

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

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



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :

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

MASTER

Thème

*Optimisation des systèmes de
solubilisation des huiles essentielles et
l'effet sur la cellule spermatique*

Présenté par :

OUMBICHE Abderrahmane & BOUZAD Rayane

Soutenu le : 02/07/2025

Devant le jury composé de :

Mme : SAD-EDDINE Ourdia	MCA	Présidente
Mr : IGUER OUADA Mokrane	Professeur	Encadrant
Mme : TALBI Asma	MCB	Examinatrice

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

*Nous souhaitons tout d'abord exprimer notre profonde gratitude à **Dieu Tout-Puissant**, pour nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à la réalisation de ce mémoire.*

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrant, **Monsieur Iguer-Ouada M.**, pour sa disponibilité, ses conseils éclairés, et son accompagnement constant tout au long de notre travail. Sa rigueur scientifique, sa bienveillance et son implication ont été des atouts majeurs dans l'aboutissement de cette recherche.*

*Nos sincères remerciements vont également à **Madame Lezrag A. H.**, doctorante, pour son aide précieuse, son soutien technique et les ressources qu'elle a mises à notre disposition tout au long de la phase expérimentale. Sa contribution a été d'une grande importance pour le bon déroulement de ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement **Monsieur Fatmi S.** pour sa disponibilité et son assistance durant nos manipulations, ainsi que pour ses conseils pratiques.*

*Nous tenons également à remercier les **membres du jury**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail :*

- ***Madame Sad-Eddine**, pour avoir accepté de présider le jury et d'évaluer notre mémoire avec bienveillance,*
- ***Madame Talbi**, pour avoir accepté d'examiner notre travail et pour ses remarques constructives.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à **l'ensemble du personnel du Laboratoire des Écosystèmes Marins et Aquacoles de l'Université de Béjaïa**, pour leur accueil, leur soutien logistique et leur collaboration tout au long de notre projet.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents, pour leur amour inestimable, leurs sacrifices constants et leur soutien inconditionnel. Votre présence et vos prières m'ont porté à chaque étape de ce parcours.

À mon cher frère Zaid, pour son soutien, ses encouragements et l'inspiration qu'il m'apporte chaque jour.

À mon binôme et ami Rayane, pour son engagement, sa persévérance, et l'esprit d'équipe dont il a fait preuve tout au long de ce travail. Merci pour ces moments de collaboration et d'amitié sincère.

À mon cher ami Yasmine, malgré la distance, installé au Canada, ton amitié reste présente et précieuse. Merci pour ton soutien moral et tes paroles toujours justes, même à des milliers de kilomètres.

À mes amis de l'université, avec qui j'ai eu l'honneur de vivre des années mémorables, notamment Omar, Fouad, Loutfi, Aya, Mounir, et tous ceux dont le soutien et la camaraderie ont enrichi cette expérience humaine et académique.

Abderrahmane

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leur soutien indéfectible à chaque étape de mon parcours.

À ma sœur, qui, malgré la distance, reste toujours présente dans mon cœur. Merci pour ton soutien moral, ta bienveillance et ta force silencieuse.

À mes amis Djamel et Yanis, pour leur amitié fidèle, leur compréhension et les instants partagés qui ont su alléger les moments difficiles.

Et à mon binôme, pour sa collaboration, son engagement et l'esprit d'équipe qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

Merci à vous tous, du fond du cœur.

Rayane

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : les huiles essentielles.....	4
Introduction	4
1. Définition	4
2. Historique	5
3. Sources des huiles essentielles	5
4. Composition chimique et propriétés biologiques.....	6
4.1 Composition chimique	6
➤ Les terpénoïdes.....	6
➤ Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (phénylpropanoïdes)	6
4.2 Propriétés biologiques	6
5. Domaines d'utilisations des huiles essentielles.....	7
6. Toxicité.....	7
7. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	8
7.1 Les méthodes classiques.....	8
7.2 Les méthodes innovantes	8
8. Le Romarin.....	8
8.1 Définition et généralité.....	8
8.2 Classification scientifique : (<i>Begum et al., 2013</i>)	9
9. Huile essentielle de Romarin (<i>Rosmanirus officilanis</i>).....	10
9.1 Description d'HE de romarin	10
9.2 La composition chimique d'HE de romarin :	10
9.3 Activités biologiques et utilisation de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officilanis</i>	10
Chapitre 2 : Solubilisation des huiles essentielles et systèmes d'encapsulation	13
Introduction	13
1. Revue des systèmes existants pour la solubilisation des HE.....	13
1.1 Les cyclodextrines.....	13
1.2 Liposome	15
1.3 Lipides	16
2. PEG	17

3. Les Tensioactifs.....	18
4. Span 60.....	20
Chapitre 3 : Conservation du sperme	22
Introduction :.....	22
1. Le sperme	22
1.1 La spermatogenèse	22
1.2 Caractéristiques biologiques du sperme	23
3. La cryoconservation	24
3.1 La conservation à court terme	24
3.2 La conservation à long terme	24
3.3 Les étapes de la conservation	26
3.3.1 La collecte du sperme.....	26
3.3.2 Analyse de sperme	27
3.3.3 Examen macroscopique du sperme	28
➤ Volume	28
➤ Couleur et aspect	28
➤ L'odeur	28
➤ Le pH.....	28
➤ La viscosité.....	29
➤ Liquéfaction / aspect physique :.....	29
➤ Analyse microscopique	29
➤ La motilité	29
➤ La concentration	30
➤ Viabilité.....	30
➤ Morphologie et anomalies.....	30
➤ Tests complémentaires et fonctionnels.....	31
➤ Techniques analytiques utilisées	31
4. Milieu de conservation de sperme.....	32
4.1 Tris	32
4.2 Jaune d'œuf	33
4.3 Le lait écrémé	33
4.4 Lécithine de soja.....	33
4.5 Le cholestérol	34
4.6 Cryoprotecteurs pénétrants (glycérol)	34
4.7 Les huiles essentielles	34

5. Le stress oxydatif	35
5.1 Effets du stress oxydatif sur le nombre, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes	35
5.1.1 Nombre de spermatozoïdes	35
5.1.2 Motilité des spermatozoïdes.....	35
5.1.3 Morphologie des spermatozoïdes.....	36
5.1.4 Stress oxydatif et dommages à l'ADN dans le sperme.....	36
5.2 Définition et types d'antioxydants	36
5.2.1 Antioxydants enzymatiques	37
5.2.2 Antioxydants non enzymatiques	37
Matériels et Méthodes	39
Partie 1 : Solubilisation de l'huile essentielle de romarin.....	39
1. Objectif :.....	39
2. Matériel et réactifs.....	39
3. Préparation des formulations.....	40
Protocole de préparation :	40
4. Caractérisation de la solubilisation :	40
5. Détermination des formulations optimales :	41
Partie 2 : Application des systèmes solubilisés sur les spermatozoïdes caprins	42
1. Objectif :.....	42
2. Matériel biologique :	42
Préparation de la solution Tris :	44
3. Préparation des formulations testées	44
4. Groupes témoins :.....	45
5. Paramètres évalués :	45
6. Analyse statistique.....	46
Résultats et discussion :.....	47
Partie 1 :	47
1. Le diamètre :.....	47
2. La richesse en gouttelettes des différentes formulations.....	49
3. Formulations retenues	50
Discussion	51
Partie 2 :	52
Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la mobilité spermatique.....	52
1. Analyse de VSL des spermatozoïdes selon le milieu et la durée de conservation	52

2. Le pourcentage des spermatozoïdes à motilité rapide.....	55
Discussion	56
Conclusion.....	58

Liste des références

Résumé

Abstract

Liste des figures

Figure 1: le Romarin (<i>Rosmanirus officinalis</i>)	9
Figure 2: Les structures de cyclodextrines les plus courantes (a) α -CD, (b) β -CD et (c) γ -CD (Bülbül et al., 2020).....	14
Figure 3 : illustrations schématiques de la formation d'un complexe d'inclusion entre une cyclodextrine (hôte) et un invité (Niculescu, 2020).	15
Figure 4 : Structure de liposome, Micelle et bicouche lipidique (Bobo, 2017)	16
Figure 5 : Systèmes à base des lipides (Poonia et al., 2016).....	17
Figure 6: La structure chimique du PEG 6000 (Helsinta et al., (2021).	17
Figure 7: schéma illustre la formation des micelles à l'aide des tensioactifs	18
Figure 8: Structure chimique du Tween-20, du Tween-80 (Szymczyk et al., 2018)	19
Figure 9: la structure chimique du Span 60	20
Figure 10: la morphologie du spermatozoïde (BOUKHECHEM, 2024).....	23
Figure 11: Exemple d'un vagin artificiel adapte au taureau (BOUKHECHEM, 2024)	27
Figure 12: logiciel de mesure les tailles des particules	41
Figure 13: microscope optique équipée à une caméra	41
Figure 14: solution préparé après homogénéisation.....	41
Figure 15: Testicule du caprin.....	43
Figure 16: La queue de l'épididyme	43
Figure 17: Le sperme collecté	43
Figure 18 : histogramme représentant le diamètre moyen des gouttelettes (μm) obtenu dans différentes formulation contenant de l'huile essentielle (romarin) associée à divers tensioactifs a différentes concentrations.....	47
Figure 19: histogrammes représentant la richesse en gouttelettes des différentes formulations contenant de l'huile essentielle (romarin) associée à divers tensioactifs a différentes concentrations.....	49
Figure 20 : solution présente un aspect visuel trouble (ex : Span60 15 μl)	50
Figure 21 : solution présente un aspect visuel transparent (ex : Tween20 15 μl).....	50
Figure 22: Évolution de la vitesse linéaire droite (VSL) des spermatozoïdes en fonction du temps dans différents milieux de conservation	52
Figure 23: Pourcentage de spermatozoïdes à motilité rapide selon les formulations et le temps (0 h, 30min, 1 h, 2 h).....	55

Liste des tableaux

Table 1: Principaux composés de l'huile essentiel de <i>Rosmarinus officinalis</i> L et leur structures chimiques et activités biologiques : (Borges et al., 2018)	11
Table 2 : Les dimensions internes typiques des cavités des Cyclodextrines (Del Valle, 2004).	14
Table 3: Propriétés des liposomes dans l'encapsulation des HE	15
Table 4: Description de critère de la richesse en gouttelette	42
Table 5: Formulations à base de Tween 20	44
Table 6: Formulations à base de PEG 600	45

Liste des abréviations

<i>Abréviation</i>	<i>Définition complète</i>
PEG	Polyéthylène glycol
CDs	Cyclodextrines
HE	Huile essentielle
VSL	Vitesse linéaire du spermatozoïde
VA	Vagin artificiel
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TA	Tensioactif
CMC	Concentration micellaire critique
T-PEG	Témoin contenant uniquement le polyéthylène glycol
T-huile	Témoin contenant uniquement l'huile essentielle de romarin
T-Tween	Témoin contenant uniquement le tensioactif Tween
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
GPx	Glutathion peroxydase
IA	Insémination artificielle
CASA	Analyse assistée par ordinateur du sperme (<i>Computer-Assisted Sperm Analysis</i>)
PNA-FITC	Lectine d' <i>Arachis hypogaea</i> marquée au FITC (fluorescéine isothiocyanate)
HOST	Test hypo-osmotique
μl	Microlitre
ml	Millilitre
DMSO	Diméthylsulfoxyde
SLN	Nanoparticules lipidiques solides (<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>)
NLC	Nanostructures lipidiques (<i>Nanostructured Lipid Carriers</i>)

Introduction générale

La recherche biologique et biomédicale explore de plus en plus le potentiel des huiles essentielles. Issues de la distillation de plantes aromatiques, ces huiles complexes sont riches en terpènes et autres composés secondaires bioactif. Leurs propriétés documentées incluent des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, analgésiques et anti oxydantes. En particulier, les composés phénoliques et mono terpéniques qu'elles contiennent peuvent piéger les radicaux libres et agir comme agents antioxydants thérapeutiques. [\(Pezantes-Orellana et al., 2024\)](#).

