

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté : Des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Des Sciences Biologiques de l'Environnement.
Spécialité : Biologie Animale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Intérêt des huiles essentielles du
Rosmarinus officinalis dans la conservation
de la mobilité du sperme du bélier à 4°C**

Présenté par:

Azamoum Farah & Rabia Fatma Zohra

Soutenu le: **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de:

Mme. Sad-Eddine O.

Mr. Iguer-Ouada M.

Mme. Boulila F.

MCA

Professeur

MCA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire: 2017 / 2018

Remerciements

Tout d'abord, nous nous devons de remercier ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce travail.

Nous tenons à remercier Mr. IGUER-OUADA, notre encadreur, pour sa disponibilité, son encouragement, sa gentillesse, sa générosité et pour l'autonomie qu'il nous a accordé, et ses précieux conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier également les membres de jury: Mme SAD-EDDINE O. de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et Mme BOULILA F. d'avoir accepté de consacrer son temps pour l'évaluation de notre travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnels du laboratoire de biologie animale du bloc 12, en particulier Mr. Benberkane Amine pour sa patience, sa sympathie, sa bonté et le temps qu'il nous a consacré.

Enfin nous n'oublions pas de remercier toute la promotion BA avec qui nous avons passé des moments agréables et tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers:

Mes Parents, mon Frère et particulièrement ma chère et adorable

*Maman, qui par son amour, son soutien ses précieux conseils et ses
sacrifices ont œuvré à ma réussite.*

Et à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenu

Sans oublier Mlle Azamoum Farah avec qui j'ai eu l'honneur de travailler.

Fatma

Dédicace

Avant tout je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé , la patience et le courage pour réaliser ce travail .

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes parents , qui m'ont toujours encouragé et conseillé , tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect .

Que dieu le tout puissant vous procure , santé et longue vie .

A mon fiancé Hicham et sur tout ma meilleure amie mon âme sœur Sabah vous étiez toujours là pour m'écouter , me reconforter et m'encourager dans les moments de doute.....tous les mots ne suffiraient... pas sans vous .

A mes deux frères jumeaux (Nabil et Lamine) et ma petite sœur chérie Anaïs que J'aime tant

A toute ma famille tantes, oncles, cousins, cousines ...A ma grand-mère à qui je souhaite une longue vie inchallah et sur tout ma petite belle-famille .

A mes ami(e)s de la promo Biologie Animale merci à tous je Vien de passer des beaux souvenir avec vous.

Et En fin J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur professeur M' Iguer-ouada pour avoir accepté de diriger mon mémoire de fin de cycle.

A ma binôme Rabia fatma zohra qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire.

Farah

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Introduction	1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : La reproduction chez les ovins

1. Rappels anatomiques de l'appareil génital :.....	3
1.1. Le testicule.....	3
1.2. L'épididyme :	3
1.3. Le canal déférent :.....	3
2. Rappels physiologiques de l'appareil reproducteur :.....	3
2.1. Spermatogenèse :	3
2.1.1. Le sperme :	4
2.1.2. Le spermatozoïde :	4

Chapitre II : La cryoconservation

1. Les étapes :	5
1.1. La collecte du sperme :	5
1.2. Analyse de la qualité du sperme récolté :	5
1.2.1. L'examen macroscopique :	5
1.2.2. L'examen microscopique :.....	5
1.3. La conservation du sperme :	6
1.3.1. La dilution :	6
1.3.2. La conservation à court terme 4°C :	7
1.3.3. La conservation à long terme :	7
2. Amélioration des milieux de conservation :	7
2.1. Le stress oxydatif :	7
2.2. Origine du stress oxydatif :	8
2.2.1. Les radicaux libres :	8
2.2.2. Sources de production des radicaux libre :	8
2.2.3. Les différentes cibles des espèces réactives (ER) :	8

2.3. Système de défense antioxydante :	8
--	---

Chapitre III : Les Huiles Essentielles

1. Définition.....	10
2. composition chimique :	10
2.1. Les composés terpéniques :	10
2.2. Les composés aromatiques :	10
2.3. Composés d'origines diverses :	10
3. Propriétés et Bioactivité des huiles essentielles :.....	10
4. Techniques d'analyse des HE :	11
5. Méthodes d'extractions :	11
6. Toxicité des huiles essentielles :.....	11
7. L'encapsulation des HE (solubilisation) :	11
7.1. Les cyclodextrines :	12

Chapitre IV : Monographie de l'espèce végétale

1. Description du romarin :	13
2. Classification botanique :	13
3. Répartition géographique :	13
4. L'huile essentielle du Romarin :	14
4.1. Composition chimique :	14
4.2. Composition phénolique :	13
5. Utilisation :	14
6. Les différentes activités biologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> :	15
6.1. Activité antibactérienne :	15
6.2. Activité antifongique :	15
6.3. Activité antivirale :	15
6.4. Activité ovicide :	15
6.5. Activité anti-oxydante :	15
6.6. Effet anti- hépatotoxique :	16

Chapitre V : Interaction substances actives-spermatozoïdes

1. Effets des huiles essentielles.....	17
1.1 Effets protecteurs.....	17
1.2 Effets spermicides.....	17
2. Effets des extraits phénoliques.....	17
2.1 Effets protecteurs.....	17
2.2 Effets spermicides.....	18

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et Méthode

1. Préparation du complexe CD-HE :.....	19
2. Préparation des milieux de conservation :	19
3. Processus de la collecte du sperme :	19
3.1. Dissection du testicule et séparation de l'épididyme :.....	19
3.2. La collecte proprement dite :.....	20
4. L'analyse du sperme collecté :	19
4.1. Analyse macroscopique	19
4.2 Analyse microscopique :.....	19
4.2.1. La motilité massale :.....	19
4.2.2. La motilité individuelle :.....	20
4.2.3. La concentration :	21
5. Analyse de la mobilité :	21
5.1. Analyse assistée par ordinateur (C.A.S.A) :	21
5.2. Méthode d'analyse :	23

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Résultats.....	24
2. Discussion.....	27

Conclusion et perspectives.....	29
--	-----------

Références bibliographiques	30
--	-----------

Liste des abréviations

- **CASA** : Computer Assisted Sperm Analysis.
- **IA** : Insémination Artificielle
- **SPZ** : Spermatozoïde
- **e** : échelle
- **HE** : Huile essentielle.
- **Na Cl** : chlorure de sodium
- **µl** : Microlitre
- **µm** : Micromètre.
- **T** : Temps
- **Tris** : Tri-hydroxy-méthyl-aminométhane
- **VSL** : Velocity Straight Line
- **VCL** : Velocity Curvilinear Path
- **VAP** : Velocity Average Path.
- **LN** : Linearity
- **STR** : Staightness
- **WOB** : Wobble
- **ROM** : Romarin
- **CD** : cyclodextrine
- **SCA** : Analyseur informatique du sperme
- *T.ammi* : *Trachyspermum ammi*
- *R.officinalis* : *Rosmarinus officinalis*
- **ER** : Espece Reactive
- **CO₂** : Dioxyde de Carbone
- **HIV** : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- **UV** : Ultraviolet
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **CCL₄** : Tétrachlorure de Carbone
- **GST** : Glutathion -S-Transférase
- **HD** : Hydrodistillation.
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.
- **DME** : Dose Minimale Effective.

Liste des figures

- **Figure 1** : Structure d'un spermatozoïde.
- **Figure 2** : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.
- **Figure 3** : Dissection du testicule et séparation de l'épididyme.
- **Figure 4** : Le système CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*).
- **Figure 5** : Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA.
- **Figure 6** : Image captée par le CASA.
- **Figure 7** : Analyse du sperme par le CASA.
- **Figure 8** : Histogramme représentant la VCL des spermatozoïdes dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5, 1, 2, 4 $\mu\ell/ml$ à T0, T2, T4, T24 H.
- **Figure 9** : Histogramme représentant la VSL des spermatozoïdes dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5, 1, 2, 4 $\mu\ell/ml$ à T0, T2, T4, T24 H.
- **Figure 10** : Histogramme représentant la VAP des spermatozoïdes dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5, 1, 2, 4 $\mu\ell/ml$ à T0, T2, T4, T24 H.
- **Figure 11** : Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5, 1, 2, 4 $\mu\ell/ml$ à T0, T2, T4, T24 H.
- **Figure 12** : Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5, 1, 2, 4 $\mu\ell/ml$ à T0, T2, T4, T24 H.

Liste de tableaux

- **Tableau I** : Détermination de la note de motilité massale du sperme.
- **Tableau II** : définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyser, CASA).

Introduction

L'insémination artificielle (IA) est une technique qui a connu un développement rapide et une diffusion universelle ce qui en fait la technologie de reproduction la plus répandue dans le monde, par ses principes d'utilisation elle ne modifie ni l'intégrité ni patrimoine génétique des spermatozoïdes. Elle permet surtout, par la démultiplication d'un éjaculat grâce aux techniques de dilution et de conservation, d'accroître dans le cadre de l'amélioration génétique, la descendance des mâles reconnus améliorateurs.

Les aspects techniques de l'insémination artificielle sont : récolte ; examen ; conservation et mise en place de la semence. La réussite de l'IA exige une bonne qualité de la semence collectée. Cependant, durant la conservation, le stress oxydatif reste un des facteurs qui altère la mobilité et le pouvoir fécondants des gamètes.

