

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et Physiologie de la Reproduction

THÈME:

**Utilisation des plantes médicinales (*Salvia officinalis*)
dans la cryoconservation des spermatozoïdes**

Présenté par : **Melle.**Benhassaini Amina

Melle.Boualamat Rabab

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : Mme	Bendahmane Malika	(Professeur/UDL/SBA)
Examineur : Mme	Zemri Khalida	(M.C.A/UDL/SBA)
Examineur : Mme	Benabbou Amina	(M.C.B/UDL /SBA)
Membre invité : Mr	Rézigui Omar	(Docteur /ITELV/SBA)
Promoteur : Mr	Benalia Abdelkrim	(M.C.B/UDL/SBA)
Co-Promoteur : Mr	Dellal Abbas	(Docteur/UDL/SBA)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à DIEU, le tout puissant Qui nous'a tracé le chemin de notre vie et nous a accordé la volonté, la santé et la Patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire;

Nous tenons à remercier en premier lieu notre promoteur Dr.BENALIA Abdelkrim de nous avoir accompagné durant cette recherche, pour ses orientations, ses encouragements et surtout pour ses précieux conseils. Nous tenons à remercier les membres de jury d'avoir accepté d'examiner notre travail :Pr.Bendahmene ,Dr.Zemri ,Dr.Ben Abou

Nous tenons à remercier le directeur de l'ITELV Dr.Rezigui Omar pour son aide précieux et sa disponibilité.

et M.Djebbar Abdelhamid ainsi que Mme Liamani et Mlle Benmaissa Amina pour l'aide qu'ils nous ont apportés.

Nous remercions les ingénieurs des laboratoire de biologie Mme feddoul ferdaous ,Mme Alam Amina ,Mme Mami Sara,Mr.Ramaci Mohamed pour leur disponibilité.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère Gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant notre cursusUniversitaire. Finalement, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui Ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

thank you!



Dédicaces

Je remercie Dieu de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce Modeste travail à ceux qui, quels que soient

Les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect :
mon chère père KHALID*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non âmes exigence et
qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère FATIMA*

A Ma chère unique sœur : ZOULIKHA et son époux Nabil

A mes frères :

Mohammed et sa femme Fatima

Omar et sa femme Zineb

A mon adorable petit frère Abdel Eleh

A les deux princes : Moncef, Hamoudy

A la belle princesse Meriem

*A mon chère binôme « Amina benhassaini » pour son soutien moral, sa patience et sa
compréhension Au long de ce travail*

*A mes grands parents et à tous mes oncles et mes tantes, et à leur enfants ,je vous adore
tous*

A mes amis : Sabrina , Fatima

A tous mes collègues de promotion pour leur soutien

Rabab



Dédicace

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié
pour me voir réussir, à toi mon père « Youb ».*

*A maman « Fatiha » pour son amour, et qu'elle m'a toujours accordé en
témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de
mon cœur, ma vie et mon bonheur ; mes grands parents que j'adore.
A la mémoire de mon grand père que dieu lui garde dans son vaste paradis.*

*A mes sœurs, « Hadjer et son époux Mostapha. C'Het leur petit prince Amir »,
« Wahiba et son époux Taher. K », pour l'amour qu'elles me réservent
Je leurs souhaite une vie pleine du bonheur et de succès.
et mon cher unique frère « Mohamed Islem ».*

A Mon cher binôme « rabab Boualamat » et à toute sa famille

À tous mes oncles et mes tantes, et à leurs enfants, je vous adore tous,

A mes amis, Sabrina. Fatima. Bouchra. khaoula. Zina. . .

*Au nom de l'amitié qui nous réunit,
Et au nom de nos souvenirs inoubliables
A tous ceux qui me sont chers.*

Amina

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet de la supplémentation d'un dilueur de congélation (jaune d'œuf + glycérol) par différentes concentrations d'huile essentielle d'une plante médicinale (*Salvia Officinalis*) sur la viabilité et la condensation d'ADN des spermatozoïdes (SPZ) après décongélation, chez l'humain. Un seul échantillon du sperme d'un patient anonyme, répondant aux critères d'un sperme de bonne qualité, a été soumis à une cryoconservation avec un milieu de congélation (jaune d'œuf + glycérol), sans aucune supplémentation (témoin) ou avec des concentrations en huile essentiel à 0.36, 0.75 et 1.5 $\mu\text{l}/\text{mL}$ pendant trois jours avant que la qualité des paillettes soit évaluée. Après décongélation, tous les échantillons ont été maintenus à 37 ° C et les analyses (viabilité, condensation d'ADN) ont été effectuées après 5 min. Par rapport au échantillon témoin, la supplémentation en HE a montré une amélioration significative à (0.36 $\mu\text{l}/\text{ml}$) de la viabilité des SPZ après la décongélation du sperme. Concernant la condensation d'ADN spermatique; les concentrations de 0.36 et 1.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ont assuré la meilleure protection du matériel génétique des SPZ. Cependant, nous avons constaté un taux de fragmentation d'ADN élevé dans le milieu qui contient le dilueur avec une concentration de 0.75 $\mu\text{l}/\text{mL}$. La supplémentation en huile essentiel de *Salvia Officinalis* dans les dilueurs du sperme humain a permis de mieux améliorer les paramètres de la viabilité de la condensation du sperme après décongélation par rapport aux témoins. Cette procédure peut constituer une nouvelle approche dans le domaine de la cryoconservation et de la procréation médicalement assistée.

Mot clé : sperme humain, cryoconservation, *Salvia Officinalis*, dilueur, supplémentation, viabilité, fragmentation d'ADN.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effect of supplementing a freezing diluent (egg yolk + glycerol) with different concentrations of essential oil of a medicinal plant (*Salvia Officinalis*) on the viability and DNA condensation of human spermatozoa (SPZ) samples after thawing. A single semen sample from an anonymous patient which presented good quality was chosen for the cryopreservation assays in freezing medium (egg yolk + glycerol), without (control) or with essential oil at 0.36, 0.75 and 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for three days before that the quality of the straws was assessed. After thawing, all samples were kept at 37°C and the analysis (the viability and condensation of DNA) was performed after 5 min. EO supplementation showed a significant improvement at (0.36 $\mu\text{L}/\text{mL}$) of SPZ viability after sperm thawing compared to controls. Regarding the sperm DNA condensation; concentrations of 0.36 and 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ provided the best protection of SPZ genetic material. However, we found a high rate of DNA fragmentation in the medium containing the diluent with the supplemented with highest concentration of essential oil (0.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Supplementation human sperm diluent with *Salvia Officinalis* essential oil resulted in better improvement of the viability and sperm DNA condensation parameters compared to controls. This procedure may represent a new approach in the field of cryopreservation and medically assisted reproduction.

Key words: Human sperm, *Salvia Officinalis*, cryopreservation, diluent, viability, DNA condensation.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير وسط التخفيف (صفار البيض + الجلوسرين) بتركيز مختلفة من الزيت العطري لنبته طبية (*Salvia Officinalis*) على حيوية وتكثيف الحمض النووي للحيوانات المنوية بعد التجميد . تم حفظ عينة واحدة من الحيوانات المنوية من مريض مجهول ، ذات معايير جودة عالية ، بالتبريد باستخدام وسط تجميد (صفار البيض + الجلوسرين) ، دون أي مكملات (شاهد) أو بتركيز مختلفة من الزيت الأساسي للنبته المستخدمة عند 0.36 و 0.75 و 1.5 ميكرو لتر / مل بعد ثلاثة أيام من التجميد وقبل تقييم جودة السائل المنوي داخل الأنابيب المخصصة للتجميد ، تم وضع جميع العينات في حمام مائي عند 37 درجة مئوية. تم معاينة العينات بعد 5 دقائق مقارنة بالمجموعة الشاهدة، أظهرت مكملات التي تحتوي على الزيت الأساسي تحسنًا ملحوظًا عند (0.36 ميكرو لتر / مل) في قابلية بقاء الحيوانات المنوية بعد التجميد. بحيث سجلنا أفضل حماية للمادة الوراثية عند التركيز 0.36 و 1.5 ميكرو لتر / مل. ومع ذلك ، لاحظنا ارتفاع معدل تفتيت الحمض النووي في الوسط الذي يحتوي على المادة المخففة بتركيز 0.75 ميكرو لتر / مل. إضافة المكملات مع الزيت الأساسي ل(*Salvia Officinalis*) في مخففات السائل المنوي البشري حسنت معايير جدوى تكثيف الحيوانات المنوية بعد الذوبان مقارنة بالشواهد . قد يشكل هذا الإجراء نهجًا جديدًا في مجال الحفظ بالتبريد والإنجاب بمساعدة طبية.

الكلمات المفتاحية : السائل المنوي , النبتة الطبية (*salvia officinalis*) الحفظ بالتبريد , المخففات , قابلية البقاء , تكاثف الحمض النووي .

Sommaire

Remerciments

Dédicace

Liste des abréviations

Liste de figures

Liste de tableaux

Résumé

Introduction..... 1

Chapitre I : Qualité du sperme et techniques de la cryoconservation

I.Généralité3

1.Rappel anatomique sur l'appareil reproducteur mâle3

1.1.le testicule3

II.Fonction testiculaire4

1.Définition de la spermatogénèse4

1.2Les étapes de la spermatogénèse5

1.3Rendement spermato génétique6

III.Le gamète mâle ou spz7

1.la structure7

IV.Régulation endocrine de l'activité testiculaire9

1. Régulation endocrine de l'activité testiculaire.....9

2.La boucle de régulation	11
V.Exploration de la fonction de reproduction	12
1.Examen de spermogramme	12
2.Examen de spermocytogramme	14
3.Technique de la lecture et notification	14
VI.Assistance médicale à la procréation.....	16
1.Définition.....	16
2.Infertilité humain	16
2.1.définition	16
VII.Conservation du sperme Humain	17
1.Principe	17
2.les techniques de la conservation	17
2.1.Conservation à courte terme	17
2.2.La conservation à long terme	17
3.Les répercussions de la congélation des cellules	18
3.1Chocs thermiques	18
3.2 Cristallisation.....	18
3.3Stress osmotique	18
3.4Stress oxydatif.....	19
4.les dilueurs	19

Chapitre II :généralité sur les huiles essentielles et monographie sur salvia Officinalis

I.La sauge (salvia officinalis).....	23
1.Définition	23
2.classification de la plante.....	24
3.habitat.....	24
4.principau constituants de salvia officinalis	25
II.huiles essentielles	25
1.définition	25
2.fonction.....	25
3.critère de qualité	25
4.conservation des huiles essentielles	26
5.propriétés physico-chimique.....	26
6.les techniques d'extraction.....	26
7.composition chimique de l'huile essentielle de la sauge	27
8.principaux usages traditionnelle de la sauge	28
8.1.usages pharmaceutiques	28
8.2.usages cosmétologiques	28
8.3.usages alimentaires	29
8.4.la toxicologie.....	29
8.5.propriétés thérapeutiques.....	29

Chapitre III :Matériel et Méthodes

I.Objectif.....	32
II.Matériel.....	32
1.Matériel végétale et dispositif d'axtraction des huiles essentielles .	32
2.Echantillons du sperme humain.....	32
2.1.Matériel d'évaluation de la qualité du sperme	32
2.2.Milieu de rinçage et de dilution de sperme	33
2.3.Matériel de la cryoconservation	33
III.Méthodes	33
1.Protocole d'extraction	33
1.1.préparation des échantillons pour l'extraction	33
1.2.Extraction des huiles essentielles par hydro-distilation	33
2.protocole de la cryoconservation du sperme humain	34
2.1.Préparation du milieu de rinçage et dilution	34
2.2.Préparation du milieu de cryoconservation	35
2.3.Préparation de milieu de cryoconservation.....	37
2.4.L'examen du sperme à l'état frais	38
2.5.Centrifugation de sperme.....	38
2.6.Dilution de sperme	38
2.7.Remplissage des paillettes	39
2.8.Congélation du sperme	39
3.Evaluation de la qualité du sperme après décongélation	40

3.1.Décongélation	40
3.2.Evaluation de la qualité de sperme décongelé	40
4.Test statistique.....	41

Chapitre IV :Résultats et discussion

I.Résultats.....	43
1.Rendements d'huile essentielle de salvia officinalis	43
2.Caractérisation du sperme avant congélation	43
3.Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la viabilité	44
4.Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la condensation d'ADN	45
II.Discussion générale	48
Conclusion	51
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

- ABP** : Androgène Binding protein
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- AFNOR** : Association française de normalisation
- ARN** : Acide ribonucléique
- CGP** : Chromatographie en phase gazeuse
- CO₂** : Dioxyde de Carbone
- CL** : Chlore
- FSH** : Follicule Stimulating Hormone
- GNRH** : Gonadotrophine-Releasing Hormone
- HE** : Huile essentielle
- LDL** : low density lipoprotein
- LH** : hormone lutéinisante
- LTH** : Luteotrophic hormon
- LH-RH** : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
- KCl** : Chlorure de potassium
- Na** : Soduim
- OAT** : Oligoasthenoteratozoospermia
- OMS** : Organisation mondiale de la santé
- ROS** : Reactive oxygen species
- S.O* : *Salvia Officinalis*

SM : Spectrométrie

SFME : Solvent Free Microwave Extraction

SO : Stress Oxydatif

SPZ : Spermatozoïdes

T : Température

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure interne du testicule.....	4
Figure 2 : schéma représente les étapes de la spermatogenèse.....	6
Figure 3 : Production et rendement des spermatozoïdes	7
Figure 4 : structure du spermatozoïde.....	8
Figure 5 : Contrôle de l'activité testiculaire.....	10
Figure 6 : La boucle de régulation de l'activité testiculaire.....	11
Figure 7 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes selon l'OMS.....	15
Figure 8 : cryoconservation du sperme dans l'azote liquide.....	17
Figure 9 : la sauge (<i>Salvia Officinalis</i>).....	23
Figure 10 : Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> dans le monde	24
Figure 11 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile ..	27
Figure 12 : extraction d'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> par un Clevenger ®.....	34
Figure13 : Les étapes de préparation du milieu H-HTF ®.....	36
Figure14 : les étapes de préparation de plasma de jaune d'œuf ®...	37
Figure 15 : préparation des paillettes pour congélation.....	39
Figure 16 : congélation des paillettes.....	40

Figure 17 : coloration des lames au bleu d'aniline 5%	41
Figure 18 : <i>effet de supplémentation en HE de Salvia officinalis sur le paramètre de la viabilité après la cryoconservation</i>	45.
Figure 19 : effet de supplémentation en HE de <i>Salvia officinalis</i> sur le paramètre de la condensation d'ADN après la cryoconservation....	46
Figure 20 : corrélation entre concentration d'HE avec viabilité.....	47
Figure 21 : corrélation entre concentration d'HE avec condensation d'ADN.....	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l’OMS 2010.....	12
Tableau 2 : Composition de l’huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	28
Tableau3 : composition de milieu H-HTF.....	35
Tableau4 : tableau représentatif des caractéristiques macroscopiques du sperme	43
Tableau5 : tableau représentatif des caractéristiques microscopiques du sperme.....	44

Introduction

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité est définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers et non protégés (OMS, 2000).

L'évaluation de l'infertilité masculine repose sur une série d'examens. L'examen du sperme s'avère un très bon examen de base permettant de poser des diagnostics, mais aussi d'orienter le prescripteur vers des examens complémentaires. Le traitement peut faire appel à un geste sur l'appareil génital (intervention chirurgicale) ou à une assistance médicale à la procréation (Dohle et al, 2005).

La biotechnologie de la reproduction a connu un progrès important et rapide ces dernières décennies. Elle inclue des techniques comme l'insémination artificielle, la cryoconservation entre autres. Ces biotechnologies permettent dans certains cas de valoriser et d'amplifier le progrès génétique des reproducteurs les plus demandés (Mocé et Vicente., 2009), ainsi que la préservation de la biodiversité. Pour ce faire, le transport de la semence sur de longues distances ou pour de longues durées nécessite des techniques de conservation performantes que ce soit pour la conservation à l'état frais ou congelé. Après conservation, le sperme connaît cependant une faible fertilité par rapport au sperme frais (Decuadro-Hansen, 2004).

