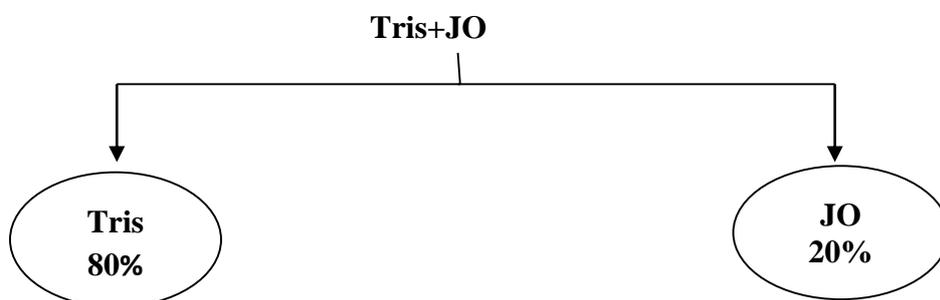
✚ Méthodologie :

Afin d'étudier les effets des HE de romarin et de l'armoise sur les caractéristiques du sperme épидидymaire conservé à 4°C, nous avons utilisé différentes concentrations des huiles essentielles diluées dans le : Tris + jaune d'œuf (JO) et évaluer ensuite les différents paramètres spermatiques mesurés par le CASA « **Computer Assisted Sperm Analysis**»

I. 3.1. Préparation des milieux de conservation :

Le sperme est dilué dans le Tris +JO préparé comme suivant :

Dans 100 ml d'eau distillé, on dissout,



- **3.028g tris**
- **1.25g fructose**
- **1.7g acide citrique**
- **1mg/mL penicilline G**

Le jaune d'œuf est habituellement utilisé à des concentrations comprises entre 15 et 20%. Il protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température.

La solution obtenue a été centrifugée pendant 30 min à 6000g puis le surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Ensuite, des milieux de conservation ont été préparés en ajoutant différentes concentrations d'huiles essentielles de romarin/armoïse : (tableauI)

Les mêmes concentrations ont été testées après encapsulation avec les cyclodextrines.

TableauI : les concentrations en huiles essentielles utilisées pour l'analyse de la mobilité.

Romarin (µl/ml)			Armoïse (µl/ml)		
0.05	0.1	0.25	1	0.5	0.25

Le contrôle contient uniquement le Tris+ JO

I.3.2. La collecte du sperme épидидymaire :

Les testicules sont récupérés tôt le matin de l'abattoir communal de Bejaia après l'abattage des ovins.

➤ Dissection du testicule et séparation de l'épididyme :

Après avoir lavé les testicules à l'eau courante, l'albuginé est enlevée puis la tête de l'épididyme et le canal déférent sont isolés du reste du testicule à l'aide d'un bistouri puis rincer avec de l'eau physiologique.

Les vaisseaux sanguins superficiels de la tête de l'épididyme sont perforés de sorte que la plus grande partie du sang puisse être éliminée afin d'éviter toute contamination de la semence lors de la collecte(figure5)

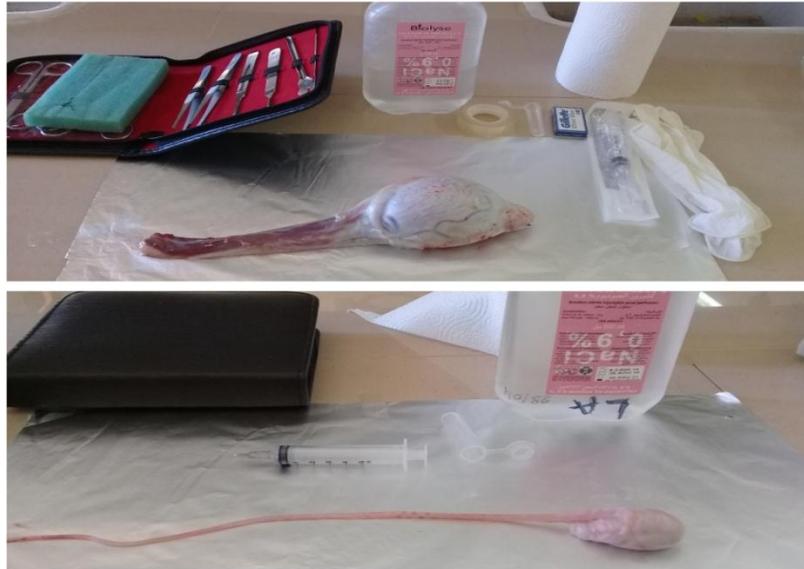


Figure5 : Dissection du testicule et séparation de l'épididyme.

➤ **La collecte proprement dite :**

La collecte du sperme épидидymaire a été réalisée par la méthode du rinçage rétrograde « *retrograde-flushing* » :

Une incision profonde est réalisée au niveau de la queue de l'épididyme avec une lame stérile et le sperme qui s'écoule est récolté dans un eppendorf gradué placé contre l'incision. Ensuite, un lavage rétrograde du canal déférent et de l'épididyme est réalisé en introduisant une seringue remplie d'air et contenant 1 ml de Tris buffer dans la lumière jusqu'à ce que tout le contenu soit chassé de l'épididyme. L'échantillon est recueilli dans l'eppendorf de collecte (figure6).

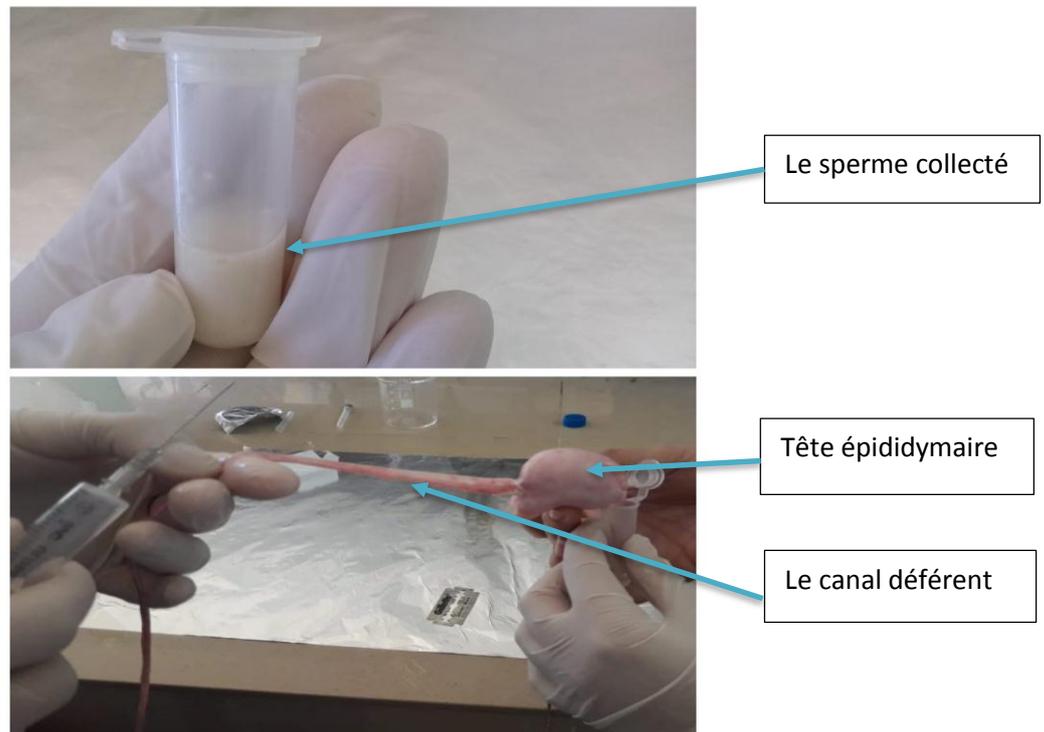


Figure6 : Collecte de sperme épидидymaire par la méthode « *retrogarde-flushing* ».

I.3.3. Traitement et conservation :

Le sperme a été ajouté à chaque milieu de conservation préparé avec un rapport de dilution de 1/200 (5µl de sperme dans 1 ml de milieu de conservation).

Après dilution et homogénéisation de la semence une première analyse est réalisée pour l'ensemble des milieux à T0 (avant conservation), le sperme est ensuite conservé à 4°C pour des analyses ultérieures.

II. Analyse de la qualité du sperme :

II.1. Analyse de la mobilité :

L'analyse de la mobilité de l'ensemble des échantillons est réalisée par le logiciel informatique CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) à T0 et après conservation à 4°C à T2h, T4h et enfin à T24h. Brièvement, on a déposé 10µl du contrôle (sperme+ (Tris+JO) ou de traitement sur la lame Makler, cette dernière est mise sous microscope au grossissement (×40), puis trois champs différents ont été captés, analysés et enregistrés pour chaque échantillon.

Pour chaque spermatozoïde mobile, 8 paramètres ont été enregistrés par le CASA. (tableauII)

Tableau II : Les paramètres de mobilité spermatique mesurés par le CASA pour chaque spermatozoïde.