L'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*) est prise comme modèle d'étude. Riche en acides phénoliques (acide carnosique, carnosol) et monoterpènes (1,8-cinéole), elle est reconnue pour ses fortes propriétés anti oxydantes. Elle est par exemple utilisée comme agent conservateur alimentaire grâce à son activité antioxydante et antimicrobienne. Des travaux ont également souligné son effet antioxydant et anticholinestérasique, suggérant un potentiel neuroprotecteur dans des contextes pathologiques (p. ex. maladie d'Alzheimer). Ces caractéristiques du romarin abondant dans la flore méditerranéenne en font un candidat privilégié pour tester l'efficacité des huiles essentielles comme protecteurs biologiques. [\(Pezantes-Orellana et al., 2024\)](#).

Toutefois, la très faible solubilité des huiles essentielles en milieu aqueux limite fortement leur utilisation in vitro et in vivo [\(Wang et al., 2023\)](#). Sans excipient, elles forment une phase séparée et ne se dispersent pas dans les milieux hydriques de conservation. Divers systèmes de solubilisation ont été développés pour contourner cette limitation : micro- ou nano-émulsions stabilisées par des tensioactifs non ioniques (polysorbates tels que Tween, sorbitan esters type Span), Co-solvants hydrosolubles (polyéthylène glycol, PEG) ou complexes d'inclusion avec cyclo dextrines. Ces vecteurs permettent d'augmenter la miscibilité et la stabilité des huiles en solution. Par exemple, formuler une huile essentielle en microémulsion accroît considérablement sa solubilité dans l'eau et renforce ses activités antimicrobienne et antioxydante par rapport à l'huile libre [\(Wang et al., 2023\)](#). De même, l'encapsulation de l'huile essentielle de romarin dans une cyclo dextrine (hydroxypropyl- β -CD) a amélioré sa solubilité et sa capacité à préserver la motilité des spermatozoïdes de bélier lors de conservation frigorifique. [\(Benberkane et al., 2019\)](#).

Introduction générale

La conservation du sperme en reproduction animale (réfrigération à 4°C ou congélation cryogénique) soumet les spermatozoïdes à un stress oxydatif important. Le cycle congélation/dégel induit une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui endommagent la membrane, l'acrosome et l'ADN, causant une chute de motilité et de viabilité spermatique ([Goujet et al., 2025](#) ; [Stigliani et al., 2024](#)). Classiquement, des antioxydants (vitamines, glutathion, etc.) sont ajoutés aux milieux de conservation pour limiter ces dommages. Plus récemment, l'ajout d'huiles essentielles anti oxydantes a montré un effet bénéfique ([Goujet et al., 2025](#)), rapportent ainsi qu'une huile essentielle de romarin maintient significativement la motilité progressive et la fonctionnalité membranaire des spermatozoïdes humains après décongélation ([Goujet et al., 2025](#)).

Il apparaît donc clairement que la mise au point d'un système de solubilisation optimal pour l'huile essentielle de romarin pourrait améliorer la qualité spermatique en situation de conservation. En effet, un véhicule de solubilisation approprié assure la distribution homogène de l'huile dans le milieu et stabilise ses composés actifs, maximisant ainsi leur effet protecteur antioxydant. Par exemple, une microémulsion d'huile essentielle améliore son efficacité antioxydante comparée à l'huile non émulsifiée ([Wang et al., 2023](#)). De même, l'enrobage cyclo dextrine de l'huile de romarin a nettement renforcé sa capacité à protéger les spermatozoïdes de bélier des dommages liés à la conservation ([Benberkane et al., 2019](#)). Ces approches suggèrent qu'une formulation bien conçue conduit à une amélioration mesurable des paramètres spermatique (motilité, viabilité, intégrité).

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé un système de solubilisation basé sur l'utilisation de tensioactifs non ioniques et de polyéthylène glycol, afin d'améliorer la dispersion de l'huile essentielle de romarin, reconnue pour ses effets antioxydants, en vue de son application dans la conservation du sperme du bouc soumis au stress oxydatif.

La première partie de ce mémoire présente une synthèse de la littérature existante, en commençant par un premier chapitre portant sur les huiles essentielles, un deuxième sur la solubilisation et les systèmes d'encapsulation des huiles essentiels, enfin un troisième chapitre qui traite la conservation de sperme.

La seconde partie est dédiée à l'étude expérimentale divisée en deux parties à savoir matériels et méthodes, résultats et discussion et conclusion.

Chapitre 1

Les huiles essentielles

Chapitre 1 : les huiles essentielles

Introduction

Les huiles essentielles représentent un groupe de composés naturels volatils produits par les plantes aromatiques. Riches en principes actifs, elles sont reconnues pour leurs propriétés biologiques variées, incluant des effets antimicrobiens, antioxydants et anti-inflammatoires. Grâce à cette diversité d'activités, elles suscitent un intérêt croissant dans divers domaines d'application tels que la médecine, la cosmétologie, l'agroalimentaire et plus récemment, la biotechnologie de la reproduction.

Ce chapitre introductif a pour objectif de fournir un cadre générale sur les huiles essentielles. Il présente leur définition, leur composition chimique, leurs mécanismes d'action biologiques, ainsi que leurs utilisations. Sont également abordés les aspects relatifs à leur toxicité, leur historique et leurs sources, ainsi que les principales méthodes d'extraction

Une attention particulière est accordée à *Rosmarinus officinalis L*, ou romarin, une plante médicinale bien connue dont l'huile essentielle est riche en composés bioactifs, Le choix de l'huile essentielle de romarin dans cette recherche est basé sur son potentiel à être introduit dans des systèmes biologiques, à condition de surmonter certaines contraintes en lien avec sa solubilité dans un milieu aqueux. Ils seront présentés dans le prochain chapitre, qui traitera des différentes méthodes de solubilisation.

1. Définition

Le terme « huile essentielle » a été introduit au XVI^e siècle par Paracelse, qui le tirait de l'expression « *quinta essentia* », les huiles essentielles sont des substances aromatiques naturelles, extraites de différentes parties des plantes. (Paul et al., 2020). Les huiles essentielles (HE) sont des substances aromatiques naturelles, extraites de différentes parties des plantes. Elles sont hydrophobes, immiscibles à l'eau, solubles dans les solvants organiques, et souvent moins denses que l'eau (El Asbahani et al., 2015).

Selon la 7^e édition de la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est définie comme un produit odorant complexe, obtenu sans altération chimique notable par entraînement à la vapeur, distillation à sec ou procédés mécaniques appropriés. Après extraction, une

séparation de la phase aqueuse est effectuée, et des traitements comme la déterpénation ou la rectification peuvent être appliqués ([El Asbahani et al., 2015](#)).

Elles sont utilisées dans des domaines variés : parfumerie, agroalimentaire, pharmacie, agriculture et hygiène, Grace à leur richesse en activités biologiques (antioxydant, antimicrobienne, antifongique....) ([Paul et al., 2020](#)). Elles sont réparties principalement dans les familles botaniques suivantes : Lamiacées, Lauracées, Astéracées, Rutacées, Myrtacées, Poacées, Cupressacées et Piperacées ([El Asbahani et al., 2015](#)).

2. Historique

Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles ont joué un rôle important dans les pratiques spirituelles et rituelles à travers le monde. Utilisés dans des contextes variés ; du culte de la Déesse en lien avec des arbres sacrés, aux rituels d'embaumement égyptiens, en passant par les offrandes hébraïques, grecques et romaines ; ces substances symbolisaient le sacré et facilitaient la connexion avec le divin. Le commerce international des épices, assuré notamment par les Arabes, permettait leur diffusion et leur adaptation dans diverses traditions, incluant celles de l'Inde, du bouddhisme et même des peuples autochtones ([Thompson, 2003](#)). Plus tard, au XIX^e siècle, ces huiles ont commencé à être utilisées industriellement, notamment dans les domaines de la parfumerie et de la médecine. ([Nebie, 2023](#)) Aujourd'hui, les huiles essentielles trouvent des applications industrielles variées, notamment dans les secteurs pharmaceutique, alimentaire et agricole. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, dans la conservation des aliments, en aromathérapie et en tant que biopesticides. ([Bolouri et al., 2022](#)).

3. Sources des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés volatils et parfumés extraits de diverses parties de plantes aromatiques. Elles sont principalement produites par des structures spécialisées appelées trichomes glandulaires, qui se trouvent sur la surface des organes végétaux tels que les fleurs et les feuilles. ([Sharifi-Rad et al., 2017](#)) Ces huiles sont des mélanges complexes d'hydrocarbures et de dérivés oxygénés, provenant de voies isoprénoïdes, comprenant principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes. ([Sharifi-Rad et al., 2017](#)) Les principales familles de plantes productrices d'huiles essentielles comprennent les Lamiacées,

les Myrtacées, les Rutacées et les Apiacées. [\(de Sousa et al., 2023\)](#) Les huiles essentielles peuvent être extraites de différentes parties de la plante, telles que les fleurs (par exemple, la lavande), les feuilles (comme la menthe poivrée), l'écorce (comme la cannelle).