De même ; en assistance médicale à la procréation ; la cryoconservation, du sperme humain, est très utile surtout pour les personnes cancéreux traités par la chimiothérapie, la radiothérapie ou une chirurgie pouvant affecter la fertilité (Marie et al., 2018). Cependant, au cours de leur cryoconservation, les spermatozoïdes sont soumis à un tas de circonstances à savoir un stress oxydatif ; un stress osmotique ; une formation des cristaux ainsi que des agressions bactériennes au qui peuvent nuire à leur qualité après décongélation (Medeiros et al, 2002 ; Bossokpi,2002).

Dans ce sens, les huiles essentielles (HE) et leurs constituants peuvent être très efficaces contre une grande variété d'oxydants et de micro-organismes. En effet ; certaines de ces HE ont d'importants effets antioxydants et antibactériens nécessaires pour une meilleure qualité du sperme et une fertilité élevée (Elmi et al, 2017)

Dans le présent travail, notre choix s'est porté sur la sauge (*Salvia Officinalis*), qui est l'une des plantes les plus répandues dans le bassin méditerranéen et particulièrement en Algérie.

Nous avons choisi cette plante après avoir découvert qu'elle avait des propriétés Communes entre deux plantes : l'armoise blanche et le Romarin qui avaient un rôle dans la cryoconservation du

sperme, selon des études précédentes (Touazi et al, 2018 ; Ouatah et Sfacene., 2018). Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est donc l'évaluation de l'effet de la supplémentation des dilueurs de cryoconservation en huile essentielle de cette plante sur la qualité du sperme au cours du processus de la cryoconservation.

*Chapitre I : Qualité du sperme et
techniques de la cryoconservation*

I. Généralité :

1 Rappel anatomique sur l'appareil reproducteur mâle :

L'appareil reproducteur mâle assure la production et la maturation des gamètes mâles ; les spermatozoïdes (SPZ). Il comprend deux gonades ou testicules, les conduits excréteurs, les gonades annexes et le pénis (Encha-Razavi et al, 2012).

1.1 Le testicule

1.1.2 Description

Le testicule a une forme ovoïde pesant 20 grammes environ. Il a une consistance ferme rénitente, sa surface est lisse et régulière et reliée à la cavité abdominale par le cordon spermatique. C'est une glande mixte dont la sécrétion exocrine est constituée d'un fluide et de cellules (les SPZ) élaborés et sécrétés au niveau des tubes séminifères. Les cellules de Leydig qui synthétisent les androgènes sont responsables de la sécrétion endocrine du testicule (Netter, 2010).

Le testicule est entouré de plusieurs enveloppes (Menche, 2014) :

- Le scrotum qui est une fine couche cutanée parsemée de poils épais et de glandes sudoripares. Il est parcouru par une vascularisation sanguine et lymphatique bien développée ; Le dartos est une couche de fibres musculaires lisses située sous le scrotum. Le dartos et le scrotum jouent un rôle important dans la thermorégulation testiculaire ;
- La vaginale est un sac d'origine péritonéale entourant tout le testicule sauf au niveau de la zone de contact avec l'épididyme ;
- L'albuginée forme une coque conjonctive fibreuse, épaisse et inextensible limitant le tissu testiculaire. Le parenchyme testiculaire est cloisonné par des parois conjonctives issues de l'albuginée délimitant 200 à 300 lobules testiculaires (Kugler, 2014) (figure 1).

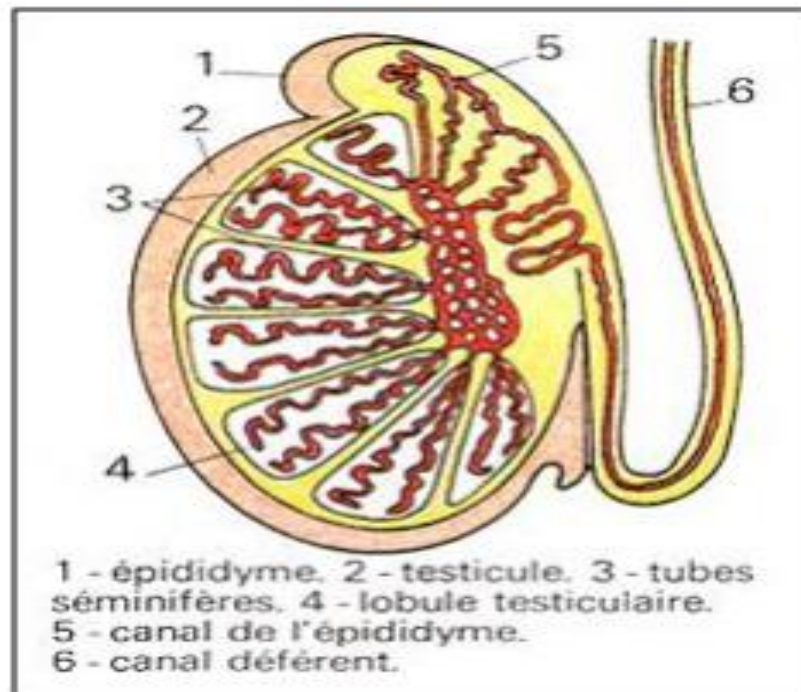


Figure 1 : Représentation schématique de la structure interne du testicule

D'après (<http://embryologie.chez-alice.fr/gametoge.html>).

II. Fonction testiculaire

1 Définition de La spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus par lequel les cellules germinales se différencient afin de donner les SPZ. Ainsi, des cellules germinales diploïdes ($2n$ chromosomes), les spermatogonies souches, génèrent des gamètes masculins haploïdes (n chromosomes), les SPZ. Ce processus de maturation des cellules germinales a lieu dans le tube séminifère.

La spermatogénèse a une durée fixe pour chacune des espèces mais variable d'une espèce à l'autre (74 jours dans l'espèce humaine, 35 jours chez la souris). D'un point de vue fonctionnel, la spermatogénèse peut être scindée en plusieurs phases impliquant des types de cellules germinales différents (Lakhdari ,2013).

1.2 Les étapes de la spermatogénèse

La spermatogénèse est une fonction exocrine du testicule qui consiste à la fabrication des SPZ, elle comprend 2 étapes : la spermatogénèse proprement dite et la spermiogénèse(figure 2).

1.2.1. La spermatogenèse proprement dite :

Elle se déroule dans les tissus séminifères et comprend 3 phases spécifiques : Phase de multiplication, d'accroissement et de maturation.

➤ La phase de multiplication

La spermatogenèse est un processus continu commençant dès la vie fœtale, il devient très actif à la puberté et se poursuit jusqu'à la sénescence. Les spermatogonies, diploïdes, se divisent par mitoses et augmentent leur nombre. Certaines de leurs cellules filles demeurent des cellules souches à la base de l'épithélium du tubule séminifère; leur chromatine est condensée. D'autres cessent de se diviser et sont repoussées vers l'apex de l'épithélium; leur chromatine est diffuse. C'est à partir de ce moment qu'est calculé le début du cycle spermatogénique. Ces cellules plus petites sont riches en ribosomes et sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques et portent maintenant le nom de spermatocytes I (Estomba et al. 2016).

➤ La phase d'accroissement

Les spermatocytes I, diploïdes, répliquent leur ADN et accroissent leur volume total. Ils subissent une phase de croissance cytoplasmique (Encha-Razavi et al. 2012).

➤ La phase de maturation

Un spermatocyte I donne naissance à quatre spermatides et font partie de la phase de maturation. Les changements morphologiques et biochimiques que subissent les spermatides pour devenir SPZ constituent la spermiogénèse. La première division méiotique (réductionnelle) des spermatocytes I se termine et sont maintenant appelés spermatocytes II, haploïdes et de taille deux fois moindre. Cette phase comprend aussi une synthèse active d'ARN dans les ribosomes. Les spermatocytes II subissent la deuxième division méiotique (méiose équationnelle) et prennent le nom de spermatides, repoussées de plus en plus vers la lumière du tubule séminifère (Netter, 2010).

1.2.2. La spermiogénèse

La structure générale des SPZ est uniforme chez toutes les espèces. On retrouve une tête qui comprend le noyau haploïde, coiffé sur sa face apicale de l'acrosome, le tout entouré d'une mince pellicule de cytoplasme; une pièce intermédiaire qui comprend la base du flagelle et l'appareillage énergétique de la cellule; une queue qui comprend surtout un flagelle assurant

la motilité du SPZ (Kugler, 2014). Le processus de spermiogénèse débute dans l'épithélium séminifère et se poursuit après que le SPZ en soit expulsé. Une bonne partie des processus de différenciation se produit une fois que les SPZ sont dans l'épididyme (Netter, 2010).

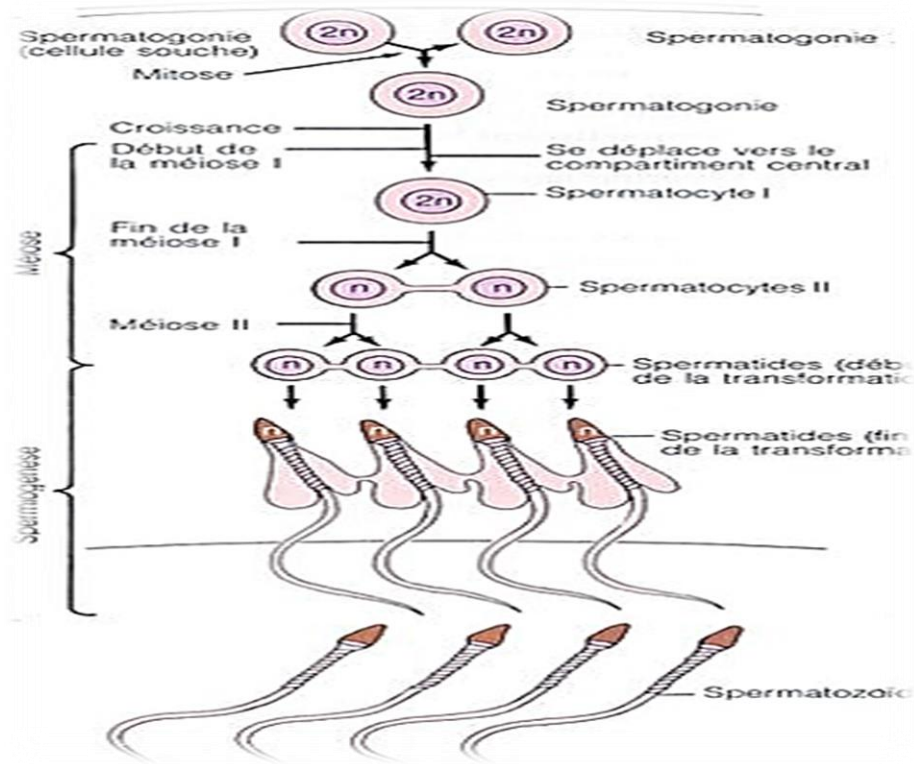


Figure 2: schéma représente les étapes de la spermatogénèse (Netter, 2010).

1.3 Rendement spermato génétique

Le rendement théorique de la spermatogénèse, c'est-à-dire le nombre de SPZ obtenus à partir d'une spermatogonie mère, dépend exclusivement du nombre de mitoses goniales. Dans l'espèce humaine, il y a trois mitoses goniales, ce qui, avec les deux divisions méiotiques, aboutissent à la formation de 32 SPZ à partir d'une gonie mère (Larsen et al, 2007)(figure3).

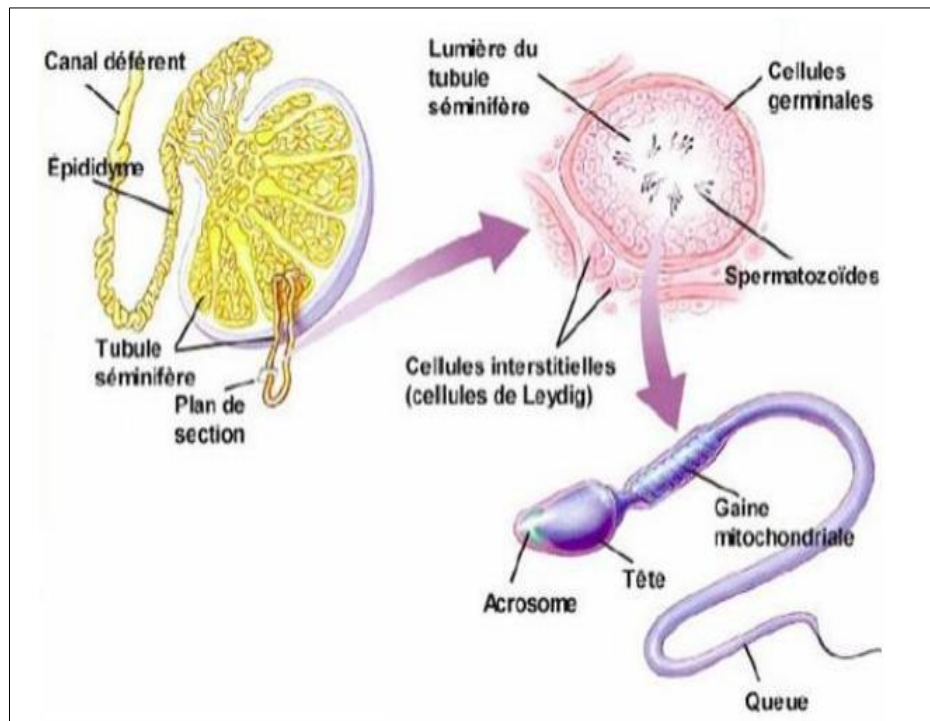


Figure 3 : Production et rendement des SPZ (Larsen et al., 2007)

III. Le gamète mâle ou SPZ

1 La structure

Le SPZ mature mesure environ 60 μm de long et est totalement enveloppé par la membrane plasmique (figure4).

- Au microscope photonique, chaque SPZ apparaît constitué d'une tête ovale recouverte d'une zone claire, l'acrosome, et d'un long flagelle renflé à sa base (pièce intermédiaire), effilé à son extrémité.
- Le microscope électronique à balayage révèle :

a. L'aplatissement de la tête ;

b. La présence d'un rétrécissement entre tête et pièce intermédiaire : le col ;

c. L'aspect annelé de la pièce intermédiaire. Les coupes ultrafines observées au microscope électronique à transmission nous permettent de préciser l'ultrastructure (figure 7) (Bommas-Ebert et al., 2008).

❖ *La tête*

Elle apparaît sous une forme ovalaire très régulière. Quelle que soit la coloration, deux zones sont distinguées :

Un moitié postérieur dense et une moitié antérieur plus pâle correspondant à l'acrosome. Sa longueur est comprise entre 4 et 5 μm et sa largeur entre 2 et 5 microns (Kugler, 2014).

❖ *Le col*

C'est la zone d'attache de la tête et du flagelle, comportant deux structures essentielles : le centriole proximal et la pièce connective (Mellal, 2010).

❖ *Le flagelle*

Il est subdivisé en deux parties : en arrière de la tête une courte portion, inférieure à 10 microns, plus épaisse avec souvent un reste cytoplasmique constituant la pièce intermédiaire et la pièce principale s'amenuise vers sa terminaison (Figure 4) (Kugler, 2014).

❖ *La pièce intermédiaire*

Elle est formée par un complexe axonémal entouré des fibres denses, puis de la gaine mitochondriale enroulée en spirale (Estomba et al. 2016).

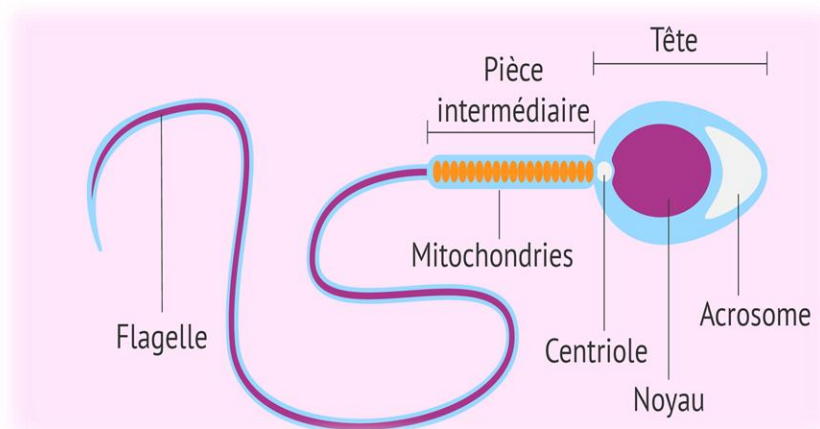


Figure4: structure du SPZ (Barberaét *al.*2018).