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire en ligne droite ($\mu\text{m/s}$)	VSL (Straight-Line Velocity)	C'est la distance entre le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet, en ligne droite.
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire ($\mu\text{m/s}$)	VCL (Curvilinear Velocity)	C'est la distance totale parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP (average pathway Velocity)	correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation.
La linéarité	LIN (linearity)	Est la valeur moyenne du rapport VSL/VCL en pourcentage.
La rectitude	STR (straightness)	Est la valeur moyenne du rapport VSL/VAP en pourcentage.
Oscillation	WOB (wobble)	Oscillation de la trajectoire réelle par rapport à la trajectoire moyenne.
		(VAP / VCL) (%)
l'amplitude de déplacement latéral de la tête	ALH (Amplitude of Lateral Head displacement)	C'est la distance balayée par la tête du spermatozoïde Durant son déplacement
La fréquence de battement de tête	BCF (beat cross frequency)	C'est la fréquence par laquelle la tête de spermatozoïdes traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz

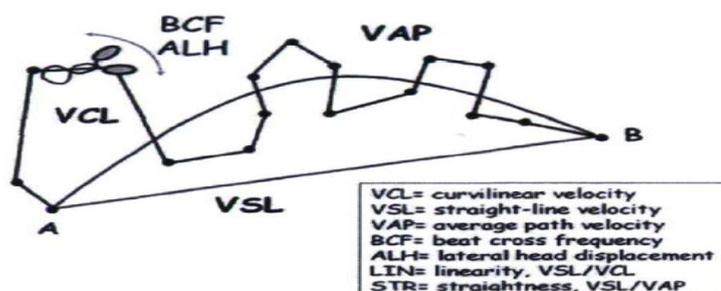


Figure7 : Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA (Luconi et al, 2006).



Figure 8 : Lame Makler.



Ordinateur



Plaque
chauffante

Figure 9 : Analyse de la mobilité par le Système « CASA ».

II.2. Analyse de la vitalité :

✚ Le test hypo-osmotique :

Le test de gonflement hypo-osmotique ou « **HOS Test** » ou « **Curling Test** » a été développé par **Jeyendran et al, (1984)** pour évaluer l'intégrité fonctionnelle des membranes des spermatozoïdes. Ce test est basé sur le fait que la membrane de la cellule intacte est semi-perméable. Le spermatozoïde vivant placé dans un milieu hypo-osmotique va augmenter de volume du fait de l'influx d'eau (osmose). Le spermatozoïde va gonfler et un enroulement plus ou moins important du flagelle sera observé (**Tournaye et al, 1994**). HOS-Test serait un indicateur de la conservation de l'intégrité membranaire au niveau du flagelle du spermatozoïde.

Dans la présente étude, l'intégrité fonctionnelle de la membrane de sperme de bédouin a été évaluée à l'aide du test HOS développé par **Jeyendran et al, (1984)** pour le sperme humain. La solution hypo osmotique est obtenue en mélangeant dans 50 ml d'eau distillée :

- ✓ 450 mg de fructose
- ✓ 245 de sodium citrate dihydrate.

20 µL de semence conservée à 4°C ont été ajoutés à 300 µL de la solution hypo-osmotique et incubés à 37°C pendant 60 minutes dans un bain-marie.

Une goutte de sperme incubé de chaque milieu a été placée sur une lame Makler et observée au microscope optique au grossissement x20. Les champs de microscope ont été sélectionnés

au hasard. Au moins 100 spermatozoïdes ont été évalués par lame et les pourcentages de spermatozoïdes à queue gonflée ont été calculés (Nur *et al*, 2005). Le comptage est effectué deux fois sur des images différentes et la moyenne des deux comptages est considérée. (Figure10).

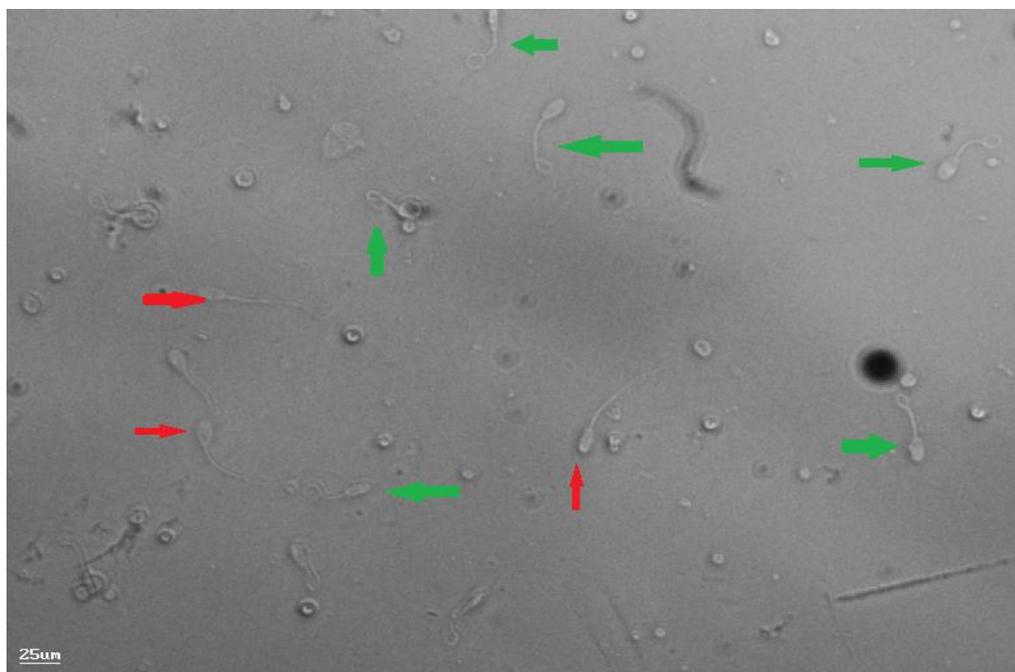


Figure10 : Les spermatozoïdes gonflés (verts) et non gonflés (rouges).

II.3. Evaluation de la peroxydation lipidique (Test TBARS) :

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit final de la LPO qui est mesuré par dosage de l'acide thiobarbiturique (TBA) (Sanocka et Kurpisz ,2004) TBA substances réactives (TBARS) se forment principalement au cours de détermination de LPO in vitro (Gotz *et al* 1993).

Nous avons évalué la peroxydation lipidique dans nos milieux de conservation contenant différentes concentrations d'huiles essentielles de chacune des deux plantes.

Les mêmes concentrations sont retenues et testées après encapsulation avec les cyclodextrines. (tableauIII)

TableauIII : Les concentrations en huiles essentielles utilisées pour le test TBARS.

Romarin (µl/ml)		Armoise (µl/ml)		
0.05	0.1	1	0.5	0.25

Le schéma ci-dessous montre les différentes étapes suivies pour la réalisation de ce test : (figure11).

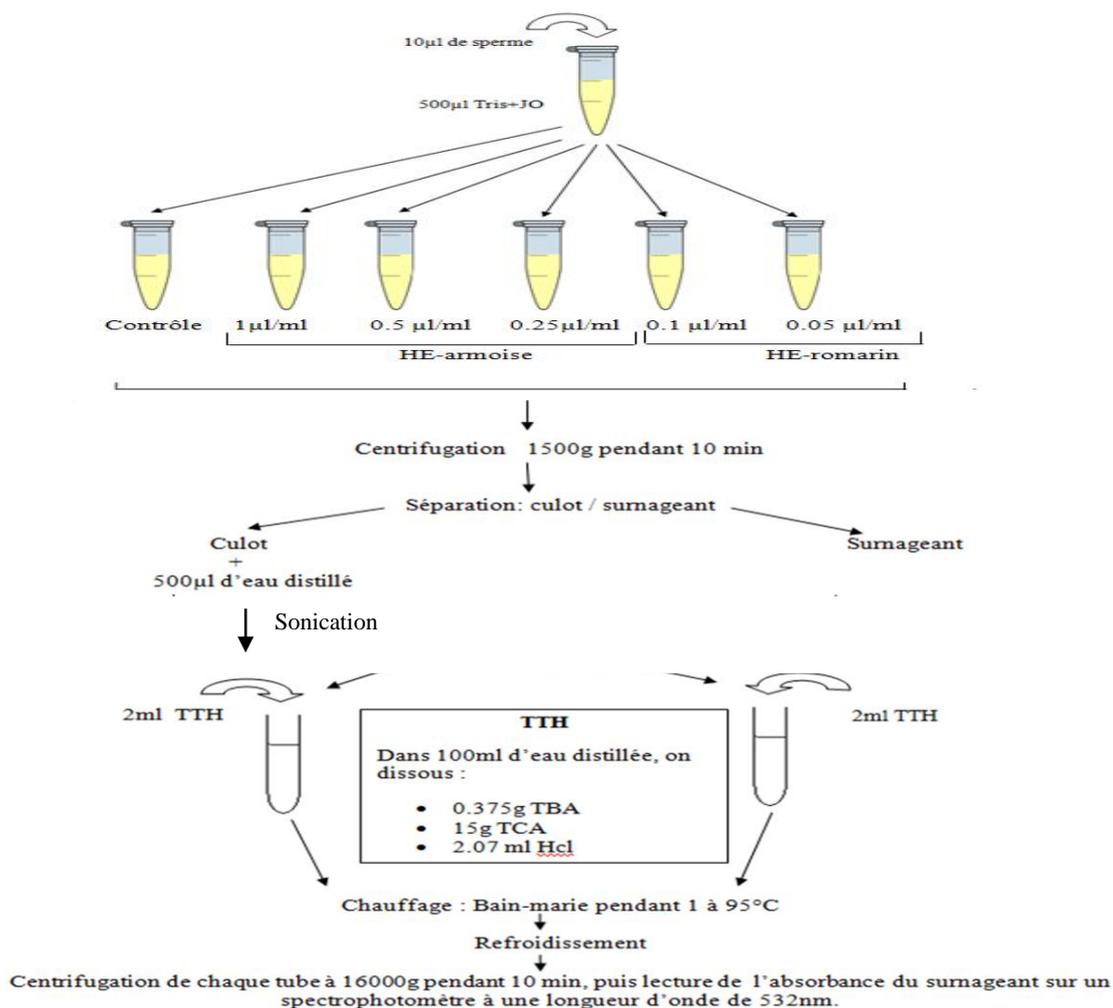


Figure11 : Evaluation de la peroxydation lipidique.

II.4. L'effet des huiles essentielles sur le développement bactérien :

L'étude de l'effet des huiles essentielles de chaque plante sur le développement bactérien a été réalisée après 24h de conservation à 4°C en choisissant une concentration de 0.25µl/ml et 0.1µl/ml avec et sans encapsulation, pour l'ardoise et le romarin respectivement.