Les huiles essentielles sont des substances naturelles extraites à partir de plantes et exploitées pour diverses fins thérapeutiques (**Richard et al., 1985**). De nombreuses recherches ont révélé qu'environ 105 plantes possèdent une activité spermicide. Cependant les huiles essentielles extraites de ces plantes possèdent des propriétés biologiques diverses et intéressantes par leur composition chimique riche en composés terpènes et en composés non terpénique. Elles constituent une grande source d'agents antioxydants et antimicrobiens naturels. En plus de ces propriétés biologiques, des études récentes se sont intéressées à leur effet inhibiteur de la fonctionnalité spermatique (**Paul et al. 2005 ; Shweta et al., 2011**).

Dans le présent travail, notre choix s'est porté sur le romarin (*Rosmarinus officinalis*), qui est l'une des plantes les plus répandues en méditerranéen et particulièrement en Algérie. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de cette plante sur la mobilité spermatique chez le bélier. Nous avons choisi une gamme de concentration d'huile essentielle allant de 0.5 µl/ml à 4 µl/ml. Nous nous sommes aussi particulièrement intéressés à l'effet solubilisateurs de la cyclodextrine sur ces huiles. La cyclodextrine est utilisée pour augmenter la solubilité des substances hydrophobes pour augmenter leurs effets biologiques.

Ce manuscrit se compose de deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui donnera un aperçu sur les différentes notions abordées dans ce travail, et est divisée en cinq chapitres : le premier est

dédié à la reproduction des ovins, le deuxième est dédié à la cryoconservation, le troisième aborde des généralités sur les huiles essentielles (HE), le quatrième est consacré à la monographie de l'espèce étudiée, et enfin le dernier chapitre contient les informations sur l'interaction entre ces substances actives et les spermatozoïdes.

La seconde partie est réservée à l'étude expérimentale, divisée en deux chapitres : dans le premier nous détaillerons le matériel et les méthodes employés et nous décrirons les tests réalisés dans l'évaluation de l'effet spermicide et protecteur des HE, le deuxième est dédié à la présentation des résultats obtenus.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La reproduction chez les ovins

1. Rappels anatomiques de l'appareil génital :

1.1. Le testicule :

Les testicules ont une forme ovoïde ou sphéroïde, et sont assez volumineux par rapport au format de l'animal, ils pendent entre les cuisses de l'animal (**Regaudie et Reveleau, 1977 ; Vaissaire, 1977 ; Barone, 1990**), le poids des deux testicules rapporté au poids total du corps représente 1/1000e chez le bélier (**Barone, 1990**). Chez cette espèce, chaque testicule représente 0,4% du poids corporel soit 300g (**Setchell, 1991**). Il varie en fonction l'âge, de la race, de la saison et de l'état nutritionnel (**Baril et al., 1993**).

1.2. L'épididyme :

C'est un organe plaqué sur l'arrière du testicule, d'une longueur de 60 m, reliant les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent. Il est divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue. La paroi de ce tube est entourée d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (**Dacheux et al., 2001 ; Bonnes et al., 2005**).

1.3. Le canal déférent :

Faisant suite au canal épидидymaire, ce canal s'engage dans le trajet inguinal où il contribue à former le cordon testiculaire, il pénètre dans la cavité abdominale et atteint la face dorsale de la vessie formant un très léger renflement pelvien avant de se jeter dans l'urètre (**Barone, 1978 ; Bonnes et al., 2005**).

2. Rappels physiologiques de l'appareil reproducteur :

2.1. Spermatogenèse :

La spermatogenèse est un processus complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose, qui, à partir des cellules germinales souches diploïdes (2n), les spermatogonies, aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes (n) hautement spécialisées.

Chez le bélier, la spermatogenèse dure 49 jours. Chez le bélier sexuellement mature, la production de spermatozoïdes est de 21 millions par gramme de testicule et par jour (Thibault C. et al., 2001).

2.1.1. Le sperme :

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

Les spermatozoïdes représentent 20 % et le liquide séminal 80% du volume de l'éjaculat.

2.1.2. Le spermatozoïde :

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée, il comporte trois principales parties qui sont (Figure 1) :

- la tête, partie essentielle qui contient le noyau surmonté de l'acrosome élaboré par l'appareil de Golgi.
- la pièce intermédiaire, qui est constituée de mitochondries et d'enzymes propres aux métabolismes des spermatozoïdes.
- le flagelle, ses mouvements favorisent le déplacement des spermatozoïdes.

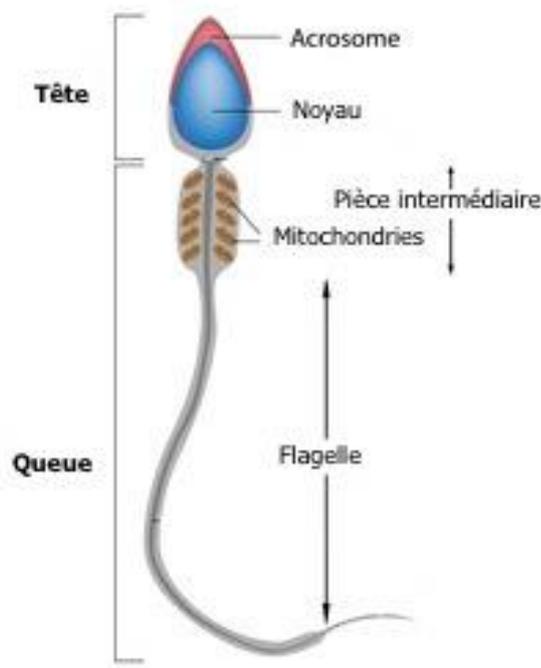


Figure1 : Structure d'un spermatozoïde (d'après Google image).

Chapitre II : La cryoconservation

1. Les étapes :

1.1. La collecte du sperme :

- **Par vagin artificiel** : Elle consiste à faire éjaculer un mâle dans un vagin artificiel au moment de l'accouplement, soit sur un mannequin soit sur une femelle oestrogénisée.
- **Par électro éjaculation** : C'est une méthode de collecte de sperme par excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs.
- **Sperme épидidymaire** : Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent sur animal vivant ou après abattage et obtention du testicule (**Deutscher et al., 2007**).

1.2. Analyse de la qualité du sperme récolté :

1.2.1. L'examen macroscopique :

- **Le volume** : Varie selon l'espèce et pour une même espèce donnée, il est en fonction de l'état physiopathologique de l'individu, de l'âge, de la saison, de la race, de la méthode de récolte ou encore des conditions sanitaires et alimentaires. Le volume du sperme varie entre 0.5 à 2 ml chez le bélier (**Hanzen, 2008**).
- **La couleur** : Est blanchâtre d'aspect crémeux, et varier en fonction des causes pathologiques, elle peut être de couleur brunâtre, bleuâtre, rosâtre, jaunâtre, ou rougeâtre.
- **La viscosité** : Elle traduit la consistance du sperme et en même temps sa concentration en spermatozoïdes.

1.2.2. L'examen microscopique :

- **La motilité massale** : Elle s'apprécie au microscope au grossissement (x10). L'examen doit se faire rapidement après prélèvement. Une goutte du sperme non dilué est déposée sur une lame chauffée à 37°C, on observe le mouvement des spermatozoïdes dans le liquide séminal, dont l'ensemble forme un tourbillon. Ces mouvements sont notés, selon une échelle de notation allant de 0 à 5 (Tableau1).

Tableau I : Détermination de la note de motilité massale du sperme. (G.Baril et al., 1993).

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

- **La motilité individuelle** : S'apprécie dans les mêmes conditions mais au grossissement (x40). On observe le mouvement individuel des spermatozoïdes, leurs rapidités et leurs trajectoires. Ce test se réalise sur du sperme dilué et permet de déterminer approximativement le pourcentage des spermatozoïdes vivants ou morts.
- **La concentration** : Peut être déterminée par :
 - appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjacula ;
 - comptage exact avec un hématimètre ;
 - mesure de la densité optique dans un spectrophotomètre (Baril et al., 1993).

1.3. La conservation du sperme :

1.3.1. La dilution :

La dilution permet d'augmenter le volume de la masse spermatique et la protection des spermatozoïdes lors de cryoconservation contre les chocs thermiques et les phénomènes de cristallisation (Decuadro-Hansen D, 2004).

Les milieux de dilutions plus ou moins complexes font intervenir (Sauveroche, 1993) :

- un produit d'origine vivante animale (jaune d'œuf, lait) ou végétale (lait de coco) ;
- des molécules régulatrices du pH ou du métabolisme telles que le sodium, citrate, bicarbonate, etc. ;
- des protecteurs cellulaires tels que la glycine ;
- des apports énergétiques tels le glucose, le lactose ;
- Avoir des solutions tampons (Tes, Pies, Hepes, Tris, etc.) et des ions minéraux qui maintiennent le pH
- des antibiotiques comme la streptomycine, la pénicilline et des sulfamides. Signalons que les sulfamides sont à écarter dans les dilueurs à congeler (Derivaux, 1971) ;
- des agents protecteurs contre les effets de la congélation tel que le glycérol.

1.3.2. La conservation à court terme 4°C :

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à 4°C, ainsi le métabolisme des spermatozoïdes est réduit ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et la conservation de leur mobilité restaurée après réchauffement. Le dilueur à base de lait est utilisé pour la conservation de la semence fraîche chez le bélier et de taureau (O'hara *et al.*, 2010).

1.3.3. 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 (Mazur, 1984). La température est abaissée jusqu'à -196°C dans l'azote liquide.

