

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Saad Dahleb de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire

De Fin d'Étude en vue de l'Obtention du Diplôme de Mastère II en Biologie

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

**Amélioration de la Conservation du Sperme Aviaire à la température de
4 C°**

Présenté Par :

Soutenue Le : 17/09/2020

Mr KIROUANI MOKRANE.

Devant le jury composé de :

- | | | | |
|---|------------------------------------|------------|---------------------------|
| ➤ | Président : HAMMAMI Nabila | MCA | ISV/Blida 1 |
| ➤ | Examineur : MSELA Amine | MAA | ISV/Blida 1 |
| ➤ | Promoteur : TOUAZI Leghel | MCB | Université/Sétif 1 |
| ➤ | Co-promoteur : KAIDI Rachid | PR | ISV/Blida 1 |

Promotion : 2019/2020.

Résumé

L'utilisation des huiles essentielles dans les milieux de conservation de la semence est à présent peu explorée. L'objectif de ce travail était de développer une nouvelle approche de conservation du sperme du coq à 4°C, par la Supplémentation des milieux de conservation par différentes huiles essentielles (armoise, romarin, eucalyptus, térébenthine). La semence de 6 coqs de population locale est collectée à un rythme de deux fois par semaine. Elle est ensuite supplémentée par deux doses (2.5 et 5µg/ml) de chaque huile essentielle. Les résultats obtenus ont montré que la plupart des huiles essentielles testées améliorent les paramètres de mobilité (totale et progressive), et les différentes vitesses (VCL, VSL, VAP) à 0, 2, 6 et 24h de conservation à 4°C. Les deux concentrations testées (2.5 et 5µg/ml) semblent avoir un effet protecteur sur le spermatozoïde. Les résultats actuels mettent en évidence le potentiel intrinsèque des différentes huiles essentielles utilisées dans le présent travail dans la conservation du sperme aviaire à 4°C, probablement en exprimant un pouvoir antioxydant puissant.

Mots clés: Sperme aviaire, insémination artificiel, milieu de conservation, huiles essentielles, antioxydant.

Abstract

The use of essential oils in semen storage media is little explored at present. The objective of this work carried out from on six local breed roosters was to develop a new approach for protective rooster sperm mobility during 4°C short-term storage, by supplementing the storage media with of different essential oils (Artemisia, rosemary, eucalyptus and turpentine). Semen from 6 local roosters is collected at a rate of twice a week. It is then supplemented with two doses (2.5 and 5µg / ml) of each essential oil.

The results obtained showed that most of the essential oils tested improve the mobility parameters (total and progressive), and the cinematic parameters (VCL, VSL, VAP) after 2, 6, 24 hours of storage at 4 ° C. The two concentrations tested (2.5 and 5µg / ml) seem to have a protective effect on the spermatozoa. The current results showed a real potential of various essential oils tested in the conservation of avian sperm at 4 ° C, probably by expressing a powerful antioxidant activity.

Keywords: avian semen, artificial insemination, liquid storage, essential oils, antioxidant

ملخص

إن تقنية استخدام الزيوت الأساسية في وسائط تخزين السائل المنوي، لم تستغل جيدا في وقتنا الحاضر . كان الهدف من هذا العمل تطوير نهج جديد للحفاظ على الحيوانات المنوية للديك عند 4 درجات مئوية من خلال تكملة وسائط الحفظ بزيوت أساسية مختلفة (حبق ، إكليل الجبل ، أوكالبتوس ، زيت التربينتين). تم استخراج السائل المنوي للسته ديوك المحلية مرتين في الأسبوع ثم تمت إضافة تركيزين (2.5 و 5 ميكروغرام) من زيوت أساسية مختلفة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن معظم الزيوت الأساسية التي تم اختبارها تعمل على تحسين معايير التنقل (الإجمالي والتقدمي) ، والسرعات المختلفة (VSL, VAP) بعد 2، 6 و 24 ساعة من التخزين عند 4 درجات مئوية . يبدو أن التركيزين المختبرين (2.5 و 5 ميكروغرام / مل) لهما تأثير وقائي على الحيوانات المنوية . تسلط النتائج الحالية الضوء على الإمكانيات الجوهرية للزيوت الأساسية المختلفة المستخدمة في العمل الحالي في الحفاظ على الحيوانات المنوية للطيور عند 4 درجات مئوية ، ربما من خلال التعبير عن قوة مضادات الأكسدة القوية.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي للطيور ، التلقيح الاصطناعي ، وسيلة التخزين ، الزيوت الأساسية ، مضادات الأكسدة

Dédicaces

Je dédie cet ouvrage

*A ma mère qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études
et à mon chère père qui est mort paix à son âme.*

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A ma famille frères et sœurs et proches et ceux qui ont partagé avec
moi Tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, ils
m'ont Chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon
parcours.*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite
plus de Succès.*

A tous ceux que j'aime.

Remerciements

*Mes gracieux remerciements s'adresse à **DIEU**, notre créateur tout puissant qui m'a donné la force et la patience pour bien mener ce travail.*

*Je tiens à remercier grandement mon promoteur **Mr, TOUAZI Leghel** à qui je ne trouve pas de mots pour le remercier et qui m'a non seulement initié à la recherche et m'a encadrer mais pour tous son aide moral et matériel.*

*Je remercie chaleureusement le professeur **Mr, IGUEROUDA Mokrane** de m'avoir donné accès au matériels de son laboratoire ainsi que ces braves conseilles qui m'ont vraiment encouragé.*

*Je remercie beaucoup la présidente **Me, HAMMAMI Nabila** et l'examineur **Mr, MSELA Amine**, d'avoir accepté de gérer cette soutenance.*

*J'adresse tout mes remerciement à mon Co-promoteur le professeur **KAIDI Rachid** et m'on chef du département **Mr LARBI Doukara** pour tout ce qu'ils m'ont appris et leur conseilles mais surtout pour m'avoir donné une chance et m'ouvrir une porte à la recherche scientifique.*

*Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail de loin ou de près tout en citant Mon Technicien **DJILALI Bouzad**.*

Liste Des Figures

Figure 1 : Schéma représentant l'anatomie de l'appareille génitale du coq.....	3
Figure 2 : Schéma de l'ultra structure d'un spermatozoïde de coq	5
Figure 3 : Photo représentant des coqs de race locale.....	19
Figure 4 : Photo représentant Le système CASA.....	22
Figure 5 : Pourcentages des spermatozoïdes mobiles totaux et progressifs à une dose 2.5µg/ml de traitements durant la conservation à 4°C pendant 24 h.....	23
Figure 6: Pourcentages des spermatozoïdes mobiles totaux et progressives à une dose 5µg/ml de traitements durant la conservation à 4°C pendant 24 h.....	24
Figure 7: Les vitesses de progressions des spermatozoïdes (VSL, VCL et VAP) à une concentrations (2.5 µg/ml) d' huiles essentielles durant la conservation à 4°C pendant 24 heures.....	25
Figure 8: Les vitesses de progressions des spermatozoïdes (VSL, VCL et VAP) à une concentrations(5 µg/ml) d' huiles essentielles durant la conservation à 4°C pendant 24 heures.....	26

Liste des Abréviations

A : Armoise

AR : Association Armoise+ Romarin.

AGPI : Acide gras polyinsaturé

ALH : Amplitude of Lateral Head Displacement

C : Control

CASA : Computer-Assisted Semen Analysis

cm : Centimètres

E : Eucalyptol

HDL : High Density Lipoprotéine

IA : Insémination Artificiel

LDL : Low density Lipoprotéine

mOsm : Concentration Osmotique

PEG : Polyéthylène glycol

R : Romarin

Spz : Spermatozoïdes

T : Térébenthène

T0 : Temps d'analyse du sperme juste après la récolte

T2 : après 2 heures de conservation

T6 : après 6 heures de conservation

T24 : après 24 heures de conservation

VAP : velocity average pathway

VCL : Velocity Curvie Line

VSL : Velocity Straight Line

VHDL : Very High Density Lipoprotéin

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre 1 : Anatomie de l'appareil génital du coq et physiologie de la

Reproduction

1 Anatomie de l'appareil génital du coq	3
1.1 Testicules	4
1.2 Voies déférentes.....	4
1.3 Appareil copulateur	4
2 Physiologie de la reproduction	4
2.1 La spermatogenèse.....	4
2.2 Le spermatozoïde	5
2.3 La membrane spermatique :	6
2.4 Principales caractéristiques du sperme	6
2.4.1 Pureté et volume de l'éjaculat	6
2.4.2 Composition du plasma séminal.....	7

Chapitre 2 : Conservation du sperme aviaire par réfrigération à 4 °C

3 Conservation de la semence par réfrigération.....	8
4 Les étapes de la réfrigération	8
4.1 La dilution	8
4.1.1 Le pH	8
4.1.2 L'osmolarité.....	8
4.1.3 Les substrats énergétiques.....	9
4.1.4 Le facteur de dilution	9
4.2 Le refroidissement.....	9
5 Milieux de Conservation.....	10
5.1 Le jaune d'œuf	10
5.2 Le lait	10
5.3 Les dilueurs synthétiques.....	10
5.4 Le Cholestérol.....	11
5.5 Huiles essentielles	11

5.5.1	Activité anti oxydantes des huiles essentielles.....	11
5.6	La vitamine E	11
5.7	Polyéthylène glycol.....	12
5.8	Cyclodextrine	12

Chapitre 3 : Les Méthodes d'Analyse du sperme

6	Analyse du sperme et insémination.....	13
6.1	Analyse classique du sperme	13
6.1.1	La concentration	13
6.1.2	La morphologie.....	13
6.1.3	La viscosité	14
6.1.4	PH du sperme	14
6.1.5	La mobilité.....	14
6.1.6	La viabilité	14
6.1.7	L'osmolarité.....	14
6.2	Nouvelles méthodes d'analyse du sperme	15
6.2.1	Cytométrie de flux	15
6.2.2	Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes par l'analyse informatique	15

Chapitre 4 : Insémination artificielle

7	Insémination artificielle chez la volaille	16
7.1	L'intérêt de l'insémination artificielle chez les volailles	16
7.2	Récolte du sperme.....	17
7.3	Le moment et le lieu d'insémination.....	17
8	Matériel et méthodes.....	19
8.1	Animaux.....	19
8.2	Récolte de la semence	19
8.3	Matériels utilisés pour l'Analyse de la semence	19
8.4	Analyse de la semence.....	20
8.4.1	Volume de l'éjaculat	20

8.4.2	Motilité massale	20
8.4.3	Concentration (nombre de spermatozoïdes/ ml).....	20
8.4.4	Préparations des échantillons	21
8.4.5	Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes	21
8.5	Analyses statistiques	22
9	Résultat.....	22
9.1	Analyse subjective de la semence	22
9.1.1	Le Volume spermatique :	22
9.1.2	Mobilité massale des spermatozoïdes.....	22
9.1.3	Concentration spermatique	22
9.2	Paramètres de mobilité	23
9.2.1	Mobilité totale et progressive (2.5µg/ml).....	23
9.2.2	Mobilité totale et progressive (5µg/ml).....	24
9.2.3	Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP)	24
9.2.4	Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP)	26
10	Discussion	27
11	Conclusion	28
Références Bibliographique		

Introduction

La conservation du sperme aviaire à 4°C, est utilisée en aviculture à travers le monde dans les programmes d'insémination artificielle afin d'optimiser la gestion des mâles génétiquement supérieurs. Cependant, la capacité de fertilisation du sperme non dilué diminue rapidement, environ 30 minutes suivant la collecte chez les espèces aviaires (Blesbois *et al*, 1999). Pour pallier à ce problème, il est intéressant de diluer la semence aussitôt prélevé pour mieux conserver la qualité du sperme stocké (Blesbois et brillard, 2007). Le sperme aviaire se conserve à court terme de 24 à 48 h par réfrigération à 4°C, et à long terme par la cryoconservation à -19°C (Wishart, 2009).