Un seul contrôle (sans huiles essentielle) a été utilisé et tous les milieux de conservation étaient sans antibiotique. Cette épreuve est réalisée en duplicate (figure12).

Chapitre II : Résultats et discussion.

Dans ce présent chapitre nous allons exposer et discuter l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre travail.

II.1. Le rendement d'extraction :

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors des extractions journalières des huiles essentielles des deux plantes sèches par hydrodistillation sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV : Rendement d'extraction en huiles essentielles.

Plante	Romarin	Armoise
Poids de plante(g)	2323.9	1600
Poids de l'huile(g)	17.38	9.4
Rendement(%)	0.75	0.59

Les rendements en huiles essentielles des deux plantes étudiées sont largement variables. En effet, *Rosmarinus officinalis* présente le rendement le plus élevé.

Le rendement d'extraction en HE de l'armoise de la région d'Akbou exprimé en pourcentage est de 0.59%. Le rendement obtenu est inférieur à celui rapporté par **bezza et al, (2010)** lors de son étude sur la composition chimique de l'huile essentielle *d'Artemisia herba alba* provenant de la région de Biskra, où seules les sommités fleuries sont distillées, et celui obtenu par **Akrout, (2004)** lors de son étude sur les huiles essentielles de l'armoise et de quelque plante pastorale de la région de Matmata (Tunisie). Les teneurs obtenues par ces auteurs sont respectivement de 0.95% et 0.65%.

Les résultats obtenus par **Ghanmi et al, (2010)** montrent que les rendements en HE de l'armoise blanche de la région de Guercif (Maroc) récoltée en avril, juin et en septembre sont respectivement de 0,86, 1,23 et 0,56%, cette dernière valeur reste inférieure à celle obtenue lors de notre étude.

En ce qui concerne le romarin, le rendement d'extraction obtenu est de 0.75%. En comparant cette teneur à celles obtenue par (**Neffar et Benabdrrahmene, 2013**) lors d'une étude quantitative des huiles essentielles de deux espèces de romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) et dans deux expositions (Nord et Sud), on constate qu'elle est similaire aux rendement d'extraction d'HE de *Rosmarinus officinalis* provenant du nord, et est supérieur à celui obtenue à partir de la même plante provenant du sud qui n'est que de 0.47%.

Cependant le rendement reste inférieur à celui rapporté par les travaux d'**Atik Bekkara et al. (2007)** et de **Rouabeh (2010)**. En effet, les quantités obtenues sont respectivement de 0.8% et 0.9 %.

Cette différence en rendement peut être attribuée à plusieurs facteurs dont essentiellement, l'origine, l'espèce, la période de récolte, la durée de séchage et la technique d'extraction des huiles essentielles (**Russo et al, 1998 ; Van Damme, 2001 ; Karousou et al, 2005 ; Loziene et al, 2005 ; Pibiri, 2005 ; Curado et al, 2006**).

II.2. Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la mobilité :

Afin d'améliorer la conservation, nous avons évalué l'effet des HE de l'armoise blanche et du romarin sur la mobilité des spermatozoïdes conservés à 4°C.

La cinétique de mouvement des spermatozoïdes :

a. L'armoise :

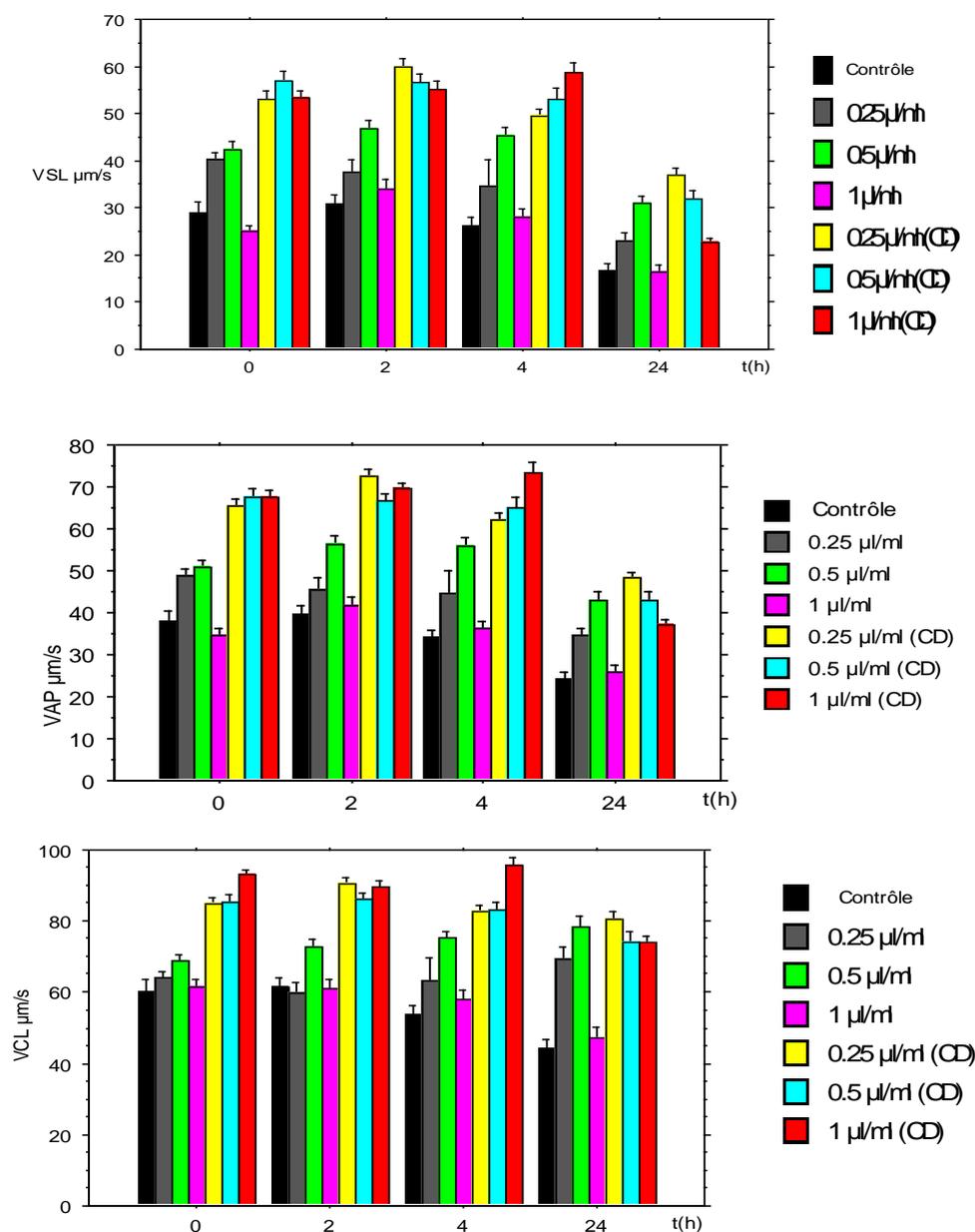


Figure13 : Histogrammes représentant les vitesses (VSL), (VCL) et (VAP) des spermatozoïdes conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE de l'armoise en fonction du temps.

La figure n°13 montre que la VSL des spermatozoïdes est largement supérieure dans les milieux qui contiennent les huiles essentielles à l'exception de la concentration 1 $\mu\text{l/ml}$ (sans encapsulation) qui ne montre qu'un faible effet à 2h de conservation et suit l'évolution

du contrôle dans les autres temps. L'encapsulation améliore nettement l'effet de cette concentration qui maintient son effet bénéfique à tous les temps.

Cependant, les vitesses les plus élevées sont obtenues avec les concentrations d'HE encapsulées. En effet, les concentrations 0.25 µl/ml, 0.5 µl/ml et 1 µl/ml encapsulées ont amélioré la VSL plus que les mêmes concentrations sans encapsulation.

Les mêmes constatations peuvent être retenues pour la VAP et la VCL.

a. Le romarin :