2. Amélioration des milieux de conservation :

2.1. Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (Ratnam *et al.*, 2006). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (Ece *et al.*, 2007). Il induit des altérations membranaires et nucléaires, entraînant une perte de mobilité et du pouvoir fécondant des SPZ (Pons *et al.*, 2009). La peroxydation des lipides et des antioxydants, est la principale cause d'un fonctionnement anormal des SPZ (Party *et al.*, 2012).

2.2. Origine du stress oxydatif :

2.2.1. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et leur durée de vie est courte (**Carange, 2010**).

2.2.2. Sources de production des radicaux libre :

Les sources de radicaux libres sont variées : la pollution atmosphérique, la cigarette, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, les radiations cosmiques, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques (**Favier, 2006**).

2.2.3. Les différentes cibles des espèces réactives (ER) :

Les dommages liés au stress oxydatif se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaire telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines, et la peroxydation des lipides (**Cook et al., 2003**).

2.3. Système de défense antioxydante :

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. On divise les antioxydants en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme (Figure 2).

Les antioxydants endogènes se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme telle que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, toutes trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie. Ces enzymes jouent un rôle très important dans le maintien de la santé (**Baba et McGrath, 2008**). Et les antioxydants exogènes sont fournis par l'alimentation. On retrouve le bêta-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le lycopène et les polyphénols. Il y a aussi divers minéraux tels le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse et le fer (**Kohen et Nyska, 2002**).

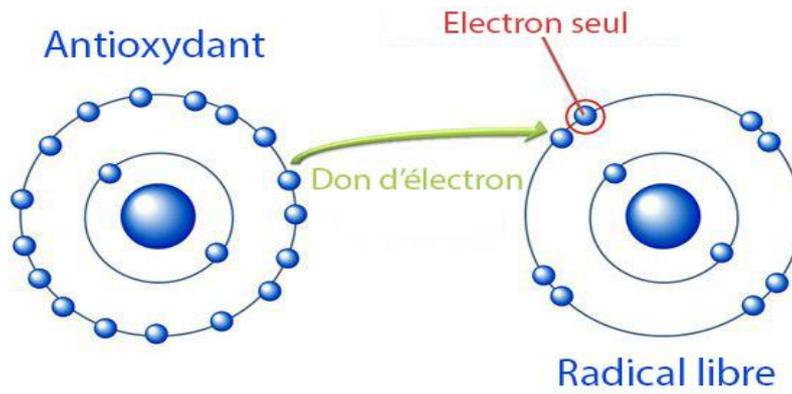


Figure 2 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.
(Google image)

Chapitre III : Les Huiles Essentielles

1. Définition :

Les huiles essentielles sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Les HE sont des composés liquides très complexes, elles ont des propriétés très réfringentes, hydrophobes et lipophiles (Benayad, 2008).

2. Composition chimique :

Les constituants des HE appartiennent à deux grands groupes, les terpénoïdes d'une part et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

2.1. Les composés terpéniques :

Les principaux constituants des HE sont les hydrocarbures terpéniques (C_{5H_8}), dont les plus fréquents les monoterpènes proprement dit ($C_{10H_{16}}$) et les sesquiterpènes ($C_{15H_{24}}$), on peut aussi trouver les terpènes sous forme tri, tétraterpènes, etc. (Allingern, 1976).

2.2. Les composés aromatiques :

Ils sont des dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) qui sont les aldéhydes, alcools, phénol, méthoxy, et dioxyde de méthylène (Bakkali et al., 2008 ; Bajpai et al., 2012).

2.3. Composés d'origines diverses :

Il s'agit des produits résultant de la transformation des molécules non volatiles : composés issus de la dégradation d'acides gras, composés issus de la dégradation des terpènes composés azotés ou soufrés (Bruneton, 1999).

3. Propriétés et Bioactivité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques, en phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Ferhat et al, 2009)

4. Techniques d'analyse des HE :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés, afin d'identifier ces différents composés, plusieurs méthodes sont utilisées comme :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie sur couche mince
- la chromatographie liquide haute performante.

5. Méthodes d'extractions :

a. Hydrodistillation :

- Immersion directe du matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition.
- La composition chimique dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante (**Bourrel, 1993**).

b. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans une chaudière, l'eau est d'abord chauffée sur un feu de bois. La vapeur produite est acheminée vers un alambic qui contient la plante. En se diffusant dans la matière végétale, la vapeur capture les huiles essentielles volatiles. Ce mélange gazeux se condense ensuite dans un serpentin refroidi à l'eau. Il s'écoule finalement dans un séparateur qui permet de récupérer les huiles (**Drouin, 1997**)

c. Expression à froid :

Ne peut convenir que pour des écorces fraîches, très riches en essence.

6. Toxicité des huiles essentielles :

Les études scientifiques montrent que les HE peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise (**Degryse et al., 2008**). Les HE semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées (**Degryse et al., 2008**).

7. L'encapsulation des HE (solubilisation) :

L'encapsulation est une technique permettant d'emprisonner des liquides ou des solides dans une enveloppe qui les isole dans le but de les protéger de l'environnement extérieur, ou de maîtriser leur libération dans un environnement choisi. L'encapsulation de

composés bioactifs (huiles essentielles, arômes, antioxydants, lipopeptides bactériens) est réalisée par le système d'encapsulation moléculaire (cyclodextrines, maltodextrines), dans laquelle la substance est encapsulée dans une cavité hydrophobe

7.1. Les cyclodextrines :

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -1,4. Elles sont dénommées respectivement α -, β - ou γ -cyclodextrine. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles. La partie extérieure est donc hautement hydrophile (Szejtli, 1988 ; Frömring and Szejtli, 1994 ; Armspach et al., 1999). Etant donné leur structure particulière et la dualité de leur polarité, les cyclodextrines sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse de composés en formant des complexes d'inclusion. Possédant une cavité plutôt hydrophobe, elles peuvent encapsuler des substances ou des parties de molécules à caractère lipophile (Brewster et Loftsson, 2007).

Chapitre IV : Monographie de l'espèce végétale

1. Description du romarin :

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L*), est une plante très connue aromatique, médicinale et condimentaire appartenant à la famille des lamiacées (labiées), qui pousse spontanément à l'état sauvage dans les régions méditerranéennes et largement répandue en Algérie.

C'est un arbrisseau qui peut atteindre jusqu'à 2 m de hauteur, touffu, toujours vert, persistant, très aromatique, très rameux et très feuillé. Les feuilles sont de couleur vert foncée étroite aux bords légèrement enroulés. Les fleurs, bilabiées, sont de couleur bleu pâle à bleu violet clair dégageant une odeur aromatique stimulante, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales ; le calice est en cloche, bilabié. Le fruit est un tétrakène de couleur brune (Wikipédia, 2018). Le mot romarin dérive du latin « *ros marinus* », qui signifie 'rosée de mer'.

2. Classification botanique :

Règne	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Genre	: Rosmarinus
Espèce	: Rosmarinus officinalis L

(Quezel et Santa, 1963)

3. Répartition géographique :

Le romarin est originaire du bassin méditerranéen mais cultivé dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps (Iserin et al., 2001), et est cultivé dans des jardins comme plante ornementale. Il apprécie les climats chauds, modérément secs, résiste

à la sécheresse et très exigeant en lumière. En Algérie, le romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national.

4. L'huile essentielle du Romarin :

4.1. Composition chimique :

L'huile essentielle de romarin a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, qui ont identifié plus de 50 composants chimiques terpéniques de l'huile essentielle dont les composants principaux sont : Camphre (15-25%) ; α -pinène (19.6%) ; Bornéol et estérifié (10%) ; 1,8 Cinéol (15-50%) ; Limonène (3,6%) (Albert. Y. et al., 1996 ; deans et al., 1998).

4.2. Composition phénolique :

- **Les acides phénoliques :** Les plus importants en teneur sont : l'acide rosmarinique, l'acide caféique, l'acide néo-chlorogénique et l'acide vanillique (M.Culvier et al., 1996) .
- **Les flavonoïdes :** Représentent l'une des classes les plus larges des composés phénoliques, elles sont responsables de la couleur des feuilles, des fleurs et des fruits. Elles présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone disposés en deux noyaux aromatiques reliés par un pont à 3 carbones.
- **Les diterpènes :** Actuellement, plus de douze diterpènes sont isolés et identifiés dans le Romarin (M-Culvier et al., 1996), ils sont responsables de l'activité antioxydante de la plante, parmi eux on cite : l'acide carnosique, le carnosol, le 12-Acide méthoxy carnosique, le rosmanol, l'épirosmanol, etc (Paris et al., 1993).

5. Utilisation :

En usage traditionnel ses feuilles sont utilisées en tisane ainsi que sur les blessures et plaies (Dorvant, 1982). Il est utilisé sous forme d'infusion, extrait fluide ou autres préparations galéniques contre les douleurs d'estomac. Il est également employé dans le traitement de plusieurs maladies (troubles digestifs ; diarrhée ; la fermentation intestinale ; etc.).

En industrie agro-alimentaire, l'épice est utilisé dans les boissons alcoolisées, les aliments cuits, viande et produits de viande et sauces. L'huile est par contre utilisée dans les boissons alcoolisées et non, les desserts glacés, confiseries.

En industrie cosmétique et parfumerie, le romarin est répandu comme l'un des ingrédients de beauté, savons, eau de toilette, dentifrice.

6. Les différentes activités biologiques de *Rosmarinus officinalis* :

6.1. Activité antibactérienne :

Weckesser et al., (2007) ont examiné les effets antimicrobiens des extraits et des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologique. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du romarin, a présenté un large spectre antimicrobien, la croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait. Le résultat montre que seule l'acide carnosique a une activité antibactérienne.