La composition lipidique du sperme aviaire est un indicateur de la qualité et de sa capacité de fertilisation (Cerolini *et al*, 1997). Le spermatozoïde aviaire présente une proportion élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la fraction phospholipidique des membranes cellulaires des spermatozoïdes (Blesbois et brillard, 2007). Cette proportion élevée en AGPI est nécessaire pour le maintien de la fluidité et de la flexibilité de la membrane. Par ailleurs, la richesse de la membrane plasmique en AGPI du spermatozoïde aviaire, le rend plus sensible à la peroxydation lipidique (Blesbois, 2012 ; Cerolini *et al*, 1997). La peroxydation des lipides membranaires est à l'origine de la détérioration des spermatozoïdes pendant la conservation *in vitro* (Whishart, 2009).

Chez l'animal, la peroxydation lipidique est limitée par les systèmes antioxydants (enzymatique et non enzymatique). Cependant, pendant le stockage *in vitro* des spermatozoïdes, les antioxydants endogènes qui sont en quantités insuffisantes sont incapables de contrecarrer la peroxydation lipidique qui se produit durant le stockage (Douard *et al*, 2003). Ainsi, l'enrichissement des milieux de conservation du sperme aviaire par les antioxydants reste une voie intéressante dans la protection du spermatozoïde contre la peroxydation. Dans ce contexte, les antioxydants naturels tels que la vitamine E, vitamine C, le sélénium et les caroténoïdes, en association avec les systèmes antioxydants enzymatiques sont utilisés dans la protection des spermatozoïdes contre les dommages oxydatifs par l'inhibition ou la suppression des EOR (espèces oxygénées réactives) (Brequeet *al*, 2003 ; Surai et Fisinin, 2014).

Depuis déjà quelques années, on observe un intérêt particulier pour l'utilisation des molécules naturelles et des extraits de plantes pour leurs effets bénéfiques sur la reproduction

et la fertilité chez la volaille (Cross *et al*, 2007 ; Radwan *et al*, 2008), notamment par l'action antioxydante (Rosato *et al*, 2012 ; Touazi *et al*, 2018). L'Armoise blanche (*Artemisia halba alba*), fait partie des molécules bioactives capables de piéger les radicaux libres, d'où leurs indications dans la lutte contre le stress oxydatif (Bouzidi *et al*, 2016 ; Djeridane *et al*, 2006). Une autre plante très présente en Algérie, le romarin (*Rosmarinus officinalis*), est aussi utilisée dans les milieux de conservations du sperme du coq, avec des effets hautement significatifs sur les paramètres de mobilité et les différentes vitesses spermatiques (Touazi *et al*, 2018).

A présent, à notre connaissance, il existe peu de littérature scientifique sur les effets protecteurs des huiles essentielles sur les spermatozoïdes aviaires pendant la conservation à 4°C. Pour cette raison, nous avons testé les effets de plusieurs huiles essentielles (armoïse, romarin, eucalyptus et térébenthine), sur la conservation du sperme du coq à 4°C. Compte tenu du caractère lipophile des huiles essentielles, nous avons utilisé le Polyéthylène glycol (PEG) pour une meilleure solubilisation des huiles dans les milieux de conservations. Ainsi, le but ultime consiste à protéger le spermatozoïde contre la peroxydation lipidique et les phénomènes oxydatifs pendant la conservation.

Chapitre 1 : Anatomie de l'appareil génital du coq et physiologie de la reproduction

Les oiseaux sont des ovipares homéothermes à fécondation interne. Cette oviparité s'accompagne de nombreuses spécificités qui placent la reproduction des oiseaux dans une classe à part au sein des vertébrés.

1 Anatomie de l'appareil génital du coq

Le tractus génital chez les oiseaux est assez réduit. Il ne contient pas de glande accessoire différenciée et l'organe copulateur est réduit voir absent. Au moment de l'accouplement, les deux cloaques des deux sexes s'éversent lors de l'accouplement.

L'appareil génital mâle des oiseaux, est organisé en trois unités morphologiques et fonctionnelles (Figure 1) qui sont les testicules, les voies déférentes et l'appareil copulateur (Sauveur, 1988).

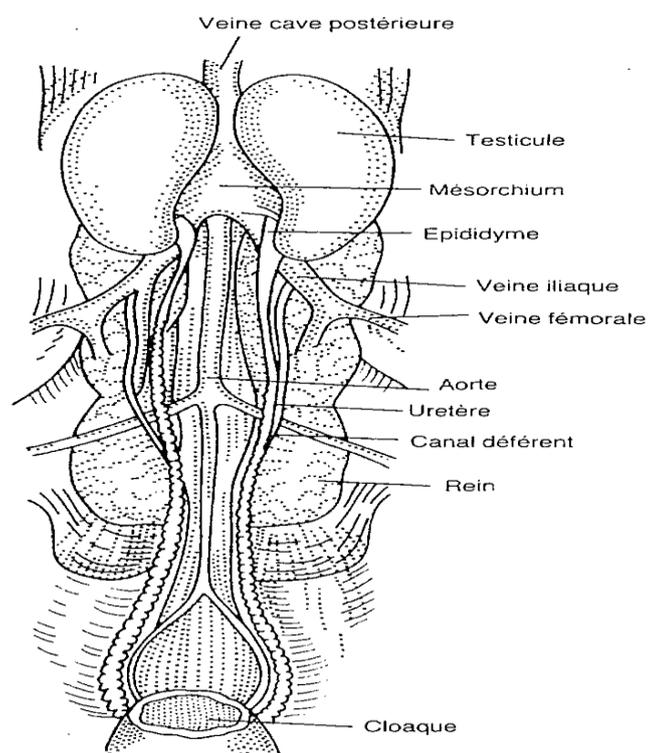


Figure 1 : Situation des testicules (d'après Sturkie, 1976).

1.1 Testicules

Les testicules des oiseaux sont internes, avec une forme d'un haricot et la spermatogénèse déroule à la température centrale de l'animal (41-43°C) (Etches, 1995). Ils sont suspendus à la paroi dorsale de la cavité abdominale par un ligament, le mésorchium, près de l'aorte et de la veine cave (Figure 1). Bien que les deux testicules soient positionnés de manière symétrique par rapport au plan médian, ils sont souvent de taille asymétrique. Les dimensions et le poids de chaque testicule varient considérablement avec l'âge (coq : 5-15mg à l'éclosion à 20-40g chez l'adulte), mais d'autres facteurs tels que l'origine génétique, l'alimentation ou la saison sexuelle participent au maintien d'une grande variabilité de développement entre individus (Blesbois et Brillard, 2005).

1.2 Voies déférentes

Chaque testicule est enveloppé d'une tunique protectrice, l'albuginée, et relié à l'appareil copulateur par un épидидyme peu différencié et prolongé par un canal déférent dépourvu de glandes annexes (prostates, vésicules séminales, etc.) (Sauveur, 1988). Les spermatozoïdes testiculaires, apparemment achevés sur le plan morphologique, ne sont ni mobiles ni féconds avant de subir la maturation dans les voies déférentes des testicules. Chez les oiseaux, ces voies déférentes ont en outre pour fonction de stocker une partie en moins de spermatozoïdes produits entre deux éjaculations successives (Sauveur, 1988).

1.3 Appareil copulateur

Chez les oiseaux l'organe copulateur est de forme extrêmement variable selon les espèces, il est constitué par des replis érectiles, le phallus et les 2 corps vasculaires para-cloacaux qui sont à l'origine du liquide séminal par filtration du plasma sanguin (Sauveur, 1988).

2 Physiologie de la reproduction

2.1 La spermatogénèse

La spermatogénèse est l'ensemble des transformations subies après la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatogonies. Elle a lieu dans l'épithélium séminifère des deux testicules (gauche et droit) logés à l'intérieur de la cavité abdominale. Chez le coq, la durée de la spermatogénèse est d'environ 14 jours (de Reviers, 1975).

Cette dernière est constituée de trois éléments importants : des mitoses permettant le renouvellement des cellules souches (spermatogonies), la méiose permettant la réduction du

nombre de chromosomes, ainsi que des changements morphologiques (spermiogenèse) qui vont permettre à un spermatide de devenir un spermatozoïde (Sauveur, 1988).

2.2 Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est produit par spermatogenèse au niveau des tubules séminifères des testicules. Le spermatozoïde aviaire est une cellule haploïde hautement différenciée, mesurant environ 100µm de longueur et environ 0,5µm à leur point le plus large. Il présente une forme filiforme et comporte trois parties : une tête, une pièce intermédiaire et un flagelle. La tête contient un noyau (haploïde), coiffée d'un acrosome et une faible quantité de cytoplasme (Figure 2). Chaque compartiment du spermatozoïde joue un rôle important dans le processus de fécondation de l'ovocyte. L'acrosome petit (2,5 µm de long, 0,5 de large) et conique, contient la vésicule acrosomique, qui constitue un réservoir de calcium, et des enzymes protéolytiques responsable de l'hydrolyse de la membrane péri-vitelline interne au moment de la fécondation (Blesbois et Brillard, 2005).

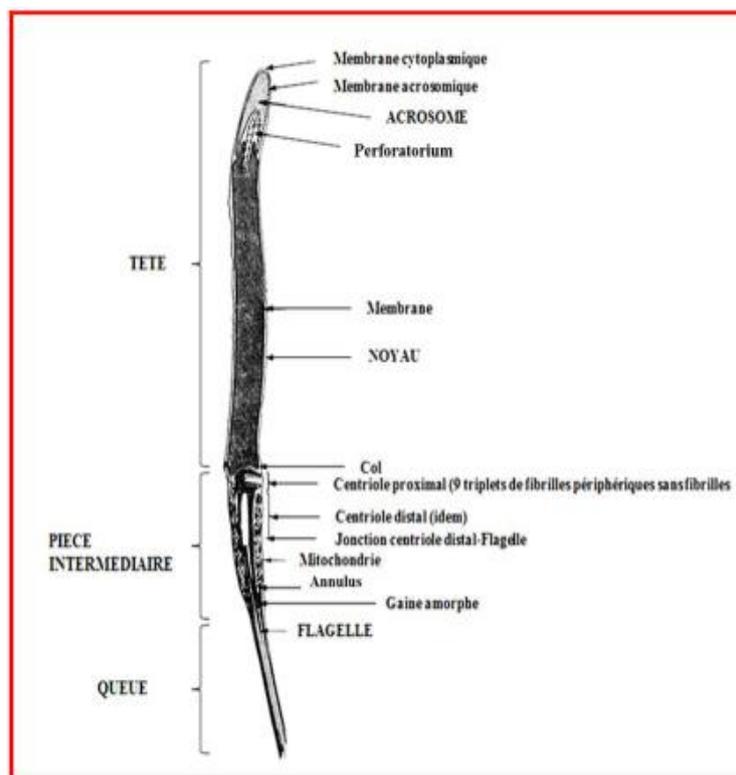


Figure 2 : Ultra structure du spermatozoïde de coq (Sauveur, 1988).