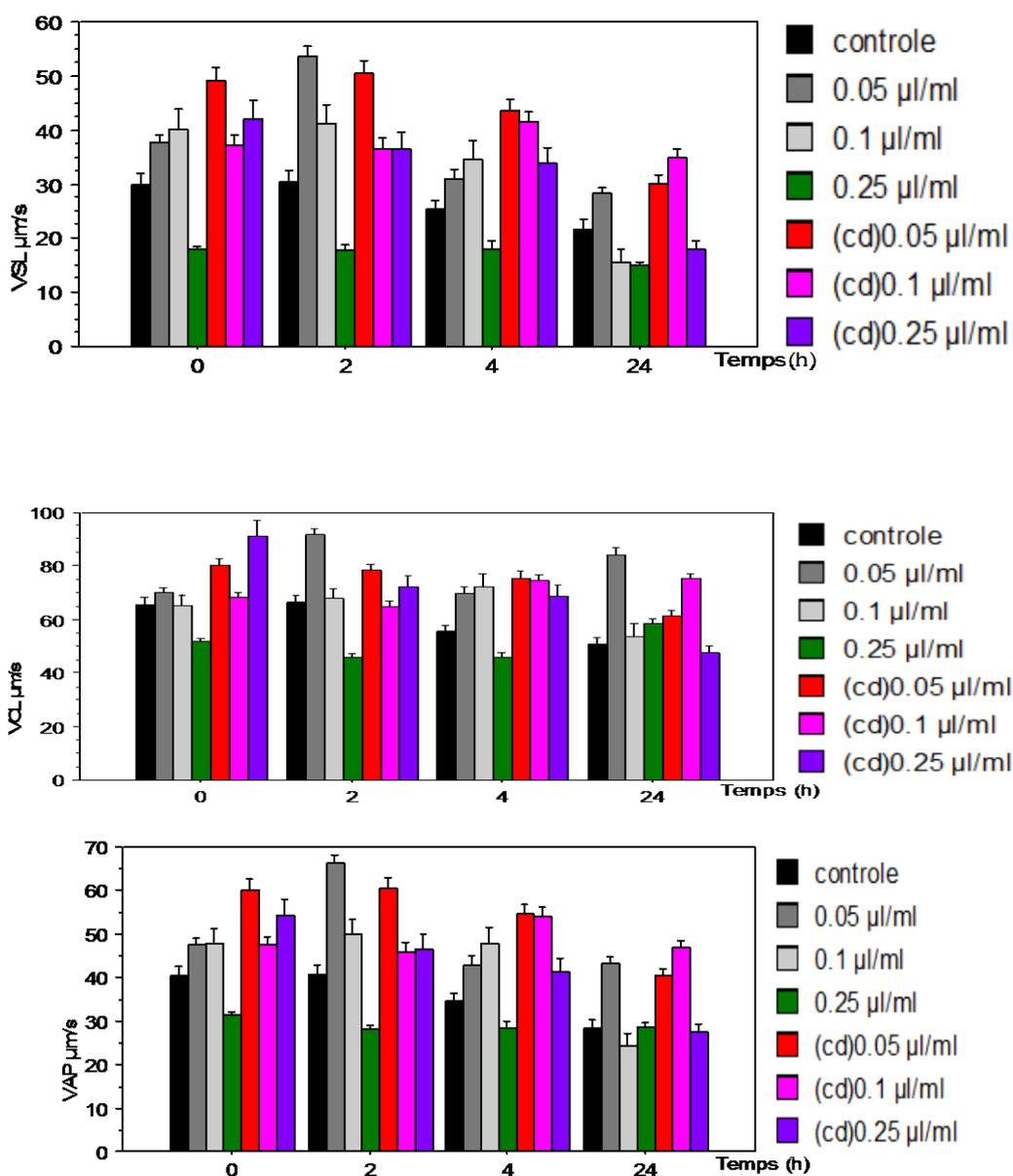


Figure 14 : Histogramme représentant les vitesses (VSL), (VCL) et (VAP) des spermatozoïdes conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE du romarin en fonction du temps.

D'après la figure n°14 on remarque que les deux concentrations 0.05 µl/ml et 0.1 µl/ml améliorent la VSL des spermatozoïdes, cependant seule la concentration de 0.05 µl/ml maintient son effet bénéfique à tous les temps.

Un Effet toxique est observé pour la concentration 0.25 µl/ml, ce dernier s'améliore avec encapsulation et n'apparaît qu'à 24h de conservation.

Le complexe CD-ROM montre un effet meilleur à T0 T4 et T24 surtout pour la concentration 0.05µl/ml.

Les mêmes constatations sont observées pour la VSL VAP et VCL.

In vivo, les huiles essentielles ont montré une efficacité remarquable dans la protection et l'amélioration des paramètres du sperme de plusieurs espèces animales (**Liu et al, 2017**), (**Köse et al, 2011**). Toutefois, lorsqu'il est utilisé in vitro, chez l'homme et chez d'autres espèces animales, des effets spermicides sont manifestés avec des effets sur la motilité et l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes (**Chikhouné et al, 2015**) (**Buch et al, 1988**).

Il a été montré que l'ingestion de l'huile de cannelle de Ceylan (écorce) à long terme entraîne une amélioration de la qualité du sperme et une tendance à la diminution des cellules germinales apoptotiques associée à une diminution de la peroxydation des lipides dans les testicules et à une augmentation des activités des enzymes antioxydantes chez le rat (**Yuce et al, 2012**). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont démontré que *C.zeylanicum* entraînait une augmentation du poids des organes reproducteurs chez les animaux normaux (**Hemayatkhah Jahromi et al, 2011**) et les animaux diabétiques (**Hafez, 2010**), (**Shalaby et Mounair, 2010**).

L'activité spermicide des HE a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs et des travaux ont été réalisés sur plusieurs HE. La majorité de ces travaux sont portés sur l'huile essentielle du neem (*Azadirachta indica*). Une étude faite sur cette dernière par **Khillare et al. (2003)** a démontré la forte activité spermicide de celle-ci en causant l'immobilisation totale des spermatozoïdes à la dose de 3 µg/ml après 20s.

Dans une autre étude **Bansal et al. (2010)**, a constaté que cette huile essentielle non diluée possédait une forte action spermicide et les spermatozoïdes humains sont devenus totalement immobiles dans les 30 secondes après le contact avec cette dernière. In vivo, La dose minimale effective est de 25 µl pour les rats. Un mois après l'arrêt de l'application de l'huile de Neem, il y a eu une réversibilité totale de la fertilité (**Bansal et al, 2010**).

Cependant, ce n'est que récemment que **Touazi et al, (2018)** ont montré l'effet protecteur des huiles essentielles in vitro lors de l'étude des effets de l'HE du romarin sur la mobilité du sperme du coq conservé à 4°C.

Nous avons trouvé des effets protecteurs similaires en utilisant des concentrations plus faibles d'huile essentielle de romarin et de l'armoise blanche avec et sans encapsulation. En effet, tous les paramètres spermatiques étudiés sont significativement conservés.

II.3. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité membranaire des spermatozoïdes :

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants est représenté par les spermatozoïdes possédants le flagelle gonflé.

a. L'armoise :

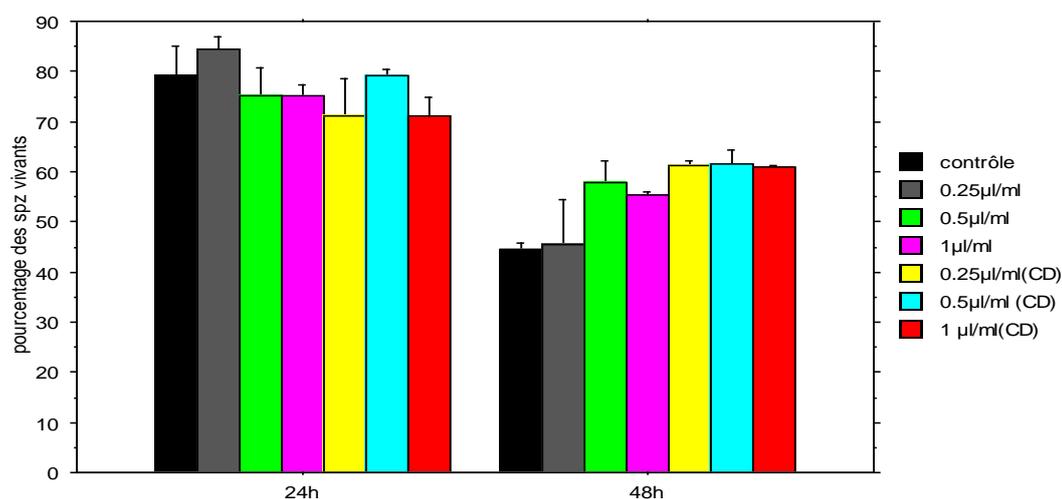


Figure15 : Histogramme représentant le pourcentage de spermatozoïdes gonflés conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE de l'armoise en fonction du temps.

Selon la figure n°15, l'effet protecteur de l'HE de l'armoise sur la membrane cytoplasmique n'apparaît qu'après 48h de conservation à 4°C.

En effet, à 24h seule la concentration 0.25µl/ml (sans encapsulation) fournit une protection de la membrane cytoplasmique. Cet effet disparaît à 48h où on note un effet protecteur avec tous les autres traitements à l'exception de cette concentration. Par ailleurs, on souligne que les résultats obtenus avec les HE encapsulées sont meilleurs que ceux sans solubilisation.

b. Le romarin :

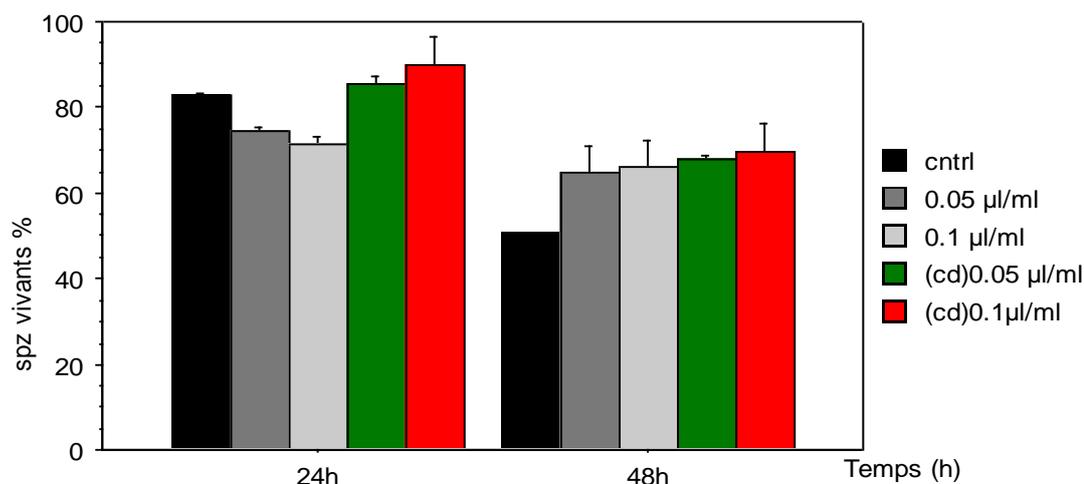


Figure16 : Histogramme représentant le pourcentage de spermatozoïdes gonflés conservés à 4°C dans différentes concentrations de l'HE du romarin en fonction du temps.

La figure 16 montre qu'à 48h de conservation les différentes concentrations de l'HE du romarin donnent de bons résultats de protections de l'intégrité de la membrane cytoplasmique avec un effet meilleur des complexe CD-ROM. Cependant, à 24h de conservation, seules les concentrations d'He encapsulées ont un effet protecteur.