4. Composition chimique et propriétés biologiques

4.1 Composition chimique

Les huiles essentielles se composent en moyenne de 20 à 60 composés, voire plus de 300 dans certains cas. Généralement, deux ou trois composants dominant (20–70 % de la composition totale) : par exemple, la *Mentha × villosa* est riche en rotundifolone, l'*Eucalyptus globulus* en 1,8-cinéole et le *Cinnamomum zeylanicum* en cinnamaldéhyde. Par ailleurs, même les composés présents en faible quantité influencent l'activité des huiles par des interactions synergiques ou antagonistes. Ces différents composés proviennent principalement de deux voies biosynthétiques, menant aux terpénoïdes et aux phénylpropanoïdes. [\(de Sousa et al., 2023\)](#).

➤ Les terpénoïdes

Sont le groupe majeur des composés présents dans les huiles essentielles. Ils sont synthétisés à partir d'unités isopréniques (de cinq carbones), il comprend les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30). Ces composés sont des hydrocarbures ou leurs dérivés oxygénés, tels que les alcools, cétones, esters et oxydes. [\(de Sousa et al., 2023\)](#).

➤ Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (phénylpropanoïdes)

Ce groupe comprend des composés tels que l'eugénol, l'anéthol et le cinnamaldéhyde, présents dans des huiles essentielles comme celles de girofle, d'anis et de cannelle. [\(de Sousa et al., 2023\)](#).

4.2 Propriétés biologiques

Depuis l'antiquité, les huiles essentielles sont employées pour leurs diverses vertus thérapeutiques. La diversité moléculaire contenue dans les huiles essentielles est à l'origine de leur large éventail de propriétés biologiques. [\(Nebie, 2023\)](#) La littérature souligne que les huiles

essentielles sont dotées de caractéristiques antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antispasmodiques, insecticides, insectifuges, antivirales, antioxydants, anthelminthique, antiparasitaire etc. *(Paul et al., 2020)*.

5. Domaines d'utilisations des huiles essentielles

Grace à la forte valeur d'activité biologique des composants des huiles essentielles, ces derniers sont utilisés dans divers domaines d'industries notamment dans le cosmétiques les huiles essentielles sont utilisés comme matière première de base pour la fabrication des savons et des parfums , Dans l'industrie alimentaire, les huiles essentielles sont employées pour améliorer la saveur des aliments, ainsi que pour leur conservation en raison des propriétés antimicrobiennes et antioxydants de certains de leurs composants . Les huiles essentielles sont utilisées aussi dans le domaine pharmaceutique et thérapeutique pour la fabrication des médicaments ou les employés directement en tant qu'agents de traitements, et dans le secteur agricole elles sont utilisées dans la lutte contre les ravageurs grâce à leurs activités insecticides. *(Bessah & Benyoussef, 2015)*. Des études montrent que les huiles essentiels possèdent des pouvoirs antioxydants pour cela sont utilisées dans la lutte contre le stress oxydative causé au moment de la cryoconservation de sperme. *(Bessah & Benyoussef, 2015)*.

6. Toxicité

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils (terpènes, alcools, phénols, aldéhydes, cétones, etc.) qui, à petites doses, peuvent offrir des bienfaits thérapeutiques, mais deviennent toxiques si elles sont mal utilisées. Leur toxicité dépend de la voie d'administration, de la biodisponibilité des composés et de la dose appliquée. Une mauvaise dilution, un surdosage ou une application inappropriée peut provoquer des réactions cutanées, des irritations respiratoires, voire des effets systémiques (neurotoxicité, hépatotoxicité, etc.). Ainsi, pour limiter les risques, il est nécessaires de respecter les recommandations posologiques et les précautions d'emploi, notamment en cas d'utilisation à des fins thérapeutiques, et de consulter un professionnel de santé lorsque nécessaire. *(Poirot, 2016)*.

7. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de matières premières végétales par plusieurs méthodes d'extraction, ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : les méthodes classiques et les méthodes innovantes ([El Asbahani et al., 2015](#)).

7.1 Les méthodes classiques

Distillation par entraînement à la vapeur, l'Hydrodistillation, Extraction par solvant organique, Extraction par expression à froid etc. ([Bouras, 2019](#) ; [El Asbahani et al., 2015](#) ; [Naeem et al., 2018](#)).

7.2 Les méthodes innovantes

Extraction par CO₂ supercritique, Extraction par micro-ondes, Extraction par fluide supercritique (SCFE) etc. ([Bouras, 2019](#) ; [El Asbahani et al., 2015](#) ; [Naeem et al., 2018](#))

Chaque méthode possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal. ([Bouras, 2019](#)).

8. Le Romarin

8.1 Définition et généralité

Rosmarinus Officinalis Linn. (Romarin) ([Figure1](#)), de la famille des Lamiacées, est une plante aromatique persistante d'un mètre de haut, aux tiges dressées, aux fleurs bleu blanchâtre et aux feuilles vert foncé ([Rajesh, 2024](#)), cette plante possède une vaste aire de culture, mais elle pousse spécifiquement dans les pays méditerranéens ([Mersin & Çitoğlu, 2022](#)) , Son nom vient du *latin* roses (rosée) *etmarinus* (mer) qui signifie « rosée de la mer », Il existe plus de 20 variétés de romarin ([Begum et al., 2013](#)). Parmi tous les espèces de Romarins ,seulement *Rosmarinus officinalis* a une importance en termes de couverture de tous ces secteurs en termes d'aspects médicaux, cosmétiques, pharmaceutiques et industriels, notamment agroalimentaires ([Mersin & Çitoğlu, 2022](#)) , grâce à de nombreuses preuves des propriétés biologiques (Antioxydants , antimicrobiennes, antidiabétiques etc....) L'activité antioxydante du romarin est directement attribuable aux composés chimiques présents dans les huiles essentielles et les extraits de la plante. ([Rajesh, 2024](#)).

8.2 Classification scientifique : (*Begum et al., 2013*)

Royaume : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Super-division : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Rosmarinus* L.

Espèces : *Officinalis*

Nom binomial : *Rosmarinus officinalis* L



Figure 1: le Romarin (Rosmanirus officinalis)

9. Huile essentielle de Romarin (*Rosmanirus officilanis*)

9.1 Description d'HE de romarin

L'HE de romarin est incolore à jaune pâle, avec une saveur caractéristique et un goût camphré ([Begum et al., 2013](#)), représente environ 1 à 2,5 % du poids total de la plante ([Borges et al., 2018](#)). Sa densité est de 0,894-0,912, son indice de réfraction de 1,464-1,476 et sa rotation optique de 5 à 10°, il est insoluble dans l'eau et soluble dans 10 volumes d'alcool à 80 %. Son indice d'acidité ne dépasse pas 1,0 ([Begum et al., 2013](#)). Le rendement d'huile essentielle de Romarin dépend de plusieurs facteurs, notamment : La méthode d'extraction, l'extraction pendant le cycle de développement et selon la partie utilisée de la plante, et par rapport à la saison de la récolte, et à la zone géographique où la plante est récoltée. ([Borges et al., 2018](#)).

9.2 La composition chimique d'HE de romarin :

Les principaux constituants de l'huile de romarin sont : le camphre, le 1,8-cinéol, l' α -pinène, le bornéol, le camphène, β -le pinène, limonène, verbénone, caryophyllène et myrcène. ([Begum et al., 2013](#)), l'acétate de bornyle l' α -terpinéol ([Borges et al., 2018](#)), Linalol, Myrténole, α -Thujène, Tréphine, 3-Carène, P-Cyménène, Camphonelal et Iso-Pinocamphone ([Meziane et al., 2025](#)).

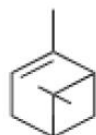
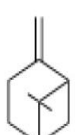
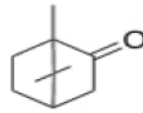
Cette diversité dans la composition chimique du romarin dépend de plusieurs facteurs essentiels tels que : la localisation géographique ; le climat ; le temps de récolte, la méthode d'extraction ([Hussain et al., 2010](#) ; [Rajesh, 2024](#)).

9.3 Activités biologiques et utilisation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officilanis*

L'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est riche en composés bioactifs tels que le 1,8-cinéole, l' α -pinène, le carnosol et l'acide rosmarinique, qui lui confèrent un large spectre d'activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Ces propriétés ont justifié son utilisation comme conservateur naturel en agroalimentaire, ingrédient fonctionnel en cosmétique et dermatocosmétique, agent d'aromathérapie pour réduire l'anxiété et stimuler la vigilance, et excipient dans des formulations pharmaceutiques visant à améliorer la biodisponibilité de principes actifs ([Rahbardar & Hosseinzadeh, 2020](#)).

Une étude a mis en évidence l'activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin, en montrant sa capacité à limiter la peroxydation lipidique ainsi que les dommages membranaires sur les spermatozoïdes durant le stockage à froid. (Touazi et al., 2018).

Table 1: Principaux composés de l'huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* L et leur structures chimiques et activités biologiques : (Borges et al., 2018)

Composé	Activité biologiques	Structure chimique
1,8-cinéole	<i>Anti-inflammatoire</i> <i>Antidépresseur</i> <i>Antalgique</i> <i>Antioxydant</i> <i>Activité relaxante des muscles lisses</i>	 1,8 cineole 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo [2.2.2]octane
-- pinène	<i>Anti-inflammatoire</i> <i>Antifongique</i> <i>Antioxydant</i> <i>Antibactérien</i>	 α-pinene 2,6,6-trimethylbicyclo [3.1.1]hept-2-ene  β-pinene 6,6-dimethyl-2-methylenebicyclo [3.1.1]heptane
Camphre	<i>Anti-inflammatoire</i> <i>Antalgique</i> <i>Antimutagène</i> <i>Antioxydant</i>	 camphor 1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1]heptan-2-one

Chapitre 2

Solubilisation des huiles essentielles et systèmes d'encapsulation

Chapitre 2 : Solubilisation des huiles essentielles et systèmes d'encapsulation

Introduction

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges lipophiles très volatils (monoterpènes, sesquiterpènes, etc.) aux usages pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires ([Pavoni et al., 2020](#)). Leur faible solubilité dans l'eau et leur instabilité (oxydation, volatilisation rapide) limitent toutefois leur exploitation industrielle ([Pavoni et al., 2020](#)). C'est pourquoi de nombreux systèmes de solubilisation et d'encapsulation ont été développés, depuis les méthodes classiques jusqu'aux nanotechnologies modernes. Cette revue compare les approches principales, tensioactifs (micelles/émulsions), cyclodextrines ainsi que les vecteurs avancés (nano-émulsions, liposomes, nanoparticules, micelles polymériques, etc.). Elle illustre notamment chaque technique par des exemples appliqués à la huile essentielle. L'efficacité (augmentation de solubilité ou de biodisponibilité), la stabilité et la sûreté de chaque système sont comparées, ainsi que leurs avantages, inconvénients et contraintes réglementaires.