IV. Régulation endocrine de l'activité testiculaire

1. Régulation endocrine de l'activité testiculaire

L'installation de la puberté et le maintien de la spermatogenèse dépendent d'un contrôle hormonal hypothalamus-hypophysaire (Encha-Razavi et al., 2012).

L'hypothalamus élabore une hormone polypeptide qui est la Gonadotrophine Releasing Hormone (GnRH encore appelée LHRH). Cette hormone est véhiculée par la voie sanguine et vient agir en stimulant la libération de deux hormones glycoprotéiques la FSH et la LH (Kugler, 2014)(figure5).

○ Les gonadostimulines

Par l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure élabore trois gonadostimulines qui seront déversées dans le sang et agiront sur les gonades (Kugler, 2014) :

- **LH** agit sur les récepteurs membranaires des cellules de Leydig et stimule la sécrétion d'androgènes (testostérone en particulier) ;
- **FSH** agit sur les récepteurs membranaires des cellules de Sertoli en activant la synthèse protéique de l'Androgène Binding Protein (ABP) qui sert de transporteur aux androgènes ;
- **La prolactine** ou Luteotrophic hormon (LTH) agit sur la glande interstitielle en influençant sa réponse à LH (Menche, 2014).

○ Les androgènes

Les androgènes élaborés par les cellules de Leydig sont transportés par le sang, liés à l'ABP et agissent sur les récepteurs cytoplasmiques des cellules cibles de façon suivante :

- Chez le fœtus, ils provoquent la transformation des canaux de Wolff en conduits mâles (caractères sexuels primaires) ;
- Au moment de la naissance, ils provoquent la sexualisation de l'hypothalamus qui, chez le mâle provoquera la sécrétion basse et continue de la gonadolibérine;

- Au moment de la puberté, ils favorisent l'apparition des caractères sexuels secondaires (pilosité, mue de la voix) ;
- Chez l'adulte, ils favorisent les étapes de la spermatogenèse surtout la fin de la méiose et la spermiogénèse. Ils agissent sur l'épididyme et les glandes annexes de l'appareil uro-génital ;
- Ils contrôlent en retour l'activité hypothalamo-hypophysaire et la production de LH et de prolactine (Figure 5) (Binder et al. 2015).

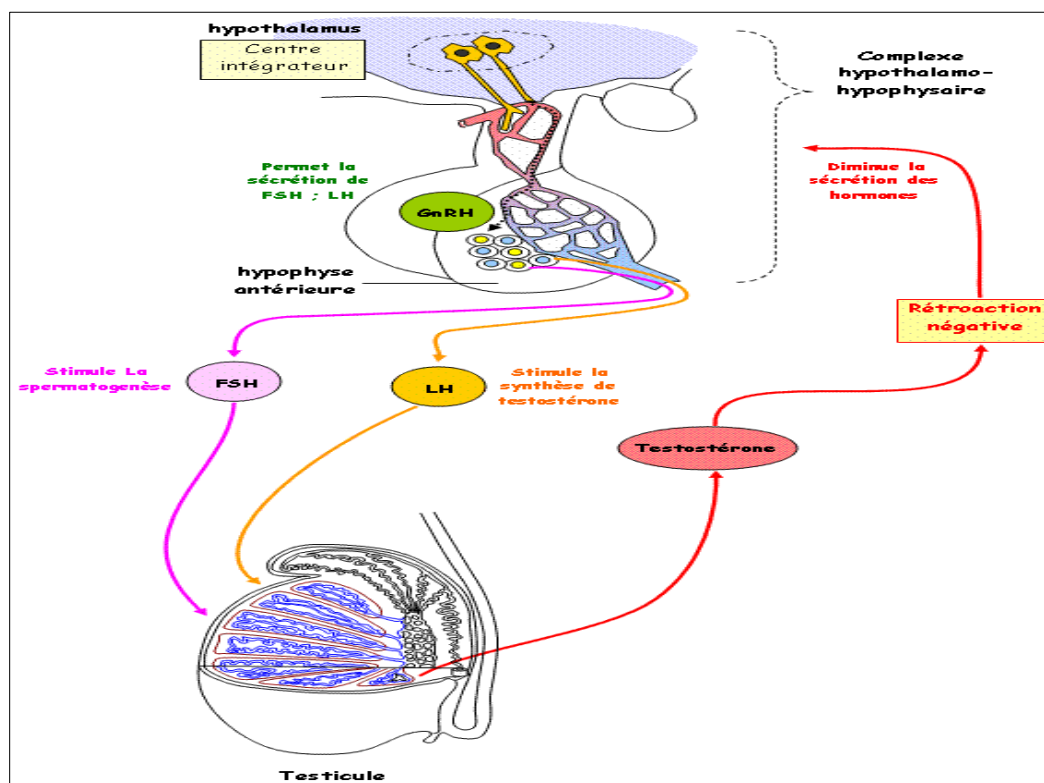


Figure 5 : Contrôle de l'activité testiculaire (Vigier, 2006).

2 La boucle de régulation

Les cellules de Sertoli élaborent une substance protéique ; l'inhibine qui freine l'activité hypophysaire surtout la sécrétion de FSH. La testostérone freine donc la sécrétion de LH. Cependant, le premier niveau où s'exerce la rétroaction négative de la testostérone est l'antéhypophyse qui en possède des récepteurs spécifiques (Boussouar et al. 2004).

Il faut noter qu'elle freine également la sécrétion de GnRH qui s'effectue au niveau des neurones hypothalamiques, on dit qu'elle exerce une rétroaction négative, également appelé rétrocontrôle (figure 09) (Wolf et al. 2008)(figure6).

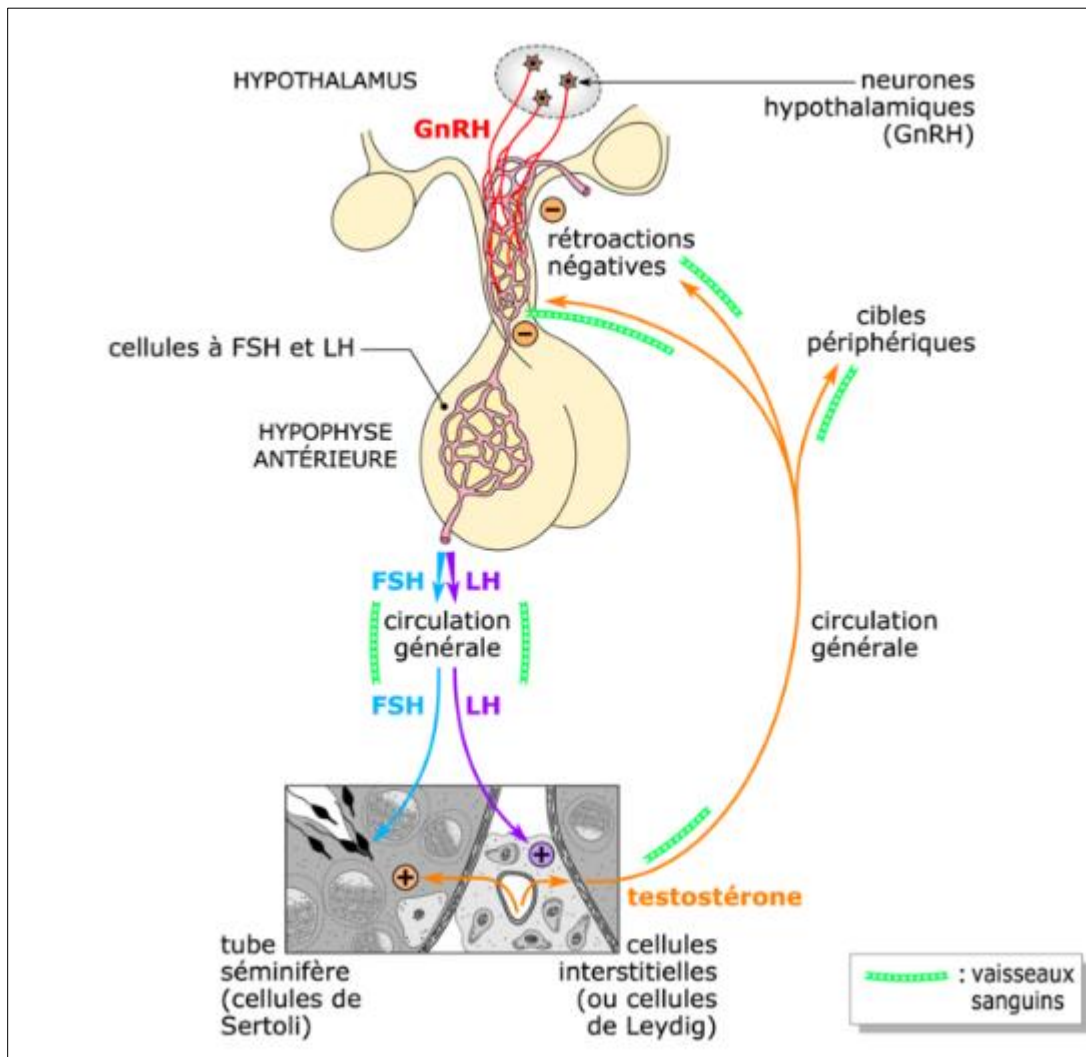


Figure 6 : La boucle de régulation de l'activité testiculaire (Boussouar et al. 2004).

V. Exploration de la fonction de reproduction :

1 Examen de spermogramme :

Il permet d'évaluer la qualité du liquide séminal et d'identifier les altérations quantitatives (azoospermie, cryptozoospermie, oligospermie) et/ou qualitatives (asthénospermie, tératospermie, nécrospermie) des SPZ (tableau 1)(LAKHDARI.N.2013)

Tableau 1. Valeurs normales du spermogramme selon les normes de l’OMS 2010.

Paramètres	Valeurs normales	Différentes anomalies observées (en dessous des valeurs normales)
Volume	>1,5ml	Hypospermie
Numération	>15. 10 ⁶ /ml	- Oligospermie modérée ($1 < N < 15 \cdot 10^6$) - Oligospermie sévère ($0 < N < 1 \cdot 10^6$) - Cryptozoospermie (présence de SPZ uniquement sur culot de centrifugation) - Azoospermie (absence de SPZ sur culot de centrifugation), $N = 0 \cdot 10^6 / m$
Mobilité progressive	>32%	Asthénospermie
Vitalité	>58%	Nécrospermie
Formes normales	>4%	Tératospermie

❖ *Le volume*

Une Hypospermie (volume d'éjaculat inférieur à 2 ml) est due à un obstacle dans les voies excrétrices et/ou dysfonctionnent des glandes qui produit le sperme, soit à une faible sécrétion d'androgènes (LAKHDARI.N. 2013).

❖ *Le pH*

La valeur normale du pH séminal est entre 7,2 et 8. Un pH acide ($\text{pH} < 7,2$) peut évoquer une atteinte des vésicules séminales et/ou des anses épидидymo -différentielles alors qu'un pH alcalin ($\text{pH} > 8$) peut évoquer une atteinte prostatique (LAKHDARI.N. 2013).

❖ *La numération*

La normospermie est définie par une numération de SPZ entre 15-200 millions/ml. L'absence totale de SPZ dans l'éjaculat définit l'azoospermie. L'oligozoospermie est équivalente à une numération inférieure à 15 millions/ml. Alors qu'un taux de SPZ supérieur à 200 millions/ml est appelé polyspermie (LAKHDARI.N. 2013).

❖ *La mobilité*

La mobilité est l'un des paramètres les plus importants pour l'appréciation du pouvoir fécondant du sperme. Ces analyses fines du mouvement se font de façon automatisée (vélocimétrie). Un éjaculat normal doit contenir au moins 32% de SPZ avec une mobilité normale. Ainsi, l'asthénospermie est définie par un pourcentage < 20 à 30% de SPZ avec mobilité normale (LAKHDARI.N. 2013).

❖ *La vitalité*

Dans le sperme normal, on observe plus de 58 % de formes vivantes. La présence d'une proportion importante de SPZ morts dans le sperme éjaculé (nécrospermie) est le plus souvent idiopathique (LAKHDARI.N. 2013).

2 Examen de Spermocytogramme

La grande variabilité de la morphologie des SPZ humains rend l'appréciation des anomalies morphologiques significatives complexe. Il correspond à l'analyse cytologique et morphologique des SPZ au microscope optique, et permet d'évaluer selon (Andersen et al. 2000) :

- la morphologie des SPZ.
- Le pourcentage des formes atypiques.

3 Technique de lecture et notification

Les colorations utilisées sont soit la coloration de Papanicolaou modifiée pour les SPZ, soit la coloration de Shorr.

La coloration de Papanicolaou est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires d'andrologie. Elle colore l'acrosome, la région post-acrosomique, la pièce intermédiaire et le flagelle et peut être même utilisée pour des spermatozoïdes très visqueux.

La coloration de Shorr est simple à réaliser et suffisante pour une évaluation de routine de la morphologie des SPZ. Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 SPZ au minimum doivent être évalués et classés selon deux méthodes ; la classification de David (1975) et celle de l'OMS (2010) (figure 7) :

Classification de DAVID (1975)

Elle permet de répartir les anomalies morphologiques des SPZ en 13 classes :

- 7 anomalies de la tête: allongée, amincie, microcéphalie, macrocéphalie, irrégulière, dupliquée et en lyse.
- 2 anomalies de la pièce intermédiaire: restes cytoplasmiques et angulations.
- 4 anomalies du flagelle: absent, court, enroulé et double.

Classification de l'OMS (2010)

Elle décrit deux anomalies supplémentaires à celle de DAVID (1975) qui sont une anomalie au niveau de la pièce intermédiaire et l'autre au niveau du flagelle (figure 7) (FIVNAT, 2000).

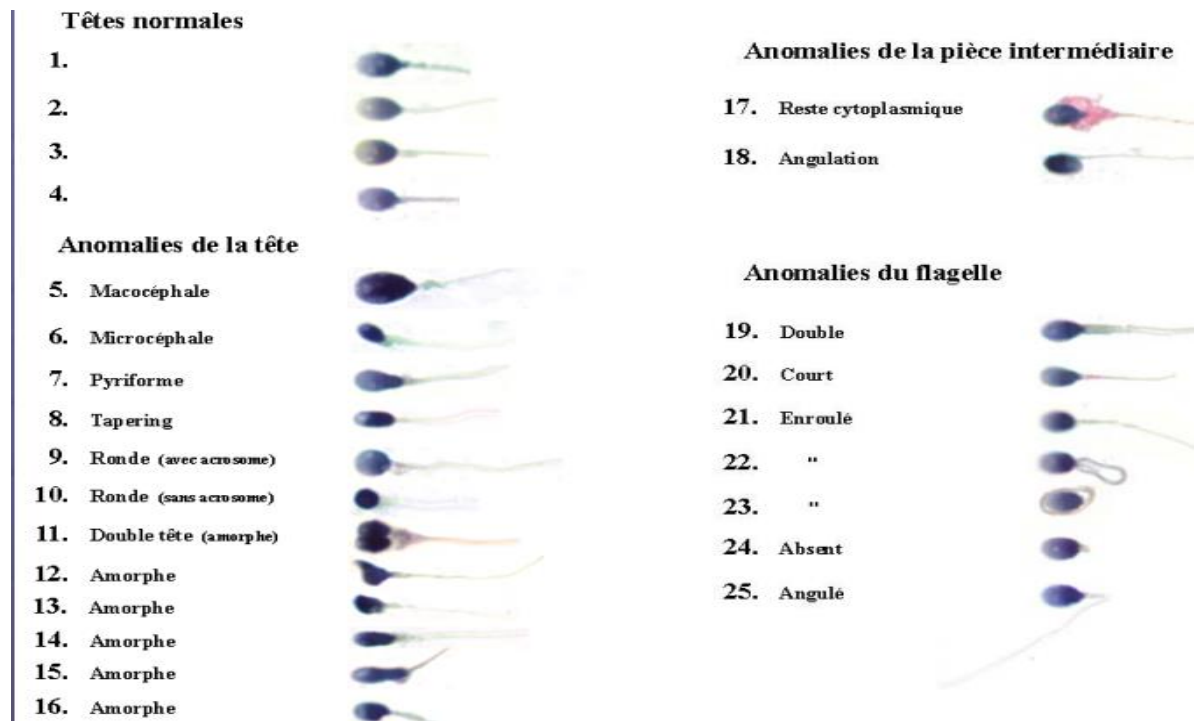


Figure 7: Classification des anomalies morphologiques des SPZ selon l'OMS (FIVNAT, 2000)

VI. Assistance médicale à la procréation

1. Définition

L'assistance médicale à la procréation est l'ensemble des techniques médicales ayant pour but d'aider un couple à concevoir un enfant. Cette médecine de la reproduction artificielle, très complexe, ne peut raisonnablement être pratiquée sans s'interroger sur les différents enjeux médicaux et éthiques qui lui sont associés (MATMAT, 2015).