2.3 La membrane spermatique :

La membrane spermatique est composée d'une bicouche lipidique, associée à des protéines et des polysaccharides. Les phospholipides de la bicouche ont une extrémité hydrophile orientée vers l'extérieur et une extrémité hydrophobe vers l'intérieur de la membrane (Chakrabarty *et al*, 2007). Les lipides les plus représentés sont les phospholipides et le cholestérol qui peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique (Amann et Pickett, 1987).

Durant la conservation à des basses températures, les phospholipides membranaires subissent une transition de phase passant de la phase dite liquide à la phase cristalline (Mazur, 1984). Pendant ce passage de phase, il en résulte une diminution des mouvements des lipides au niveau de la membrane, avec un réarrangement des lipides et protéines membranaires conduisant à une instabilité et pertes des fonctions membranaires (Hammerstedt et Graham, 1992). Une fois dépasser la phase de transition, la membrane se fragilise, se rigidifie et devient vulnérable aux différents dommages.

Un point en relation avec la stabilité de la membrane cellulaire, est la fluidité membranaire qui elle est liée en partie au ratio molaire cholestérol/phospholipide de la membrane plasmique. Ainsi, certains spermatozoïdes sont plus sensibles que d'autres aux basses températures, qui seraient dû à la composition en lipides des membranes. Le spermatozoïde humain et celui du lapin avec des ratios élevés (0.99 et 0.88 respectivement), sont plus résistants au refroidissement que ceux du coq, du taureau et du bélier par exemple. La teneur élevée en cholestérol rend les membranes plus fluides et subissent moins de dommage comparativement aux membranes spermatiques des espèces avec un faible ration cholestérol/phospholipide (Taureau : 0.45 ; Coq : 0.30 ; Etalon : 0.23) (Parks et Lynch, 1992).

2.4 Principales caractéristiques du sperme

2.4.1 Pureté et volume de l'éjaculat

Le volume des éjaculats, leur teneur en spermatozoïdes et par conséquent le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat varient considérablement en fonction de l'espèce, de la souche, de l'individu, de son état physiologique et des conditions de collecte. Au moment de la collecte, une précaution particulière doit être prise pour éviter toute contamination par les urates, les fèces et le sang. Le volume des éjaculats peut être déterminé par une simple pesée, la masse volumique du sperme étant très voisine de celle de l'eau (Sauveur, 1988).

2.4.2 Composition du plasma séminal

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes baignent dans le plasma séminal. En absence de glande annexe chez le coq, il semble que les cellules qui tapissent les voies déférentes participent à l'élaboration du plasma séminal (Sauveur, 1988). Le pH du plasma séminal est neutre ou légèrement basique 7.2 chez le coq, alors que la pression osmotique est comprise entre 300 et 400 mOsm (Etches, 1996). Le plasma séminal est riche en lipides, avec des concentrations élevées en cholestérol et phospholipides issus des nombreuses vésicules lipidiques et de lipoprotéines (HDL, VHDL) (Douard *et al*, 2000). Au niveau des voies génitales mâles, le plasma séminal stimule la mobilité des spermatozoïdes pendant leur parcours.

Chapitre 2 : Conservation du sperme aviaire par réfrigération à 4 °C

3 Conservation de la semence par réfrigération

Le développement des techniques de collecte et d'insémination artificielle chez la volaille à contribuer à des avancées dans le domaine de la manipulation du sperme aviaire, pendant les étapes de collecte, de stockage et d'analyse avant l'insémination de femelles (Lake, 1995). La réussite de l'insémination dépendra de la maîtrise de ces différentes étapes, particulièrement le stockage de la semence à court terme (réfrigération). La réfrigération du spermatozoïde aviaire permet de ralentir les processus cataboliques des spermatozoïdes et prolonger par-là leur durée de vie. La conservation à 4°C, permet la conservation de la semence à l'état liquide de 3 à 48 heures (Douard *et al*, 2004).

4 Les étapes de la réfrigération

4.1 La dilution

Le sperme aviaire une fois dilué peut être conservé de 24 à 48 heures sans perdre sa capacité de fécondation (Siudzinska et Lukaszewicz, 2008). La dilution est indispensable pour le maintien de la viabilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Un dilueur doit avoir une composition comparable à celle du plasma séminal pour le maintien en vie des spermatozoïdes (Mocé *et al*, 2010). Les paramètres physicochimiques à prendre en considérations dans un dilueur sont :

4.1.1 Le pH

Le pH idéal pour le sperme aviaire est proche de la neutralité, alors qu'un pH de 6 à 8 est toléré par le spermatozoïde du coq (Siudzinska et Lukaszewicz, 2008). En effet, Lake et Ravie, 1979 ; ont obtenus les meilleurs résultats de maintien de viabilité du sperme conservé à pH 6.8 ou 7.1, alors qu'un pH de 5.8 semble être délétère pour la survie des spermatozoïdes. Le pH du milieu de conservation doit être stable afin de ne pas affecter le métabolisme et la motilité du spermatozoïde.

4.1.2 L'osmolarité

Le sperme aviaire garde son pouvoir fécondant avec des osmolarités de 325 à 350 mOsmol / kg. En conditions hypo-osmotique, des dommages irréversibles sont constatés au

niveau de la membrane et de la pièce intermédiaire suite au gonflement du spermatozoïde (Bakst, 1980). Le glutamate de sodium est le composé utilisé le plus souvent pour le maintien de l'osmolarité du dilueur. D'après Clarke *et al*, 1984, la perméabilité de la membrane plasmique se détériore avec l'âge, rendant les spermatozoïdes plus sensibles aux variations osmotiques.

4.1.3 Les substrats énergétiques

Le glucose, le fructose, mais aussi des acides gras, utilisés comme substrats, permettent le maintien du métabolisme énergétique et par conséquent de la viabilité des spermatozoïdes (Nguyen, 2015). En effet, après la collecte de la semence, le spermatozoïde du coq contient très peu de réserve énergétique intra cellulaire, alors qu'il peut utiliser les substrats du milieu extra cellulaire.

4.1.4 Le facteur de dilution

Le sperme du coq présente une variabilité dans la concentration entre 2 à 5 x 10⁹ spz/ml. En effet, il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer cette variabilité comme l'individu, l'âge et la souche (Lukaszewicz., 2000). Etant donné que le sperme du coq très concentré (très visqueux), il est important judicieux de le diluer avant la conservation. Le niveau de dilution optimal augmente avec l'augmentation de la durée de conservation, d'un minimum de deux volumes de sperme pour un volume de dilueur (2/1), jusqu'à un maximum de trois volume de dilueur pour un volume de sperme (Sexton, 1982). La dilution du sperme permet de réduire non seulement les facteurs délétères présents dans le plasma séminal (ex: fèces, urates, catabolites des spermatozoïdes), mais assure également la présence d'éléments protecteurs naturellement présents dans les éjaculats (Blesbois, 2012).

4.2 Le refroidissement

Chez le coq, le sperme peut être stocké in-vitro à température ambiante pendant 5 à 15 minutes seulement sans perte significative de fécondité (Blesbois et Brillard, 2007). Par ailleurs, en conditions d'élevage avec le nombre important de femelle à inséminer, il est primordial d'optimiser toute les phases de travail allant de la collecte à l'insémination proprement dite. Pour ce faire, l'utilisation d'un dilueur pour la semence est indispensable afin de maintenir la viabilité et la fertilité des spermatozoïdes pendant des périodes plus longues.

5 Milieux de Conservation

Les milieux de conservations (dilueurs) sont des solutions aqueuses qui servent à augmenter le volume initial d'un éjaculat afin de pouvoir ajuster les concentrations. Un dilueur doit apporter des nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes (glucose ou fructose), avec un pH optimum, une osmolarité physiologique (NaCl, KCl), empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et faciliter l'ajout d'agent cryoprotecteur dans le cas de la cryoconservation (Gadea, 2003).

5.1 Le jaune d'œuf

Le dilueur à base de jaune d'œuf est le dilueur le plus utilisé dans le commerce, puisqu'il a été le premier à être testé avec succès pour la congélation de semence bovine avec des retombées économiques sans précédent (Holt, 2000). Le jaune d'œuf est généralement utilisé à raison de 20%, et il en est ressortit que la lipoprotéine de basse densité (LDL), est le composant actif du jaune d'œuf avec un effet protecteur sur la semence (Watson, 1981). Dans d'autres études, il a été montré que les LDL étaient largement responsable de la résistance des spermatozoïdes bovins au choc au froid avec un effet positif sur la motilité spermatique après décongélation (Moussa *et al*, 2002; Amirat *et al*, 2004).

5.2 Le lait

Le lait entier ou le lait écrémé, sont couramment utilisés dans les dilueurs dans la conservation par réfrigération mais également lors de la congélation de la semence (Kakar et Ganguli, 1978). Les protéines du lait (caséines) semblent jouer un rôle protecteur sur la semence. En effet, Batellier *et al*, 1997 ; ont montrés l'effet positif des caséines du lait sur le sperme de l'étalon conservé à 4°C.

5.3 Les dilueurs synthétiques

Les dilueurs synthétiques exempts de produit d'origine animale, souvent à base de produit d'origine végétale comme la lécithine de soya sont utilisés. En effet, la lécithine de soya est composée en grande partie de phosphatidylcholine, phosphatidylinositol et phosphatidyléthanolamine, qui sont les mêmes phospholipides retrouvés au niveau de la membrane spermatique (Lenzi *et al.*, 1996; Martinez et Morros, 1996). Chez le chien, il a été démontré par son apport en phospholipides, la lécithine de soya était aussi efficace que le jaune d'œuf dans la cryoconservation du sperme de chien (Beccaglia *et al.*, 2009). Des résultats similaires sur la mobilité spermatique ont été obtenus chez le bélier, avec la lécithine de soya comparativement au jaune d'œuf (Khalifa et Lymberopoulos, 2013).

5.4 Le Cholestérol

L'augmentation du niveau du cholestérol dans les membranes spermatiques augmente leur résistance à la cryoconservation (Moce *et al*, 2010). Le cholestérol en réduisant la perméabilité membranaire diminue les transferts d'eau, protège la structure membranaire des cellules pendant les variations osmotiques au moment de la cryoconservation. La qualité spermatique est améliorée suite à un apport exogène en cholestérol. Récemment, une meilleure solubilisation du cholestérol par encapsulation dans la cyclodextrine, améliore les paramètres spermatiques après décongélation (Glazar *et al*, 2009; Aksoy *et al*, 2010).