6.2. Activité antifongique :

Sacchetti et al., (2005) ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du romarin en utilisant la technique standard de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que la plupart de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée contre les cinq levures examinées : *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lypolytica*.

6.3. Activité antivirale :

Aruoma et al., (1996) ont évalué l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin, le résultat a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) aux concentrations très basses. Cependant, le carnosol a montré une activité anti-HIV à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique.

6.4. Activité ovicide :

Prajapati et al., (2005) ont identifié un agent ovicide dans l'huile essentielle du romarin contre les œufs de trois espèces de moustiques (*Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*). De même Gillij et al., (2007) ont trouvé que cette huile présente une activité répulsive contre l'œuf du moustique *Aedes aegypti*.

6.5. Activité anti-oxydante :

Balentine et al., (2006) ; Fernandez-Lopez et al., (2005) ; Sebrotynnek et al., (2005) ont étudié l'utilisation des extraits du romarin comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande.

6.6.Effet anti- hépatotoxique :

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du romarin, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine le tétrachlorure de carbone(CCL4). Les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, et enfin il a augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) (**Marie et al., 2004**).

Chapitre V : Interaction substances actives-spermatozoïdes

1. Effets des huiles essentielles :

1.1. Effets protecteurs :

Les effets protecteurs des HE à l'égard du spermatozoïde ne sont pas largement documentés par des études *in vitro*.

Aussi, la quasi-totalité des publications rapportent des effets cytotoxiques de ces huiles *in vitro* (Adeiza et al., 2011). *In vivo*, une étude a exploré l'effet de l'huile essentielle de la sarriette (*Satureja khuzestanica*) sur des rats mâles. L'HE a été administrée par voie orale à des doses de 75, 150 et 225 mg / kg / jour pendant 45 jours. Les rats traités ont été accouplés au jour 45 du traitement. Le traitement a considérablement amélioré tous les paramètres évalués tels que la libido, la fécondité, l'indice de fertilité et la taille de la portée. En outre, les concentrations de FSH et de testostérone ont été significativement augmentées dans les groupes traités avec l'HE. De même, le poids des testicules, des vésicules séminales et de la prostate a été significativement augmenté à la dose de 225 mg / kg. L'analyse histopathologique a montré que chez les rats mâles traités par cette huile (150, 225 mg / kg), le nombre de spermatogonies, de cordes spermatiques, de cellules de Leydig et de spermatozoïdes a été amélioré (Haeri et al., 2006).

1.2. Effets spermicides :

Une étude a été menée par Paul et Kang (2011) pour déterminer l'efficacité spermicide et contraceptive de l'huile essentielle de l'Ajowan « *Trachyspermum ammi* » sur le sperme humain *in vitro*. La dose minimale effective (DME) de l'huile essentielle de *T. ammi* qui a induit une immobilisation instantanée de spermatozoïdes humains était de 125 µg/ml, la motilité était irréversible. Tous les spermatozoïdes humains ont été jugés non viables après 10 minutes à cette concentration.

2. Effets des extraits phénoliques :

2.1. Effets protecteurs :

Les extraits polyphénoliques mentionnés dans la littérature ont des effets protecteurs et inhibiteurs sur les spermatozoïdes lors d'expériences *in vitro*.

Une étude de l'action de l'extrait aqueux de la nigelle, administré par voie orale à 300 mg/kg pendant 60 jours, sur la fertilité du rat mâle, montre une augmentation du poids des organes reproducteurs, ainsi qu'une stimulation des paramètres de reproduction cités précédemment. Une hausse du taux d'hormones responsables de la spermatogénèse, la LH, la FSH et la testostérone, pourrait expliquer ces observations. De plus, une mise en contact de ces rats traités avec des femelles a provoqué une augmentation du nombre de femelles gestantes, par rapport aux rats non traités. Ceci s'expliquerait par l'augmentation de la motilité et de la densité du sperme des rats traités (**Lemaoui, 2011**).

2.2. Effets spermicides :

Beaucoup de travaux ont été réalisées dans ce sens. Les extraits causent une inhibition significative de la motilité du sperme et une réduction de sa viabilité *in vitro* (**Dubey et al., 2011 ; Hemalatha et al., 2011**).

Les effets de différentes doses d'extraits de méthanol de feuilles, d'écorce de tige et de racine de la plante *Ximenia americana* sur le système de reproduction masculin ont été étudiés chez des rats mâles. Le résultat a montré que les extraits ont diminué le poids du testicule et le nombre de spermatozoïdes et augmenté les défauts de la morphologie du spermatozoïde (**Adeiza et al., 2011**).

Une étude récente montre que le nimbolide, qui est un isoprénoïde qui se trouve dans les feuilles de neem et l'extrait de graines a des effets délétères à haute dose sur les paramètres biochimiques des fonctions reproductrices chez les rats après administration orale. On a observé qu'il inhibait efficacement la motilité du spermatozoïde et la viabilité de manière dépendante de la dose. L'activité spermicide des doses graduées de nimbolide a été étudiée séparément *in vitro*, et la dose minimale effective qui conduit à l'immobilisation de la totalité des spermatozoïdes après 20 secondes était de 3,50 µg/million de spermatozoïdes (**Kumbar et al., 2012**).

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et méthode

Notre travail s'est effectué au niveau du laboratoire de Biologie Animale du bloc 12 au sein de l'Université A. Mira/ Bejaia. L'expérimentation a été faite sur des testicules de bélier (n= 7) récupérés au niveau de l'abattoir de Bejaia tôt le matin juste après l'abattage.

1. Préparation du complexe CD-HE :

Pour la préparation du complexe le ratio molaire doit être connu et respecter. Le ratio molaire de 3 : 7 pour le complexe huile essentielle romarin-cyclodextrine est donné par la littérature. Le complexe d'inclusion est préparé avec la méthode d'évaporation en utilisant un rotavapeur.

La cyclodextrine et HE du romarin ont été dissous dans 50 ml d'éthanol, le mélange a été laissé sous agitation pendant 24 h à l'abri de la lumière. Après séchage à 50°C pendant 60 min à l'aide du rotavapeur, la poudre obtenue est conservée dans un dessiccateur.

2. Préparation des milieux de conservation :

Le Tris buffer (2.7 g Tris, 1.25 g acide citrique, 1.4 g fructose, 100mg pénicilline dans 100 ml d'eau distillé) a été préparé. Des concentrations différentes d'HE (0.5, 1, 2, 4 µl/ml) ont été ajoutées respectivement dans chaque tube de Tris, le milieu sans addition d'HE a été considéré comme un contrôle.

3. Processus de la collecte du sperme :

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

- Laver bien le testicule à l'eau courante ;
- Enlever la tunique vaginale qui enveloppe le testicule et l'épididyme à l'aide d'un bistouri ;
- Isoler soigneusement l'épididyme du testicule avec toujours un bistouri ;
- Mettre en évidence le canal déférent en le débarrassant de la tunique qui l'entoure ;
- Rincer l'épididyme et le canal déférent avec la solution physiologique (0.9% NaCl) ;
- A l'aide d'une seringue stérilisée, effectuer des ponctions sur la tête de l'épididyme afin d'éliminer le sang présent dans les vaisseaux sanguins pour éviter toute contamination avec la semence. Le sang est nettoyé avec du papier absorbant.



Figure 3 : Dissection du testicule et séparation de l'épididyme.

3.2. La collecte proprement dite :

- Une incision profonde est réalisée au niveau de la tête de l'épididyme à l'aide d'une lame stérilisée et le sperme écoulé est récolté dans un eppendorf ;
- Aspirer 1 ml du Tris et remplir le reste du volume de la seringue avec de l'air ;
- L'eppendorf est placé juste en dessous de l'incision afin de récolter la semence ;
- Vider l'air et le Tris de la seringue tout en maintenant le contact de l'aiguille avec la lumière du canal bien fermer pour créer une pression qui conduit à l'écoulement de la semence dans l'éppendorf de collecte.

4. L'analyse du sperme collecté :

4.1. Analyse macroscopique :

- La couleur : observation à l'œil nu, le sperme doit être de couleur blanchâtre.
- Le volume : lecture direct sur l'eppendorf.

4.2. Analyse microscopique :

4.2.1. La motilité massale :

Une goutte de sperme de 10 μ l est déposée directement après la collecte sur une lame à l'aide d'une micropipette, puis analysée sous microscope optique au grossissement (Gx10), afin d'évaluer la motilité du sperme sur une échelle allant de 0 à 5.

4.2.2. La motilité individuelle :

L'observation se fait au grossissement (Gx40) afin de pouvoir détecter toutes anomalies morphologiques des spermatozoïdes et observer la mobilité individuelle.

4.2.3. La concentration :

En général chez l'ovine la concentration du sperme est de 3 à 4 x 10⁹, la dilution 1/50 permet d'obtenir une concentration finale de 40 à 50 x 10⁶ mesurable par l'analyseur informatique du sperme : SCA Version 5.4 (microptic S.L. Viladomat 3216,6 e4 08029 e Barcelona, Spain)

5. Analyse de la mobilité :

5.1. Analyse assistée par ordinateur (C.A.S.A) :

Les méthodes C.A.S.A (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de standardiser les examens de mobilité totale et progressive (tableau II). du sperme conservé à 4°C pe

La mobilité totale est le pourcentage de spermatozoïdes dont la VAP (Velocity Average Path) est supérieure à 10-15µm/s (**Amann and Graham, 1993**) ou supérieure à 20µm/s (**Vidament, 2005**). Après décongélation, la mobilité totale doit approcher les 50 % (**Amann et Graham, 2011**). Cependant, dans le sperme frais comme dans le congelé, la mobilité totale est peu prise en compte : les doses sont idéalement définies à partir du nombre de spermatozoïdes progressifs.