On constate que les huiles essentielles de l'armoise et du romarin protègent également l'intégrité membranaire des spermatozoïdes conservés à 4°C.

Contrairement à nos résultats, **Chikhouné et al, (2015)**, **Türk et al, (2016)** et **Elmi et al, (2017)** ont décrit des dommages considérables sur la structure de spermatozoïdes y compris les membranes cellulaires et l'intégrité de l'acrosome. Ces derniers sont associés à l'activité spermicide des HE chez de nombreux animaux. Ceci est probablement lié aux fortes concentrations utilisées par ces auteurs.

II.4. Effet des huiles essentielles sur la peroxydation lipidique (MDA) :

a. L'armoise :

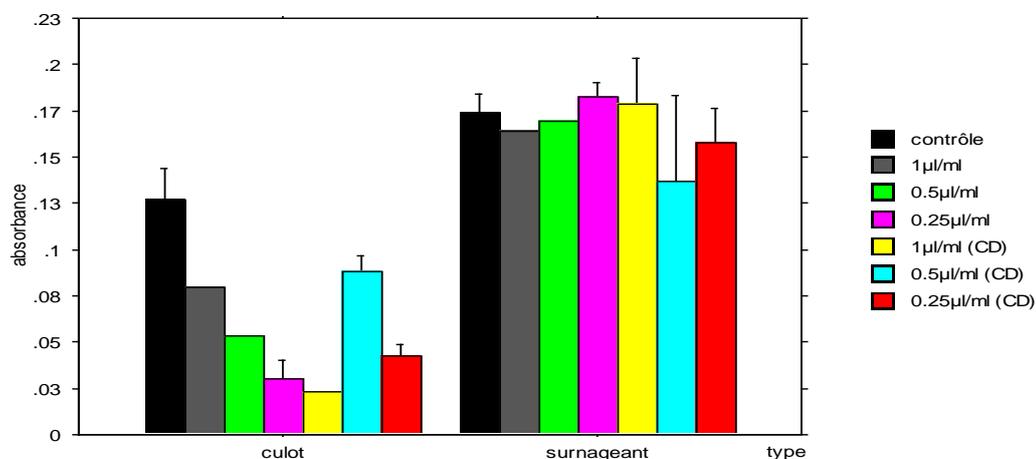


Figure17 : Histogramme représentant les concentrations des MDA exprimées par l'absorbance dans le culot (spermatozoïde) et le surnageant (milieu extracellulaire).

La figure n°17 montre que la concentration des MDA est plus élevée dans le surnageant (milieu de conservation) que dans le culot (spermatozoïde) où l'effet des huiles essentielles sur le stress oxydatif est clairement apparent, en effet, on remarque que la concentration des MDA est plus faible dans les milieux contenant les HE (encapsulée ou non) que dans le contrôle.

En revanche, la plus faible concentration d'huile essentielle non encapsulée qui est de 0.25 µl/ml présente un niveau des MDA plus faible que les deux autres concentrations (0.5 et 1 µl/ml) mais il reste supérieur que celui obtenu avec la concentration de 1 µl/ml encapsulée avec les cyclodextrines.

b. Le romarin :

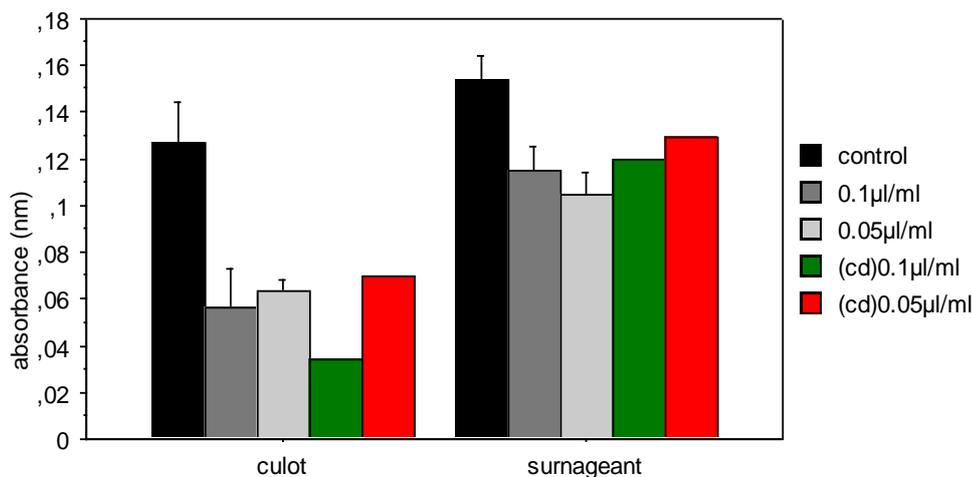


Figure 18 : Histogramme représentant l'absorbance des MDA dans le culot (spermatozoïde) et le surnageant (milieu extracellulaire).

La figure n°18 montre que les différentes concentrations d'HE du romarin donnent des effets protecteurs contre le stress oxydatif, cependant, on constate que la quantité des MDA produite dans le culot est inférieure à celui du surnageant.

On note un effet de protection meilleur contre le stress oxydatif avec la concentration de 0.1 µl/ml (CD) et 0.05 µl/ml dans le culot et le surnageant respectivement.

D'après les résultats obtenus, on constate que les huiles essentielles du romarin et de l'armoise blanche sont d'excellents agents antioxydants durant la conservation du sperme à 4°C, ce qui explique l'effet protecteur de la mobilité et de l'intégrité membranaire. Cet effet bénéfique est rapporté par **Touazi et al, (2018)**, sans pour autant explorer le statut oxydatif des spermatozoïdes.

II.5. L'effet des huiles essentielles sur le développement bactérien :

a. L'huile essentielle de l'armoise :

Pour l'interprétation des résultats on a compté l'ensemble des colonies apparues dans les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies (après 24h). Cependant, il est admis qu'il est difficile de compter le nombre de colonies dans une boîte contenant plus de 300 colonies en raison d'un risque d'erreur, pour cela on n'a fait qu'estimer à l'œil nu la charge en colonies bactériennes afin de pouvoir comparer entre les milieux sans et avec encapsulation (figure19 et figure20) (tableauV et tableauVI).

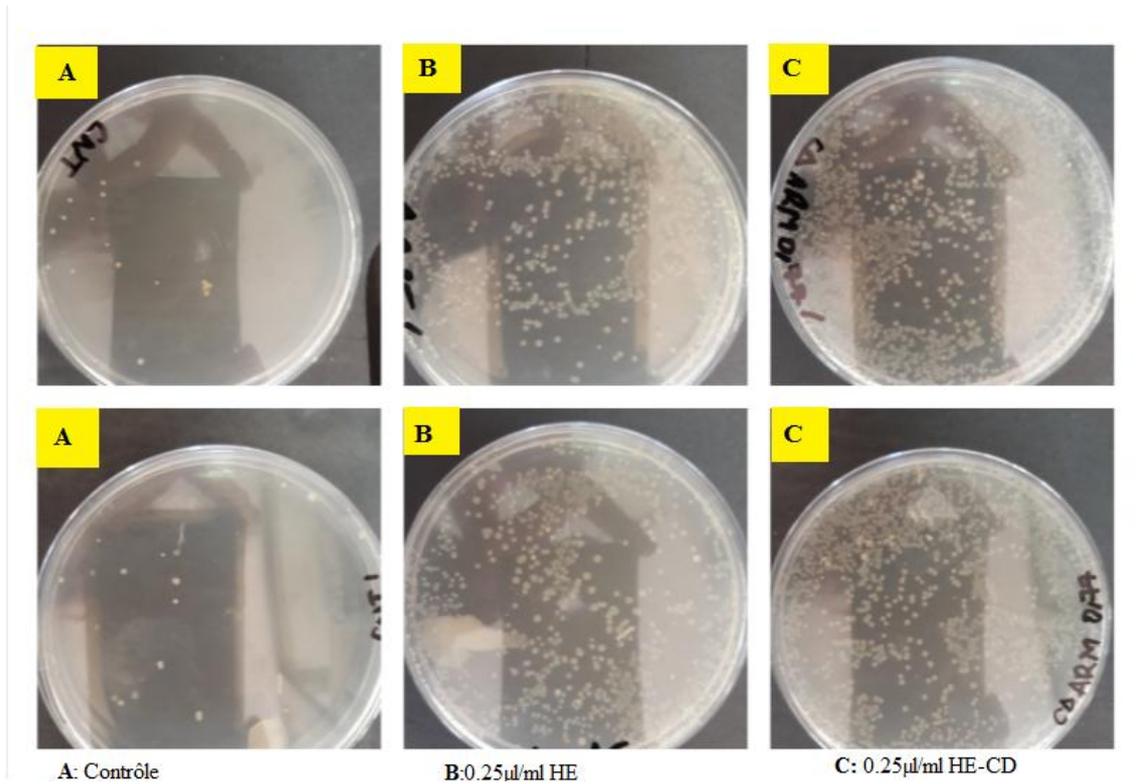


Figure 19 : Effet de l'HE de l'armoise sur le développement bactérien.

Tableau V : Effet de l'HE de l'armoise sur le développement bactérien.