5.5 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés naturels complexes de structures organiques variées, liquides, volatiles, limpides et odorantes, synthétisées par des plantes aromatiques et médicinales comme métabolites secondaires (Bakkali *et al*, 2008). Les HE sont insolubles dans l'eau et solubles dans l'alcool et les solvants organiques (Bouhdid, 2009). La composition chimique et le rendement en huile essentielle d'une plante peuvent être influencés par plusieurs facteurs à savoir la saison de récolte, la zone géographique d'origine, la partie de la plante utilisée, le stade de développement de la plante, les conditions environnementales (climat, nature du sol, pollution), séchage et stockage de la plante ainsi que la méthode d'extraction (Faleiro *et al*, 2002; Hyldgaard *et al*, 2012).

5.5.1 Activité anti oxydantes des huiles essentielles

Les huiles essentielles et les extraits de plantes sont connus pour leurs effets antibactériens mais aussi pour leurs activités antioxydantes. Au niveau de la littérature scientifique, plusieurs études montraient des effets antioxydants de plusieurs huiles essentielles (Eminagaoglu *et al.*, 2007). Certains auteurs ont rapporté des effets antioxydants plus important comparativement aux antioxydants synthétiques (Mimica-Dukic *et al.*, 2004, Hussain *et al.*, 2008). En raison de la complexité et la nature de la composition des huiles essentielles, leur activité peut être due à différents mécanismes tels que la décomposition des peroxydes, ainsi que le piégeage des radicaux libres (Mao *et al.*, 2006). Pour ce qui est des HE du romarin par exemple, plusieurs recherches montraient clairement des propriétés antibactériennes et antioxydantes (Frankel *et al*, 1996; Rašković *et al*, 2014).

5.6 La vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Elle est naturellement présente dans les spermatozoïdes aviaires, et par leur nature

hydrophobe, la vitamine E peut s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes, contribuant ainsi à la diminution de la peroxydation des lipides membranaires des spermatozoïdes lors de la conservation (Blesbois et al, 1993).

5.7 Polyéthylène glycol

Les polyéthylènes glycol (PEG) sont des polymères linéaires de faible poids moléculaire. Leurs propriétés hydrosolubles et absence de toxicité, en font des produits utilisés dans un grand nombre d'industries (médicale, cosmétique, biotechnologie) (Annunziata *et al*, 2002). Les études réalisées par Boucheffa et Mennas, 2016 ; montraient l'importance du PEG dans l'amélioration de l'action préventive du cholestérol et de la vitamine E, en augmentant leur solubilité dans les milieux de conservation de la semence bovine. Les meilleurs résultats de protection des spermatozoïdes sont obtenus avec les milieux de conservation associés au PEG.

5.8 Cyclodextrine

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharachides cycliques, qui possèdent au sein de leur structure une cavité hydrophobe. Celle-ci leur permet de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : solubilité dans l'eau, réactivité, stabilité, etc. (Moutard, 2003). Aujourd'hui les cyclodextrines sont utilisées dans plusieurs domaines (cosmétique, médical) dans l'amélioration de la solubilité des molécules hydrophobes.

Chapitre 3 : Les Méthodes d'Analyse du sperme

6 Analyse du sperme et insémination

L'analyse du sperme consiste en l'analyse du volume, de la motilité (massale et progressive) et de la concentration. L'évaluation de la qualité de la semence est d'une importance capitale dans l'exploration de la fertilité, et du choix des reproducteurs génétiquement supérieurs pour les programmes d'insémination.

6.1 Analyse classique du sperme

Les méthodes classiques d'analyse du sperme permettent l'analyse de certains paramètres qui sont la concentration de l'éjaculat, la mobilité et le pourcentage d'anomalies morphologiques ainsi que la viabilité. Ces techniques sont pratiquées en routine avec l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et peu coûteuses. L'inconvénient majeur de l'analyse classique est la subjectivité des résultats générés surtout pour le paramètre de la mobilité. En effet, c'est l'examineur qui estime la qualité de la mobilité des spermatozoïdes (appréciation personnelle).

6.1.1 La concentration

La concentration de la semence est un paramètre de qualité, qui est estimé après avoir suffisamment dilué la semence. Elle doit être connue avant l'acte d'insémination afin de déterminer le taux de dilution nécessaire. La concentration peut être mesurée par spectrophotomètre. La densité optique étant corrélée avec la concentration de spermatozoïdes estimée par la cellule de comptage (Bakst et Cecil, 1997). La concentration spermatique varie en fonction des espèces, (de $2-5 \cdot 10^9$ spermatozoïde/ml chez le coq et de $4-8 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ml chez le dindon).

6.1.2 La morphologie

L'examen morphologique du spermatozoïde, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'aide d'un colorant de l'éosine-nigrosine par exemple. Les spermatozoïdes viables présentent une membrane plasmique intacte empêchant l'entrée de l'éosine, alors que ceux qui sont endommagés vont concentrer l'éosine et prendront une couleur rouge à l'observation (Lake., 1978 ; Lukaszewicz et al., 2000). Un éjaculat contenant plus de 30% d'anomalies de formes est éliminé (Ottle, 1993).

6.1.3 La viscosité

La viscosité est proportionnelle à la concentration spermatique. Le sperme présente généralement une consistance laiteuse voir crémeuse. La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signe une pathologie (Parez et Duplan, 1987).

6.1.4 PH du sperme

A l'aide d'un pH-mètre, il est important de prendre le pH du sperme dans l'heure qui suit l'éjaculation. En effet, le sperme s'acidifie rapidement par formation d'acide lactique. Le pH du sperme aviaire avoisine la neutralité, et se situe entre 7,0 et 7,4. La mobilité des spermatozoïdes est plus élevée dans cette plage de pH, alors qu'un pH acide peut endommager la membrane plasmique du spermatozoïde (Latif et al, 2005).

6.1.5 La mobilité

L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes est révélatrice de la viabilité des spermatozoïdes et de la qualité de l'échantillon de sperme. L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes est réalisée par microscopie optique avec du sperme frais après dilution (Hafez et Hafez, 2000). L'examen de la mobilité consiste en deux types d'évaluation, une estimation de la mobilité massale qui analyse la qualité générale de la mobilité avec une graduation allant de **0** (absence totale de mouvement) à **5** (mobilité vigoureuse). L'évaluation individuelle des spermatozoïdes s'opère sous lamelle, elle consiste à déterminer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles ainsi que leur type de progression.

6.1.6 La viabilité

L'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes est un critère pour la détermination des doses adéquates pour l'IA. Il existe plusieurs techniques de colorations pour l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes, la plus couramment utilisée est la coloration à l'éosine-nigrosine qui présente l'avantage de permettre simultanément l'évaluation de la morphologie et de la viabilité des spermatozoïdes (Bakst et Cecil 1997).

6.1.7 L'osmolarité

La mesure de l'osmolarité s'effectue à l'aide d'un osmomètre. elle nous fournis de précieux renseignements afin d'utiliser les diluants adaptés pour limiter au maximum le choc osmotique lors des processus de conservation (Marc, 2015). Les diluants de sperme doivent être isotoniques, car la pression osmotique créée par la solution peut être préjudiciable aux spermatozoïdes (Senger, 2003).

6.2 Nouvelles méthodes d'analyse du sperme

Les nouvelles méthodes sont venues faciliter les contraintes rencontrées avec les méthodes traditionnelles. L'avantage des nouvelles méthodes est de mieux objectiver l'analyse spermatique, avec une meilleure évaluation de la concentration, de la morphologie et de la mobilité spermatique.

6.2.1 Cytométrie de flux

La cytométrie est une technique rapide et précise, est donc un moyen très intéressant pour l'estimation du pouvoir fertilisant des spermatozoïdes. Le principe de la cytométrie de flux est d'analyser, et de trier les cellules mises en suspension dans un liquide. Dans une population de cellules spermatiques, cette technique permet l'estimation de plusieurs caractères incluant, la viabilité cellulaire, l'intégrité de l'acrosome et la fonction mitochondriale (Graham JK (2001).

6.2.2 Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes par l'analyse informatique

L'analyse de la mobilité spermatique représente l'évaluation la plus subjective de l'analyse microscopique classique. Les nouvelles techniques d'analyses informatiques sont venues corriger cette subjectivité.

Le système CASA, acronyme de «Computer-Assisted Semen Analysis» en Anglais, est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement.

Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et dans l'espace. L'analyse informatique du sperme est largement utilisée aujourd'hui aussi bien en médecine humaine (Larsen et al, 2000), qu'en médecine vétérinaire (Eriksson et al, 2000). Les résultats obtenus par l'analyse informatique sont plus fiables en terme de répétabilité et de précision que ceux obtenus par toutes les autres méthodes d'analyse (Krause et Viethen, 1999).L'analyse informatique du sperme permet de générer avec précision le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et statiques, les vitesses de progression des gamètes, la fréquence de battements et les distances balayées par les têtes des spermatozoïdes en mouvement. Elle permet aussi de caractériser l'ensemble des spermatozoïdes en fonction et leur vitesse de déplacements et de déterminer leur aptitude à progresser d'une manière linéaire. Chez le coq, les résultats de l'analyse informatique sont corrélés à la fertilité des coqs reproducteurs (McDaniel et al, 1998).

Chapitre 4 : Insémination artificielle

7 Insémination artificielle chez la volaille

L'insémination artificielle consiste à déposer manuellement la semence dans les voies génitales femelles. Chez la poule, en plus de la collecte du mâle et le transfert du sperme, il existe des étapes intermédiaires avant d'inséminer, telles que la dilution, la conservation et l'analyse du sperme. L'insémination artificielle est largement utilisée chez les reproducteurs dinde, alors qu'elle n'est généralisée chez la poule. L'insémination proprement dite de la poule, s'effectue par deux personnes. Une personne applique la bonne pression sur le côté gauche de l'abdomen de la poule pour faire éversion de son orifice vaginal à travers le cloaque, et le sperme est déposé par la deuxième personne à une profondeur de 2 à 4 cm dans l'orifice vaginal en même temps que le retrait de la pression sur l'abdomen de la poule.

Le sperme est stocké ici pendant plusieurs jours ou semaines pour participer au processus de fécondation ultérieur (Hafez 2000), jusqu'à 32 jours chez les poulets. Les spermatozoïdes migreront vers la partie supérieure de l'oviducte vers un deuxième site de stockage (nids de sperme) situé à la jonction du magnum et de l'infundibulum. Le passage d'un ovule dans l'infundibulum stimule la libération des spermatozoïdes des nids de sperme et la fécondation a lieu. Habituellement, l'IA est largement utilisée avec le sperme fraîchement collecté en raison de sa facilité de collecte et de la proximité des poules dans les grandes fermes d'élevage pour insémination (Aisha et Zain, 2010).