La mobilité progressive a été initialement définie comme une vitesse est supérieure à 10-15µm/s avec une linéarité importante (**Amann and Graham, 1993**). Vidament a défini la mobilité progressive comme une vitesse supérieure à 40µm/s et une linéarité supérieure à 80% (**Vidament, 2005**).

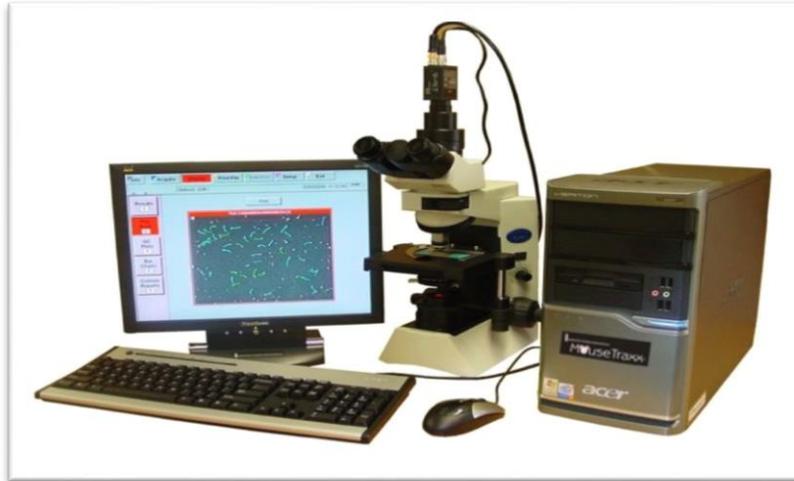


Figure 4 : Le système CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*)

Tableau II : définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyser, CASA).

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL <i>(velocity curvilinear path)</i>	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP <i>(velocity average path)</i>	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL <i>(velocity straightline path)</i>	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïde pris entre n intervalle de temps
Linéarité	LN (<i>linearity</i>)	VSL/VCL
Rectitude	STR (<i>staightness</i>)	VSL/VAP
Oscillation	WOB (<i>wobble</i>)	VAP/VCL

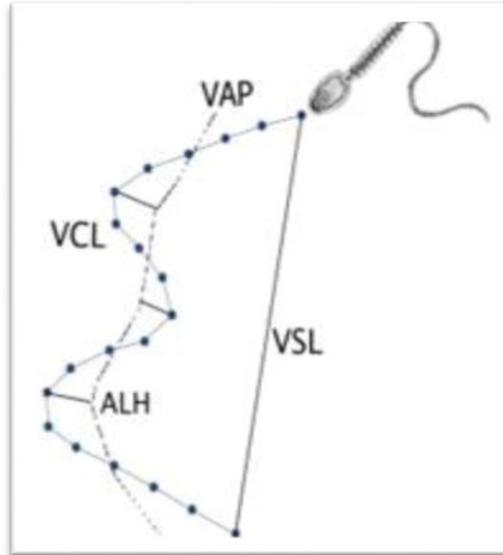


Figure 5 : Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA

5.2. Méthode d'analyse :

Dans des eppendorf nous avons mélangé 500 μl des traitements avec 10 μl de sperme et nous avons pris le milieu Tris buffer comme contrôle.

Une première analyse à T0 et à température ambiante est réalisée à l'aide du logiciel informatique CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) pour l'ensemble des 06 milieux. Les échantillons (traitement + sperme) sont conservés à 4°C, pour être analysés chaque deux heures jusqu'à T4 avec une dernière analyse après 24 heures (T24). Les figures 1 et 2 montrent un exemple des images captées et analysées par le CASA montrant les différents spermatozoïdes observés.

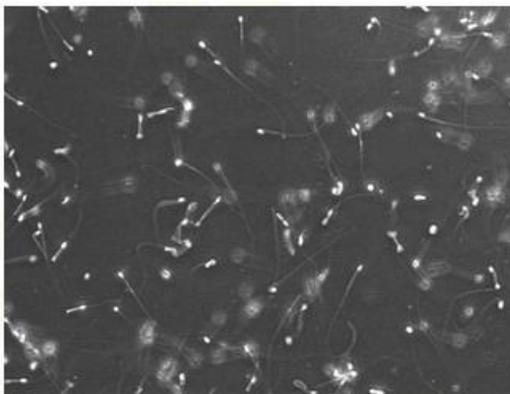


Figure 6 : Image captée par le CASA

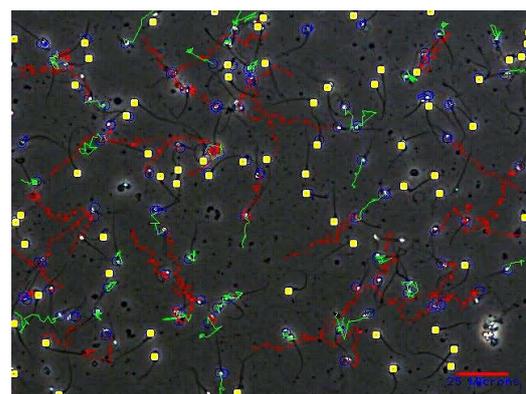


Figure 7 : Analyse du sperme par le CASA

Chapitre II : Résultats et discussion

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

Résultats :

Les figures 8, 9 et 10 représentent la variation de la VCL, VSL et la VAP en fonction des différentes concentrations d'HE dans le temps.

On remarque la présence de deux concentrations protectrices (0.5- 1 $\mu\text{l/ml}$) à T0 et une concentration à effet bénéfique (2 μl) à T0, T2 et T4. Le complexe ROM-CD a un effet bénéfique à T0 et un effet meilleur à T2, T4 et à T24

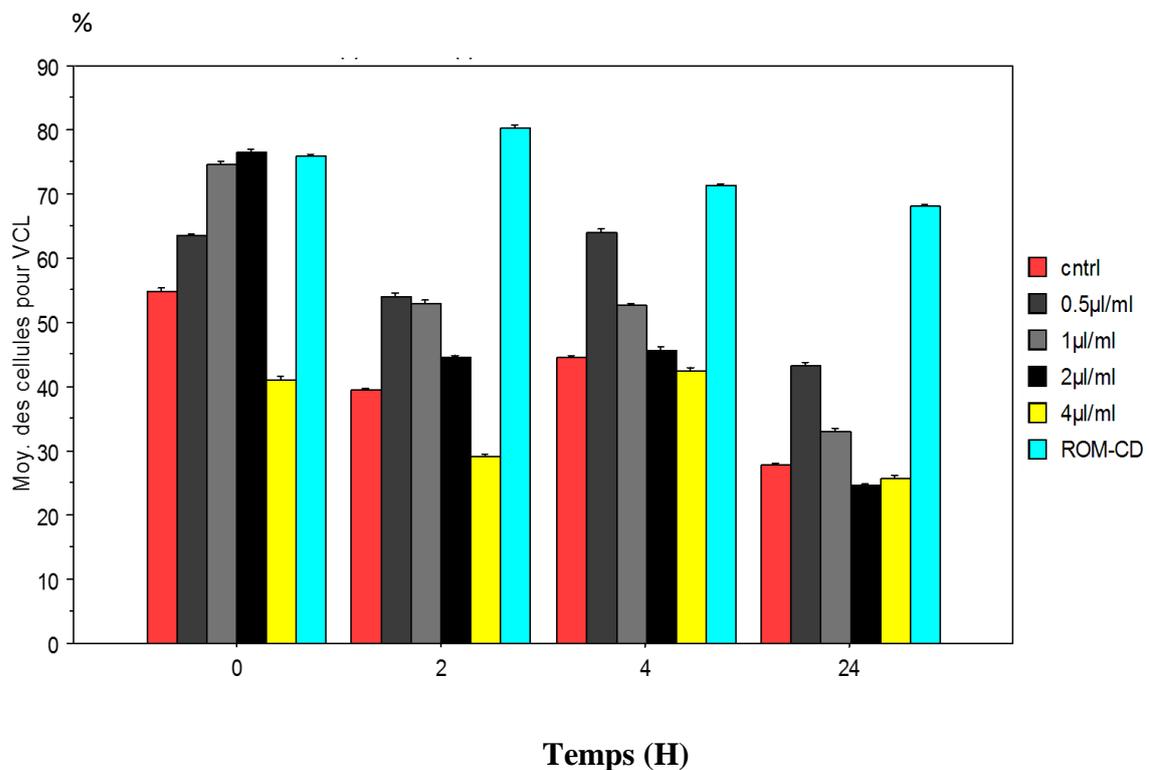


Figure 8 : Histogramme représentant la VCL des spermatozoides dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5 , 1 , 2 , 4 $\mu\text{l/ml}$ à T0 , T2,T4, T24 H .