2. Infertilité humaine

2.1 Définition

L'infertilité est définie par l'OMS par l'absence de grossesse au bout d'un an ou plus de rapports réguliers non protégés chez les couples en âge de procréer (femme âgées de 18 à 45 ans). Après 2 ans, 5 % des couples sont dit infertiles avec un taux de grossesse spontané proche de zéro (Poncelet et al., 2011).

Chez la femme, la première cause d'infertilité (32 %) est représentée par les troubles ovulatoires, la seconde par des anomalies tubaires (26 %). Ces deux causes, représentant à elles seules plus de 50 % des infertilités féminines, devront faire l'objet d'une recherche systématique (BERTRAND, 2003).

Chez l'homme, la majeure partie des infertilités est due à une anomalie des SPZ. Il peut s'agir de leur nombre, de leur mobilité ou bien encore de leur morphologie mais le plus souvent, ce sont ces trois paramètres qui sont touchés: l'oligoasthéo-tératozoospennie (OAT) représente la première cause d'infertilité masculine (21% des cas) (BERTRAND, 2003).

VII. Conservation du sperme humain

1. Principe

Toutes les méthodes de conservation du sperme sont basées sur le même principe limiter voir arrêter le métabolisme des SPZ afin de prolonger leur durée de vie. La mise en œuvre de la conservation du sperme à différentes températures est relativement simple, après avoir effectué l'évaluation rapide (couleur, volume, concentration, motilité), le sperme est alors diluée, puis conservée à l'état liquide ou congelée. Par ailleurs, le choix du dilueur utilisé présente l'étape cruciale pour réussir la conservation (ELBARRAK, 2016).

2. Les techniques de la conservation

La conservation du sperme joue un rôle important dans le domaine de la reproduction. Les SPZ peuvent ainsi être utilisés aux moments voulus pour l'insémination artificielle. De plus, la conservation permet de distribuer le sperme à travers le monde et un éjaculat peut être divisé en plusieurs petites doses pour inséminer des femelles (Vishwanath et Shannon, 2000 ; Medeiros et al. 2002).

2.1 Conservation a courte terme

Pour éviter la détérioration de la qualité du sperme, la température est abaissée jusqu'à 4°C, ainsi le métabolisme des SPZ est réduit, ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et la conservation de leurs mobilité restaurée après réchauffement (O'hara et al, 2010).

2.2 La conservation à long terme

Cette technique se définit comme l'utilisation de très basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intact leur structure et leurs fonctions. La température est abaissée jusqu'à -196°C dans l'azote liquide (Figure 8) (Mazur., 1984).



Figure 8 : cryoconservation du sperme dans l'azote liquide (Bozaillacq, 2012).

3. Les répercussions de la congélation des cellules

La cryoconservation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures, souvent dans l'azote liquide à -196°C . À cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (Bakhachet *al.* 2007). Cette méthode de conservation des gamètes mâles facilite la dispersion du bagage génétique d'animaux supérieurs, notamment par l'insémination artificielle. Elle permet également la création de réserves du sperme chez les espèces en voie de disparition ou encore la conservation des gènes d'un sujet de valeur. Les techniques de congélation détériorent la qualité du sperme (Batista *et al.*, 2009).

Les stress responsables des dommages causés aux cellules et plus précisément aux SPZ sont principalement provoqués par les chocs de température, les cristallisations et les stress osmotiques (Watson, 2000). Les processus de congélation du sperme visent à minimiser la perte de motilité et de viabilité des SPZ (Doradoet *al.*, 2010).

3.1 Chocs thermiques

On appelle *chocs thermiques* les changements rapides de température allant essentiellement de 35 à 15°C et de 0 à -80°C (Bakhachet *al.* 2007). Ces variations de température créent des changements de l'arrangement des constituants lipidiques membranaires et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du SPZ (Medeiros *et al.* 2002; Bakhachet *al.* 2007). Il s'ensuit une perte de motilité et de perméabilité sélective de la membrane au calcium (Medeiros *et al.* 2002). Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est très élevée, la motilité et la fertilité sont réduites (Colin *et al.*, 2000). Il en va de même pour la viabilité du SPZ (Simpson et White, 1986). Le degré de dommage structurel dépend de la température et de la constitution en lipides des membranes (Bailey *et al.* 2003).

3.2 Cristallisation

L'eau est essentielle à la structure et au bon fonctionnement des cellules vivantes. Le phénomène de cristallisation se produit lors du passage de l'eau à l'état solide. La formation de glace extracellulaire serait activatrice du processus de cristallisation intracellulaire (Mazur, 1965; Toner, 1993). La présence de cristaux dans le milieu extracellulaire crée un gradient de concentration qui favorise la sortie d'eau de la cellule au profit de l'entrée des solutés. À basse température, la membrane cellulaire modifie son coefficient de perméabilité et se comporte comme une membrane semi-perméable (Andersen, 1969; Mazur, 1984). De plus, la vitesse de refroidissement du sperme détermine si la formation des cristaux de glace sera intra ou extracellulaire lors de la congélation. La cristallisation extracellulaire modifie l'environnement chimique des cellules et génère des contraintes mécaniques qui vont déformer les cellules (Bakhachet *al.* 2007). D'autre part, la cristallisation intracellulaire combinée à la déshydratation de la cellule peut former des lésions aux membranes des organelles intracellulaires (Bakhachet *al.* 2007).

3.3 Stress osmotique

Au cours de la congélation des SPZ, la formation de cristaux extracellulaires augmente l'osmolarité de l'eau intracellulaire et provoque sa sortie et la déshydratation de la cellule.

Les cryoprotectants sont très importants pour empêcher la formation de cristaux extracellulaires (Medeiros *et al.* 2002). Le cryoprotectant le plus utilisé pour le sperme de mammifère est le glycérol. Durant le processus de congélation, l'ajout de cryoprotectants au diluant du sperme crée un stress osmotique plus ou moins important selon sa perméabilité. Les dommages cellulaires dépendent alors des éléments constitutifs de la membrane, tels le ratio cholestérol / phospholipides, le degré de saturation de la chaîne hydrocarbonée et le ratio protéines / phospholipides (Parks, 1997). La concentration finale de cryoprotectants dans un médium détermine son effet sur la cellule. Les cellules exposées à des concentrations élevées de cryoprotectants subiront une déshydratation et une perte de volume intense. On appelle limite de tolérance osmotique le degré auquel la cellule peut maintenir sa viabilité malgré les variations de volumes cellulaires causées par les stress osmotiques (Bever-Gilmore, 1998).

3.4 Stress oxydatif

Le stress oxydatif (SO) est un déséquilibre dans la balance métabolique cellulaire durant lequel il y a production des molécules appelées radicaux libres. Ces molécules sont composées d'oxygène, initialement inerte et indispensable aux processus énergétiques des SPZ, et sont des molécules toxiques conduisant à la formation des radicaux libre appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ROS) (Bossokpi., 2002).

Une augmentation de la quantité des radicaux libres et/ou une diminution des composés antioxydants sont responsables du SO. Les SPZ se défendent contre ce stress (Ben Ali et al. 2012) et se protègent de l'effet néfaste des ROS grâce aux enzymes anti oxydantes présentes dans leur cytoplasme (Lusignan.,2011). Il existe de même des antioxydants synthétiques tels que les médicaments, la Vitamine E et C qui peuvent protéger contre le SO (Gülçin., 2012) comme il existe des antioxydants naturels tels que les HE et les polyphénols (Mighri et al, 2010).

4. Les dilueurs

Les dilueurs de sperme sont des solutions servant à augmenter le volume d'un éjaculat pour l'amener à la concentration de conservation souhaitée. Afin d'être efficace, le dilueur doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des SPZ (glucose ou fructose), conserver un pH et une osmolarité physiologique (Na Cl, KCl), empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et faciliter l'ajout d'agent cryoprotecteur (Gadea, 2003).

Depuis les 50 dernières années, les dilueurs à base de jaune d'œuf et de lait de vache sont les plus répandus pour la conservation des semences d'animaux d'élevage, frais ou congelées (Iritani et Nishikawa, 1961). Cependant, le mécanisme par lequel le jaune d'œuf et le lait protègent les SPZ pendant la conservation reste très peu connu (Maxwell et Salamon, 1993).

4.1 Les dilueurs à base de lait

Le lait est un milieu biologique de composition complexe composé de protéines, sels, glucides, lipides, vitamines, etc. (Druart, 2009). Le lait entier ou écrémé est classiquement utilisé comme milieu de conservation de la semence de bélier.

Le lait de vache écrémé est, parmi d'autres, le plus utilisé pour la conservation du sperme. Il doit être chauffé à la température de 95° C, pendant 10 min, afin d'inactiver la lacténine présente dans la fraction protéique car cette dernière possède des radicaux libres qui ont un effet toxique sur les SPZ (Druart, 2009). Le lait est un milieu complexe riche en protéines et en glucides. La fraction protéique joue un rôle tampon contre des modifications du pH et assure une chélation des métaux lourds. En effet, des métaux comme le fer catalysent les réactions oxydatives et favorisent la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Le degré élevé d'insaturation des lipides membranaires des SPZ les rend particulièrement sensibles à l'oxydation. Sous réserve que son activité persiste après chauffage du lait, la lactoferrine, une protéine proche de la transferrine et présente en grande quantité dans le lait, pourrait protéger les SPZ de l'oxydation par chélation du fer (Jones, 1969).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation du lait améliore la qualité du SPZ chez le bélier soit à l'état fraîche ou bien congelée (Maxwell and Salamon, 1993; Paulenz et al., 2002; Anel et al., 2006; Bergeron et al., 2007 ; Kasimanickam et al., 2011; Kulaksiz et al., 2012).

4.2 Les dilueurs à base de jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est un agent protecteur qui ne pénètre pas dans la cellule. Il protège les SPZ lors du refroidissement et durant la congélation (De Leeuw, 1993). Le jaune d'œuf est ajouté aux dilueurs utilisés pour conserver les SPZ du bélier. Il permet de conserver la semence ovine à 4°C et 15°C avec une fertilité variable, et présente un effet préservateur bien

connu sur la motilité et le métabolisme des SPZ (Maxwell et Salamon, 1993 ; Moussa et al. 2002 ; Gil et al. 2003).

Le jaune d'œuf est composé d'eau, de lipides, de protéines, de glucides, de minéraux et de vitamines (Powrie et al. 1986). Plusieurs données attestent que la fraction de lipoprotéines de faible densité est le constituant du jaune d'œuf qui protège les SPZ durant la cryoconservation (Amirat et al. 2004). Ainsi, des LDL isolés à partir du jaune d'œuf protègent aussi efficacement les SPZ que le jaune d'œuf entier lors du refroidissement et de la congélation (Moussa et al. 2002).

4.3 Les dilueurs commerciaux (synthétiques)

Plusieurs dilueurs commerciaux sont disponibles sur le marché pour la conservation des SPZ de différentes espèces. Ces dilueurs contiennent un agent protecteur d'origine animale (jaune d'œuf) ou végétale (soja lécithine) et ils peuvent être utilisés pour la conservation des SPZ en milieu liquide et/ou congelé (Sariozkan et al. 2010). La lécithine a un effet émulsifiant et permet de maintenir un niveau de toxicité bas pour les cellules. Il a été démontré que grâce à son apport en phospholipides, la lécithine de soja était aussi efficace que le jaune d'œuf pour préserver les semences de chien contre le choc au froid induit pendant la cryoconservation (Beccaglia et al., 2009).

*Chapitre II: généralité sur les huiles essentielles
et monographie sur *Salvia officinalis**

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement comme aliment et aussi pour traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique. Alors que le choix des plantes est basé d'une part sur leurs richesses en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes...) tout en sachant que ces derniers sont produits exclusivement par les plantes et d'autre part sur leur usage traditionnel connu et fréquent chez nos populations (**Labraouiet al. 2017**).

Parmi les plantes que les études ont abordées : la sauge (*Salvia Officinalis*)(figure 1).

I. La sauge : (*Salvia Officinalis*)

1. Définition

Salvia officinalis, la Sauge officinale est aussi connue sous le nom de Théd'Europe, de Grande sauge ou encore Herbe sacrée.

La sauge est un sous-arbrisseau buissonnant, à rameaux dressés. Elle affectionne les sols légers et perméables et une exposition ensoleillée. Le feuillage est persistant, gris-vert, dégageant une forte odeur. Les feuilles sont lancéolées et oblongues. Les fleurs sont bleues violacées, groupées par trois, elles forment des inflorescences en épis mesurant jusqu'à 30 cm de haut (**Clementine ,2018**)(figure9).



Figure 9 : *Salvia officinalis* (wikimedia, 2017)

2. Classification de la plante :

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Salvia*

Espèce : *Officinalis*. (Belabbas. H et al.2019)

3. Habitat

La sauge officinale est originaire du pourtour du bassin méditerranéen. Elle pousse dans les zones tempérées; son habitat type se situe dans les pelouses basophiles méso-méditerranéennes, méso-xérophiles.

Aire de répartition: introduite d'Asie occidentale Les espèces *Salvia* représentent un groupe d'espèces cosmopolites, qui montrent une gamme remarquable de variation (Pistelli, 2006). Ce genre est distribué dans trois régions principales dans le monde: 530 espèces à l'Amérique centrale et latine, 250 espèces en Asie centrale et en régions méditerranéennes, 30 en Afrique du Sud et 90 espèces en Asie de l'Est (figure 10) (Walker *et al*, 2004).

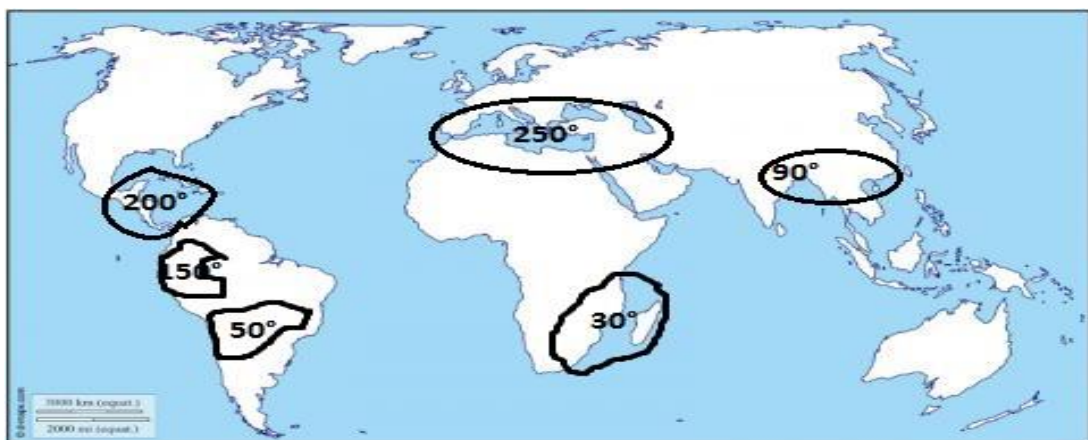


Figure 10 : Répartition géographique du genre *Salvia* dans le monde (Walker *et al*. 2004).