Traitement	Colonies
Contrôle	+ (20)
Armoise 0.25 (µl/ml)	++
Armoise 0.25 (µl/ml) encapsulée	+++

b. L'huile essentielle du romarin :

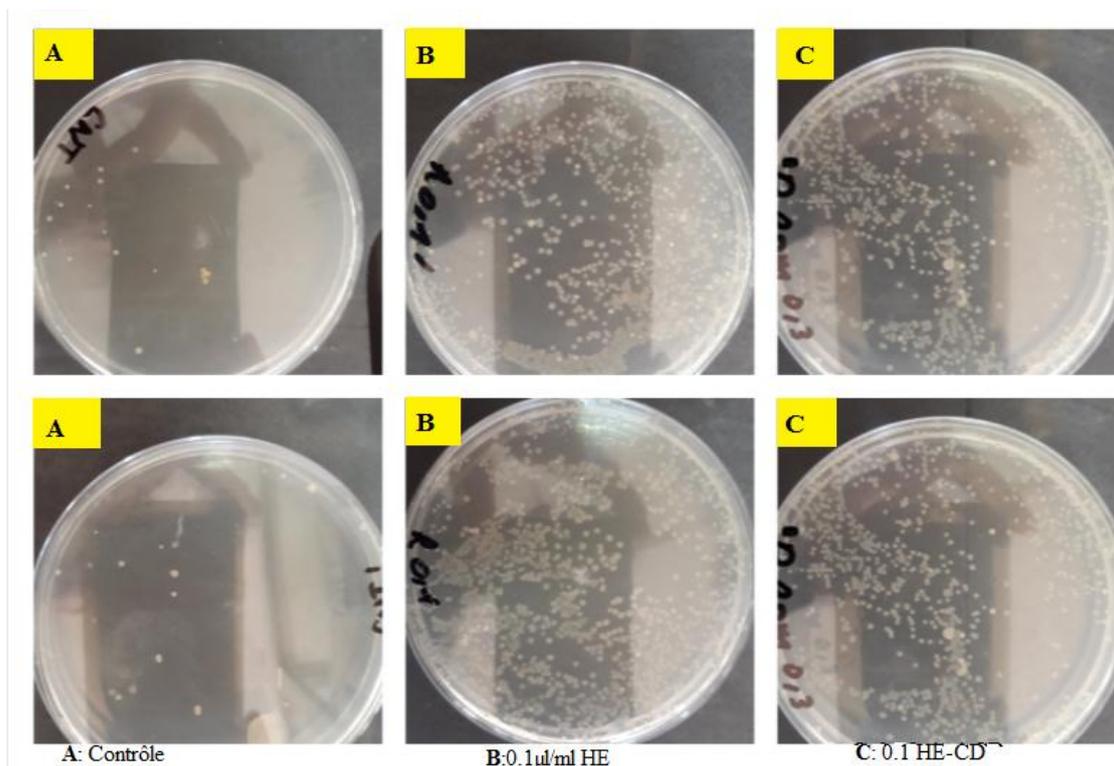


Figure 20 : l'effet de l'HE du romarin sur le développement bactérien.

Tableau V: l'effet de l'HE du romarin sur le développement bactérien.

Traitement	Colonies
Contrôle	+ (20)
Romarin 0.1 (µl/ml)	+++
Romarin 0.1 (µl/ml) encapsulée	++

Les résultats montrent que le nombre de colonies dans les milieux contenant les huiles essentielles est largement supérieur (indénombrable) à celui du contrôle (20 colonies).

Par ailleurs, on précise que la charge en colonies dans les milieux contenant l'huile essentielle de l'armoise solubilisée est supérieure que celle dans les milieux ayant la même concentration d'huile essentielle mais non encapsulée.

Pour le romarin, le contraire est observé où on note plus de colonies dans les milieux contenant l'HE non encapsulée que dans ceux qui contiennent la même concentration d'HE mais encapsulée.

Cela pourrait être expliqué par le degré de lipophilie des composants d'HE de chaque plante, en effet, les composants de l'huile essentielle de l'armoise seraient peut-être plus lipophiles que ceux de l'huile essentielle du romarin.

Contrairement à ce qui a été rapporté par plusieurs auteurs qui ont montré l'activité antibactérienne des HE (**Elharas et al, 2013 ; Satrani et al, 2007 ; Thoresen et al, 2003**) et particulièrement l'effet antibactérien du romarin (**Boutabia et al, 2016**) et de l'armoise (**Lakehal et al, 2016**), nos résultats montrent pour la première fois, que ces HE ont un pouvoir promoteur du développement bactérien à de faibles concentrations.

Conclusion

Notre étude nous a permis de mettre l'accent sur l'impact des huiles essentielles de l'armoise blanche et du romarin sur le développement bactérien d'une part et sur la conservation de la qualité de sperme à 4 °C d'autre part.

Pour cela, nous avons évalué trois paramètres indicateurs de la qualité du sperme à savoir la mobilité, l'intégrité membranaires des spermatozoïdes et le stress oxydatif.

Les résultats ont fait ressortir une augmentation de la mobilité spermatique avec une protection de l'intégrité membranaire notamment à 48h de conservation. Ces effets sont expliqués par l'effet antioxydant des HE des deux plantes. En effet, la peroxydation lipidique a diminué sensiblement par rapport au contrôle, notamment au niveau des culots (spermatozoïde).

Les concentrations utilisées ont montré une efficacité pour la préservation de la mobilité. Cependant, les plus grandes concentrations ont induit soit un effet inhibiteur (romarin) soit similaire au contrôle (armoise). Par ailleurs, les complexe CD-ROM et CD-ARM montrent un effet meilleur dans l'amélioration de la mobilité des gamètes. Cette association entre l'HE et la cyclodextrine semble offrir une synergie entre ces deux molécules où la cyclodextrine permettrait d'encapsuler l'HE pour les solubiliser et prolonger leurs effets.

L'effet bénéfique est noté également à l'égard des cellules bactériennes, le développement des colonies dans tous les milieux contenant les huiles essentielles témoigne de leur effet promoteur. Ce résultat est probablement lié aux faibles concentrations utilisées.

A la lumière de nos résultats des perspectives intéressantes s'ouvrent. En effet, le rôle des huiles essentielles dans le développement des bactéries probiotiques pourrait être investigué ainsi que l'identification des molécules actives qui sont responsables des effets protecteurs.

Références bibliographiques

- **Abdelguerfi A. (2003).** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Rapport de synthèse. Projet ALG/97/G31, 2003.
- **Abu-Irmailehand B et Afifi F. (2003).** Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbes. *J Ethnopharmacol* 89: 193.
- **Adamou-N'diaye M, Gbangboche Ab, Adjovi A Et Jondet R. (2003).** Cryopréservation de la semence de taureau de race Borgou au Bénin. *Revue Méd. Vét.* 154 (1), 3-8.
- **Adorjan B, Buchbauer G. (2010).** Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J* 25:407–426.
- **AFNOR Association Francaise de Normalisation. (1986).** Recueil de norme française « Huiles essentielles » paris, AFNOR NF T 75 – 006.
- **Agarwal K, Makker and R Sharma. (2008).** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update, *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 59, no. 1, pp. 211.
- **Aguinaldo SD.(2006).** Conditions de développement de l'insémination artificielle dans les élevages petits ruminants du Nordeste du Brésil : typologie des élevages concernés & mise au point d'un dilueur pour sperme de bouc.
- **Akrout A, Chemli R, Chreif I, et al. (2001)** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J Flav Fragr* 16: 337–9.
- **Akrout A. (2004).** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 289-292 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62).
- **Atik Bekkara1.F, Bousmaha1 Sa, Taleb Bendiab1 Jb, Boti2 J, Casanova2. (2007).** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen., *Biologie & Santé* vol. 7, n° 1.
- **Baba Aissa F. (1999).** Encyclopedie des plantes utiles. Librairie moderne, Alger, Algerie.

- **Badr Satrani, Mohamed Ghanmi, Abdellah Farah, Abderrahman Aafi, Hassan Fougrach, Brahim Bourkhiss, Dalila Bousta et Mohamed Talbi. (2007)** .Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146, 85-96.
- **Bagchi. A, Woods EJ, Cristerj. K. (2008)** .Cryopreservation and vitrification: recent advances in infertility preservation technologies.*Expert Rev. Med. Devices* .5, 359-370.
- **Bailey C, Danin A. (1981)**. Bedouin plant utilization in Sinai and Negev. *Econ Bot* 35: 145.
- **Bansal Amrit Kaur et GS Bilaspuri. (2011)**. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International* Volume 2011, Article 686137, p7.
- **Bansal P, Bansal R et Gupta V. (2010)**. Antifertility effects of *Azadirachta Indica* (Neem). *Annals of Biological Research*, 1 (2) :108-113.
- **Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S.(2012)**. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 27 :1041–8.
- **Barros Fernandes RV, Marques GR, Borges SV, Botrel DA. (2014)**. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. *Ind Crop Prod* 58:173–81.
- **Baser KHC, Demirci B, Demirci F, Koçak S, Akinci Ç, Malyer H, Güteryüz G.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. - *Planta Med.*, 2002, **68**(10), 941-943.
- **Belaiche P. (1979)**. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome I Ed: Maloine S.A. Paris.
- **Belhattab R, Amor L, Barroso JG, Pedro LG, Cristina Figueiredo A. (2014)**. Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arab J Chem* 7: 243–251.
- **Bernard T, Perineau F, Bravo P, Delmas M, et Gaset A. (1988)** . Informations chimie n298, Oct, 179.
- **Bezza L, Mannarino A, Fattarsi K, Mikail C, Abou L, Hadji-Minaglou F et Kaloustian, J. (2010)**. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia*

herba-alba provenant de la région de Biskra (Algérie). *Phytotherapie*, 8(5), 277–281.
<https://doi.org/10.1007/s10298-010-0576-3>.