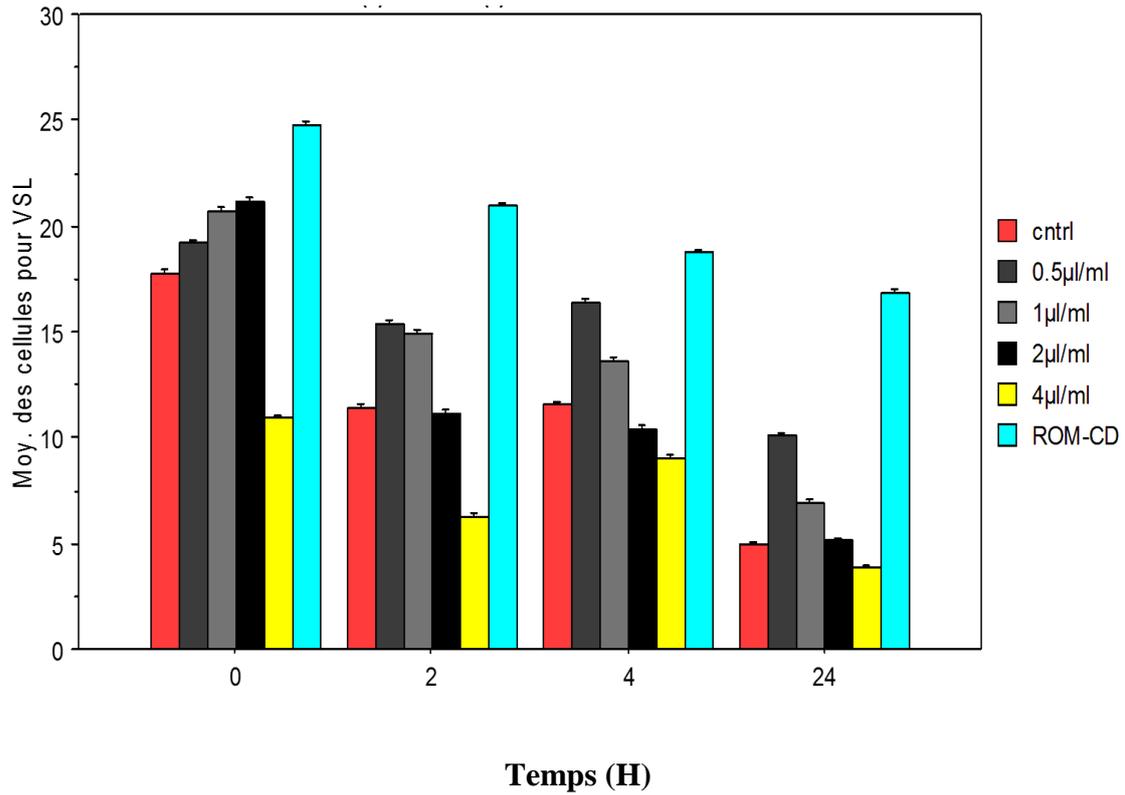


Figure 9 : Histogramme représentant la VSL des spermatozoides dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5 , 1 , 2 , 4 µl/ml à T0 , T2,T4, T24 H .

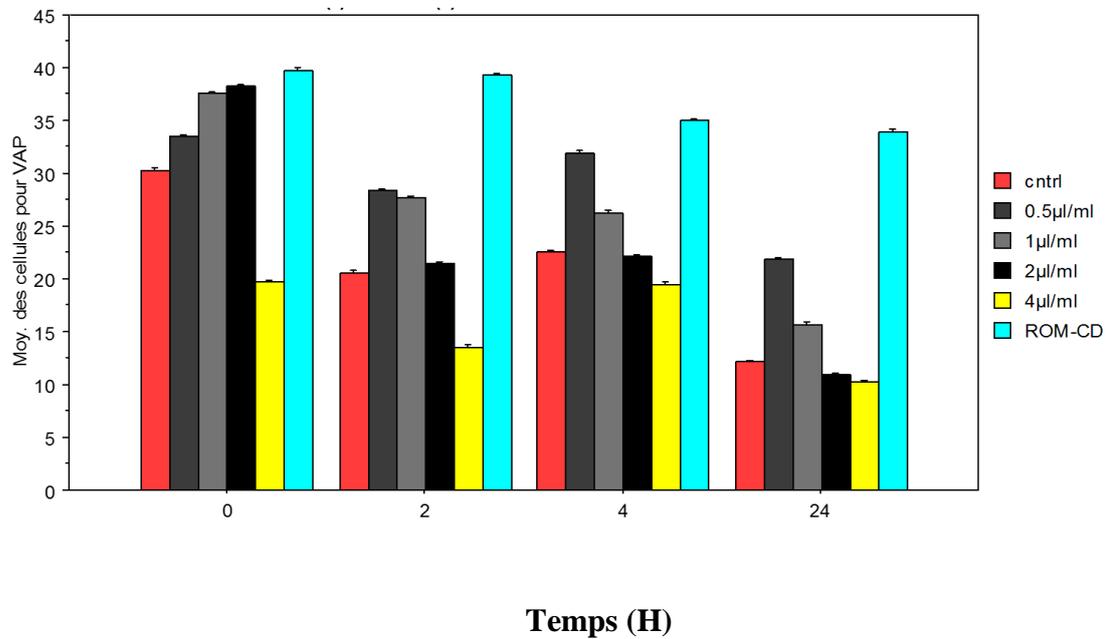


Figure 10 : Histogramme représentant la VAP des spermatozoides dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5 , 1 , 2 , 4 µl/ml à T0 , T2,T4, T24 H .

La figure 11 représente, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles en fonction des différentes concentrations HE de romarin et en fonction du temps. Nous remarquons une diminution du taux des spermatozoïdes mobiles en fonction du temps avec une meilleure mobilité dans le milieu à concentration 0.5 $\mu\text{l/ml}$. Le complexe ROM-CD a une meilleure mobilité même après 24 heures.

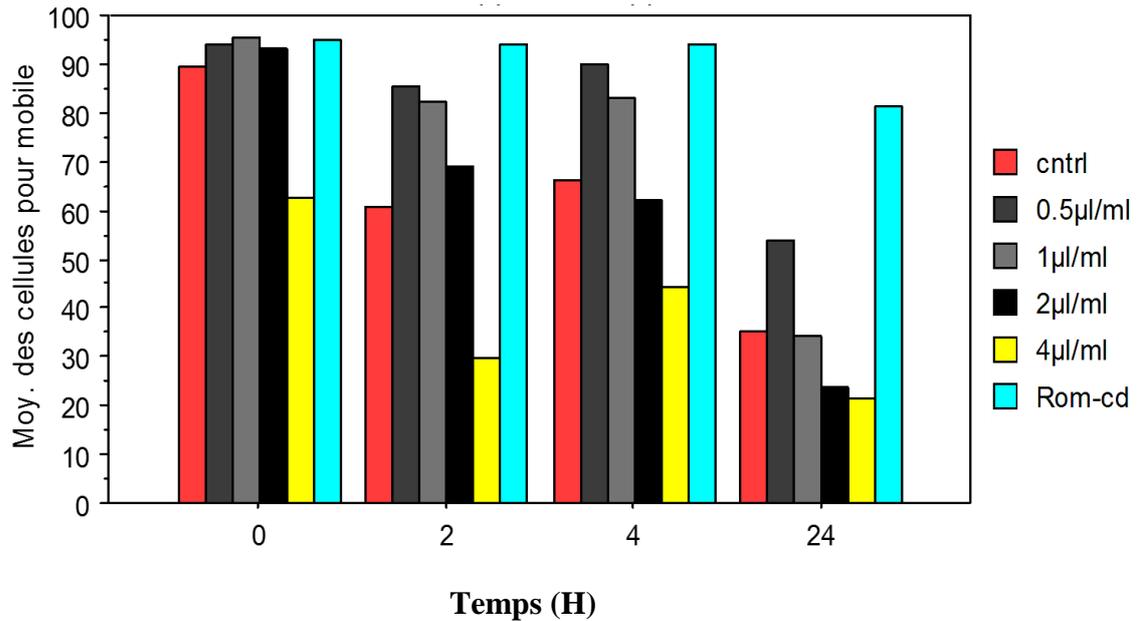


Figure 11 : Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5 , 1 , 2 , 4 $\mu\text{l/ml}$ à T0 , T2,T4, T24 H .

Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs est illustré dans la figure 12, il montre une meilleure progressivité dans le milieu ROM-CD. Deux concentrations avec un pourcentage progressif supérieur au contrôle (0.5 – 1 $\mu\text{l/ml}$) et le milieu à concentration de 4 $\mu\text{l/ml}$ a une très faible progressivité après 24 heures comparé au contrôle.