4. Principaux constituants de Salvia Officinalis

- Huile essentielle ;
- Composés phénoliques dont l'acide rosmarinique
- Tanins et flavonoïdes : Riche en œstrogènes (hormones féminines)
- Salvène (Teuscher et al, 2005)

II. Huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, parfumées, à la consistance huileuse, produits par le métabolisme des plantes. Elles se forment avec l'aide de l'énergie solaire qui agit sur les cellules sécrétoires des plantes. La plante retient l'huile essentielle dans une minuscule cavité glandulaire qui s'ouvre, par exemple, lorsque la plante est soumise à la chaleur ou à la lumière intense. Les huiles essentielles sont présentes dans différents parties des plantes : dans les fleurs ou elles ont un effet sédatif et relaxant ; dans l'écorce, les bois, les résines, les exsudats ou elles ont un effet réchauffant ; dans les racines, les fruits (Toninoli & Meglioli, 2013).

2. Fonction

La fonction exacte de l'essence pour la plante est encore mal connue (Toninoli & Meglioli, 2013), mais elle semble jouer un rôle important dans la fabrication de produits alimentaires et pharmaceutiques et de cosmétiques.

Les essences jouent aussi un rôle pour la plante elle-même. On estime que certains de leurs composants seraient des messagers internes ou encore des intermédiaires du métabolisme de la plante. Enfin, les essences pourraient être des sources d'énergie lorsque l'activité de photosynthèse n'est plus suffisante (Figueredo et al. 2007).

3. Critères de qualité

Selon les recommandations françaises (2008), pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, présentées des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon satisfaisante.

Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HE sont définies sur le plan français par des normes établies par l'AFNOR, élaborées par une commission spécifique. Ces normes sont établies en étroite collaboration avec les producteurs ainsi que les importateurs et sont le fruit d'un échange entre experts (Toninoli&Meglioli, 2013).

4. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons sombres bien fermés, à l'abri de la lumière et de la chaleur. Après ouverture, elles doivent être tenues éloignées des enfants. Contrôler l'année de production et /ou la date limite à partir de l'ouverture du flacon (Toninoli&Meglioli, 2013).

5. Propriétés physico-chimique

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bruneton, 1993), Les principales caractéristiques sont :

- Aspect liquides à température ambiante
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (zabeirou et hachimou ,2005).

6. Les Techniques d'extraction

Il existe différentes méthodes d'extraction utilisées pour obtenir de précieuses huiles essentielles naturelles :

- La distillation par entraînement à la vapeur
- L'extraction par pression à froid ou expression

- L'extraction au CO2 supercritique
- L'extraction par solvant
- Hydrodistillation par micro- ondes sous vide
- Extraction par hydrodistillation Clevenger (**figure 11**).

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité (**FIGUEREDO, 2007**).

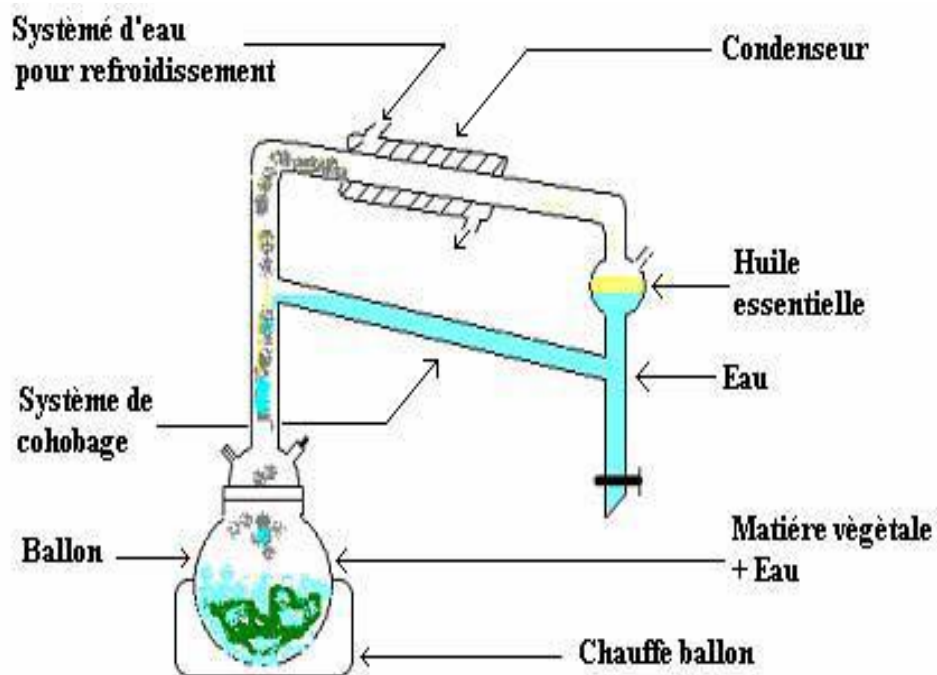


Figure 11 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile ((FIGUEREDO, 2007)

7. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

La composition chimique de l'huile essentielle de la sauge a été déterminée par la méthode chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM)(**tableau 2**).

Tableau 2 : Composition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* (Wolter, 2007)

hydrocarbures terpéniques		Cétones	
Myrcène	0,3 à 3%	Camphre	4,1 à 27,5%
Limonène	trace à 7,6%	a-thujone	1,5 à 44,2%
Humulène	trace à 18,9%	P-thujone	1 à 36,7%
a-pinène	1,7 à 13,1%	Ester	
P-pinène	0,5 à 17,9%	Acetate de bornyl	0,1 à 3,5%
Camphène	1,1 à 10,3%	Alcools	
P-caryophyllène	trace à 9,4%	Linalol	trace à 1,8%
p-cymène	trace à 1,1%	Bornéol	0,7 à 6,2%
		Viridiflorol	0 à 9,9%
		Autres	
		1,8- cinéole	0,7 à 20,8%

8. Principaux usages traditionnelle de la sauge

8.1. Usages pharmaceutiques:

Les sauges ont été employées comme des plantes à propriétés médicinales salutaires pendant des milléniums (**Radulescu et al, 2004**).

La sauge était un composant fréquent des mélanges de tisanes, recommandés pour les

Patients tuberculeux (**Dulinget al, 2007**).

L'huile essentielle de la sauge est encore utilisée en condiments d'assaisonnement, viandes traitées et liqueurs. Outre ces utilisations, les feuilles de la sauge (*S. officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antifongique, antivirale et astringente (**Djerroumi&Nacef, 2004**).

- **8.2. Usages cosmétologiques**

Les espèces *Salvia* ont un grand intérêt en cosmétologie, dont les extraits de *S. Officinalis* et *S. lavandula efolia* sont largement introduits dans les produits de beauté et les parfums. La sauge est peut être utilisée comme compresse ou infusion ou même dans les préparations des masques de visage et leurs crèmes sont souvent appliquées sur des blessures froides près de bouches (**Radulescu et al, 2004**).

- **8.3. Usages alimentaires**

Au Mexique et en Amérique latine, les graines de quelques espèces de sauge sont intensivement employées par les Américains indigènes comme source de nourriture et aussi pour préparer ses boissons. La découverte des antioxydants a augmenté l'usage des extraits de sauge officinale connue par son activité antioxydant élevée. La Saugue officinale est riche en huiles essentielles que l'on extrait par distillation, vu ses propriétés importantes, elle est l'une des plantes les plus utilisées (**Radulescu et al, 2004**).

- **8.4. La toxicologie**

Généralement, il n'y a pas de rapports sur les effets secondaires négatifs associés à *Salvia Officinalis*. Malgré leur utilisation pendant de nombreux siècles. L'utilisation normale de la sauge est très sûre ; cependant, il pourrait y avoir un effet négatif sur l'utilisation de *S.officinalis* en quantité excessive, ce qui peut être causé par le contenu élevé de la thuyone (**Hamidpour, et al, 2014**).

La thuyone est une molécule contenue dans plusieurs plantes comme le thuya duquel est dérivée son nom), le genévrier, la sauge. Elle compose 50% dans huiles essentielles de l'absinthe (**Tildesley, et al.2003**).

- **8.5. Propriétés thérapeutiques**

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie: *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie «guérir». Sa saveur est chaude, amère et astringente, elle agit contre les maux de gorge, les troubles de la digestion, elle est stimulante, tonique et stomachique. La sauge possède aussi à divers degrés des propriétés antispasmodiques, fébrifuges, antisudorales et emménagogues

(action bénéfique sur les menstruations) (**Duke et al. 2002**). L'huile essentielle de la sauge officinale est neurotoxique, pouvant provoquer des crises nerveuses rappelant l'épilepsie, ainsi que des vomissements. Le thujone et le camphre en sont responsables. Elle est par ailleurs bactéricide et elle est à éviter lors de la grossesse (risque de fausse couche) ou de l'allaitement (**Jean-Michel, 2012**).

Partie expérimentale

*Chapitre III : Matériel et
méthodes*

I. Objectif

L'objectif de cette étude expérimentale est de tester l'effet de l'huile essentielle de *Salvia Officinalis* à différentes concentrations ajoutée au milieu de cryoconservation sur la qualité du sperme humain cryoconservé. En fonction des produits et du matériel disponible au niveau de notre laboratoire, nous avons choisi d'évaluer deux critères qualitatifs : la viabilité et la condensation d'ADN des SPZ.

II. Matériel

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de biologie de développement à la faculté des Science de Nature et de la vie de l'Université de sidi bel abbés.

II.1 Matériel végétal et dispositif d'extraction des huiles essentielles

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (feuilles, tiges, fleurs) de la sauge (*Salvia officinalis* L.), une espèce de plante de la famille de lamiaceae « *Salvia officinalis* ». Les échantillons de la sauge ont été récoltés pendant la période de la floraison, dans le site de l'Université de Djilali liabes (Ex-ITMA) Sidi Bel Abbès, au mois d'avril. L'identification est effectuée par un botaniste au laboratoire d'écologie de l'université de sidi bel Abbès.

Un appareil d'extraction (Clevenger), un mixeur, un ballon en verre à fond rond, de l'eau distillée et des petits flacons pour la récupération et la conservation d'huile sont utilisés dans cette première partie de l'étude.

II.2 Echantillons du sperme humain

Nous avons apporté des échantillons du sperme humain à partir d'un laboratoire privé d'analyses médicales. la durée entre le récolte du sperme et arrivage au notre laboratoire pour la manipulation été 30min. Nous assurons que l'identité des patients n'était pas dévoilée lors de la réception des échantillons.

II.2.1 Matériel d'évaluation de la qualité sperme

Il est constitué de microscope optique, une cellule de Thoma, des lames, des lamelles et des micropipettes.

II.2.2 Milieu de rinçage et de dilution du sperme

Le milieu (H-HTF) est utilisé pour le rinçage des échantillons du sperme. Il est composé d'eau physiologique NaCl 0.9%, de KCL, de sulfate de magnésium (MgSo4), de phosphate de mono-potassium(KH2PO4), de bicarbonate de Sodium (NaHCO3), du glucose, de pénicilline, du rouge de phénol et de BSA(albumine de sérum bovine).

Le milieu de dilution est une solution saline concentrée composée d'un mélange de glycérol à 7%, et de plasma de jaune d'œuf à 20%. C'est un dilueur indiqué pour la préparation des doses de semence fraîche (+4°C) ou destinées à la congélation et la cryoconservation (-196°C), auquel sont ajoutées, déférentes concentrations des huiles essentielles de *Salvia Officinalis*.

II.2.3 Matériel de la cryoconservation

Le matériel utilisé pour la cryoconservation est constitué d'une cuve d'azote liquide (-196°), des paillettes de 0.25mL, une pipetes de 250 µL et de l'alcool polyvinylique.

III. Méthodes

III.1 Protocole d'extraction

III.1.1 Préparation des échantillons pour l'extraction

Après leur récolte, les échantillons ont été triés, distribués sur du papier et séchés dans un espace bien aéré à l'abri du soleil. Les feuilles et les tiges séchées sont coupées en petits morceaux, broyées et ensuite conservées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

III.1.2 1.2 Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation

Les feuilles et les tiges ont été nettoyées et débarrassées de tous éléments étrangers. L'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L a été effectuée à l'aide

d'un hydro -distillateur de type Clevenger (Figure 12) (Duruet *al.*, 2003). Cela consiste à introduire 50g de la poudre dans un ballon à fond rond en verre contenant 500 ml de l'eau



distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 heures à l'aide d'un chauffe-ballon. L'huile essentielle obtenue a été stockée dans des flacons en verre entourés du papier aluminium. La conservation de cette dernière s'est faite à 4°C jusqu'à l'utilisation (Gardeli *et al.* 2008).

Figure12 : extraction d'huile essentielle de *Salvia officinalis* par un Clevenger ®

III.2 Protocole de la cryoconservation du sperme humain

III.2.1 Préparation du milieu de rinçage et dilution

III.2.1.1 Préparation de milieu de rinçage

Etant néfaste pour les SPZ à long terme, le plasma séminal doit être éliminé, avant que les échantillons soient rincés. Pour le rinçage du sperme, nous avons utilisé le milieu de fluide tubaire humain (H-HTF). Ce milieu est préparé selon le protocole de (Patrick Quinn. *et al.* 1985). Dans notre milieu, les quantités des ingrédients utilisés ont été mesurées dans une balance de précision seulement pour la préparation d'un volume de H-HTF 500 ml (Figure 13). Tous les ingrédients ont été mélangés dans un bécher stérile et placé par la suite dans un agitateur magnétique pour qu'ils soient remués pendant un

certain temps jusqu'à le dissout complet de tous les constituants. Le milieu est ensuite mis dans une étuve réglée à 37°C pendant 10 min avant qu'il soit utilisé. L'ajout des constituants suit leur ordre d'apparition dans le tableau ci-dessous.

Tableau03 : composition de milieu H-HTF

Composant	Quantité
NaCl 0.9%	500ml
KCl	0,1748mg
MgSo4	0,0246mg
KH2PO4	0,0252mg
NaHCO3	1,05mg
Glucose	0,25mg
Pénicilline	0,0375mg
Rouge de phénol	200µl
BSA (albumine de sérum bovin)	0,12mg

III.2.2 Préparation du milieu de Cryoconservation

Le milieu de dilution que nous avons préparé est composé de 7% de glycérol avec 20% de plasma du jaune d'œuf. Préparé dans l'eau physiologique. Le glycérol est utilisé pour améliorer l'aptitude à la fécondation des spermatozoïdes fragilisés ou endommagés pendant le processus de congélation, alors que le jaune d'œuf était ajouté dans le but d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ceci en fournissant un pouvoir tampon et des propriétés anti-oxydantes au dilueur de congélation (Dascanio et McCue, 2014).