- **Boutabia L, Telailia S, Bouguetof I, Guenadil F and Chefrour A. (2016).** Composition chimique et activité anti-bactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bull.Soc. R. Sci. Liège.*, 85: 174-189.
- **Boyd B, Ford C, Koepke Michael C, Gary A, Horn E, McAnalley S et McAnalley B. (2003)** .Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience et Nutrition*.4(6) ,7p.
- **Bremness L. (1998).** Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- **Brewer L, M Corzett and R Balhorn. (2002).** Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry*. 277(41): p. 38895-900.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et documentations Lavoisier.
- **Bucak S, Sari ozkan P, B Tuncer et al. (2010).** The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities," *Small Ruminant Research*, vol. 89, no. 1, pp. 24–30, 2010.
- **Buch JG, Dikshit RK and Mansuri SM. (1988).** Effect of certain volatile oils on ejaculated human spermatozoa. *Indian. J. Med. Res.*, 87: 361-363.
- **Chikhoun A, Stouvenel L, Iguer-Ouada M, Hazzit M, Schmitt A, Lorès P, Wolf JP, 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.
- **Christian M. (2009).** La reproduction des ovins, des caprins et des chameaux cas de la zone tropicale, 1–42.
- **Cook JW, Taylor LM, Orloff SL, Landry GJ, Moneta GL et Porter JM. (2003).** Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. *Vascular Pharmacology*. 38: 293-300.

- **Cseke L J, Kaufman PB. (1999).** How and why these plants are synthesized by plants. In: Natural Products from Plants, Cseke L.J., Kaufman P.B, Warber S., Duke J.A. et Brielmann H.L. (eds), CRC Press, Boca Raton, FL,USA. pp 37-90.
- **Curado MA. (2006).** Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytotherapy*, **67**, 2363-2369.
- **Decuadro-Hansen.G. (2004).** La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen: the animal experience. IMV Technologies, coopérative interdépartementale d'élevage et d'insémination animale (CIA) de L'Aigle, BP 54, 61302 L'Aigle,France . Gynécologie Obstétrique & Fertilité 32 (2004) 887–893.
- **Degner SC, Papoutsis AJ, Romagnolo DF. (2009).** Health benefits of traditional culinary and medicinal Mediterranean plants. In: Watson RR, editor. Complementary and alternative therapies and the aging population. New York: E-Publishing Inc. p 541–62.
- **Deutscheur GH, Wells ME, et Battaglia RA. (2007).** Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and effects of in vivo storage I Angus bulls. *Journal of animal science*, 39 (36), 1136-1143.
- **Dob T, Benabdelkader T (2006).** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *J Essen Oil Res* 18: 685.
- **Dorman HJD, Deans SG. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. - *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **88**, 308-316.
- **Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG and Deans SG. (2000).** In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 12-16.
- **Eisenhut M. (2007).** The toxicity of essential oils. Article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.
- **El Kolli M. (2008).** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemispedunculata* Desp, d'*Athemispunctata* Vahl et de *Daucus crinitus* Desf. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Elmi A, ventrella D, Barone F, Filippini G, Benvenuti S, Pisi A, Scozzoli M and Bacci ML. (2017).** *Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.)

essential oils: *In vitro* effects and toxicity on swine spermatozoa. *Molecules*, 22: 2162.

- **Fadi Z. (2011).** Le romarin, *rosmarinus officinalis*, le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal. P46.
- **Fang Z, Bhandari B. (2010).** Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21:510-23.
- **Favier A. (2003)** le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.108-115.
- **Fawcett DW. (1975).**The mammalian spermatozoon. *Developmental biology*. 44(2): p. 394- 436.
- **Fernandes RVD, Borges SV, Botrel DA, Silva EK, da Costa JMG, Queiroz F. (2013).** Microencapsulation of rosemary essential oil: characterization of particles. *Dry Technol* 31:1245–54.
- **Figueredo G. (2007).** Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (*lamiaceae*) cultivées issues de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université de Clermont-Ferrand, France, 417p.
- **Flipse RJ, Patton S, Alquimint JO. (1954).** Diluents for bovine semen. III Effect of lactenin and of lactoperoxidase upon spermatozoa viability. *J Dairy Sci*. 1954; 41: 1205 -11.
- **Floc'h E. (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Editions Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.
- **Gainard A. (2016).** Lavandes et lavandin, utilisation en aromathérapie : enquête auprès des pharmaciens d'officine To cite this version : HAL Id : dumas-01304457. Université de Bordeaux.
- **Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Isamili M R, Houti H, Monfalouti H. et Harki L. (2010).** Article original la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). *Phytothérapie*, 8, 295–296. <https://doi.org/10.1007/s10298-010-0578-1>.
- **Girod C et Czyba J. (1997).** HISTOLOGIE. Appareils circulatoire, respiratoire, digestif, urinaire, organes hématopoïétiques, 3ème édition, pp 252.

- **Gotz ME, Dirr A, Freyberger A, Burger R et Riederer P.(1993).**The thiobarbituric acid assay reflects susceptibility to oxygen induced lipid peroxidation *in vitro* rather than levels of lipid hydroperoxides *in vivo*: a methodological approach,” *Neurochemistry International*, vol. 22, no. 3, pp. 255–262, 1993.
- **Graham KJ. (2011).** Principles of cryopreservation. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), *Equine reproduction*.
- **Guérin Y, Locatelli Y, Comizolli P, Mauget R, Mermillod P, Legendre X et Dacheux JL. (2003)** Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d’ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation *in vitro*. *Les Actes Du BRG*, 4(OCTOBER), 173–183.
- **Hafez DA. (2010).** Effect of extracts of ginger roots and cinnamon bark on fertility of male diabetic rats. *J Am Sci*6:940–947.
- **Hafez E S E.** Reprodução Animal. Fisiologia veterinária Essayed Saad Edition, 1993, 513 p.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C et Chapelle JP. (2007):** le stress oxydant, *Rev Med Liège*; 62:10:628-638.
- **Hanzen P C. (2010).** L’insémination artificielle chez les ruminants, 1–15.
- **Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N, & Idrissi N. (2001).** *In vitro* evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba Alba Asso*. *Bull Soc Pathol Exot*, 94(1), 29–31.
- **Hemayatkah Jahromi V, Parivar K et Forozaifar M (2011).**The effect of cinnamon extract on spermatogenesis hormonal axis of pituitary gonad in mice. *Iran J Appl Anim Sci*1:99–103.
- **Henkel RR. (2011).** Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 43-52.
- **Henrich. (2006).** Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.
- **Jeyendran, R.S., Van Der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. (1984).** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70, 219–228.
- **Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL. (2011).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:63–8.

- **Jones C. (1998).** Rosemary's Whole-Plant Properties Counter Cancer. *Nutrition Sciences News*. 1- 4.
- **Jumeau F. (2015).** Caractérisation du protéome du spermatozoïde humain To cite this version : HAL Id : tel-01144470, 250.
- **Kalembe D, Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.
- **Kamal ELHARAS1, Abdelmoula DAAGARE2, Abdelhalem MESFIOUI1 et Mohammed OUHSSIN. (2013).** Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*, *Afrique SCIENCE* **09(2)134 – 141**.
- **Karousou R, Koureas DN et Kokkini S. (2005).** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, **66**, 2668- 2673.
- **Khillare B et ShrivastavTG. (2003).** Spermicidal activity of *Azadirachtaindica*(neem) leaf extract. *Contraception*, **68**, 225-229.
- **Konfe H. (2014).** Etude spermologique des bovins de races locales de l'Afrique de l'Ouest : cas du Borgou , du taurin Lagunaire , du taurin N'Dama et du Zébu Peulh., Université polytechnique de Bobo-Dioulaso:87.
- **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.
- **Lakehal Meliani A, Benmimoune S, Bensouna SN, Benrebiha FZ and Chaouia C, 2016:** Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria; Laboratory of Biotechnology Plants Production, Department of Biotechnology, Blidal University, Blida, Algeria. *Med chem (Los Angeles)*, **6**:6 DOI: [10.4172/2161-0444.1000382](https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000382).
- **Lakhdar L. (2015).** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro*. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 183p.
- **Lamia A, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL et al. (2004).** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a

comparison with Optidyl a commercial egg yolk extender. *Theriog* 2004; 61:895–907.

- **Liolios C, Gortzi O, Lalas. S, Tsaknis J and Chinou I. (2009).** Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem* 112, 77–83.
- **Liu Q, Duan RJ, Zhou YF, Wei HK, Peng J and Li JL. (2017)** .Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen anti-oxidant status and semen quality parameters. *Andrologia*, 22: 1-8.
- **Loza-TaveraHerminia. (1999).** Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 464, 49-62.
- **Loziene K, Venskutonis PR. (2005).** Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 517-525.
- **Luconi M, Forti G et Baldi E. (2006).** Pathophysiology of sperm motility. *Front. Biosci.* 11:1433-1447.
- **Mazur P. (1984).** Freezing of living cells: mechanisms and implication. *Am J Physiol* 247 C125-42.
- **Mohamed AEHH, El-Sayed MA, Hegazy ME, Helaly SE, Esmail AM, Mohamed NS. (2010).** Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. *Rec Nat Prod* 4:1-25.
- **Morel Y ET Barouki R. (1999):** Repression of gene expression by oxidative stress. *biochem J.* 342 (3), 481-496.
- **Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.(2002).** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed semen. *Theriog* ; 57:1695–706.
- **Nabli MA (1989)** Essai de synthese sur la vegetation et la phytoecologie tunisienne, tome 1, Ed MAB, Tunis, Tunisie, 186.
- **Nassu RT, Guaraldo Goncalves, LA, Azevedo Pereira da Silva MA, Beserra FJ. (2003).** Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science.* 63: 43-49.
- **Nawroth. F, Isachenko V, Dessole. S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattenam, Capobianco G, Peters D, Orth I, Isachenko E.(2002).** Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters*, 2002, 23, 93-102.