7.1 L'intérêt de l'insémination artificielle chez les volailles

Au niveau des élevages de reproducteurs (chair et ponte), on observe généralement une baisse de la fertilité des troupeaux mis en reproduction naturelle à partir de la deuxième moitié de reproduction (à partir de 40-45 semaines d'âge). La première cause est en relation avec le mâle, puisqu'il ne peut produire suffisamment du sperme plus de 15 à 20 semaines de suite, alors que la saison de ponte des femelles s'étend sur 40 semaines environ. La seconde cause est liée à la femelle puisque le nombre de spermatozoïdes nécessaires pour maintenir des taux de fertilités élevés augmente avec l'âge des poules (Bilgili, 1985 ; Brillard, 1985).

7.2 Récolte du sperme

Chez le coq, mais aussi pour les autres espèces aviaires, le moyen le plus efficace pour la récolte du sperme est le massage dorso-abdominal (Burrows et Quinn, 1937). L'absence de pénis développé dans ces espèces rend en effet difficile, voire impossible, la récolte de sperme par vagin artificiel (Sauveur, 1988). Le stress lié à la manipulation et l'expérience de l'opérateur peuvent influencer les volumes de sperme collecté (Cooper, 1965). La fréquence de la collecte de sperme détermine la qualité et la concentration en spermatozoïdes, qui sont des facteurs déterminants pour la fertilité (Tabatabaei, 2010; Beulah, 2017).

7.3 Le moment et le lieu d'insémination

Le moment de l'insémination peut avoir des conséquences importantes sur les niveaux de fertilité observés ultérieurement. C'est ainsi que les femelles inséminées au voisinage de l'heure de ponte ne sont que peu ou pas fertiles (Klein-Hessling, 2006). En effet, les spermatozoïdes peuvent être évacués par l'œuf si l'insémination précède l'oviposition. Il existe aussi des modifications chimiques du milieu utérin, liées à la proximité de l'heure d'oviposition, et enfin, les mouvements contractiles de l'utérus et du vagin qui favorisent la progression de l'œuf, sont défavorable à la progression des spermatozoïdes.

Le lieu de l'insémination aussi joue un rôle important puisque des inséminations pratiquées à 2-4 cm à l'intérieur du vagin paraissent utiles pour éviter les rejets d'une partie de la dose de sperme, surtout chez les poules âgées. A l'inverse, des inséminations pratiquées à plus de 5-6cm pourraient être dangereuse en entraînant des lésions de l'appareil génital femelle ainsi que des arrêts de ponte (Donoghue et Wishart, 2000). Pour une meilleure fertilité chez la poule, l'IA doit débuter quand 15 à 20% des poules sont en ponte.

Partie Expérimentale

8 Matériel et méthodes

8.1 Animaux

La partie expérimentale du présent travail a été réalisée au niveau d'une ferme avicole privée de Mr A. KIROUANI, sise dans la commune de Chemini (w) Bejaïa, du 10/04/2020 jusqu'au 08/07/2020. Six coqs reproducteurs de population locale âgés entre 6 et 12 mois ont été utilisés durant l'expérimentation. Les animaux ont été logés en cages individuelles classiques, sous éclairage naturel, nourris ad-libitum avec un aliment commercial standard. Ce dernier est composé de maïs-soja et comporte 17% de protéines.



Figure 3 : coqs de race locale

8.2 Récolte de la semence

Après un entraînement à raison de trois fois par semaine au massage dorso-abdominal, les coqs sont soumis à des collectes de semences bihebdomadaires par la technique de massage décrite par Burros et Quinn (1997). Cette technique pratiquée par deux personnes en prenant soin de ne pas stresser l'animal. Pour l'analyse du sperme, les éjaculats collectés sont d'abord mélangés en pools, puis traités avec les différents milieux de conservation et enfin analysés. Afin de minimiser le stress des animaux et obtenir une semence de qualité, la collecte est réalisée par un même opérateur dans les mêmes conditions.

8.3 Matériels utilisés pour l'Analyse de la semence

- Semence de coq fraîchement récoltée
- Un microscope optique
- Lame de mallassez, lames et lamelles
- Micropipettes graduées

- Balance électronique
- Sérum physiologique
- Polyéthylène glycol (PEG)
- Huiles essentielles (Armoise, romarin, eucalyptol, térébenthine)

8.4 Analyse de la semence

8.4.1 Volume de l'éjaculat

La mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par lecture directe juste après la récolte à l'aide d'une pipette graduée. La lecture se fait sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat.

8.4.2 Motilité massale

L'examen de mobilité comporte une évaluation massale des spermatozoïdes. Le principe consiste à diluer une goutte de sperme pur au 10ème aussitôt récolté, dans du sérum physiologique, puis déposer une goutte de dilution sur une lame propre au microscope sous grossissement. L'évaluation massale consiste à donner une note allant de 0 (absence totale de Mouvements) à 5 (mouvement vigoureux).

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

8.4.3 Concentration (nombre de spermatozoïdes/ ml)

L'examen de la concentration spermatique est réalisé à l'aide de la cellule de Malassez. La cellule de comptage mesure 1 mm^3 et comporte 5 bandes horizontales de 5 lignes et 5 bandes verticales de 6 lignes chacune. On compte le nombre de spermatozoïdes dans les quatre rectangles composés de 20 petits carrés situés aux quatre coins du quadrillage (= N) et on fait la moyenne des quatre valeurs trouvées ($m = N/4$). Etant donné que le volume d'un rectangle = $1/100 \text{ mm}^3$; la concentration en spermatozoïdes par ml sera donné par la formule suivante : $C = m \times 100 \times 10^3 \text{ (dilution)} \times 10^3 \text{ SPZ / ml}$. Puisque le sperme aviaire est très

concentré, un volume de 0,01ml de sperme pur et diluer dans 10 ml de sérum physiologique. Une goutte de sperme dilué est déposée entre lame et lamelle sans bulle d'air. La gouttelette par capillarité, se répartit alors entre lame et lamelle. Laisser reposer quelques minutes afin que les spermatozoïdes se déposent sur le fond de la lame (Balédent, 2000).

8.4.4 Préparations des échantillons

Avant la collecte des coqs, la solution de dilution contenant des huiles essentielles est préparée. Pour chaque huile (Romarin, Armoise, Eucalyptol, Térébenthine), on prélève 10µg qu'on mélange avec 1 ml de NaCl 0.9% qui contient 39,15 mg de PEG préalablement dissous par agitation. L'ensemble est mélangé par agitation jusqu'à dissolution complète des huiles dans la solution aqueuse. Pour ce qui est de l'association armoise et romarin, 5µg de pour chaque huile est mélangée avec 1 ml de NaCl 0.9% qui contient 39,15 mg de PEG.

➤ Traitement de la semence par les huiles essentielles

Juste après la collecte de la semence, le pool du sperme est dilué par un facteur de 1/2 à température ambiante (18-22°C) dans les solutions préparées pour la conservation. L'objectif est d'avoir une concentration finale en huile essentielle de 5µm/ml dans le milieu de conservation. Pour ce qui est de la deuxième concentration utilisée dans le travail (2.5µg/ml), la même solution utilisée précédemment est dilué par un facteur de 2 dans du sérum physiologique. L'ensemble des échantillons a été ensuite conservé à 4°C et analysé à 0, 2, 6 et 24 heures.

8.4.5 Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes

Les différents paramètres de mobilité spermatique ont été évalués à l'aide d'un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain). Le CASA permet d'estimer objectivement les caractéristiques des mouvements des spermatozoïdes. Les paramètres mesurés sont : le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, qui est l'ensemble des spermatozoïdes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale. Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs et les différentes vitesses de progression. La vitesse curviligne (VCL µm/s) : distance totale parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné. La vitesse en ligne droite (VSL µm/s) : vitesse qui prend en considération le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet et la vitesse de trajet (VAPµm/s), qui est l'équivalent de la VCL après lissage de son trajet.



Figure 4 : photo du système CASA.

8.5 Analyses statistiques

A l'aide d'un logiciel de traitement de données « statview », les données sont analysées par utilisation des statistiques descriptives pour chaque paramètre étudié.

9 Résultat

9.1 Analyse subjective de la semence

9.1.1 Le Volume spermatique :

Les volumes du sperme récoltés par pool est de l'ordre de 1ml à peu près, les variations des volumes du sperme observer peuvent être justifié par les conditions stressantes dans lesquelles les coqs sont entretenus. Seuls les éjaculats sans souillures sont maintenus.

9.1.2 Mobilité massale des spermatozoïdes

Les pools retenus pour la conservation présentait au moins une note de 3. Les pools avec une note inférieure à 3 sont éliminés.

9.1.3 Concentration spermatique

La mesure de la concentration spermatique a été faite grâce à une cellule de mallassez. La plupart des pools étaient concentrés au environ 3.10^9 Spz/ml.

9.2 Paramètres de mobilité

9.2.1 Mobilité totale et progressive (2.5µg/ml)

La figure 5, présente la mobilité totale et progressive de l'ensemble des échantillons de sperme traités avec 2.5µg/ml des huiles essentielles (A, AR, E, R et T) solubilisés dans le PEG, et celui du control (dilué dans du NaCl à 0.9%), durant la conservation à 4°C pendant 24 heure. A T0, le control (C) (70% ± 0,81) a montré un pourcentage de mobilité totale le plus faible comparativement aux lots traités avec les différentes huiles essentielles. Après deux heures de conservation, la même tendance a été observée, puisque les valeurs des lots traités aux HE sont nettement supérieures au control. A T6, la mobilité totale de tous les huiles sont significativement supérieures aux control à l'exception de la térébenthine.

En ce qui concerne la mobilité progressive, qui est un paramètre important dans la qualité spermatique, on observe des mobilités progressives nettement supérieures pour les traitements avec les huiles comparativement aux control juste après la collecte et après 2h de conservation. Après 6h de conservation, les seules les traitements eucalyptus et l'association armoise romarin, présentaient des valeurs de mobilités progressives supérieures aux control. Cette différence est maintenue même après 24h de conservation.