1. Revue des systèmes existants pour la solubilisation des HE

1.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques capables de former des complexes d'inclusion avec diverses molécules hydrophobes, comme les huiles essentielles ([Figure 3](#)). Leur mécanisme d'action repose sur leur structure en forme d'anneau : l'intérieur hydrophobe capte les composés lipophiles, tandis que l'extérieur hydrophile rend l'ensemble soluble dans l'eau. Cela améliore la stabilité, la solubilité et la biodisponibilité des huiles essentielles, tout en masquant leur goût ou odeur désagréables. L'efficacité des cyclodextrines se traduit par une libération contrôlée et une meilleure protection des huiles contre la lumière, la chaleur et l'oxydation. Parmi les avantages figurent leur faible toxicité, leur biodégradabilité et leur capacité à améliorer l'activité biologique des huiles essentielles. Cependant, leurs inconvénients incluent un coût élevé de production, une capacité limitée d'encapsulation pour les molécules très volumineuses et une possible interaction avec d'autres composés dans les formulations complexes ([Wadhwa et al., 2017](#)).

Les cyclodextrines (CDs) sont généralement classées en trois types naturels selon le nombre d'unités de glucose dans leur structure cyclique (**figure 2**) :

- **α -cyclodextrine (α -CD)** : 6 unités de glucose
- **β -cyclodextrine (β -CD)** : 7 unités de glucose
- **γ -cyclodextrine (γ -CD)** : 8 unités de glucose

Chaque type possède une cavité hydrophobe de taille différente, ce qui conditionne son affinité avec les molécules invitées, comme les composés d'huiles essentielles (HE). La taille de la cavité influence la stabilité du complexe d'inclusion formé ainsi que le rendement d'encapsulation. (*Del Valle, 2004*).

Les dimensions internes typiques des cavités sont les suivantes :

Table 2 : Les dimensions internes typiques des cavités des Cyclodextrines (*Del Valle, 2004*).

Type de CD	Nombre d'unités glucose	Diamètre interne (nm)	Volume de cavité (nm ³)	Exemples d'HE compatibles
α -CD	6	0,47–0,53	$\approx 0,17$	Menthol, eugénol
β -CD	7	0,62–0,78	$\approx 0,26$	Thymol, carvacrol, linalol
γ -CD	8	0,75–0,90	$\approx 0,48$	Géraniol, citronellol

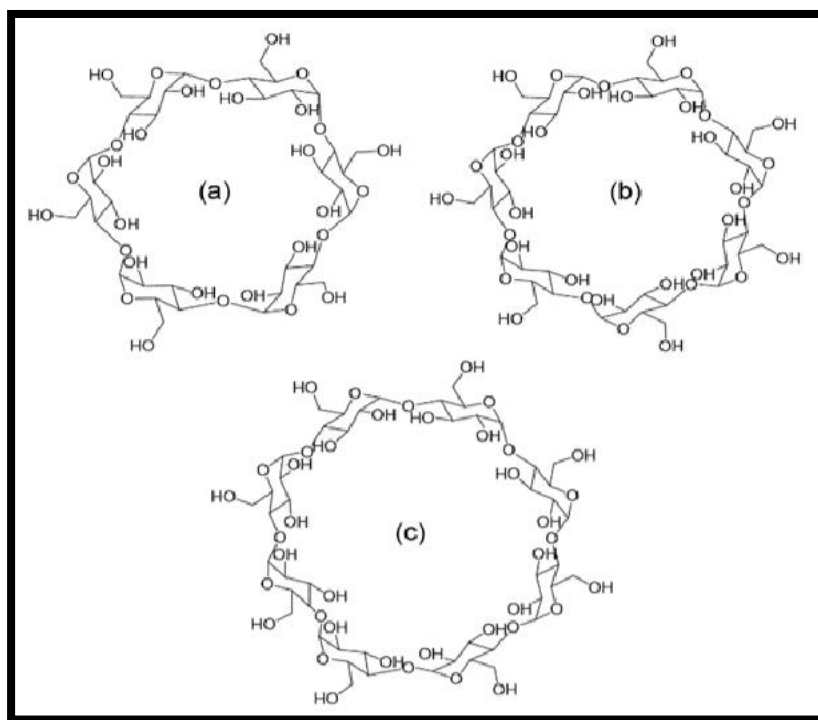


Figure 2: Les structures de cyclodextrines les plus courantes (a) α -CD, (b) β -CD et (c) γ -CD (*Bülbül et al., 2020*)

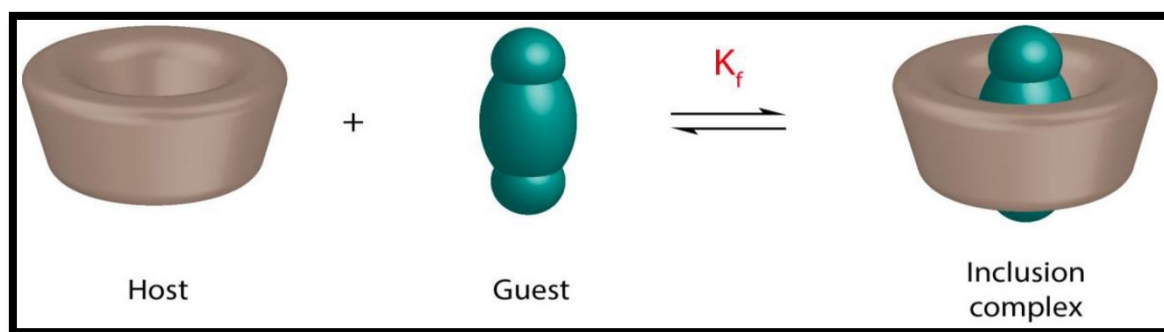


Figure 3 : illustrations schématiques de la formation d'un complexe d'inclusion entre une cyclodextrine (hôte) et un invité (Niculescu, 2020).

1.2 Liposome

Les liposomes (Figure 4) sont des vésicules sphériques formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides capables d'encapsuler des substances hydrophiles dans leur cœur aqueux et des composés lipophiles dans leur membrane lipidique. Cette propriété les rend particulièrement intéressants pour la solubilisation, la stabilisation et la libération contrôlée des huiles essentielles (HE), dont la faible solubilité aqueuse limite l'utilisation. (Sherry et al., 2016)

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'encapsulation des HE dans des liposomes, allant de la méthode classique de Bangham à des techniques plus avancées utilisant des fluides supercritiques. Ces méthodes influencent les caractéristiques des liposomes obtenus, telles que la taille, l'efficacité d'encapsulation et la stabilité. (Sherry et al., 2016)

Table 3: Propriétés des liposomes dans l'encapsulation des HE

Propriété	Valeur courante	Référence
Taille moyenne des particules	100–200 nm (selon méthode)	(Sherry et al., 2016 ; Torchilin, 2005)
Efficacité d'encapsulation	65–90 %	(Baranauskaite et al., 2018) (Nii & Ishii, 2005).
Zêta potentiel	±20–40 mV	(Kumar et al., 2021)
Stabilité (en solution)	1–6 mois à 4 °C, selon le type de phospholipide	(Torchilin, 2005)

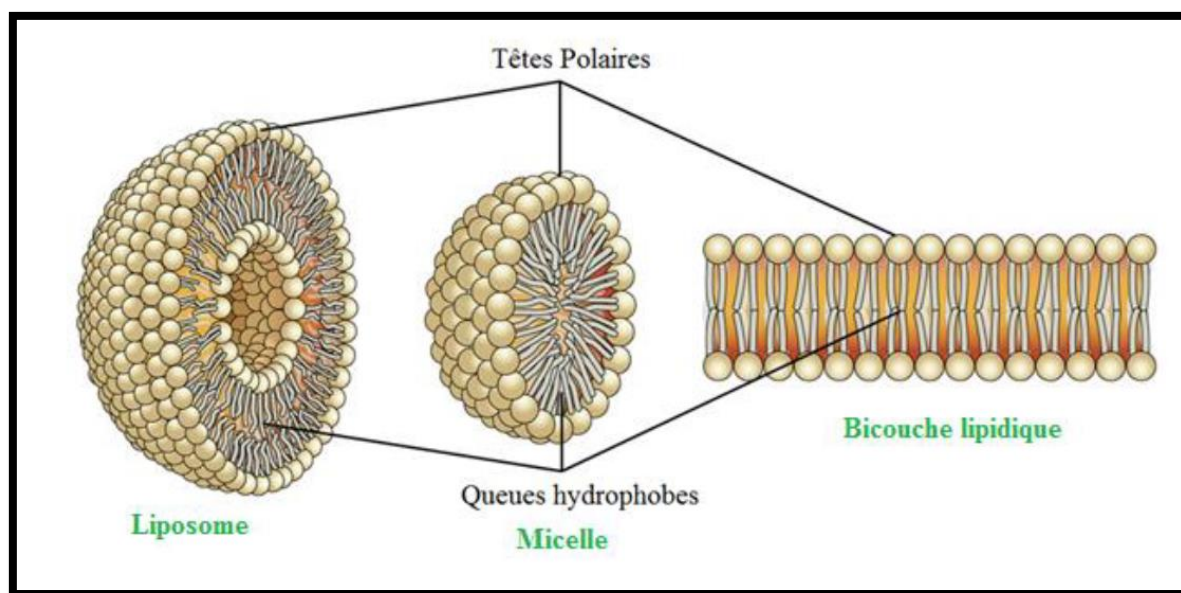


Figure 4 : Structure de liposome, Micelle et bicouche lipidique (Bobo, 2017)

1.3 Lipides

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) (figure 5) sont des systèmes colloïdaux submicroniques dans lesquels un lipide liquide est remplacé par un lipide solide à température ambiante, offrant une matrice rigide capable d'encapsuler des composés lipophiles. Les nanostructures lipide carriers (NLC) (figure 5), quant à eux, combinent des lipides solides et liquides pour former un cœur lipidique moins ordonné, améliorant la capacité d'incorporation et évitant la cristallisation prématurée des lipides. Leur mécanisme d'action repose sur la constitution d'une matrice lipophile qui piège le principe actif dans le noyau, le protégeant des fuites et de la dégradation avant libération. Cette structure permet une diffusion contrôlée du composé encapsulé, modulée par la taille des particules et le degré de cristallinité du lipide. Pour les huiles essentielles, l'encapsulation dans SLN/NLC améliore la solubilité et la stabilité, réduisant l'oxydation et la volatilisation des terpènes. La libération prolongée et ciblée des huiles essentielles se traduit par une bioactivité accrue (antimicrobienne, antifongique) et une biodisponibilité améliorée in vivo. Enfin, ces nanotransporteurs, biocompatibles et fabriqués à partir de lipides issus de sources GRAS, sont facilement extensibles à l'échelle industrielle et présentent un profil de sécurité favorable pour les applications pharmaceutiques et alimentaires.