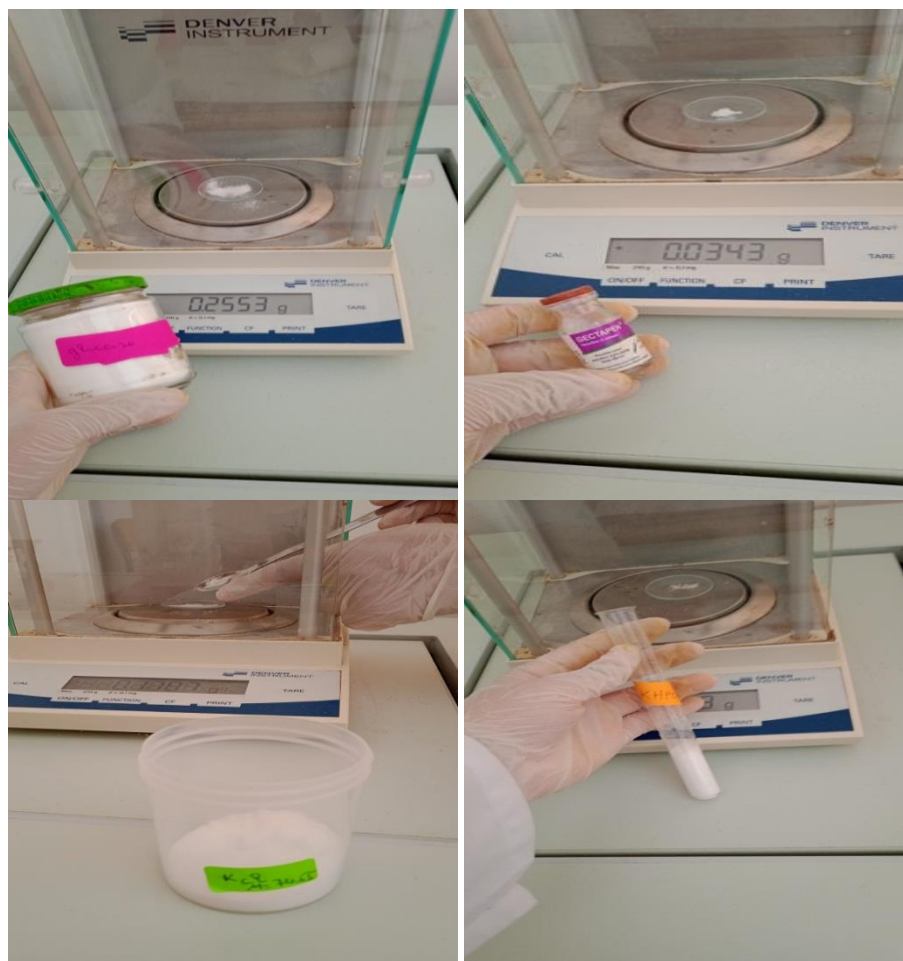


Figure13 : Les étapes de préparation du milieu H-HTF ®

III.2.2.1 Préparation de plasma du jaune d'œuf

Afin de séparer le plasma du jaune d'œuf constituant la partie fluide de ce dernier du reste de la fraction solide qui représente le jaune d'œuf lui-même, nous avons d'abord filtrés les jaunes d'œufs via deux feuilles de papier filtre 0,5µm superposées, en agitant, afin de permettre la rétention de l'albumine et le passage du reste jaune d'œuf. Le jaune d'œuf filtré est ensuite récupéré dans une éprouvette graduée stérile jusqu'à atteindre un volume de 21 ml. Ensuite, 7mL d'eau distillée stérile sont ajoutés pour

diminuer la viscosité du jaune d'œuf. La solution diluée est enfin divisée sur plusieurs tubes stériles puis centrifugée à 2000 x g pendant 45 minutes. Trois fractions sont ainsi séparées, le culot constitué de membranes, la fraction moyenne correspondant au plasma du jaune d'œuf dont nous avons besoin, et un surnageant de nature lipidique. Un volume de 15 ml du plasma de jaune d'œuf est récupéré à l'aide d'une micropipette après avoir éliminé le surnageant (figure 14)(Delektat et al, 2019).



Figure14 : les étapes de préparation de plasma de jaune d'œuf ®

III.2.3 Préparation de milieu de cryoconservation

l'invention dans cette étude concerne un milieu de dilution des spermatozoïdes comprenant un milieu de base constitué de jaune d'œuf 20% et de glycérol 7% supplémenté d'huile essentielle de la sauge à différentes concentrations

(0,36µL/ml : 0,75µL/ml : 1,5µL/ml). Nous voulons donc tester si ce milieu peut être utilisé notamment pour la conservation par congélation des spermatozoïdes humains.

III.2.4 L'examen du sperme à l'état frais

Une fois l'échantillon est arrivé au niveau du laboratoire, l'examen à l'état frais nous a permis d'évaluer la motilité et la viabilité des SPZ et de faire une estimation initiale de la concentration des spermatozoïdes suivant un protocole standard de spermogramme. Cette estimation nous a permis de déterminer la qualité du sperme, de choisir le bon échantillon et la bonne concentration ainsi que la dilution appropriée lors de la cryoconservation.

Une goutte de sperme était analysée sous microscope optique afin de d'étudier la mobilité des SPZ. Un échantillon de sperme dilué dans le formol à 9% est placé sur une cellule Thoma afin de déterminer la concentration des SPZ calculé en appliquant la formule citée ci-dessous. La viabilité, à son tour, a été étudiée en colorant les SPZ par l'éosine à 2%. Cette coloration est basée sur la perméabilité des SPZ morts au colorant rose, alors que les SPZ vivants, étant imperméable à l'éosine, ne se colorent.

$\text{Nombre SPZ} = (\text{Nombre calculé sur 5 carrés moyens} / 5) \times \text{facteur de dilution} \times 250000$

III.2.5 Centrifugation de sperme

Dans le but de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes et de les concentrés, l'échantillon du sperme est remplie dans des tube secs et centrifugés pondant 10 mn à 600 x g (Cochran JD et al, 1984).Après centrifugation, au moins 95%du surnageant a été éliminé, le culot était ensuite rassemblé dans un tube sec dans lequel on a rajouté le milieu H-HTF pour le rinçage.

III.2.6 Dilution de sperme

Avant la dilution du sperme, le culot est rincé par l'H-HTF et centrifugé on cours une fois. Le milieu de dilution est ensuite ajouté dans le but d'améliorer la conservation du sperme et de préserver une bonne capacité fécondante des SPZ lors de leur congélation. Le sperme est dilué dans 3 tubes secs contenant chacun 2ml du dilueur non supplémenté,

seulement 20% de plasma de jaune d'œuf 7% de glycérol) constituant le témoin de l'étude, ou supplémenté par l'huile essentielle de la sauge à 0,36 μ l/ml, 0,75 μ l/ml, et 1.5 μ l/ml.

III.2.7 Remplissage des paillettes

Après équilibrage, le sperme dilué est conditionnée dans des paillettes d'un volume de 0,25mL à l'aide d'une micropipette de 250 μ L. Les paillettes sont obstruées par la poudre d'alcool polyvinylique et elles subissent en suite une légère agitation afin d'amener la bulle d'air au milieu de la paillette pour éviter tous éclatement par le processus de dilatation (Figure 15).

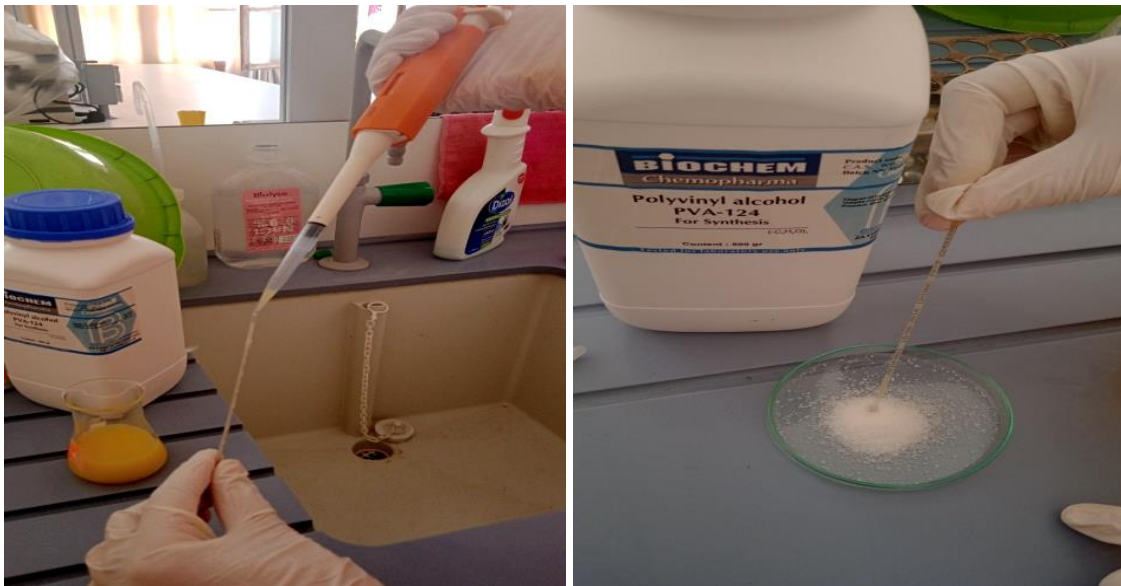


Figure15 : préparation des paillettes pour congélation

III.2.8 Congélation du sperme

Les paillettes chargées en sperme sont rapidement déposées verticalement dans des supports appropriés puis plongées rapidement dans l'azote liquide (-196°), et laissées là-dedans pendant 3 jours (Figure 16).



Figure 16 : congélation des paillettes

III.3 Evaluation de la qualité du sperme après décongélation

III.3.1 Décongélation

Pour décongeler les paillettes, juste avant leur évaluation qui a été faite après 3 jours après leur congélation, les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie réglé à 37°C pendant 5 minutes et elles sont par la suite bien essuyées. Leur contenu est vidé dans des tubes éppendorf qui sont mis à l'étuve à 37°C, et les différents paramètres sont enfin évalués.

III.3.2 Evaluation de la qualité du sperme décongelé

La viabilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique après une coloration par l'éosine et la condensation d'ADN été réalisée par coloration de bleu d'aniline. Nous avons éliminé le paramètre d'évaluation de la mobilité des SPZ à cause de l'absence du matériel et des produits nécessaires.

Pour analyser le taux de condensation de l'ADN des SPZ, les lames à analyser sont fixées à l'air libre puis immergées pendant 5 minutes dans une solution de bleu d'aniline à 5% (Figure 17).

Les lames ont subi un triple rinçage par l'eau distillée stérile. Ensuite, elles sont déshydratées en les émergeant dans des flacons contenant de l'éthanol à degré croissant (95 % ; 99% 3) et enfin séchées à l'air libre. L'analyse des lames a été effectuée sous microscope optique au grossissement 1000. Les SPZ avec une tête bleue ou mauve, ont une chromatine mal condensée. Le taux de condensation était comparé avec celui des mêmes échantillons avant la cryoconservation pour bien élucidé l'effet de cette procédure et des différents traitements utilisés.

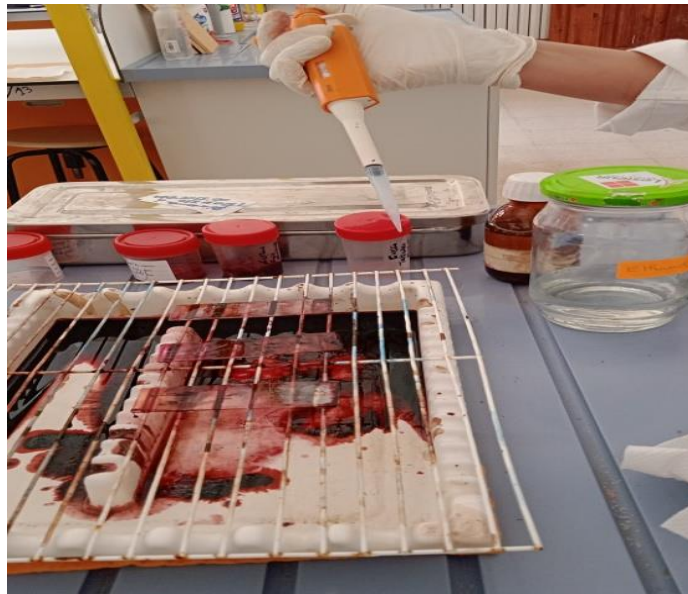


Figure 17 : coloration des lames au bleu d'aniline 5%

III.4 Test statistique

A l'aide du programme IBM SPSS version 20 ont été réalisés des tests statistiques pour l'obtention des données concernant les qualités du sperme congelé-décongelé. Des comparaisons multiples des moyennes ont été effectuées avec le test d'ANOVA suivi par le test Turkey. La valeur de P a été fixée à $<0,05$ pour définir la signification statistique.

En plus, la relation entre les concentrations des huiles essentielles et le taux des paramètres étudiés a été analysée en appliquant le test de corrélation de Pearson sur Excel 2010.

Chapitre IV : résultats et discussion

I. Résultats

1. Rendement d'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Dans notre étude, le rendement moyen en huiles essentielles de la partie aérienne de *Salvia officinalis* L, extraite par hydrodistillation dans un Clevenger , calculé en fonction de la masse du matériel végétal traité est de l'ordre de 1%.

2. Caractérisation du sperme avant congélation

Les caractéristiques macroscopiques du sperme utilisé dans cette étude sont représentées dans le tableau 4 .

La numération spermatique est de 73 millions/ ml, et la mobilité progressive a concernée 65,19 %des SPZ dusperme utilisé (Tableau5).

Tableau 4 :Tableau représentatif des caractéristiques macroscopiques du sperme .

Propriétés physiques	
Volume (ml)	1,5
pH	8
Aspect	Blanc nacré
Odeur	Normale
Viscosité	Modérée
Temps de liquéfaction	20min
Liquéfaction	Complète

Tableau 5 :tableau représentatif des caractéristiques microscopiques du sperme.

Résultat du test	
Numération	<i>73 million /ml</i>
Nombre totale de SPZ	<i>101 million/éjaculate</i>
Mobilité progressive (PR)	<i>65,19%</i>
Mobilité totale(PR+NP)%	<i>90,5%</i>
Vitalité	<i>92,5%</i>

Ces résultats sont obtenus avant la conservation du sperme, afin de pouvoir confirmer le choix de l'échantillon utilisé qui devait répondre aux critères d'un spermogramme normal.

3. Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la viabilité des SPZ

La viabilité est l'un des premiers critères utiles de caractériser, car elle peut être directement liée à la fonction de fécondation d'un ovocyte.

Nous avons utilisé l'huile essentielle de la sauge à plusieurs concentration (0,36µl/ml :0,75µl/ml :1,5µl/ml) pour réaliser une cryoconservation en comparaison à un témoin négatif. Les résultats obtenus ont montré qu'une concentration de 0,36 µl/ml d'huile essentielle induit une amélioration de la viabilité des SPZ pendant 3 jours de conservation dans l'azote liquide, alors que l'utilisation d'autres concentrations ont engendré une moindre amélioration(Figure 18).

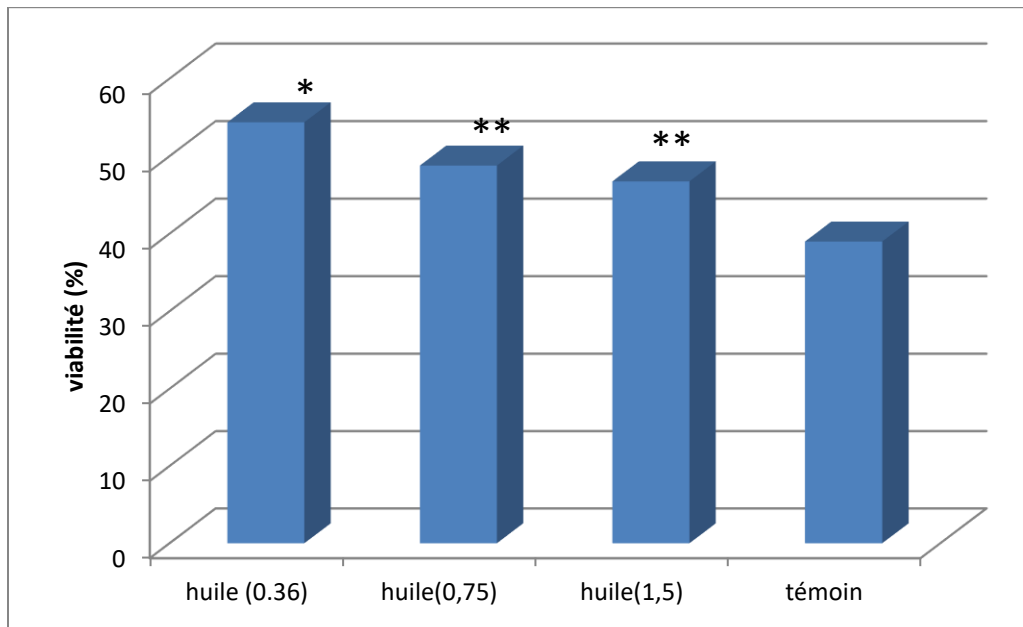


Figure 18 : effet de supplémentation en HE de salvia officinalis sur le paramètre de la viabilité après la cryoconservation.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type; (n=4). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$)

4. Effet de supplémentation en HE de salvia officinalis sur le paramètre de la condensation d'ADN après la cryoconservation .