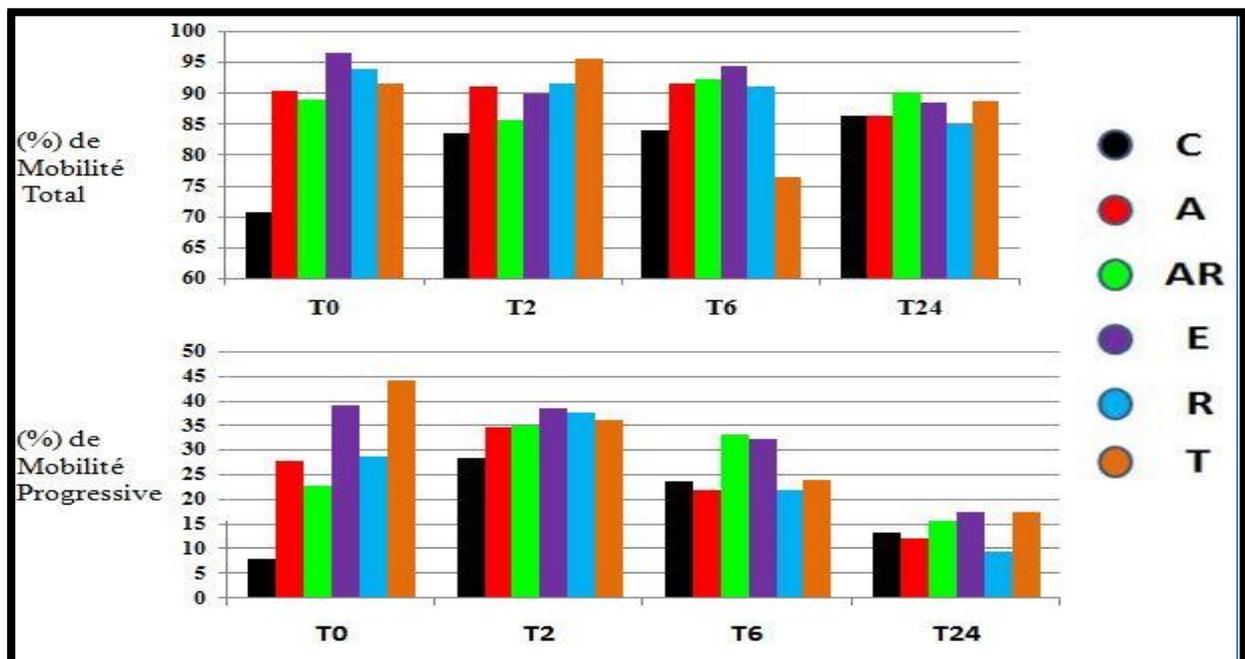


Figure 5: pourcentages de mobilité totale et mobilité progressive du sperme du coq à 0, 2, 6 et 24h de réfrigération à 4°C, du groupe contrôle (C) et des groupes traités avec 2.5µg/ml de l'huile essentielle de l'armoise (A), armoise+romarin (AR), eucalyptus (E), romarin (R) et térébenthine (T) solubilisés dans du PEG.

9.2.2 Mobilité totale et progressive (5µg/ml)

Les résultats de la mobilité totale et progressive des échantillons de sperme de coq traités avec 5µg/ml des huiles essentielles (A, AR, E, R et T), et le control lors de la conservation à 4°C pendant 24 heures sont présentés sur la figure 6. A T0, aucune différence significative entre le control et les huiles à l'exception de l'eucalyptus. Des différences en termes de mobilité totale sont observées seulement après 6h de conservation. En effet, les résultats de mobilité totale des traitements AR, R et E sont supérieures au control.

Concernant la mobilité progressive, le control à T0 avec (27% ± 0.74) a montré une valeur de mobilité significativement plus faible que l'armoise (30% ± 0.20), l'association armoise-romarins (38% ± 0.80) et la térébenthine (41% ± 0.34). A partir de 2h de conservation, peu de différence observées entre le control et les différentes huiles essentielles.

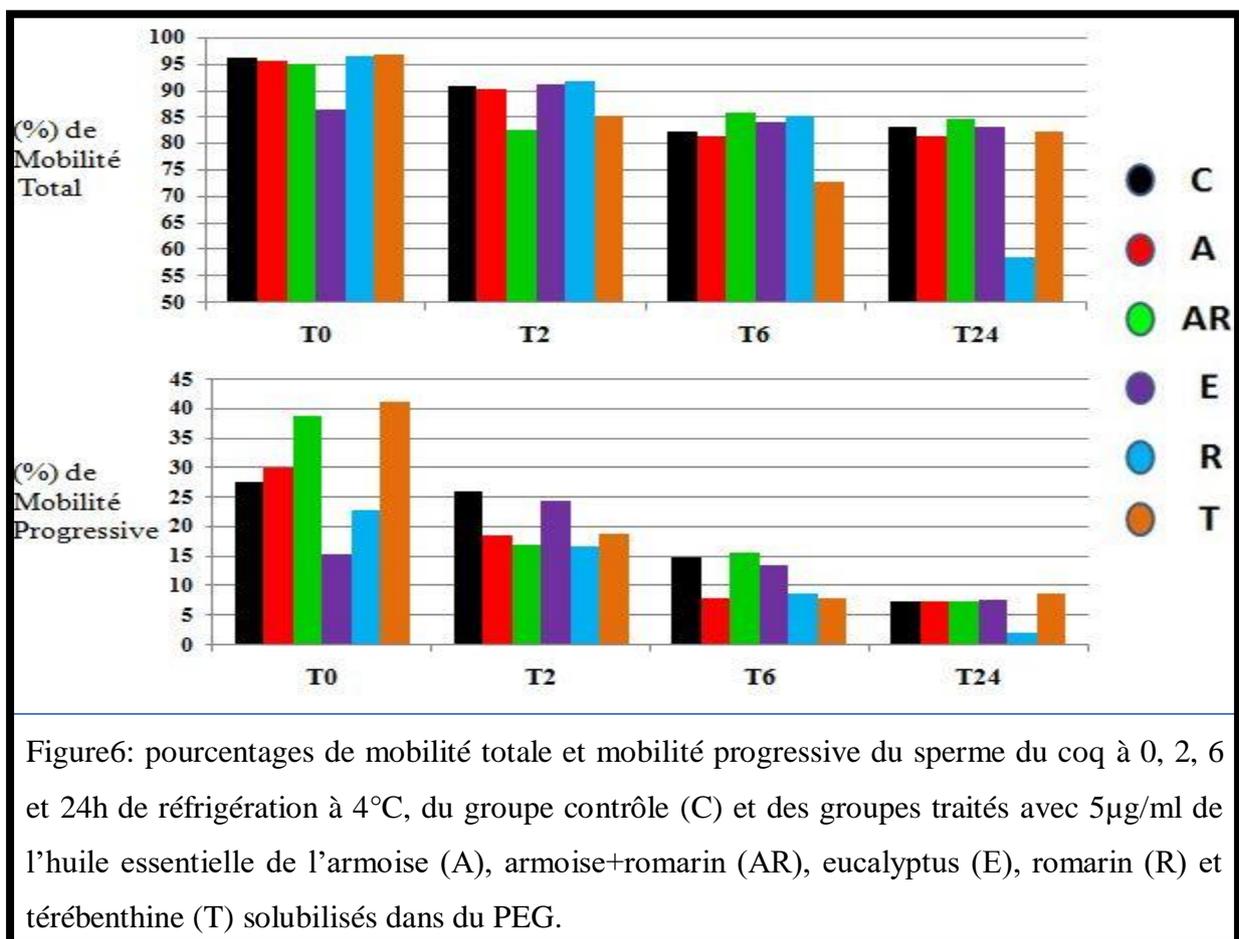


Figure6: pourcentages de mobilité totale et mobilité progressive du sperme du coq à 0, 2, 6 et 24h de réfrigération à 4°C, du groupe contrôle (C) et des groupes traités avec 5µg/ml de l'huile essentielle de l'armoise (A), armoise+romarin (AR), eucalyptus (E), romarin (R) et térébenthine (T) solubilisés dans du PEG.

9.2.3 Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP)

Utilisation de la Concentration en huiles essentielles de (2.5µg/ml)

L'impact du traitement de la semence aux huiles essentielles sur les paramètres cinématiques des spermatozoïdes (VSL, VCL, VAP) est représenté sur la (Figure 7). A T0, les

valeurs de la VSL des lots traités aux huiles à la dose de 2.5µg/ml, sont supérieures au contrôle avec une différence statistique hautement significative. La valeur la plus élevée (35 µm/s) est enregistrée avec l'HE de térébenthine. Après 2 heures de conservation (T2), les valeurs de la VSL des huiles AR (30.91µm/s) et E (32.82µm/s), sont supérieures aux C (28.65µm/s). Après 6h de conservation, la tendance pour la VSL est maintenue puisque les valeurs des milieux AR (26.57 µm/s), T (25 µm/s) et E (23.86 µm/s) sont supérieur au contrôle (23.54 µm/s). Pour le paramètre VCL, le profil des résultats semblent être similaires à celui obtenu pour la VSL. En effet, les VCL de tous les milieux (A, AR, E, R et T) sont significativement supérieures à la VCL du milieu control à T0 et T2. A T6, les valeurs de la VCL des huiles AR (63.53µm/s) et E (65.54µm/s), sont nettement supérieures à celle du control (55.14µm/s). Après 24 h de conservation, les lots AR, E et T, montraient des valeurs supérieures comparativement aux control. Concernant la VAP, des différences significatives sont enregistrées à T0 pour l'ensemble des lots traités avec les huiles comparativement aux control. Pour les analyses à 2, 6 et 24h de conservation, on peut voir que les meilleures vitesses VAP sont obtenues avec les milieu (AR, E et T).

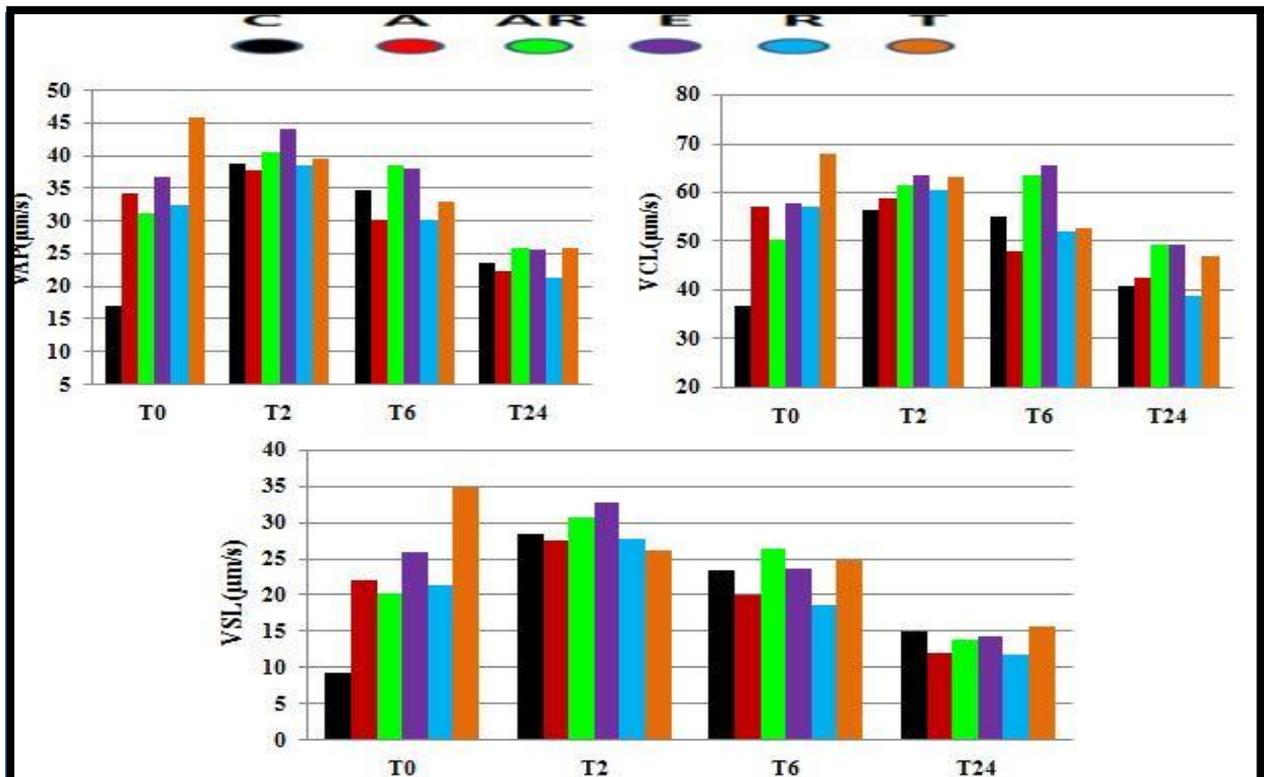


Figure 7 : histogrammes montrant les variations de vitesses des spermatozoïdes de coq (VSL, VAP et VCL) à 0, 2, 6 et 24h de réfrigération à 4°C, dans les cinq milieux de conservation supplémentés avec 2.5µg/ml en huiles essentielles (A, R, AR, E et T) solubilisés dans du PEG.