(Bashiri et al., 2020 ; Sheikh et al., 2024).

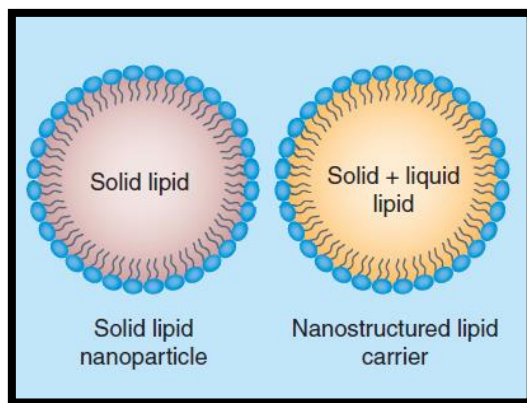


Figure 5 : Systèmes à base des lipides
(Poonia et al., 2016)

2. PEG

Le polyéthylène glycol (PEG) est une macromolécule issue de la polymérisation d'unités d'oxyde d'éthylène (éthoxylation). Ce polymère synthétique fait partie de la famille des polyéthers linéaires de masse moléculaire inférieure à 20000 g.mol⁻¹. Ce polymère peut être sous différent poids moléculaire, et présente des qualités physico-chimiques et biologiques remarquables incluant l'hydro solubilité et liposolubilité élevée, sa biodégradation à température ambiante, sa biocompatibilité et le fait qu'il est éliminé par filtration rénale pour de faibles poids moléculaire. (Zohra et al., 2021)

Le polyéthylène glycol (PEG 6000) (Figure 6), polymère non toxique, couramment utilisé dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires, représente une option prometteuse. Le PEG 6000 est un polyéther linéaire de masse molaire 6000 g/mol de la famille des glycols, dont les deux groupes hydroxyles sont portés par des atomes de carbone différents formés par la répétition du motif de formule éthylène glycol C₂H₆O₂ (Et-tanteney et al., 2024)

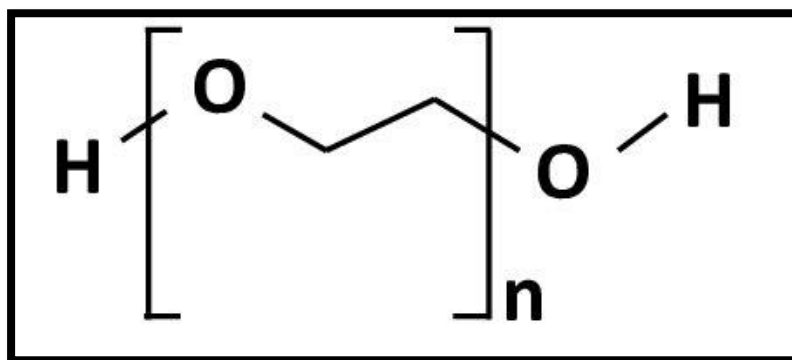


Figure 6: La structure chimique du PEG 6000 (Helsinta et al., (2021).

De plus, le PEG présente une grande solubilité dans les solvants organiques, ce qui facilite les modifications des groupes terminaux. De plus, le PEG est soluble dans l'eau et présente une faible toxicité intrinsèque, ce qui en fait un polymère idéal pour les applications biologiques. Lorsqu'il est lié à des médicaments ou des vecteurs hydrophobes, son hydrophilie augmente leur solubilité en milieu aqueux. Il confère aux médicaments une meilleure stabilité physique et thermique, tout en prévenant ou en réduisant leur agrégation *in vivo* et pendant le stockage, grâce à l'encombrement et/ou au masquage des charges par la formation d'un « nuage conformationnel » (*Knop et al., 2010*).

3. Les Tensioactifs

Les molécules tensioactives, également appelées agents de surface ou surfactants. Selon la terminologie anglo-saxonne, sont en général des amphiphiles naturelles ou synthétiques caractérisées par la présence, dans la même molécule, de deux parties de polarités opposées : une tête hydrophile (cationique, anionique, zwitterionique ou non ionique), à affinité pour l'eau et les composés polaires, et une queue hydrophobe, le plus souvent formée d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, ayant une affinité pour les huiles ou, plus généralement, pour les milieux apolaires. Cet antagonisme interne entraîne des contraintes locales responsables de l'adsorption spontanée de ces molécules aux interfaces (air-eau, huile-eau, solide-liquide), où elles s'orientent de façon à diminuer la tension interfaciale et à stabiliser les émulsions, même à très faible concentration (**Figure 7**). Au-delà de la concentration micellaire critique (CMC), les tensioactifs s'auto-assemblent en micelles, phénomène repérable par une modification brutale de propriétés physico-chimiques telles que la tension superficielle, la conductivité électrique (pour les composés ioniques), l'absorbance ou la pression osmotique (*Chaal, 2005*).

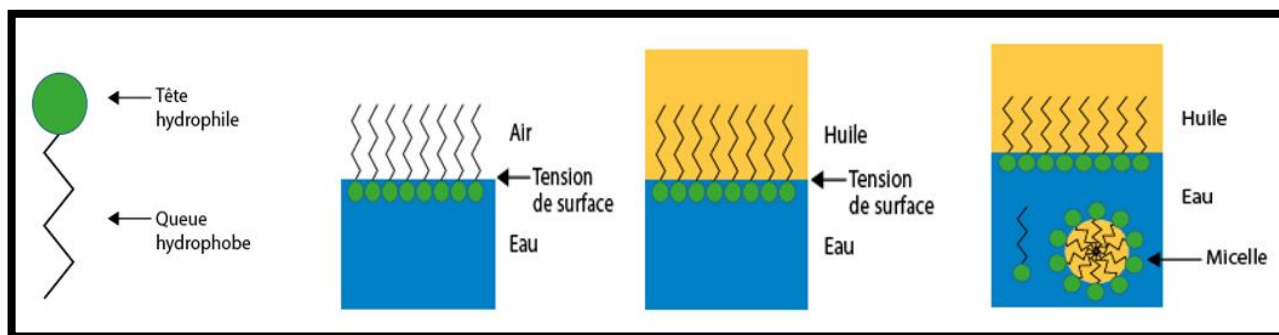


Figure 7: schéma illustre la formation des micelles à l'aide des tensioactifs

Les tensioactifs non ioniques, tels que ceux du groupe Tween (polysorbates), sont largement utilisés dans les essais précliniques et cliniques, car ils servent d'émulsifiants pour les substances lipophiles. Il a été démontré que les tensioactifs non ioniques sont moins toxiques que les tensioactifs ioniques pour les membranes biologiques. De plus, étant plus hydrophobes, les tensioactifs non ioniques possèdent également une plus grande capacité à dissoudre les médicaments peu solubles, sont des émulsifiants très efficaces et peuvent être utilisés dans des systèmes d'administration de médicaments auto émulsifiants.

Le Tween-80 et le Tween-20 présentent des propriétés structurales et fonctionnelles similaires. Structuellement, ils possèdent deux groupements non ioniques (Figure 8), l'un hydrophile (sorbitol polyéthoxylé) et l'autre hydrophobe (groupes oléyle ou lauryle). En solution aqueuse, ces molécules ont tendance à s'auto-agréger et, au-delà de la concentration micellaire critique, elles forment des particules colloïdales, des micelles sphériques lipophiles à l'intérieur et hydrophiles à l'extérieur. La taille des particules varie entre 5 nm et 25 nm selon les propriétés physicochimiques du milieu. En raison de leur nature amphiphile, ils peuvent réduire la tension interfaciale des systèmes de solvants et disperser une variété de matériaux non miscibles. (Pérez-Rosés et al., 2015)

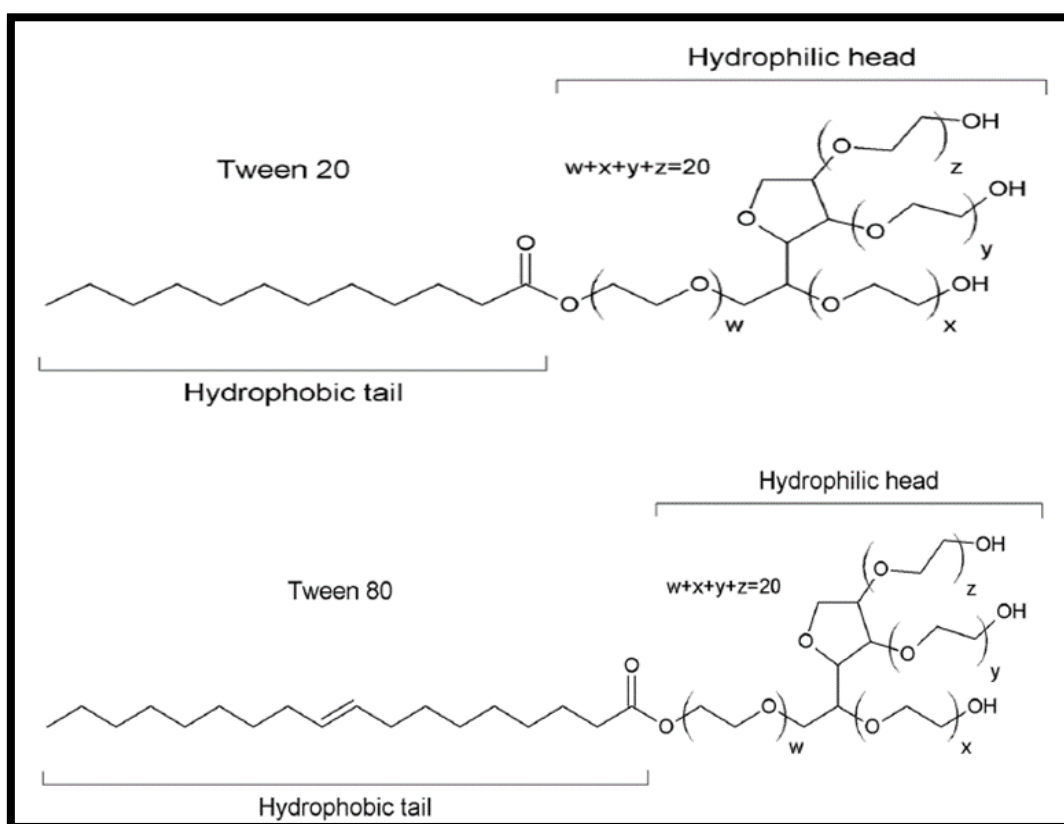


Figure 8: Structure chimique du Tween-20, du Tween-80 (Szymczyk et al., 2018)

4. Span 60

Span 60 (**Figure 9**), ou sorbitan monostearate, est un tensio-actif non ionique souvent utilisé dans des applications scientifiques, notamment en pharmacie, en chimie et en science des matériaux. Il est employé comme émulsifiant, dispersant et agent de stabilisation dans divers systèmes, y compris les émulsions et les systèmes lipidiques, il est stable et peut être utilisé dans une large gamme de conditions (**Nikorn et al., 2022**). Il est utilisé pour stabiliser les émulsions huile dans eau (H/E) et pour contrôler la taille des particules et la stabilité des émulsions, Il est efficace pour stabiliser les émulsions et pour contrôler la taille des particules. (**Nurhaliza et al, 2023 ; Uvanesh et al, 2016 ; Zhao et al, 2013**).