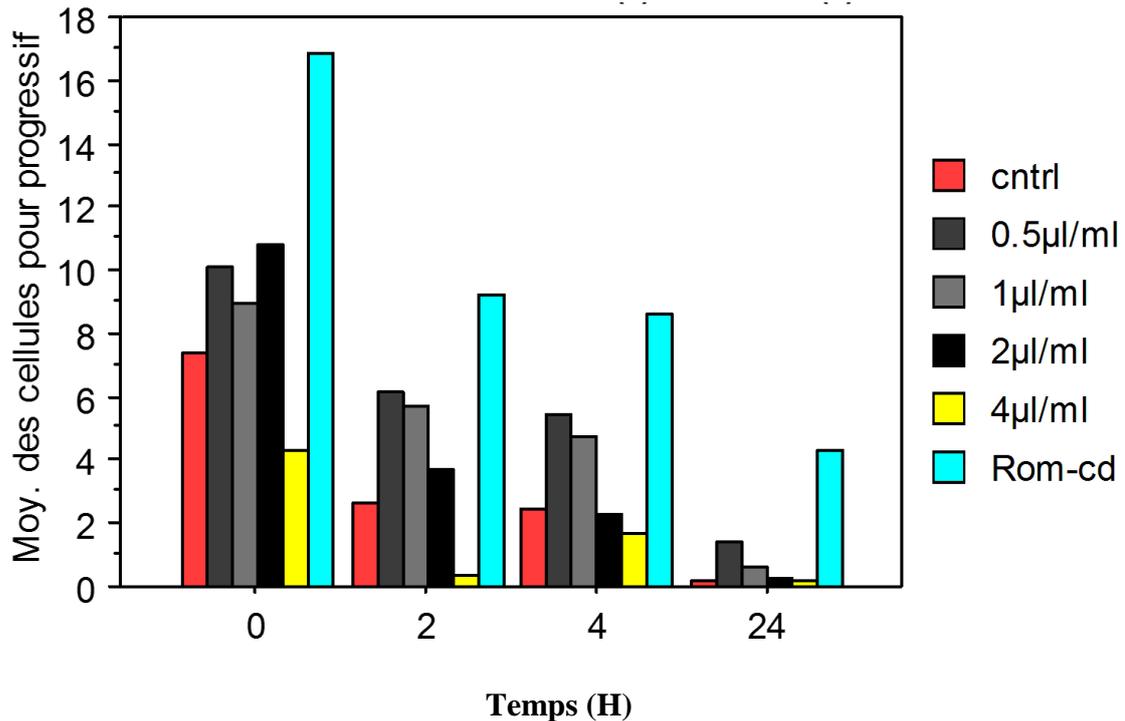


Figure 12 : Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs dans les milieux étudiés : Contrôle, ROMTrisCD et ROMTris aux concentrations 0.5 , 1 , 2 , 4 µl/ml à T0 , T2,T4, T24 H .

Discussion :

Le romarin est largement utilisé pour son activité antioxydante (**Bozin, B. et al., 2007 ; Djeddi, S. et al., 2007**), et ses propriétés antimicrobiennes (**Djeddi, S. et al., 2007 ; Boutabia, L. et al.,2016**). Récemment, chez les volailles **Borghei-Radand et al. (2017)** ont montré des effets positifs de compléments alimentaires des feuilles de *R. officinalis* sur la mobilité des spermatozoïdes et la fertilité chez les coqs avancés dans l'âge. Cependant très peu de travaux sont consacrés à l'étude de l'effet protecteur de *R.officinalis* sur la mobilité des spermatozoïdes dans l'étude *in vitro*.

Dans la présente étude, afin de lutter contre le stress oxydatif, différentes concentrations d'HE de *R.officinalis* ont été ajoutées au milieu de conservation du sperme du bélier stocké à 4°C pendant 24h. Les résultats ont montré que la qualité du sperme a été significativement préservée, en particulier avec les plus faibles concentrations de l'huile essentielle (0.5 µl/ml et 1 µl/ml) et le milieu contenant la cyclodextrine (ROM-CD). Les doses les plus élevées (2 et 4 µl/ml) ont montré un effet spermicide après 24h, ces deux

concentration ont provoqués des altérations probablement similaires à celle décrites au niveau des bactéries (Moreno, S. et al., 2006 ; Satyal, P. et al., 2017). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés sur le sperme aviaire par Touazi L. et al., (2018). Plusieurs molécules actives telles que le 1,8 cinéole, le camphre, le β -thujène, la chrysanthénone, le β -cubebène, et le camphène, connu pour son activité antioxydante, ont été identifiés dans l'analyse phytochimique, Touazi L. et al., (2018) a suggéré que ces composés sont probablement impliqués dans les effets protecteurs observés. Elmi A. et al., (2017) a indiqué un effet spermicide complet de *Thymbra capitata* à une concentration de 0.4 mg/ml mais des concentrations tolérées de *R.officinalis* allant jusqu'à 0.6 mg/ml. Une étude réalisée par Motlagh MK et al., (2014) a déterminé un effet bénéfique de l'extrait phénolique de romarin sur les paramètres spermatiques.

D'après nos résultats, nous constatons que la concentration optimale est de 0.5 $\mu\text{l/ml}$, largement supérieure à celle utilisée par Touazi L. et al., (2018) (8.7 $\mu\text{g/ml}$), cela pourrait s'expliquer par le type de l'animal étudié.

Selon les résultats de cette étude, l'utilisation de petites concentrations *in vitro* pourrait être bénéfique aux spermatozoïdes du bélier dans des conditions de 4°C, en effet les paramètres de mobilité analysés (VCL, VSL, VAP, % mobiles et progressifs) ont été significativement conservés notamment dans les concentrations 0.5 $\mu\text{l/ml}$ et 1 $\mu\text{l/ml}$.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif majeur de notre travail est de valoriser les huiles essentielles d'une plante aromatique médicinale utilisée pour ses diverses propriétés : *Rosmarinus officinalis*, par le biais de la mise en évidence de leurs propriétés spermicides et protectrices du sperme épидидymaire du bélier conservé par réfrigération à 4°C. Les huiles sont testées seules ou en association avec les cyclodextrines pour augmenter leur solubilité.

Les résultats ont montré que les meilleurs VSL et les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes progressifs sont obtenus dans le milieu contenant la cyclodextrine. Cette association entre l'HE et la cyclodextrine semble offrir une synergie entre ces deux molécules où la cyclodextrine permettrait d'encapsuler l'HE et prolonger ainsi l'action antioxydante et améliorer leur impact sur la cellule spermatique et préserver leur mobilité.

Dans l'évaluation de l'activité spermicide de cette HE sur les spermatozoïdes, les résultats ont montré une baisse de la mobilité des spermatozoïdes dans les milieux aux concentrations 2 µl/ml et 1 µl/ml.

Dans l'évaluation de l'activité protectrice de cette HE sur les spermatozoïdes, les résultats nous ont permis d'observer une amélioration des paramètres de la mobilité aux concentrations 0.5 µl/ml et 1 µl/ml avec une meilleure mobilité dans le milieu contenant la cyclodextrine.

En perspective, il serait intéressant d'explorer de nouvelles pistes de recherche notamment :

- ✓ L'effet antibactérien de cet huile essentielle dans le sperme conservé.
- ✓ Une évaluation plus profonde de la qualité des gamètes en utilisant les tests hypoosmotique (HOS), qui évalue la fonctionnalité membranaire et la microscopie électronique pour mieux caractériser les altérations ultra-structurales.
- ✓ Une meilleure caractérisation de ces HE et leur propriétés *in vivo*, par l'évaluation de leur impact sur différents types cellulaires.

Références bibliographiques

A

- Adeiza A., Abubakar. et Minka N S.** (2011) Effects of methanol extract of *Ximenia americana* on sexual behaviour, testicular weight, sperm count and sperm morphology of wister rats. *Annals of Biological Research*, 2, 107-113.
- Albert Y. Leung, Steven Foster,** (1996). *Encyclopedia of Common Naturel Ingradients Used In Foods, Drugs, And Cosmetics*, 2ème édition. Awrley -interscience publication, P445.
- Allingern.L** (1976). *Chimie organique*» Ed.Univ, MCGRAW.HILL. Tome III. Paris.
- Amann, R.P., Graham, J.K.** (1993). Spermatozoal function, In : McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds.), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 715-745
- Amann R. P, Graham J. K.** (2001). Spermatozoal function, *Equine reproduction*. 2nd edition. Wiley-Blackwell, Oxford. 1053-1085.
- Armspach, D., Gattuso, G., Königer, R., Stoddart, J.F.,** 1999. Cyclodextrins. In: *Bioorganic Chemistry : Carbohydrates*. Hecht, S.M. (Ed.), Oxford University Press, Oxford, 458-488.
- Aruoma, O I.** (1996). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 8: 53-63.B.

B

- Baba, L. & McGrath, IM.** (2008). Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care 8 Journal*, pp. 256-264.
- Bajpai K., Beak K., Jung S.** (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils. *Areview Food research international* 45:722-734. Bakchiche
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.** (2008). Biological effects of the essential oils. *Food and chemical toxicology* 46: 446-475.
- Balentine et al.** (2006). The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science*.73, p.413-421.

- Baril (G.), (P.) Chemineau, (Y.) Congnie, (Y.) Guerin, (B.) Leboeu, (P.) Orgeur, (J.C.) Valet.** (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO Production et Santé Animale, 83 : 231 p
- Barone, R.** (1978). Anatomie comparée des animaux domestiques. Tome 3. Splanchnologie II. Appareil uro-génital. Fœtus et Annexes. Péritoine et topographie abdominale. Ed. Vigot, Paris : 951 p.
- Barone, R.** (1990). Anatomie comparée des animaux domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital. Fœtus et Annexes.
- Benayad N.** (2008) : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V – Agal. Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclairée. Département de Chimie. Faculté des Sciences de Rabat. P 61.
- Bonnes, G., Desclauze, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussisau, R., Le loc'h, A., Montmeas, L., Robin, G. et al.** (2005). Reproduction des animaux d'élevages. 2^{ème} Ed. Dijon : Educagri (Ed.): 407 p.
- Borghei-Rad, S.M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H., and Ansari, M.** (2017) Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. Theriogenology, 101: 35-43.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E.** (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rose-mary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. J. Agric. Food. Chem., 55: 7879-7885.
- Bourrel C.** (1993). Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits des plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France Bousmaha-Marroki.
- Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. and Chefrour, A.** (2016). Composition chimique et activité anti-bactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). Bull. Soc. R. Sci. Liège., 85: 174-189.
- Brewster, M.E., Loftsson, T.,** (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 645-666.
- Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition. Paris: Editions médicales internationales, éditions Toc & Doc Lavoisier, 1120p.

Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional.

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

C

Carange, J. (2010). Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? Thèse de doctorat. Université du Québec Trois-Rivières.