- **Neffar F, Benabdrrahmene Z. (2013).** Quantification des Huiles Essentielles dans deux Espèces de Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de Djebel Metlili (Batna). Laboratoire de Biochimie. Département du Biologie. Université Alhadj Lakhdar .Batna. *Revue Agriculture. 05 (2013) 19 – 23.*
- **Nikmaram N, Roohinejad S, Hashemi S, Koubaa M, Barba FJ, Abbaspourrad A, et Greiner R.(2017).** Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications. *RSC Advances, 7, 2895 le 28964.*
- **Noblanc A. (2013) :** Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont- Ferrand II, 2013.
- **Novelli GP. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol, 48: 517-527.*
- **Nur Z, Dogan I, Gunay U et Soylu MK. (2005).** Relations entre l'intégrité de la membrane du sperme et d'autres caractéristiques de la qualité du sperme des boucs de chèvre Saanen. *Taureau. Vétérinaire. Inst. Pulawy 49, 183-188.*
- **Peggy A, Cevallos P,Buera MP et Elizalde BE.(2010).** Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *J. Food En. , 99, 70-75.*
- **Pibiri P, (2005).** *Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles.*Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse).
- **Pierron C. (2014).** Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatifs. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 257p.
- **Quezel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.
- **Rafiq R, Hayek S A, Anyanwu U, Hardy BI, Giddings V L, Ibrahim SA, et Kang H W. (2016):** Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from *Artemisia herba-alba* Asso., *Pelargonium capitatum* ^ *radens* and *Laurus nobilis* L. *Food and Nutritional Sciences, 5,28, 12.*<https://doi.org/10.3390/foods5020028>.

- **Rouabah Y. (2010).** Contribution à une étude quantitative des huiles essentielles dans deux espèces végétales: *Globularia alypum L.* et *Rosmarinus officinalis L.* dans le P.N.B. Mém. Ing. Univ. Batna. 68 P.
- **Rozman T, Jersek B. (2009).** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of *Listeria*. *Acta Agric Slovenica* 93:51–8.
- **Russo M, Galleti G, Bocchini P, et Garnacini A. (1998).** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare ssp. Hirtum* (Link) letsweet): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3741-3746.
- **Sagalowicz L, et Leser ME. (2010).** Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Sciences*, 15, 61–72.
- **Samah Lakehal, Meliani A, Benmimoune S, Bensouna SN, Benrebiha FZ and Chaouia C. (2016).** Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba alba* Asso Grown in Algeria, Laboratory of Biotechnology Plants Production, Department of Biotechnology, Blidal University, Blida, 435-439 (2016) 435, DOI: [10.4172/2161-0444.1000382](https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000382).
- **Sanocka.D et Kurpisz.M. (2004).** Reactive oxygen species and sperm cells, *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 2, pp. 12–26, 2004.
- **Shalaby MA, Mouneir SM. (2010).** Effect of zingiberofficinale roots and cinnamon zeylanicum bark on fertility of male diabetic rats. *Global Veterinaria* 5:341–347.
- **Soylu EM, Kurt S, Soylu S. (2010).** In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int J Food Microbiol* 143:183–9.
- **Sutour S. (2011).** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France, 222p.
- **Thoresen M.A, Hildebrand K.S. (2003).** Quantitative determination of phenolic diterpenes in brosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *J. Chromatogr.A.* 2003, 119-125.
- **Tournaye H., Van Steirteghem A.C., Devroey E. (1994).** Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Hum. Reprod.* 9: 996-1000.

- **Trussell JC. (2013).** Optimal diagnosis and medical treatment of male infertility. *Semin Reprod Med* 2013; 31:235-6.
- **Türk, G, Çeribaşı AO, Şimşek ÜG, 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.
- **Van Damme P. (2001).** Pesticide, drug and essential oil crops. *In: Raemakers R.H., ed. Crop production in tropical Africa.* Brussels, Belgium: DGIC, 1155-1166.
- **Vansant G. (2004).** Radicaux libres et antioxydants: principes de base .Symposium « Antioxydant et alimentation » Institut Danone.
- **Vernin G, Merad LO (1994):** Mass spectra and Kovats indices of some new cis-chrysentenyl esters found in the essential oil of *Artemisia herba-alba*. *J Ess Oils Res* 6(4): 437–48.
- **Vernin G, Merad O, Vernin GMF. (1995):** GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oil from Algeria. *Dev Food Sci* 37A: 147–205.
- **Vieira de Sa F. - “O leite – Noções Gerais” As vacas leiteiras. (1990).** 7ª edição, col. Técnica Agraria. Lisboa. 1990.
- **Wandrey C, Bartkowiak.A et Harding S.E. Materials for Encapsulation In: Zuidam N J, Nedovic VA. 2009: Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Springer: Dordrecht, The Netherlands; 2009, p. 31-100.**
- **Wang J, Cao Y, Sun B et Wang C. (2011):** Physicochemical and release characterisation of garlic oil-bcyclodextrin inclusion complexes. *Food Chem*, 127, 1680-1685 (2011).
- **Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. (2008).**Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil compared to its main components. *Food Chem.* 108: 1019-1022.
- **Wicht M et Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science.
- **Younsi F, Mehdi S, Aissi O, Rahali N, Jaouadi R, Boussaid M et Messaoud C. (2017).** Essential Oil Variability in Natural Populations of *Artemisia campestris* (L.)

and *Artemisia herba-alba* (Asso) and Incidence on Acetylcholinesterase and Antioxidant Activities. *Chem Biodiv* 14:e1700017.

- **Younsi F, Mehdia S, Aissia O, Rahalia N, Jaouadia R, Boussaida M, & Messaouda C. (2017).** Paper reduction using scs-slm technique in stfbc mimo-ofdm. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 12(10), 3218–3221. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>.
- **Yuce. A, Turk.G, Ceribasi.S, Sonmez.M, Ciftci.m, Guvenc.M. (2012).** Effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on testicular antioxidant values, apoptotic germ cell and sperm quality.
- **Zoubiri S, Baaliouamer A. (2011).** Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chem* 129:179–82.
- **Zuidam JN, Heinrich E. (2010).** Encapsulation of Aroma, Encapsulation Technologies for active Food Ingredients and Food Processing,” 127-160. New York: Springer Science-Business Media, LLC, DOI 10.1007/978-1-4419-1008-0, *N. J. Zuidam & V. A. Nedovič (Eds)*, (2010).

Annexe I

Tableau1 : rendement des ensembles des extractions d'HE de romarin.

extractions	Poids de la plante (g)	Poids HE (g)	Rendement (%)
1	750	70.5	0.94
2	400	4.95	1.23
3	300	3.6	1.2
4	400	3.85	0.96
5	473.85	3.9	0.82

Tableau2 : rendement des ensembles des extractions d'HE de l'armoise.

Extractions	Poids de la plante (g)	Poids HE (g)	Rendement (%)
1	250	1.55	0.62
2	250	1.45	0.58
3	250	1.65	0.66
4	250	1.6	0.64
5	300	1.4	0.46
6	300	1.75	0.58

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les effets protecteurs de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* et du *Rosmarinus officinalis* seules ou sous forme de complexes CD-HE lors de la conservation du sperme de bélier à 4°C. Plus particulièrement nous sommes intéressés à l'impact des huiles essentielles des deux plantes sur le développement bactérien. Nous avons mesuré différents paramètres indicateurs de la qualité du sperme à savoir la mobilité qui a été évaluée par l'analyse informatique (CASA), l'intégrité membranaire par le test hypo-osmotique (HOST) et le stress oxydatif (TBARS). Les résultats ont montré que les concentrations utilisées sont efficaces pour la préservation de la mobilité. Cependant, les plus grandes concentrations ont induit soit un effet inhibiteur (Romarin) soit similaire au contrôle (Armoise). Par ailleurs, les complexes CD-ROM et CD-ARM ont montré un effet meilleur dans l'amélioration de la mobilité des gamètes. L'effet protecteur de l'intégrité membranaire est essentiellement noté à 48h de conservation et les concentrations encapsulées étaient plus efficaces. L'effet antioxydant est apparu essentiellement au niveau du culot (Spermatozoïdes) où on a noté une faible quantité des MDA résultant de la peroxydation lipidique. L'effet bénéfique est noté également à l'égard des cellules bactériennes, en effet nous avons constaté un important développement bactérien notamment avec les concentrations 0.25 µl/ml encapsulée et 0.1 µl/ml pour le l'armoise et le romarin respectivement. L'huile essentielle de l'armoise blanche et du romarin semblent offrir un pouvoir protecteur du sperme essentiellement lié à l'effet antioxydant sans que l'effet antibactérien soit impliqué. Au contraire, un effet promoteur du développement bactérien est observé en présence d'huiles essentielles à faibles doses.

Mots clés : Les huiles essentielles, *Rosmarinus Officinalis*, *Artemisia Herba Alba*, Sperme, Conservation.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the protective effects of the essential oil of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* alone or in the form of CD-HE complexes during the conservation of the sperm of the ram at 4 ° C. In particular, we were interested in the impact of the essential oils of both plants on the bacterial development. We measured different parameters indicating sperm quality, namely mobility that was evaluated by computer analysis (CASA), membrane integrity by Hypoosmotic test (HOST) and oxidative stress (TBARS).

The results showed that the concentrations used are effective for the preservation of mobility. However, the higher concentrations induced either an inhibitory effect (rosemary) or similar to control (Mugwort).

In addition, the CD-ROM and CD-ARM complexes showed a better effect in improving gamete mobility. The protective effect of membrane integrity is essentially noted at 48h of conservation and the encapsulated concentrations were more effective. The antioxidant effect appeared mainly at the level of the pellet (spermatozoa) where a small amount of the MDA resulting from the lipid peroxidation was noted.

The beneficial effect is noted also with regard to bacterial cells, in fact we have observed a significant bacterial development, especially with concentrations of 0.25 µl / ml encapsulated and 0.1 µl / ml for Mugwort and rosemary, respectively.

The essential oil of white Mugwort and rosemary seem to offer a protective power of sperm essentially related to the antioxidant effect without the antibacterial effect is involved. On the contrary, a promoter effect of bacterial development is observed in the presence of essential oils at low doses.

Keywords: essential Oil, Rosmarinus Officinalis, Artemisia Herba Alba, Sperm, Conservation.