Span 60 peut être utilisé dans une variété d'applications scientifiques, ce qui en fait un outil précieux pour les chercheurs. Des études à long terme ont été menées pour évaluer la toxicité de Span 60 chez les souris, mais il a été démontré qu'il ne présente pas d'effets cancérogènes. (**Hendy et al., 1978**). Il est considéré comme non toxique et biocompatible, ce qui le rend adapté à une utilisation en pharmacie et en médecine. (**Hendy et al, 1978 ; Nikorn et al., 2022**).

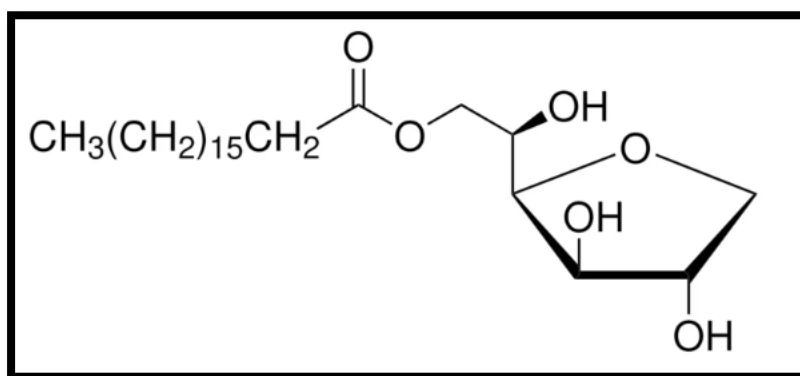


Figure 9: la structure chimique du Span 60

Chapitre 3 : La conservation du sperme

Chapitre 3 : Conservation du sperme

Introduction :

La conservation du sperme est une étape clé dans le domaine de la reproduction assistée et dans les programmes de préservation de la fertilité. Elle repose sur la compréhension fine des caractéristiques biologiques du sperme, ainsi que sur la maîtrise des procédés de cryoconservation et des milieux utilisés. Ce chapitre aborde les aspects biologiques du sperme, les étapes de sa conservation, les types de milieux employés, et l'impact du stress oxydatif sur sa qualité.

1. Le sperme

1.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse (ou gamétogenèse mâle) se déroule dans les testicules, plus précisément à l'intérieur des tubes séminifères. Elle débute à la puberté et se poursuit de manière continue chez les mammifères adultes. Les spermatogonies, cellules souches germinales diploïdes situées à la périphérie des tubes séminifères, subissent des divisions mitotiques pour assurer leur renouvellement et générer des spermatocytes primaires.

Ces spermatocytes primaires entrent ensuite en méiose : la première division méiotique donne naissance aux spermatocytes secondaires, qui subissent à leur tour une seconde division pour former des spermatides haploïdes ([Ferih, 2020](#)).

Enfin, lors de la spermiogénèse – phase finale de la spermatogenèse – ces spermatides se différencient en spermatozoïdes haploïdes, cellules allongées, mobiles et hautement spécialisées, qui sont alors libérées dans la lumière du tube séminifère ([Akhtar et al., 2020](#)).

En résumé, la spermatogenèse est un processus cyclique et hautement coordonné de multiplication, de différenciation et de maturation cellulaire, qui transforme des spermatogonies diploïdes en spermatozoïdes fonctionnels haploïdes ([Akhtar et al., 2020](#)).

1.2 Caractéristiques biologiques du sperme

Le sperme est une suspension biologique complexe composée principalement de spermatozoïdes et de plasma séminal, qui fournit un environnement nutritif et protecteur aux gamètes mâles ([Saha et al., 2022](#)).

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée composée de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. La tête contient l'acrosome, qui libère des enzymes facilitant la pénétration de l'ovule, et le noyau. La pièce intermédiaire est riche en mitochondries fournissant l'énergie nécessaire à la motilité ([Johnson et al, 2000](#)). ([Figure 10](#))

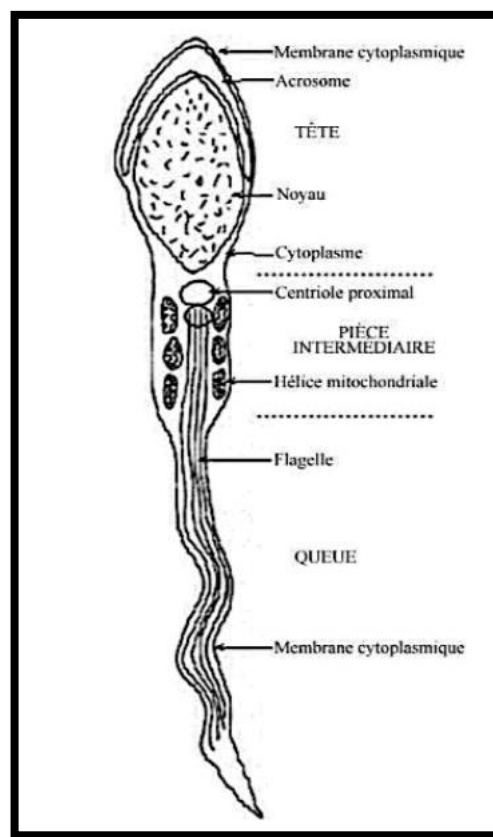


Figure 10: la morphologie du spermatozoïde ([BOUKHECHEM, 2024](#))

Le plasma séminal contient des éléments essentiels tels que des sucres (fructose), des enzymes, des ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}), des protéines, des lipides, et parfois des facteurs antioxydants, qui assurent la viabilité, la mobilité et l'intégrité des spermatozoïdes. ([Saha et al., 2022](#)).

Les paramètres biologiques fondamentaux utilisés pour évaluer la qualité spermatique comprennent la motilité, la vitalité, la morphologie et la concentration ([Barth & Oko, 1989](#)). Le sperme est très sensible aux facteurs externes comme les variations de température, le pH, et l'exposition à des agents oxydants ([Rosato et al., 2006](#)).

3. La cryoconservation

La cryoconservation du sperme est une approche facultative pour conserver les spermatozoïdes du meilleur donneur pendant des périodes illimitées, permettant la préservation des pools génétiques et l'utilisation la plus efficace des dosages de sperme en utilisant l'IA. (Saha et al., 2022). C'est une des méthodes les plus importantes pour améliorer la reproduction des animaux domestiques elle visant à améliorer la reproduction et la conservation de nombreuses espèces, notamment des petits ruminants. (Saha et al., 2022).

3.1 La conservation à court terme

La conservation à court terme (réfrigération) du sperme animal implique un stockage à 4 °C sans descendre en dessous de zéro dans des dilueurs spécifiques pour une durée limitée allant de quelques heures à plusieurs jours. Cette méthode est utilisée principalement pour l'insémination artificielle rapide (Salamon & Maxwell, 2000), elle vise à prolonger la viabilité des gamètes tout en préservant leur pouvoir fécondant. En ramenant progressivement la température corporelle à 4 °C (à un rythme d'environ 0,5 °C par minute), on ralentit le métabolisme des spermatozoïdes et on réduit leur consommation énergétique, ce qui permet d'économiser leurs réserves. Un abaissement trop rapide provoquerait un « choc dû au froid » susceptible d'endommager les membranes plasmique, acrosomique et mitochondriale. Enfin, le stockage à 4 °C assure une durée de conservation nettement supérieure à celle observée à des températures de 22 °C à 37 °C (Touazi & Iguer-Ouada, 2019).

3.2 La conservation à long terme

La cryoconservation du sperme, développée en 1963 grâce à l'utilisation de l'azote liquide, a marqué une avancée majeure dans le domaine de la reproduction. Cette technique, désormais utilisée à l'échelle mondiale, consiste à conserver les spermatozoïdes à très basse température (−196 °C), ce qui permet de suspendre presque totalement leur métabolisme cellulaire. Cette suspension métabolique garantit la viabilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes pendant plusieurs années, voire plusieurs décennies (Borate GM & Meshram, 2022).

Chez les animaux, la cryoconservation permet une préservation durable des spermatozoïdes, en particulier dans les programmes de sélection génétique ou les banques de gènes. Elle repose sur un processus de refroidissement contrôlé, généralement assisté par des diluants spécifiques (ou extenders) enrichis en cryoprotecteurs. Ces diluants souvent à base de

Tris, citrate, fructose, jaune d'œuf, sérum ou lait incorporent des agents cryoprotecteurs pénétrants (comme le glycérol ou le DMSO) et non-pénétrants (tels que le saccharose ou le tréhalose). Leur rôle est de prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaires et de protéger les membranes cellulaires des spermatozoïdes ([Sharma & Sood, 2020](#)).

Cependant, le processus de congélation induit une chute brutale de la température, qui provoque un quasi-arrêt de l'activité cellulaire. Cette variation thermique, bien que nécessaire, peut causer des lésions dites cryogéniques : déshydratation partielle, pores membranaires, formation de cristaux de glace, et stress osmotique à la décongélation. Ces dommages peuvent se traduire par une altération des structures cellulaires (bris de la membrane plasmique ou de l'acrosome, condensation anormale de l'ADN), affectant négativement la motilité et la viabilité des spermatozoïdes après décongélation ([Saha et al., 2022](#)) ([Sharma & Sood, 2020](#)).

Pendant le processus de cryoconservation incluant le refroidissement, la congélation et la décongélation les spermatozoïdes subissent divers stress liés à la baisse de température, à l'exposition prolongée aux cryoprotecteurs, à la formation de glace et à l'augmentation de l'osmolarité. Ces conditions extrêmes entraînent des altérations majeures des fonctions cellulaires et une dégradation de la qualité spermatique. Des modifications sont observées dans la composition lipidique de la membrane, l'état des acrosomes, la motilité et la vitalité des spermatozoïdes, ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN nucléaire, compromettant ainsi leur capacité fécondante ([Taouzinet, 2021](#)).