9.2.4 Paramètres cinématiques (VCL, VSL, VAP)

✚ Utilisation de la Concentration en huiles essentielles de (5µg/ml)

L'impact du traitement de la semence aux huiles essentielles (5 µg/ml) sur les paramètres cinématiques des spermatozoïdes (VSL, VCL, VAP) est représenté sur la (Figure 8). A T0, les valeurs de la VSL des milieux : T (22.73 µm/s), AR (22.54µm/s) et A (20.52 µm/s) sont nettement supérieur au control (18.47 µm/s). A partir de 2, 6 et 24h de conservation, aucune différence significative n'est observée entre le contrôle et les lots traités avec les huiles essentielles. Pour la VCL, la valeur obtenue avec le traitement T (78.97 µm/s) et AR (73.06 µm/s) sont significativement supérieurs à la valeur du contrôle (62.27 µm/s). a partir de 2h de conservation, peu de différences sont à notées entre le contrôle et les différents traitements. Pour ce qui est de la VAP, des différences sont observées seulement à T0. En effet, la VAP des traitements : T (42.13 µm/s) et AR (40.37 µm/s) sont nettement supérieurs à celle du contrôle (33.66 µm/s).

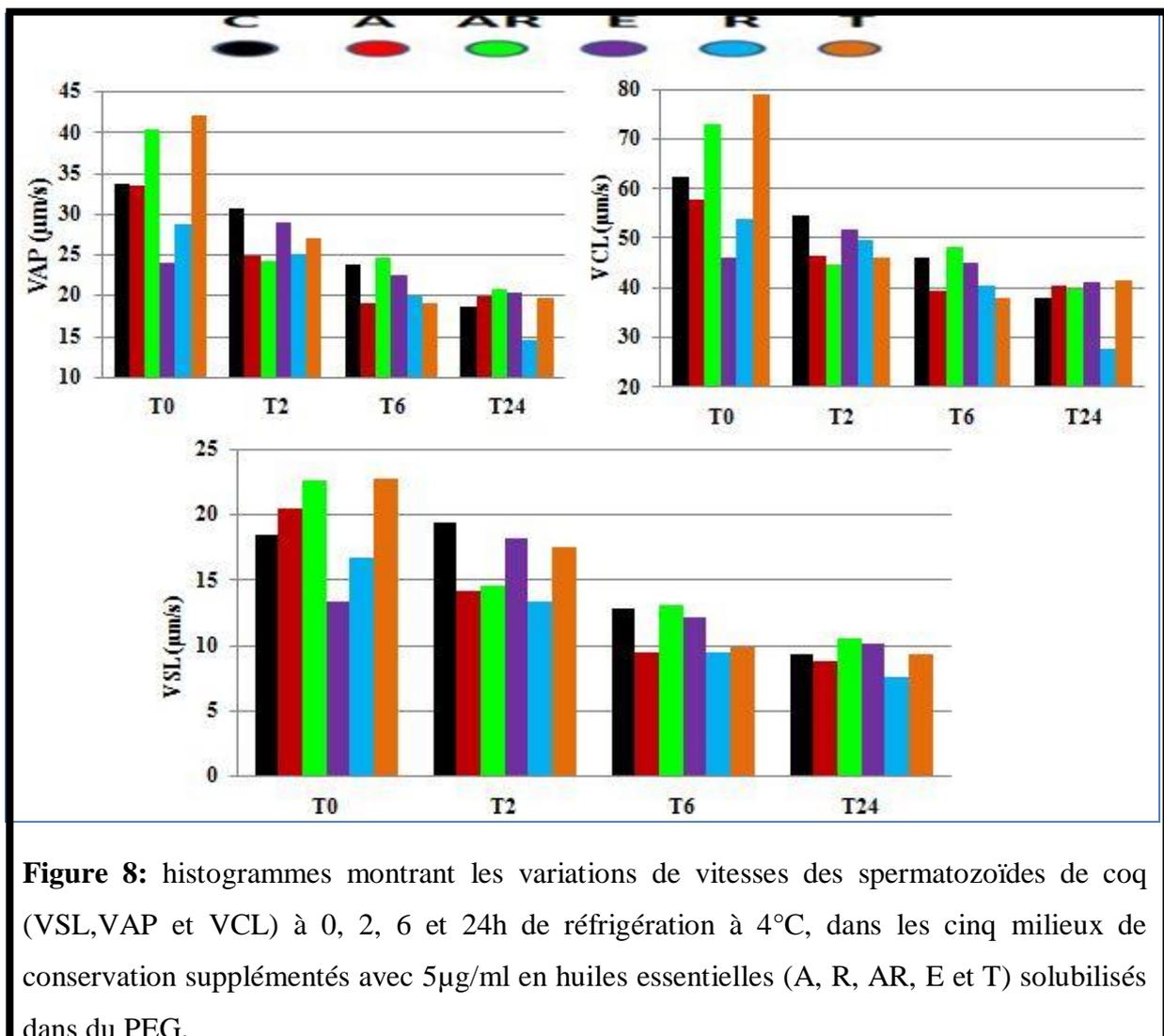


Figure 8: histogrammes montrant les variations de vitesses des spermatozoïdes de coq (VSL,VAP et VCL) à 0, 2, 6 et 24h de réfrigération à 4°C, dans les cinq milieux de conservation supplémentés avec 5µg/ml en huiles essentielles (A, R, AR, E et T) solubilisés dans du PEG.

10 Discussion

La conservation des spermatozoïdes engendre divers dommages sur la cellule spermatique notamment par la voie du stress oxydatif et du choc thermique. Pour une meilleure protection du spermatozoïde, il est important d'améliorer des milieux de conservation qui permettront de préserver la qualité des gamètes et d'assurer leur protection pendant le processus de réfrigération à 4°C. Dans le présent travail, nous avons utilisé une nouvelle approche dans la conservation du sperme du coq. Cette approche consiste à solubiliser les huiles essentielles utilisées dans les milieux de conservations pour leur effet antioxydant avec le Polyéthylène glycol (PEG). Les résultats ont montré que les antioxydants doivent être utilisés avec des concentrations adéquates.

Le sperme du coq est caractérisé par une proportion élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) au niveau membranaire (Blesbois et al, 1997), et par conséquent, le spermatozoïde est susceptible à la peroxydation lipidique (Surai et al, 1997), avec comme conséquence une altération de la qualité du sperme pendant la conservation par réfrigération pour une durée supérieure à 6 heures (Surai et al, 1998). La conservation du sperme aviaire à 4°C s'accompagne d'une perte importante en phospholipides membranaires (Douard et al, 2000).

L'utilisation d'antioxydants notamment les plantes médicinales, dans l'alimentation en aviculture est répandue pour limiter les réactions oxydatives et éviter ainsi l'installation des processus du stress oxydatif. L'armoise blanche (Chih) est utilisée dans différents domaines pour ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Zouari et al, 2010 ; Khlifi et al, 2013; Bouzidi et al, 2016). Le romarin est aussi utilisé pour ses propriétés antioxydant (Djeddi et al, 2007 ; Laura et al, 2010 ; Makhloufi et al, 2011), et en industrie alimentaire comme conservateur naturel (Kadri et al, 2011). Chez le coq, Borghei-Radand *et al.* 2017, rapportait l'effet positif des feuilles du romarin en Supplémentation alimentaire sur la mobilité spermatique et sur la fertilité du coq. Dans une autre étude, Touazi et al, 2018, rapportaient des effets bénéfiques des huiles essentielles de romarin sur les paramètres du sperme du coq après conservation *in vitro* à 4°C pendant 24 heures. Les effets bénéfiques des huiles essentielles dans les milieux de conservation du sperme, sont probablement dus à leur pouvoir antioxydant, limitant ainsi la peroxydation lipidique membranaire et les dommages qui en découlent durant la réfrigération.

Les résultats du présent travail montraient l'effet protecteur des huiles essentielles sur les paramètres de mobilité du sperme avec de faibles concentrations (2.5 et 5 µg/ml). Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Touazi et al, 2018, avec la dose de 8.7µg/ml

d'huile essentielle de romarin. Pour ce qui est des doses utilisés dans le présent travail, la concentration de 5µg/ml d'huile essentielle affect plus la mobilité totale et progressive, surtout à partir de deux heures de conservation probablement à cause de la toxicité des huiles essentielles à forte dose. Dans une étude réalisée sur le porc, Elmi *et al.* 2017, rapportait une altération des paramètres de mobilité des spermatozoïdes après conservation avec la concentration de 200µg/ml. Les différences en termes de résultats obtenues pour les huiles utilisées sont probablement dues à la composition propre de chaque huile essentielle.

11 Conclusion

La maîtrise des biotechnologies dans le domaine de la reproduction reste une voie intéressante pour l'amélioration des productions animales. L'insémination artificielle et la conservation de la semence sont les outils de base pour toute approche d'amélioration. En Algérie, la généralisation de l'insémination artificielle chez la poule en vue de la production de poussins chair pourrait améliorer considérablement les performances de nos élevages.

Les résultats du présent travail, montrent l'intérêt de l'utilisation de faibles concentrations en huiles essentielles (armoise, romarin, eucalyptus, térébenthine), dans le milieu de conservation *in vitro* à 4 °C. En effet, la mobilité (totale et progressive) ainsi que les paramètres cinématiques ont été significativement préservés avec les concentrations de 2.5µg/ml et 5µg/ml. Les résultats obtenus juste après la collecte, mais aussi 2 et 6 heures après conservation, sont nettement supérieures au groupe control.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont la conséquence d'une bonne solubilisation des huiles utilisées dans les milieux de conservations (aqueux) par l'ajout de polyéthylène glycol. L'action préventive des huiles essentielles sur la peroxydation des lipides membranaires, et sur le stress oxydatif généré par la réfrigération, est potentialisée par le PEG. Ainsi, au vu du prix très intéressant du PEG sur le marché comparativement à la cyclodextrine par exemple, les propriétés de solubilisation du PEG peuvent être exploitées dans les milieux de conservations du sperme aviaire.

Au terme de ce travail, les résultats ont montré l'efficacité de la solubilisation des huiles essentielles par le PEG dans l'amélioration de la qualité de la semence du coq après réfrigération pendant 24h. Toutefois, il serait intéressant de tester l'association de plusieurs huiles avec plusieurs doses différentes.