Le pourcentage de condensation de l'ADN des SPZ cryonconservé dans les différents milieux préparés est représenté dans la figure 19.

Nous avons comparé la condensation de l'ADN spermatique par la coloration au bleu d'aniline à différentes concentration par rapport au taux de condensation avant la cryoconservation. Nous avons constaté une amélioration très significative du taux de condensation de l'ADN pour les concentrations (0.36 μ l et 1.5 μ l/mL), mais non pas à la concentration de 0.75 μ l/mL d'HE où nous avons rapporté un taux élevé de condensation de l'ADN comparable à celui du contrôle.

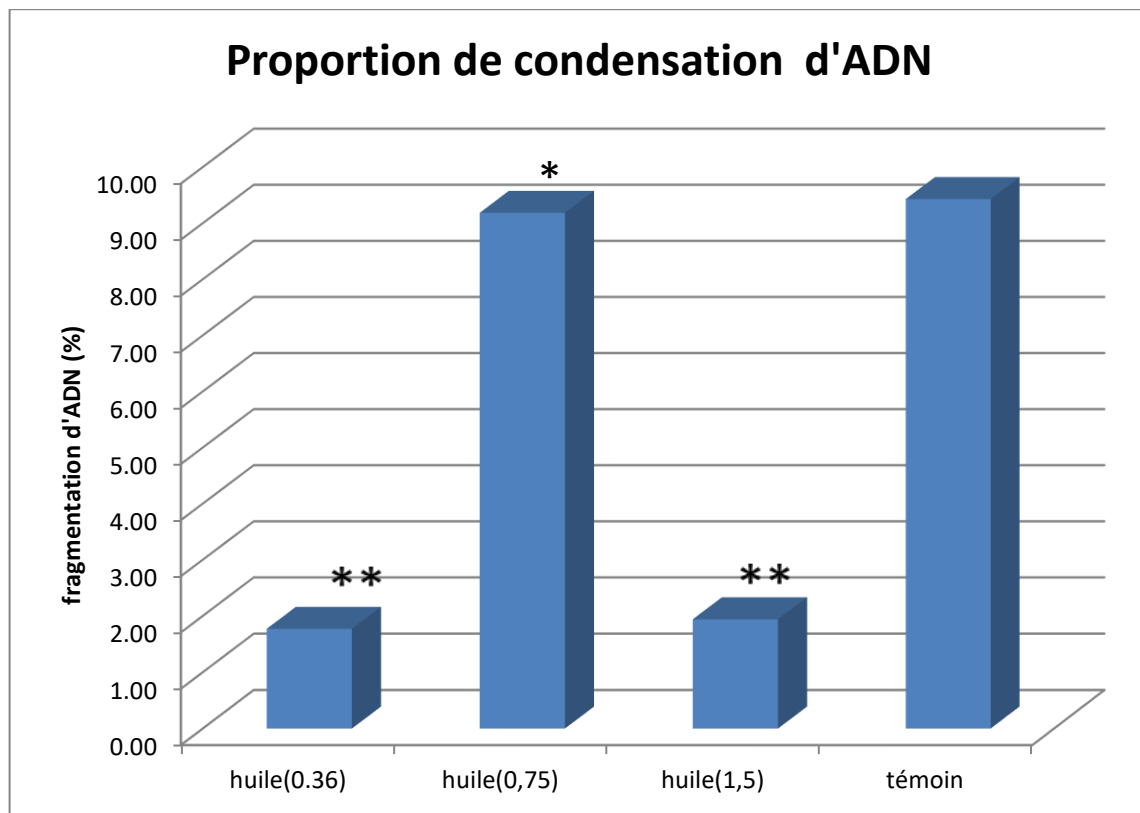


Figure 19 :effet de supplémentation en HE de *salvia officinalis* sur le paramètre de la condensation d'ADN après la cryoconservation .

*Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarte type; (n=4). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$)*

D'après l'interprétation des figures 18 et 19, nous avons trouvé que la meilleure concentration pour l'amélioration de la viabilité et le taux de condensation d'ADN était de $0,36 \mu\text{l/mL}$ d'HE dans le dilueur.

5. Corrélation entre la concentration en HE et les paramètres étudiés

Afin d'étudier la relation entre la concentration en huile essentielle dans les milieux de cryoconservation et la préservation de la viabilité et de l'ADN des SPZ cryoconservés, nous avons réalisés des tests de corrélation de Pearson.

La figure 20 représente l'analyse de la corrélation entre de la viabilité des SPZ et les concentrations d'HE. Nous avons mis en évidence une corrélation significative ($R^2=0,954$) qui témoigne d'une forte relation inversement proportionnelle entre la concentration en HE et le taux de viabilité des SPZ après décongélation. Les concentrations les plus faibles assurent donc une meilleure protection des spz vivants.

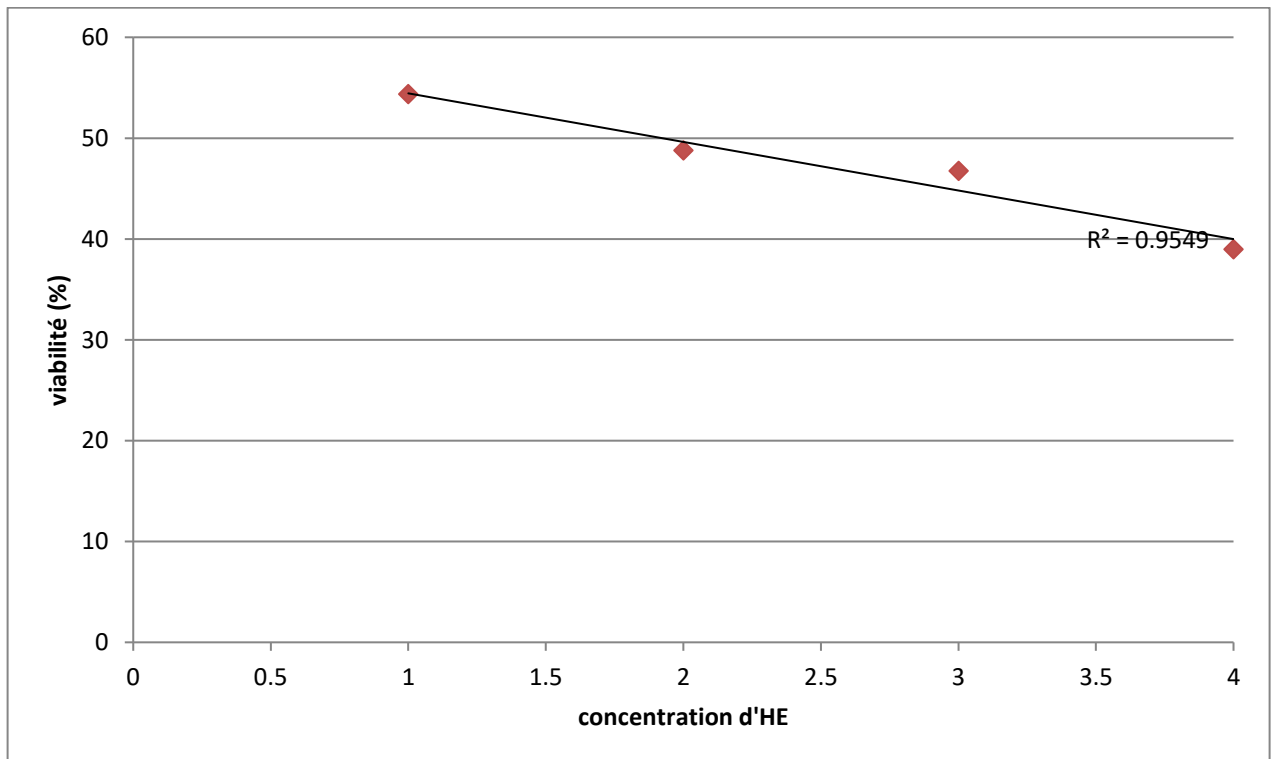


Figure 20 : corrélation entre concentration d'HE avec viabilité

D'autre part, l'analyse de la corrélation entre le taux de condensation d'ADN des SPZ et les différents concentration d'HE a montré une relation faible non significative ($R^2=0,224$) entre les paramètres étudiés. Ceci indique qu'il n'y a pas de relation entre la concentration d'HE dans le dilueur et le taux de condensation d'ADN.

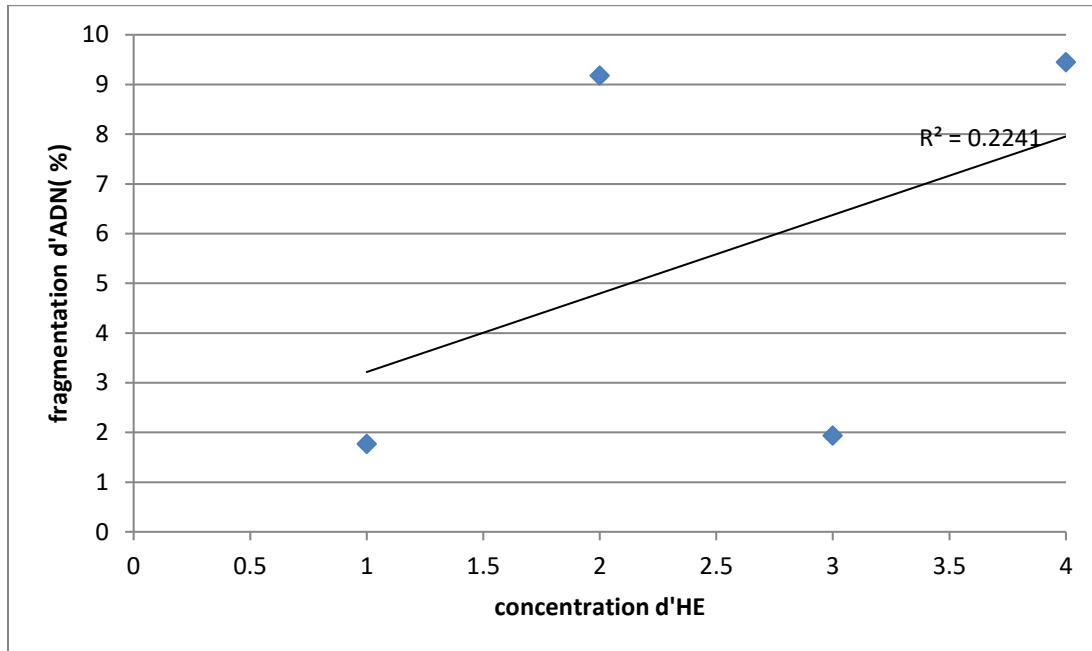


Figure 21: corrélation entre concentration d'HE avec condensation d'ADN

II. Discussion générale

Notre étude avait pour objectif l'évaluation de l'effet d'HE de *Salvia Officinalis* sur la qualité du sperme humain après une cryoconservation. Nous avons choisis d'évaluer deux critères qualitatifs : la viabilité et la condensation d'ADN.

Le rendement d'HE de notre expérimentation est estimé à 1%. Ce rendement est comparable à celui obtenu dans des études similaires. Chalchat et Michet, (1998), ont montré que le rendement d'extraction des HE de *Salvia Officinalis* obtenue par distillation pendant quatre heures dans un appareil « Clevenger » varie en fonction de l'origine de la plante: France (2,05%), Hongrie (2,50%), Portugal (2,90%), Roumanie (2,30%)...etc. Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante et à la technique d'extraction mais également à la période de prélèvement du matériel végétal (Belabbas et al., 2019).

Les résultats obtenus par Chikhouné et al., (2013) montrent que les fruits présentent un rendement d'extraction plus important en HE (0,80) par rapport à celui obtenu à partir

des feuilles (0,40). Cette différence du rendement en HE pourrait être expliquée selon Kelen et Tepp, (2008) par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et de qualité de l'HE. La durée de séchage, la zone géographique, le climat et la partie de la plante étudiée, ce sont les principaux facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE (Vekiari et al., 2002).

Plusieurs variantes des médiateurs de dilution ont été utilisés à des fins de traitement de sperme congelé (Jerez et al., 2016). La composition des dilueurs de sperme dépend de l'utilisation du sperme, de la température et de la période de stockage. Les spermatozoïdes chez les mammifères ont besoin de substrats exogènes pour remplir diverses fonctions, par exemple ; préserver les ressources énergétiques intracellulaires, les constituants des cellules et plus particulièrement la motilité (Salisbury et al., 1978). Le lait (lait écrémé, homogénéisé ou entier) fournit les phospholipides nécessaires à la stabilisation de la membrane à basse température et minimise l'activation de la membrane acrosomique (Bustamante et al., 2009). Les dilueurs à base de jaune d'œuf (Tris jaune d'œuf et Tryladil), se sont montrés, avantageux dans la préservation de la qualité des spermatozoïdes après décongélation. Nos résultats étaient en accord avec ceux de Moussa et al., (2002) et Amirat et al., (2004) qui ont montré que le jaune d'œuf améliore la résistance des spermatozoïdes dilués au choc thermique de la procédure de congélation/décongélation.

Dans la présente étude, nous avons utilisé l'HE de *Salvia Officinalis* dans un dilueur de sperme humain à base de jaune d'œuf afin d'assurer une meilleure protection des spermatozoïdes vu son effet antioxydant bénéfique sur la stabilité de la membrane des spermatozoïdes. L'HE a été utilisé avec un dilueur cryoprotecteur pour le sperme humain à différentes concentrations (0,36 µL/ml ; 0,75 µL/ml ; 1,5 µL/ml).

L'activité biologique des HE pourrait être liée à des actions individuelles mais aussi à la synergie de plusieurs composés. En effet, la bioactivité d'une huile essentielle peut s'expliquer par son profil chimique (Bourkhiss et al., 2007). Les huiles essentielles du romarin et de l'armoise blanche sont considérées comme excellents agents antioxydants durant la conservation du sperme à 4°C, ce qui est attribué à leur effet protecteur de l'intégrité membranaire (Touazi et al., 2018).

La viabilité des spermatozoïdes est un paramètre qualitatif. Nos résultats d'analyse de ce paramètre après une cryoconservation du sperme pendant 3 jours dans l'azote liquide avec un milieu de dilution contenant le plasma de j'aune d'œuf, le glycérol et l'HE de *Salvia Officinalis* a montré que l'augmentation des doses d'HE provoque une diminution de taux de viabilité des spermatozoïdes. Nous avons constaté plutôt une relation inversement proportionnelle significative entre la viabilité et la concentration d'HE et que la meilleure concentration pour l'amélioration de la qualité du sperme est celle de 0,36µl/mL avec un taux de viabilité de 54,36%. D'autres études réalisées par des chercheurs dans ce domaine ont noté le même résultat (Azamoum et Rabia, 2018). Ces derniers ont montré que la qualité du sperme a été significativement préservée, en particulier avec les plus faibles concentrations de l'huile essentielle. En effet il a été démontré que l'HE de *Rosmarinus officinalis* reste bien tolérée par les spermatozoïdes porcins jusqu'à une concentration de 0.6mg/mL (Elmi et al., 2017). Cette activité spermicide des HE a suscité beaucoup l'intérêt de nombreux chercheurs et plusieurs travaux ont été réalisés à cet égard. La majorité de ces travaux sont portés sur l'huile essentielle de *Azadirachta Indica*. Une étude faite sur cette dernière par Khillare et son collaborateur (2011) a démontré la forte activité spermicide de celle-là en causant l'immobilisation totale des spermatozoïdes à la dose de 3 µg/mL après 20s. Et une autre étude plus récente sur l'HE du thym (*Thymus Munbyanus*) et le thymol; son composé majoritaire (52%); a révélé que l'effet spermicide de cette huile commence à apparaître à la dose de 200 µg/mL et l'arrêt quasi-total de la mobilité est observé à partir de 780 µg/mL. Cependant, pour un effet inhibiteur similaire à celui de l'HE du thym, il fallait une dose de 223µg/mL du thymol (Chikhoun et al., 2015). Nous pouvons dire donc que les effets des huiles essentielles dépendent largement de la concentration utilisée.