Ainsi, le succès de la cryoconservation repose sur l'optimisation de plusieurs paramètres critiques : le choix et la concentration des cryoprotecteurs, le temps d'équilibration à 5 °C, ainsi que les taux de refroidissement et de réchauffement. Une maîtrise fine de ces facteurs est essentielle pour maximiser la proportion de spermatozoïdes intacts après la décongélation. ([Sharma & Sood, 2020](#)).

La cryoconservation a de nombreuses applications pratiques, notamment la création de banques de sperme pour la préservation de la diversité génétique, la conservation des lignées animales d'élite, et la facilitation des échanges de matériel génétique à l'échelle internationale. Elle est également largement utilisée en insémination artificielle, permettant par exemple l'utilisation du sperme d'un mâle d'exception longtemps après sa disparition physique. ([Sharma & Sood, 2020](#)).

Chez les caprins, les diluants Tris-citrate enrichis en jaune d'œuf et en glycérol (5–10 %) sont couramment utilisés pour la cryopréservation du sperme de bouc. Ils peuvent être complétés par des sucres comme le saccharose ou le tréhalose. Des études ont permis d'optimiser les protocoles, notamment en ajustant le temps d'équilibration avec le cryoprotecteur et en choisissant une taille de paillette appropriée, afin d'améliorer les résultats post-décongélation ([Sharma & Sood, 2020](#)).

3.3 Les étapes de la conservation

3.3.1 La collecte du sperme

La collecte de sperme vise à obtenir le maximum de spermatozoïdes de la meilleure qualité possible à partir de chaque éjaculat. Le sperme est principalement collecté par voie vaginale artificielle (VA) ([Figure 11](#)) ou électroéjaculation (EE) chez les petits ruminants. La collecte de sperme par VA est la méthode privilégiée pour les ovins. La méthode VA de collecte de sperme est plus appropriée et simple à utiliser et produit un éjaculat de qualité comparable à l'éjaculat naturel. L'eau chaude dans VA assure une stimulation thermique, tandis que la pression dans VA stimule mécaniquement le gland du pénis. Le principal inconvénient de cette procédure est qu'elle nécessite un animal avec une bonne libido, la capacité de monter des femelles, et un entraînement préalable à l'éjaculation en VA. Comme alternative à l'AV, la méthode EE peut être utilisée. Une sonde d'électrode (6–12 V) est utilisée pour appliquer 3 à 5 séries de stimulation courte (3 à 8 secondes) à des intervalles de 15 à 20 secondes au nerf des glandes accessoires de l'organe reproducteur dans la méthode EE. ([Saha et al., 2022](#)).

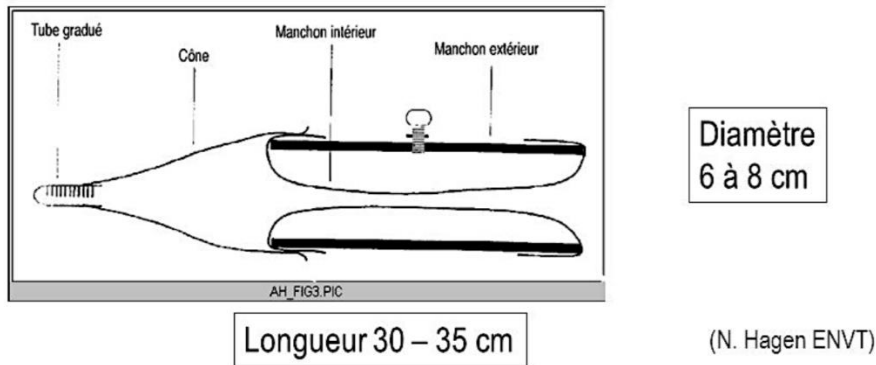


Figure 11: Exemple d'un vagin artificiel adapte au taureau (BOUKHECHEM, 2024)

Par ailleurs, chez certaines espèces comme le coq, une méthode simple et efficace repose sur le massage dorso-abdominal, technique manuelle non invasive décrite par (Burrows & Quinn, 1937). Elle permet la collecte de sperme sans recours à des femelles ni à un équipement sophistiqué, tout en minimisant le stress de l'animal.

3.3.2 Analyse de sperme

L'analyse spermatique comporte deux volets complémentaires macroscopique et microscopique qui permettent d'évaluer la qualité du sperme en vue d'examens de fertilité ou d'insémination artificielle. Cette analyse examine les caractéristiques physiques du liquide séminal (couleur, odeur, pH, viscosité, volume) ainsi que les paramètres cellulaires (concentration et motilité des spermatozoïdes, morphologie, viabilité). Chacun de ces paramètres est mesuré par des techniques appropriées : microscopie optique (contraste de phase), chambre de comptage, colorations vitales ou immunofluorescences, et systèmes d'analyse assistée par ordinateur (CASA) pour la motilité. (Tanga et al., 2021).

3.3.3 Examen macroscopique du sperme

L'examen macroscopique se fait immédiatement après la collecte (en maintenant le sperme à 37 °C). On évalue les paramètres suivants :

➤ Volume

Mesuré à l'aide d'un cylindre gradué ou d'une pipette, il varie considérablement selon l'espèce et les conditions de prélèvement. Par exemple, chez le bovin le volume typique est de l'ordre de 5–10 ml, tandis que chez le verrat il peut atteindre plusieurs centaines de millilitres. Ce volume, multiplié par la concentration, permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes éjaculés. La littérature souligne que le volume est un paramètre macroscopique standard de tout spermogramme (*Lange-Consiglio et al., 2013 ; Tanga et al., 2021*).

➤ Couleur et aspect

Un sperme frais normal est clair à blanc laiteux, parfois légèrement opalescent. Une couleur anormale (rougeâtre, jaune ou verdâtre) peut traduire la présence de sang (hémospermie) ou d'infection. L'aspect turbide dépend essentiellement de la concentration spermatique. (*Tanga et al., 2021*)

➤ L'odeur

Le sperme de mammifères a typiquement une odeur dite « animale » ou musquée. Une absence d'odeur ou une odeur fétide peut signaler un problème de contamination bactérienne. Ce critère, bien qu'assez subjectif, fait partie de l'évaluation initiale. (*Tanga et al., 2021*)

➤ Le pH

Mesuré par papier pH ou pH-mètre sur le liquide séminal non dilué. Le pH du sperme frais dépend de l'espèce (généralement entre ~6,5 et 7,5 chez les mammifères domestiques) et influence la motilité. Par exemple, chez le bovin on observe un pH moyen d'environ 6,8–7,0. (*Tanga et al., 2021*)

➤ La viscosité

Évaluée qualitativement par la capacité du sperme à former un fil en suspension entre la pipette et la goutte. Un excès de viscosité (consistance gélatineuse) peut gêner le comptage et la motilité ; par exemple chez le verrat on élimine par filtration la fraction gélatineuse du sperme ([Lange-Consiglio et al., 2013](#)).

➤ Liquéfaction / aspect physique :

Chez l'espèce humaine le sperme coagule partiellement à la sortie puis se liquéfie en ~30 minutes sous l'action d'enzymes prostatique. Chez de nombreux animaux (ruminants, porcs, etc.), la liquéfaction est plus rapide ou moins marquée, mais on note l'absence de coagulation excessive. On observe également l'aspect global (homogénéité, présence de grumeaux, etc.). ([Lange-Consiglio et al., 2013](#) ; [Tanga et al., 2021](#)).

➤ Analyse microscopique

L'analyse microscopique commence après dilution appropriée du sperme (en milieu tamponné à 37 °C) pour maintenir la viabilité et éviter la coagulation. On examine plusieurs paramètres clés des spermatozoïdes.

➤ La motilité

C'est la proportion de spermatozoïdes mobiles. On distingue la motilité totale (mouvements de n'importe quelle qualité) de la motilité progressive (déplacement linéaire vers l'avant). Elle est évaluée en microscopie optique (contraste de phase) sur lame chauffée (37 °C) : on estime le pourcentage de spermatozoïdes mobiles en observant 5–10 champs à fort grossissement. Pour plus d'objectivité, on utilise souvent des systèmes CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) qui calculent automatiquement les paramètres cinématiques (vitesses curviligne VCL, linéaire VSL, linéarité LIN, amplitude de battement de tête ALH, etc.) ([Mircu et al., 2008](#) ; [Mortimer et al., 2015](#)).

Ces systèmes permettent de mesurer finement la vitesse moyenne et la trajectoire de centaines de spermatozoïdes en quelques secondes. ([Mortimer et al., 2015](#)) rappellent que la technologie CASA, développée dans les années 1980, a grandement amélioré l'évaluation de la motilité et de la concentration chez de nombreuses espèces animales ([Mortimer et al., 2015](#)).

Notamment, la motilité hyperactivée (excitée) est définie par une baisse de la linéarité et une hausse de la vitesse curviligne ([Mircu et al., 2008](#)), ce qui illustre l'importance des paramètres cinématiques dans l'analyse spermatique.

➤ La concentration

Correspond au nombre de spermatozoïdes par millilitre. Elle se détermine en diluant le sperme (par exemple dans un tampon salin fixateur) puis en effectuant un comptage sur une chambre de Neubauer (hémocytomètre). On dépose une petite goutte de l'échantillon dilué sous une lamelle de comptage et on compte au microscope (400x) le nombre de spermatozoïdes dans un nombre défini de carrés de la grille. La concentration (cellules/ml) est ensuite calculée à partir du facteur de dilution et du volume de la grille. Cette mesure est systématique dans tout spermogramme ([Lange-Consiglio et al., 2013](#) ; [Tanga et al., 2021](#)). Par exemple, Lange-Consiglio et al. Indiquent que, après prélèvement, ils ont dilué et mesuré la concentration des spermatozoïdes de verrats par microscope (CASA leur donnant directement le nombre de spermatozoïdes par unité de volume).

➤ Viabilité

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants parmi les immobiles. On l'évalue par coloration vitale : le plus classique est l'éosine-nigrosine (coloration supravital), où les spermatozoïdes morts (membrane endommagée) se colorent en rose/rouge tandis que les vivants restent incolores ([Merck & Co., Inc. 2024](#)). On prépare ainsi un frottis de sperme dilué dans le colorant, on sèche et compte à microscope (1000x) les cellules colorées ou non. En microscopie en fluorescence (cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence), on peut utiliser des sondes comme SYBR-14 (marqueur des vivants en vert) et l'iodure de propidium (PI, marqueur des morts en rouge) ([Merck & Co., Inc. 2024](#)) ([Lange-Consiglio et al., 2013](#)). En effet, l'iodure de propidium ne pénètre que les membranes perméables (cellules mortes), permettant de quantifier précisément les spermatozoïdes non viables ([Lange-Consiglio et al., 2013](#)). Ces méthodes donnent le pourcentage de vivants, complément utile notamment quand la motilité est faible ([Merck & Co., Inc. 2024](#)).