References

A

- Aisha, K. and Zain, U.A.2010.**Artificial Insemination in Poultry. Department of Pathology, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan.
- Aksoy, M, Akman, O, Lehimcioglu, N C et Erdem, H. 2010.**Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 120,pp166-72.
- Amann, R.P et Pickett, B.W. 1987.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7 145-73.
- Amirat, L ., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L. , Annton, M. 2004.**Bull smen in vitro fertility after cryoconservation using egg yolk LDL : a comparison with optidyl. a commercial egg yolk extender. *Therogenology*. 6, pp895-907.
- Annunziata O., Asherie N., Lomakin A., Pande J., Ogun O. and Benedek G. B. 2002.** Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions, 22, 14165-14170.

B

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp446-475.
- Bakst MR et Cecil HC. 1997.** Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. Sperm viability. I. Nigrosin/ eosin stain for determining live/dead and abnormal sperm counts. The Poultry Science Association, Inc., Savoy, Illinois, pp 29–34.
- Bakst, M.R., 1980.** Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *J. Reprod. Fertil.* 60, pp121–127.
- Batellier, F, Magistrini, M, Fauquant, J & Palmer, E. 1997.** Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Therigenology* 48, pp391 -410.
- Beccaglia, M, Anastasi, P, Chigioni, S et Luvoni, G,C. 2009.**TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2 345-9.

- Beulah, P.V. 2017.** Effect of different semen extenders on fertility of chicken spermatozoa during short term preservation. M.V.Sc Thesis, ICAR-Indian Veterinary Research Institute, India.
- Bilgili SF, Renden JA et KJ Sexton. 1985.** The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. *Poultry Science* (64) 2358–2361.
- Blesbois E. 2012.** Biological Features of the Avian Male Gamete and their Application to Biotechnology of Conservation. *J. Poult. Sci.*, 49, pp 141-149.
- Blesbois E., Grasseau I., Hermier D. 1999.** Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5°C. *Theriogenology*. 52, pp 325-334.
- Blesbois E., Brillard JP. 2007.** Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*. 1, pp 1472-1481.
- Blesbois E et JP Brillard., 2005.** Reproduction des animaux d'élevage. Deuxième édition. Chap 15, pp358-369.
- Blesbois .E., Grasseau.I and Blum.G.C. 1993.** Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4°C i.n.r.a., Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France.
- Borghai-Rad, S.M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H., et Ansari, M. 2017.** Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology*, 101, pp35-43.
- Boucheffa, B. Mennas, D. 2016.** L'intérêt du polyéthylène glycol dans la solubilisation du cholestérol et de la vitamine E pour une conservation optimale du sperme bovin. Mémoire mastère. Université A. MIRA – Bejaia.
- Bouhdid S. 2009.** Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles. Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse pour l'obtention du doctorat en sciences. Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences de Tétouan. Maroc.
- Bouzidi N., Mederbal K., Bachir Raho G. 2016.** Antioxidant Activity of Essential Oil of *Artemisia herba alba*. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 6(5) pp 59-65.

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

Brillard, JP. 1995.Artificial Insemination: How many sperm? How often? In: Bakst MR Wishart GJ Eds, Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp176–183.

Burrows, W.H. And Quinn, J.P. 1937.Artificial insemination of chicken and turkeys. Poultry Science 14,pp251-254.

C

Cerolini S., Surai P., Maldjian A., Gliozzi T., Noble R. 1997. LIPID Composition of Semen in Different Fowl Breeders. Poultry and Avian Biology Reviews. 8 (314), pp 141-148.

Chakrabarty, J, Banerjee, D, Pal, D, De, J, Ghosh, A & Majumder, G C .2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54, pp27-35.

Clark, R.N., Bakst, M.R., Ottinger, M.A., 1984. Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poul. Sci. 63, pp801–805.

Cooper, D.M. 1965.Artificial insemination in poultry. World's Poultry Science Journal 21,pp12-22.

Cross DE, Mcdevitt RM., Hillman K., Acamovic T. 2007.The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. Br Poult Sci., 48(4), pp 496-506.

D

de Reviere, M. 1975. Le développement testiculaire du coq. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15 (4), 633-641.

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H.D., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. Chem. Nat. Compd. 43, pp487–488

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. 2006.Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 97., PP 654–660

Donoghue AM et GJ Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* (62) 213–232.

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

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

Douard V., Blesbois E., Hermier D., Magistrini M. 2004 . Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61, pp1-13.

Douard, V., Hermier, D., Blesbois, E., 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biol. Reprod.* 63, pp1450–1456.

Dumont, P. 1997. Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le Point Vétérinaire*, 28, 185, pp19-32.

E

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

Eminagaoglu O., Tepe B., Yumrutas O., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. and Sokmen A. 2007. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. And *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*, 100, pp339-343.

Eriksson BM et H Rodrigues-Martinez. 2000. effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatPacks and maxi-straws. *Anim Reprod Sci*, 63: 205-20.

Etches, R.J. 1996. The male. In : *Reproduction in Poultry*. Wallingford, London, UK, pp 208-233.

Etches RJ, 1995. *Reproduction in Poultry*. Chap 12, pp298-307.

F

Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Pedro L.G. 2002. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, pp35-40.

Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R., et Prior, E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, pp131-135.

G

Gadea, J. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 1, pp17- 27.

Glazar, A I, Mullen, S F, Liu, J, Benson, J D, Critser, J K, Squires, E L et Graham, J K. 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59, pp201-6.

Graham JK. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68 (2001) pp239-247

H

Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th ed. New York. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., et Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11, pp73–88.

Holt WV., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences, *Theriogenology* 53, pp47-58.

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H. and Przybylski R. 2008. Chemical composition, Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986-995.

Hyldgaard M., Mygind T. and Meyer R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-24.

K

Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R., 2011. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 5, pp5999–6004.

Kakar, S, S et Ganguli, N C .1978. Milk as an extender for semen: a review. *Indian J Anim Sci* 48,pp77- 90.

Khalifa, T et Lymberopoulos, A.2013.Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell Tissue Bank* 14,pp687-98.

Klein-Hessling H. 2006. Artificial Insemination. *World Poultry - Turkey special 2006*, pp 21-22.

Khelifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013. Composition and antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba alba*, *Rutachalpensisl.* and *PeganumharmalaL.* *Food ChemToxicol.* 55, pp202–208.

Krause W et G Viethen. 1999. Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia*, 31, pp125-9.

L

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

Lake, P. E., et Ravie, O. 1979.The effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5°C in fluids of different pH. *J. Reprod. Fertil.* 57, pp149–155.

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

Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkeback NE et A Giwercman. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors of fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study team. *Hum Reprod.* 15: 1562-43.

Latif A, Ijaz A, Aleem M and Mahmud A .2005. Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. *Pakistan Veterinary Journal*, 25, pp179-183.

Laura, P.F., Garon, M.T., Vicente, M., 2010. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food. Chem.*58, pp161–171.

Lenzi, A, Picardo, M, Gandini, L et Dondero, F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 2, pp246-56.

Łukaszewicz., E., 2000. Effects of Semene Filtration And Dilution Rate on Morphologie and Fertility of Frozen Gander Spermatozoa. *Theriogenology.* 55, pp181-1829.

M

Makhloufi, A., Moussaoui, A., Makhloufi, L., Benlarbi, Z., Hibi, B.S., Mellouki, S., Rahal, S., 2011. Microbiological and physicochemical quality of four cultivars of dates in the region of Bechar, South-West of Algeria-optimization of conservation by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Acta. Hortic.* 994, pp247–255.

Mao L.C., Pan X., Que F. and Fang X.H. 2006. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222, pp236-241.

Marc.S. 2015.Actualites En Cryoconservation Des Semences Des Principales Especies D'interet Veterinaire. L'universite CLAUDE-BERNARD - LYON I. Vetagro Sup Campus Veterinaire De Lyon.

Martinez, P et Morros, A. 1996.Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* 1 d103-17.

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

McDaniel CD, Hannah JL, Parker HM, Smith TW, Schultz CD et CD Zumwalt. 1998. Use of a Sperm Analyzer for Evaluating Broiler Breeder Males. 1. Effects of Altering Sperm Quality and Quantity on the Sperm Motility Index. *Poultry Science* 77, pp888–893

Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M. and Simin N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 2485-2489.

Moce, E, Blanch, E, Tomas, C et Graham, J K 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim* 45 Suppl 2,pp57-66.

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 bull semen. *Theiogenology* ; 57,pp1695-1706.

Moutard, S. 2003. relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles. Thèse de Doctorat. Université de Picardie Jules Verne.

N

Nguyen T. M. 2015. Rôle de protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinée à être cryopréservées, thèse de Doctorat. Université François – Rabelais de Tours.

O

Ottle, E.1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, , Suppl. 47, pp257-260.

P

Parez, M ; Duplan, J.M. 1987. L'insémination artificielle bovine : Reproduction, Amélioration génétique. Paris :ITEB-UNCEIA, , p256.

Parks, J, E et Lynch, D,V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, pp255-66.

R

Radwan Nadia L., Hassan R.A., Qota E.M., Fayek HM. 2008. Effect of Natural Antioxidant on Oxidative Stability of Eggs and Productive and Reproductive Performance of Laying Hens. *International Journal of Poultry Science.*, 7 (2). pp 134-150.

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

Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D. ET De Kruif A. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*. Vol. 64, n° 3, pp706-719.

Rosato MP., Centoducati G., Santacroce MP., Iaffaldano N. 2012. Effects of lycopene on in vitro quality and lipid peroxidation in refrigerated and cryopreserved turkey spermatozoa. *British Poultry Science*, Volume 53, Number 4, pp. 545-552.

S

Sauveur, B et M. de Revires. 1988. Reproduction des volailles et production des oeufs. INRA Edition, Paris : pp449.

Senger PL 2003. Pathways to pregnancy and Parturition. (99164-6332) 2nd Ed. Pullman, Washington, USA.

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

Siudzinska, A., et Łukaszewicz, E. 2008. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *J. Appl. Poult. Res.* 17pp 101-108.

Sturkie, P.D. 1976. Avian Physiology, 3rd Edition Springer-Verlag, New York Inc p400.

Surai P., Fisinin VI. 2014. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Animal Feed Science and Technology*, 191, pp 1-15.

Surai, P.F., Cerolini, S., Wisharta, G.J., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H.C., 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian. Poult. Biol. Rev.*9 (1), pp11–23.

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

T

Tabatabaei, S. 2010.The effect of spermatozoa number of fertility rate of chicken in artificial insemination programs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9,12,pp1717-1719.

Touazi, L. Aberkane, B. Bellik, Y. Moula, N. Iguer-Ouada, M. 2018. Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*(L.) on rooster sperm motility during 4 °C short-term storage. *Vet World*, 11, pp 590-597.

W

Watson, P F.1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 62 pp483-92.

Wishart G.J. 2009.Semen Quality and Semen Storage. *Biology of Breeding Poultry* ; pp151-178.

Z

Zouari, S., Zouari, N., Fakhfakh, N., Bougatef, A., Aydi, M.A., Neffatil, M., 2010. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, pp871–880.