Cook J.W., Taylor L.M., Orloff S.L., Landry G.J., Moneta G.L., Porter J.M. (2003). Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. *Vascular Pharmacology*. 38: 293-300.

D

Dacheux, F., Dacheux, J-L., (2001). L'épididyme et les glands annexes. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme, 290-315 pp. Coédition INRA- Ellipses.

Deans et al., (1998). Chemical Composition, Antibacterial, and Antioxydatantive Activity of Laurel, sage, rosmmary, Oregano and Coriander Essentials Oils *J. Essent.Oil Res.* 10 P : 618.

Decuadro-Hansen D, (2004). Chilled and frozen semen: the animal experience. Journée thématique de la SFEF, WEB : [www.em-consulte.com/en/article/27814].

Degryse A., Delpla I., Voinier M. (2008). Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ingénieure du Génie Sanitaire, atelier santé environnement.

Delaveau P, (1982). Histoire et renouveau des plantes médicinales, Paris albin Michels : éditeur. p348.

Derivaux J., (1971). Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège. Edition Derouaux.-175p.

Deutscher, G.H., Wells, M.E., et Battaglia, R.A. (2007). Evaluation of

epididymal sperm by the cannulation technique and effects of in vivo storage I Angus bulls. *Journal of animal science*, 39 (36), 1136-1143.

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

Drouin G. (1997) Résumé d'un article publié dans la revue Interface, novembre décembre.

Dubey R, Dubey K, Sridhar C. et Jayaveera K. N., (2011). Spem immobilization activity of aqueous, methanolic and saponins extract of bark of *Ziziphus Mauritiana*. *Pelagia Research Library*. Ed. *Der Pharmacia Sinica*, 2, 11-16.

E

Ece, A. Gurkan, F. Celik, F. Boşnak, M. Yel, S. Balik, H. Erel, O. (2007). Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clinical Biochemistry Journal*, Vol 40(9-10), pp. 634-639.

Elmi, A.; Ventrella, D.; Barone, F.; Benvenuti, S.; Scozzoli, M.; Bacci, M.L. (2017). *Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.) Essential Oils: In Vitro Effects and Toxicity on Swine Spermatozoa. *Molecules*, 22, 2162.

F

Favier, A. (2006). Stress Oxydant et pathologies humaines, *Annals of Pharmacotherapy SAGE Journal*, Vol 64, pp. 390-396.

Ferhat M., Kadi I. et Lahouaou A. (2009) : Recherche de substances bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Coss et Dur. Le Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie (DES). Université Mohamed Boudiaf-M'sila. Faculté des Sciences et des Sciences de L'ingénieur. Département de Biologie.

Fernandez-Lopez et al. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69 :371-380.

Frömming, K.-H., Szejtli, J., (1994). *Cyclodextrins in Pharmacy*. Davies, J.E.D. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p.

G

Gill J et al. (2007). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants.

Girod C et Czyba J – (1997). HISTOLOGIE. Appareils circulatoire, respiratoire, digestif, urinaire, organes hématopoïétiques, 3ème édition, pp 252.

H

Haeri S., Minaie B., Gholamreza A., Shekoufeh N., Khorasani R., Esmaily H., Salehnia A. et Abdollahi M. (2006). Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. Elsevier, Fitoterapia, 77, 495-499.

Hanzen Ch. (2008). Propédeutique de l'appareil génital mâle des ruminants. WEB : [http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R06_Propedeutique_male_2009_PWP.pdf]

I

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

J

Jaroslav F., Jaroslav H., Pavel K., Vojtech R., Dalibor T., Michal B., Michal S. et Ladislav K. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. Veterinary Microbiology, 145, 129–133.

K

Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M. and Gdoura, R. (2011). Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus*

officinalis L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. J. Med. Plants Res., 5: 5999-6004.

Kohen, R. & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicologic Pathology: SAGE Journals, Vol 30, pp. 620-650.

Kumbar S B., Jadaramkunti U C. et Aladakatti R H., (2012). *In vitro* spermicidal efficacy of nimbolide, an isoprenoid of neem leaf, in albino rats. Journal of Phytotherapy and Pharmacology, 4, 1-13.

L

Lemaoui A., (2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.l algérienne. Mémoire Magister, Université de Sétif, 100p.

Loftsson, T., Duchêne, D., (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, 329, 1-11.

M

Marie Elisabeth1 Lucchesi, Farid Chemat, And Jacqueline Smadja. (2004). Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J. 19: 134-138.

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

M.Culvier et al., (1996). Sage and Rosmary Phenolic Antioxydants, JAOCS.Vol(73), n°5.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rose-mary extracts linked to their polyphenol composition. Free. Radic. Res., 40: 223-231.

Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, et al. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. Cryobiology. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.007.

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* 73 541-9.

P

Paris et al., (1993). Effect of Carnosolic Acid Products. Vol 56, N°8, P1426.

Partyka Agnieszka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski.(2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77, pp1497–1504.

Patel Dk, Kumar R, Prasad Sk, Hemalatha S. (2011).Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. *Asian Pac J Trop Biomed* ; 1(1) : S131-S138.

Pons-Rejraji. H, B. Sion, F. Saez, F. Brugnol, L. Janny et G. Grizard. (2009). Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, pp 529–535.

Paul, D. , Bera, S., Jana, D., Maiti, R., & Ghosh, D. (2005). In vitro determination of the contraceptive spermicidal activity of a composite extract of *Achyranthes aspera* and *Stephania hernandifolia* on human semen. *Contraception*, 73(3), 284–288.

Paul S. et Kang S-C., (2011). *In vitro* determination of the contraceptive spermicidal activity of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex turrill fruits. *New Biotechnology*, 28, 684-690.

Prajapati et al. (2005). Insecticide, repellent.

Q

Quezel P., Santa S, (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, (1963) : pp 600.

R

Ratnam, VD. Ankola, DD. Baradwaj, V. Sahana, DK. Ravi Kumar, MNV. (2006). Role of antioxidants in Sciences, Vol 81, pp. 895-905.

Regaudie, R., Reveleau, L. (1977). Le mouton. 2ème Ed. J. B. Ballière (Ed.) : 567p.

Richard H., Benjlali B., Bauquour N., Baritoux O., (1985). Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. Lebensm-Wiss U-Technol.

S

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M.,

Gui J et ai (2007). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants.

Sauveroche, B. ; Wagner, R.G., (1993). Physiologie de la reproduction des bovins trypanotolérants : synthèse des connaissances actuelles. Rome : FAO, 1993.- 149p.- (Etude FAO Production et Santé animales " 112.

Saraswat R., (2011). Spermicidal activity in aqueous extract of *Abrus precatorius* (L.) In male albino rats. Pharmacologyonline, 3, 305-311.

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

Sebrotyneket al. (2005) .Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat science .69:289-296

Setchell, B.P. (1991) Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. 4th Ed., Academic Press, Inc. San Diego. New York. Boston. London. Sydney. Tokyo: 670 p.

Szejtli, J., (1988). Cyclodextrin Technology. Davies, J.E.D (Ed.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 450 p. Szente,

T

Thibault C, Levasseur, MC. (2001), La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris : Eddition INRA, 928p.

Touazi L., B. Aberkane, Y. Bellik B. N. Moula and M. Iguer-Ouada. (2018). Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage. Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/4.pdf].

V

Vaissaire, J.P. (1977) Sexualité et reproduction des mammifères. Maloine S.A. Ed., Paris : 457 p.

Vidament, M. (2005). French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89, 115-136.

W

Weckesser et al. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (In press).

Résumé

L'objectif de l'étude était de déterminer l'effet de l'addition de l'huile essentielle du romarin (HE ROM) et la combinaison de l'HE ROM avec la cyclodextrine (ROM-CD) sur la conservation de la semence épидидymaire du bélier stockée. La qualité de la semence a été évaluée par l'analyse assistée par ordinateur de la mobilité (CASA) à TO ; T2 ; T4 et T24 heures. Dans notre travail nous avons utilisé le Tris comme dilueur et nous avons préparé des solutions contenant différentes concentrations de l'huile essentielle. Les résultats ont montré que le meilleur milieu de conservation est celui associé à la cyclodextrine. Cette association permettrait ainsi la protection de la qualité de mobilité des spermatozoïdes au cours de la conservation. L'effet de l'huile essentielle est dépendant de la concentration, l'HE altère les spermatozoïdes avec la plus grande concentration, avec un effet spermicide à 4 µl/ml. Les concentrations les plus faibles (0.5 à 1 µl/ml), ont exhibé un effet protecteur.

Mots clés : Romarin, huile essentielle, cyclodextrine, sperme épидидymaire, bélier, conservation, effet protecteur, effet spermicide.

Abstract

The objective of the current study was to determine the effect of the addition of the essential oil of rosemary (HE ROM) and the combination of the HE ROM with the cyclodextrin (ROM-CD) on the conservation of the seed epididymal ram stored. Seed quality was assessed by Computer Assisted Mobility Analysis (CASA) at TO; T2; T4 and T24 hours. In our work we used Tris as diluter and we prepared solutions containing different concentrations of the essential oil. The results showed that the best preservation medium is that associated with cyclodextrin. This association would thus allow the protection of the mobility quality of spermatozoa during conservation. The effect of the essential oil is concentration dependent; HE spoils the sperm with the highest concentration, with a spermicidal effect at 4 µl / ml. The lowest concentrations (0.5 to 1 µl/ml) exhibited a protective effect.

Key words: Rosemary, essential oil, cyclodextrin, sperm, ram, conservation, protective effect, spermicidal effect.