Dans notre étude, Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la condensation d'ADN des spermatozoïdes et les concentrations d'HE dans le dilueur après une cryoconservation. Ceci était le point commun observé dans de nombreux travaux portant sur le sperme des animaux. D'après (Aparnak et Saberivand, 2019), les deux concentrations de curcumine (2,50 et 5,00 mm) ont maintenu la stabilité de l'ADN.

Par ailleurs, les scientifiques s'efforcent actuellement à trouver une alternative aux antibiotiques pour enrayer l'utilisation des antibiotiques dans les agents de cryoconservation du sperme. Le miel, un produit d'origine naturelle, possède une activité

antibactérienne puissante (Zoheir et al., 2015) et constitue une bonne source d'énergie pour les spermatozoïdes en raison de la présence de glucose et de fructose (Al-Waili., 2004). Les microorganismes présents dans le sperme réduisent la motilité, la longévité et l'intégrité acrosomique des spermatozoïdes en concurrençant directement les spermatozoïdes avec des nutriments ou en produisant des produits toxiques (Catry et al., 2010; Morrell et Wallgren, 2014). Quand ces huiles sont mélangées avec l'antibiotique la multiplication bactérienne augmente. Ceci témoigne probablement d'une interaction mutuelle avec l'antibiotique avec au final une diminution de l'effet antibactérien (Ouatah et Sfacene, 2018). Face au problème de l'émergence des bactéries multi résistantes aux antibiotiques, le retour à l'utilisation des huiles essentielles semble être une voie prometteuse. Elles provoquent une activité importantes sur les parois bactériennes (Atilia et Djahoudi., 2015) et cette propriété est commune à toutes les huiles essentielles (Fratini et al., 2018).

Cela vient renforcer notre hypothèse concernant l'efficacité de la supplémentation des milieux de cryoconservation en HE qui s'avère plus importante à de faibles concentrations.

Conclusion

Le présent travail était consacré à l'étude de l'intérêt des huiles essentielles de *Salvia Officinalis* dans la cryoconservation du sperme humain. Deux paramètres indicateurs de la qualité du sperme sont mesurés : la viabilité et la condensation de l'ADN.

Les résultats obtenus dans notre étude nous permettent d'affirmer que le sperme humain peut être mieux conservé dans l'azote liquide, lorsque le diluant de cryoconservation est supplémenté par l'huile essentielle de *Salvia Officinalis*. Selon nos résultats, ces affirmations sont valables pour les conditions expérimentales utilisées. Nous avons pu clairement montrer que la supplémentation en HE du diluant à base de plasma de jaune d'oeuf et de glycérol pour SPZ humains à une faible concentration (0.36µl/ml) a permis de préserver la viabilité et la condensation de l'ADN des SPZ lors de la décongélation, par rapport au groupe contrôle et aux autres concentrations. Compte tenu les données de la littérature, il est probablement possible d'incorporer de l'HE à une faible concentration pour améliorer la viabilité et la condensation de l'ADN des spz, ainsi que d'autres caractéristiques des SPZ de différentes espèces. Ceci est probablement dû à la composition de l'HE riche en substances favorables à la protection des SPZ contre le stress oxydatif.

La sauge, contenant une huile essentielle riche en thuyone, ditérpène, tanins en composées phénoliques et en antioxydants auxquels est attribué l'effet protecteur de cette huile lors de la cryoconservation des SPZ. Cette huile essentielle semble être une éventuelle solution contre les agressions induites par la cristallisation et le stress oxydatif lors des cycle congélation/dcongélation. Etant fragiles et nécessitant une meilleure protection, nous proposons que la supplémentation des milieux de cryoconservation des SPZ par les HE de *Salvia Officinalis* peut largement améliorer l'état de ces derniers au moment de leur utilisation en AMP.

Cependant, d'autres recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux élucider les effets bénéfiques d'HE de la sauge comme élément qui entre de la composition des dilueurs de cryoconservation des SPZ, via une série de tests plus élargie incluant essentiellement la mobilité, le pouvoir fécondant des SPZ et de la qualité des produits de conception après fécondation *in vitro*, et de même pour la cryoconservation des fragment tissulaires et des embryons dans le cadre d'une procréation médicalement assistée.

En fin, et dans le but de réduire les résistances et les allergies dues à la présence des antibiotiques dans les dilueurs , l'HE de la sauge réputée pour ses effets antibactériennes important peut donc remplacer les antibiotiques dans la composition du milieu de cryoconservation et réduire les risques liés à l'utilisation de ces derniers.

-A-

- **Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J.L., Anton, M., 2004.** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61,p 895-907.
- **Andersen AG., Jensen TK. 2000.** High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 15:p366- 372.
- **Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., de Paz, P., 2006.** Improvementstrategies in ovine artificialinsemination. *Reprod. Domest. Anim.*41, p30-42.
- **Atailia, I., & Djahoudi, A. 2015.** Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L ' Hér .) cultivé en Algérie. *Phytothérapie,AROMATHÉRAPIE EXPÉRIMENTALE*, 13, p156–162.
- **APARNAK.P , SABERIVAND,A.2019.** EFFECTS OF CURCUMIN ON CANINE SEMEN PARAMETERS AND EXPRESSION OF NOX5 GENE IN CRYOPRESERVED SPERMATOZOA.
- **Azamoum .F ,Rabia F.2018.***Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER Intérêt des huiles essentielles du Rosmarinus officinalis dans la conservation de la mobilité du sperme du bélier à 4°C. .*

-B-

- **Barberá.A.Gómez.S.Recuerda.T et al. 2018.**Qu'est-ce que le SPZ? – Fonction, structure et anomalies.invitra staff.
- **Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P., 2007.** Milk Caseins Decrease the Binding of the Major Bovine Seminal Plasma Proteins to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm Membrane During Sperm Storage. *Biol. Reprod.* 77,p 120-126.
- **BERTRANDA .L.2003.**traitement actuels de l'infertilité dans le cadre de assistance médicale à la procréation .Nancy .France .
- **Binder N.K., Sheedy J.R., Hannan N.J. and Gardner D.K. 2015.** Male obesity is associated with changed spermatozoa Cox4i1 mRNA level and altered seminal vesicle fluid composition in a mouse model. *Mol. Hum. Reprod.*, 21:p424-434.

- **Bommas-Ebert U., Teubner P., Voss R. et al. 2008.** Partie spongieuse de l'urètre Gland et du pénis. Paris, Masson, p502-510.
- **Boussouar F. and Benahmed M. 2004.** Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab*, 15:p 345-350.
- **Bruneton, J. (1993) :** *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris p :7.*
- **Belabbas ,H. et Riad, F.2019.** Etude de l'effet antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis* sur les bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*).

-C-

- **Chalchat, A., Michet, B., Pasquier, 1998.** *Flavour Fragr J. 13, 68 lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen thawed bull semen. Theriogenology 57, p1695-1706.*

-D-

- **Djerroumi A & Nacef M. (2004) :** *100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Palais du livre P :135-131.*
- **Duke J A., Bogenschutz-godwin du cellier M J., et Duke P A K., (2002).** *Medicinal Herbs. Edition CRC Press LLC.P:201.*
- **Duling E.N., Owen J.C., Joh B.G., Rosmaru F.W., Kevin A.M., Yeap L.F & Nigel B.P. (2007):** *Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (salvia officinalis) using ethanol-water mixture. Food chemistry, 101:p :1417-1424.*
- **Dascanio.J, McCue.P. 2014.** *Equine Reproductive Procedures, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).*
- **Delekta, P. C., Lydic, T. A., & Hammer, N. D. 2019.** *Isolation of Lipoprotein Particles from Chicken Egg Yolk for the Study of Bacterial Pathogen Fatty Acid Incorporation into Membrane Phospholipids. Journal of Visualized Experiments, (147).*
- **Decuadro-Hansen, G. 2004.** La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l' animal Chilled and frozen semen : the animal experience. Journée Thématique de La SFEF, 32,p 887-893.

- **Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W.2005.** EAU Guidelines on male infertility. *EuropeanUrology*. 48:p 703-11.

-E-

- **Encha-Razavi F. et Escudier E. 2012.** Anatomie et histologie de l'appareil reproducteur et du sein. Elsevier Masson, Paris,p 140-146.
- **Estomba H., Muñoa-Hoyos I., Gianzo M.2016.**Expression and Localization of Opioid Receptors in Male Germ Cells and the Implication for Mouse Spermatogenesis.*PLoS One*, 11(3):p152-162.
- **Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Filippini, G., Benvenuti, S., Pisi, A., ... Bacci, M. L. 2017.** Thymbra capitata (L.) cav. and rosmarinus officinalis (L.) Essential oils: in vitro effects and toxicity on swine spermatozoa. *Molecules*, p21,22.

-F-

- **FIVNAT., Mouzon J., Levy R., Mourouvin Z., Belaisch-Allart J., Bachelot A.2000** Caractéristiques du sperme et qualité du conceptus en fécondation in vitro fertilization. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 35 (3):p216-223.
- **Fratini, F., Casella, S., Pistelli, L., Leonardi, M., Pistelli, L., Pisseri, F., & Ebani, V. V. 2018.**Antibacterial activity of essential oils , their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis,p 3–5.

-G-

- **Gadea, J., 2003.** Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1, p17-27.
- **Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, et al. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017.** *Andrology*. 5(5):p845-62
- **Gil, J., Rodriguez-Irazaqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H., 2003.**Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical
- **Gilles Figueredo.2007.** *Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lami-aceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Chimie organique. Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II. Français .p14-27.*

- **GARDELI, C., VASSILIKI, P., ATHANASIOS, M., KIBOURIS, T., KOMAITIS, M.2008.** *Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chemistry, Greece 107(3), 1120–1130.*

-H-

- **Hamidpour, M. R. S., Shahlari, M. 2014 -** *Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (Salvia) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. Vol.4, N°, p.82–88.*

-I-

- **Iritani, A., Nishikawa, Y., 1961.** Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulating phenomena. J. Anim. Reprod. 8, p109-112.

-J-

- **Jones, R.C., 1969.** Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 22:p 995-1004.

-K-

- **Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., Pelzer, K., 2011.** Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. Small Rumin. Res. 99,p 208-213.
- **Kugler P. 2014 .**Anatomie, physiologie, pathologie du corps humain. Paris, edsMaloine, p301-314
- **Kulaksiz, R., Cebi, C., Akcay, E., 2012.** The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 36, p177-182.

-L-

- **LAKHDARIN.2013.** Programmation néonatale de l'infertilité mâle : rôle de la dérégulation de l'expression des microARNs dans l'apoptose des cellules germinales. Université Paris-Sud.

- **Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1993.** Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30, p 32-44.
- **Labraoui S et al., 2017** , *Détermination des polyphénols dans les extraits de la sauge, du thé et du thym en utilisant les techniques spectroscopiques et les méthodes chimiométriques.*

-M-

- **M.Beccaglia, P.Anastasi, S.Chigioni, GC.Luvoni.2009.** TrisLecithinExtenderSupplement edWithAntioxidantCatalaseforChillingofCanineSemen. Journal compilation Black well Verlag GmbH.
- **Marie-Christine Leborgne, Jean-Michel Tanguy.2013.** Reproduction des animaux d'élevage .
- **MATMAT.S.2015.** L'assistance médicale à la procréation : aspects médicaux, juridiques et éthiques. UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER.
- **Maxwell, W.M.C. Salamon, S. 1993.** Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5: p613-638.
- **Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL.2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* ; 57:p 327-344.
- **Mellal S, Westhersbee P.S., Werlin L.B., and Stone S.C. 2010** Pentoneal recovery of sperm after intrauterine insemination. *FertilSteril*, 42:p3226.
- **Menche N. 2014.** Biologie, anatomie, physiologie. Edition Maloine, p 400-408.
- **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. *Theriogenology* p57,
- **M.E. Duru, A. Cakir *, S. Kordali, H. Zengin, a b, c M. Harmandar, S. Izumi, T. Hiratad .d.2003.** Chemical composition and antifungal properties of essential oil of three Pistacia species, *Fitoterapia* 74 :p170–176. Turkey.
- **Michael J. Rieder, MD; Jack Uetrecht, MD, PhD; Neil H. Shear, MD; Marilyn Cannonf; Margaret Miller, MSc; and Stephen P. Spielberg, MD, 1998.** PhD,

Diagnosis of Sulfonamide Hypersensitivity Reactions by In-Vitro “Rechallenge” with Hydroxylamine Metabolites. . *Annals of Internal Medicine*, 110(4), p286.

- **Mocé, E., & Vicente, J. S. 2009.** Rabbit sperm cryopreservation : A review. Journal Homepage: [Www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci) Review, 110,p 1–24.
- **Marie .EG,Bernard.J,Lang.N.2018.**Fertilité et cancer chez les jeunes adultes .Genève.

-N-

- **Netter H.F. 2010.** Atlas d’anatomie humaine.Elsevier Masson (5e editions),p 510- 525.

-O-

- **O'Hara, L, Hanrahan, J P, Richardson, L, Donovan, A, Fair, S, Evans,A C &Lonergan, P.2010.** *Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. Theriogenology :p 41-49.*
- **Ouatah .S., Sfacene .N.2018.** Intérêt des huiles essentielles de l’Armoise (*Artemisia herba alba*) dans la conservation de la mobilité du sperme du bélier à 4°C.

-P-

- **Pistelli L. 2006 - Photochemicals from lamiaceae: from nutraceuticals to Hallucinogens. International symposium The La biatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization, Sanremo, Italy: p22-25 .**
- **Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé. R., Andersen Berg K. 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.Theriogenology. 57:8p23–36.
- **Poncelet.E. G. Robin. D. Dewailly.2011** Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. Oxford UniversityPress.
- **Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé. R., Andersen Berg K. 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.Theriogenology. 57:8p23–36.
- **Poncelet.E. G. Robin. D. Dewailly.2011** Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. Oxford UniversityPress.

-Q-

- **Quinn, P., Kerin, J. F., & Warnes, G. M. 1985.** *Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid**Supported in part by a grant from the National Health and Medical Research Council of Australia. Fertility and Sterility, 44(4),p 493–498.*

-R-

- **Radulescu V., Silvia C & Eliza O. (2004):** *Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of salvia officinalis. Journal of chromatography A, 1027:p121-126.*

-T-

- **Teuscher E., Anton R., et Lobstein A., (2005).** *Plantes Aromatiques (épices, aromates, condiments et huiles essentielles).Edition Tec et Doc. Paris. Edition. E.M. inter. Allemagne. P 266.*
- **Toninoli.F,Meglioli.V,2013.** *huiles essentielles .éditionsJUDENA,p55-85.*
- **Tildesley, N. T. ., Kennedy, D. ., Perry, E. ., Ballard, C. ., Savelev, S., Wesnes, K. ., & Scholey, A. . (2003).** *Salvia lavandulaefolia (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 75(3), p669–674.*
- **Touazi.L .,Aberkene.B ,Bellik.Y,Moula.N et M.Iguer-Ouada .2018;***Effet de l’huile essentielle Rosmarinus .officinalis (L) sur le sperme du coq .*

-V-

- **Vishwanath R, Shannon P.2000.** *Storage of bovine semen in liquid and frozen state. AnimReprodSci ; 62:p 23-53. 167.*

-W-

- **Way AL, Griel LCJ, Killian GJ.2000.** *Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of caudaepididymal bull spermatozoa. J Androl ; 21:p 213-219.*

- **Wolff D., Langan-Fahey S., Johnson D., Ricchio M., Thompson M. 2008.** Leucocytospermia ,oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynécologie obstétriqueet fertilité* , 95(1):p 17-25.
- **Walker, J B., Sytsma, K J., Treutlein, J., Wink, M ., (2004).** *Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Mentheae. Am. J. Bot. 91,p 1115–1125.*
- **Wolters kluwer, (2007).** *Botanique pharmacognosie phytothérapie.1, rus Eugène et Armand Peugeot.92500 Rueil-Malmaison Cedex.*

-Z-

- **ZABEIROU ; HACHIMOU (2005):** *Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (Mentha Spicta L) et de la Poivree (Mentha Piperita L) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie —Université de Kasdi Merbbah _Ouargla p 6.*
- **@1 : WIKIMEDIA, 2017**
- **@2 : (<http://embryologie.chez-alice.fr/gametoge.html>).**