➤ Morphologie et anomalies

On examine la forme des spermatozoïdes. Après fixation et coloration (May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quik, éosine-nigrosine, etc.), on observe en microscopie (1000x immersions) la

tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. On compte typiquement 100 spermatozoïdes et on calcule le pourcentage de formes normales. Les défauts sont classés selon leur siège : anomalies de la tête (macro/micro-céphalie, acrosome anormal, acrosome manquant), de la pièce intermédiaire (vacuoles, absence de pièce annulaire), du flagelle (tortuosités, détachements, flagelle double). On distingue aussi anomalies primaires (liées à la spermatogenèse, souvent irréversibles) et secondaires (acquises après éjaculation ou lors du stockage, comme la coiling du flagelle en conditions froides) ([Tanga et al., 2021](#)). Par exemple, l'utilisation d'une technique de marquage à PNA-FITC (lectine marquée au fluorochrome) permet de visualiser spécifiquement l'acrosome : les spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomiale sont fortement marqués au PNA-FITC ([Lange-Consiglio et al., 2013](#)). Ceci est utile pour évaluer l'intégrité de l'acrosome et détecter des anomalies acrosomiales. En pratique courante, un sperme de bonne qualité contient typiquement plus de 70–80 % de formes normales, mais cela dépend de l'espèce et des normes établies.

➤ Tests complémentaires et fonctionnels

Outre les critères classiques, divers tests de fonctionnalité sont disponibles. Par exemple, le test hypo-osmotique (HOST) évalue l'intégrité membranaire fonctionnelle en exposant les spermatozoïdes à un milieu hypo-osmotique : les cellules vivantes voient leur flagelle gonfler tandis que les morts restent intacts. De même, on peut tester la capacité de réaction acrosomiale (réaction au contact de la zonapellucida) en incubant le sperme avec des agents comme la lysophosphatidylcholine ou par réaction à la spermagglutinine, puis en observant la consommation d'acrosine. D'autres tests spécialisés concernent l'intégrité de l'ADN : le test TUNEL ou le SCSA (sperm chromatin structure assay) évaluent la fragmentation de l'ADN spermatique, souvent corrélée à la fertilité. Enfin, des tests biologiques (liaison au zona, pénétrément d'ovocyte in vitro, test de survie, etc.) existent, mais sont réservés aux laboratoires de recherche ou reproduction assistée et rarement utilisés en routine. ([Merck & Co., Inc. 2024](#))

➤ Techniques analytiques utilisées

Toutes ces analyses s'appuient sur des techniques standardisées de laboratoire reproductif. L'examen au microscope optique à contraste de phase est la méthode de base pour évaluer la motilité (grand champ à faible grossissement) et la morphologie (forte immersion avec colorant). La chambre de Neubauer (ou Thoma) demeure la référence pour le comptage

cellulaire manuel : elle comporte une grille définie dont le volume permet de déduire la concentration après comptage. Les colorations vitales (éosin-nigrosine, SYBR-14/PI, Hoechst/PI, etc.) sont utilisées pour le test de vitalité et parfois pour étudier l'intégrité membranaire (fluorochromes). De plus en plus, on recourt aux analyseurs CASA (Caméra et logiciel spécialisé) pour la motilité et la concentration : ces systèmes capturent des vidéos du sperme dilué et calculent automatiquement les paramètres cinétiques et le nombre de spermatozoïdes. Mortimer et al. Rappelent que le CASA a été très utile en production animale pour quantifier objectivement motilité et concentration. (*Mortimer et al., 2015*)

4. Milieu de conservation de sperme

Les dilueurs de la semence sont des solutions aqueuses servant à augmenter le volume d'un Éjaculat pour l'amener à la concentration de conservation souhaitée et d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro. Afin d'être efficace, le dilueur doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes (glucose ou fructose), avec un pH optimum et une osmolarité physiologique (NaCl, KCl), pour empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et le protéger contre les chocs thermiques et oxydatifs et faciliter l'ajout d'agent Cryoprotecteur pendant la cryoconservation (*Gadea, 2003 ; Raheja et al., 2018*). On distingue deux modalités : conservation réfrigérée (quelques jours à 4–17 °C selon l'espèce) ou congélation (stockage à –196 °C avec cryoprotecteurs). Les tampons courants incluent le Tris (hydroxy-méthyl-aminométhane) et le citrate, souvent associés au fructose comme substrat énergétique. Depuis la découverte du jaune d'œuf comme protecteur membranaire (1939), de nombreux additifs lipidiques (jaune d'œuf, lait, lécithine) sont utilisés pour stabiliser les membranes spermatiques au froid (*Bustani & Baiee, 2021*).

4.1 Tris

Les milieux de conservation classiques de nombreux mammifères (bovins, ovins, caprins) sont à base de tampon Tris-citrate avec du fructose comme source d'énergie. Le Tris régule le pH à environ 6,5–7,0 et résiste aux variations thermiques. Ces formules (appelées couramment TCG ou TCE, selon la source de tampon protègent les spermatozoïdes grâce à un effet tampon et à la fourniture de substrats énergétiques. En utilisation réfrigérée (4–5 °C), ces milieux ralentissent le métabolisme spermatique et préservent la motilité plus longtemps qu'avec du sperme brut. Ils sont très utilisés en IA bovine, où ils donnent de bons taux de survie post-thaw et de fécondation. Leur principal avantage est la simplicité et la stabilité du tampon,

mais il demande l'ajout de lipides protecteurs pour résister au choc thermique. (*Bustani & Baiee, 2021 ; Raheja et al., 2018*).

4.2 Jaune d'œuf

Le dilueur à base de jaune d'œuf est le dilueur le plus répandu dans le milieu de conservation de sperme, il fournit des **cholestérols et phospholipides** qui se déposent sur la membrane spermatique et la stabilisent contre le choc de congélation. Les protéines et LDL (lipoprotéines) du jaune agissent comme réservoir de lipides membranaires, prévenant leur perte lors du froid. Dans la pratique, on incorpore typiquement 10–20 % de jaune (v/v) dans les milieux de conservation Tris ou citrate pour bovins, ovins, caprins, buffles, etc. Les milieux œuf-Tris-glycérol sont très efficaces en congélation ; ces milieux préservent la fertilité spermatique à des dilutions élevées. (*Bustani & Baiee, 2021*).

4.3 Le lait écrémé

Le lait écrémé est couramment utilisé comme dilueur dans le milieu de conservation. Il contient des protéines de caséine qui se lient aux protéines de la membrane spermatique, limitant la perte lipidique et protégeant ainsi la motilité. Le lactose, sucre majeur du lait, est hydrophile et ne pénètre pas dans la cellule, ce qui aide à équilibrer l'osmose sans endommager le spermatozoïde (*Bustani & Baiee, 2021*). Une étude a montré l'avantage du lait est sa faible toxicité et sa source naturelle de lipides (caséine) dans la congélation de sperme ovine (*Glazar et al., 2009*).

4.4 Lécithine de soja

Les milieux à base de lécithine de soja ont été développés pour remplacer le jaune d'œuf. La lécithine apporte des phospholipides (phosphatidylcholine, acides gras) très similaires à ceux du jaune d'œuf. Elle confère une protection membranaire équivalente, en évitant les risques sanitaires associés aux produits animaux. Ces extendeurs ont été validés chez de nombreuses espèces (taureaux, verrats, béliers, bucks, chiens, etc.) (*Bustani & Baiee, 2021*). Des études récentes montrent des efficacités comparables : par exemple chez le bouc, un extenseur à base de soja a donné une motilité post-thaw plus élevée qu'un extenseur à base de jaune d'œuf (*Saratsi et al., 2024*).

4.5 Le cholestérol

L'ajout de cholestérol aux membranes spermatiques, par encapsulation dans les cyclo dextrine, constitue une stratégie innovante pour améliorer la cryosurvie des spermatozoïdes pendant la conservation. Le cholestérol renforce la stabilité de la membrane plasmique en maintenant sa fluidité à basse température, limitant ainsi les transitions de phase qui causent des dommages membranaires lors du gel et de la décongélation. Il permet également d'élargir les limites de tolérance osmotique des spermatozoïdes, les rendant plus résistants aux variations de pression osmotique induites par l'ajout ou le retrait de cryoprotecteurs. De plus, le traitement au cholestérol augmente la perméabilité membranaire aux cryoprotecteurs tels que le glycérol ou l'éthylène glycol, facilitant leur diffusion intracellulaire et réduisant ainsi les variations brutales de volume cellulaire, souvent responsables de lésions irréversibles. Ces effets combinés se traduisent par une meilleure motilité post-décongélation et une viabilité accrue des spermatozoïdes, faisant du cholestérol un composant clé dans les milieux de conservation. (Glazar et al., 2009).

4.6 Cryoprotecteurs pénétrants (glycérol)

Pour la cryoconservation en azote liquide, on ajoute aux extendeurs des cryoprotecteurs pénétrants. Le glycérol est de loin le plus utilisé. Il pénètre la cellule, Le glycérol, réduirait la formation des cristaux de glace délétères pour les membranes cellulaires en augmentant la concentration totale en soluté (Simonik et al., 2022).

4.7 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont reconnues pour leurs activités antioxydantes. Plusieurs études scientifiques ont démontré les effets antioxydants de nombreuses huiles essentielles (Rahbardar & Hosseinzadeh, 2020 ; Rajesh, 2024) et celles-ci sont également utilisées comme agents cryoprotecteurs dans les milieux de conservation du sperme (Touazi et al., 2018). Par exemple, l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*) a montré un effet bénéfique en améliorant les paramètres morphologiques, cytologiques et physiologiques des spermatozoïdes, ainsi que les performances de reproduction. Elle exerce également un effet protecteur contre le stress oxydatif après cryoconservation (Ferih, 2020).

5. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, également connu sous le nom de stress oxydant, est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité de l'organisme à les neutraliser. Ces ERO, ou radicaux libres, sont des molécules très réactives qui peuvent endommager les cellules, y compris les spermatozoïdes (*Migdal & Serres, 2011 ; Walczak-Jedrzejowska et al., 2013 ; Walke et al., 2023*).

Ces radicaux sont par définition des espèces chimiques possédant un électron libre sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. (*Migdal & Serres, 2011*).

Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. (*Migdal & Serres, 2011*).

Le stress oxydatif peut fragiliser l'ADN des spermatozoïdes, entraînant des cassures et une fragmentation. Ces dommages peuvent compromettre la capacité de fécondation et la transmission de l'information génétique. (*Walke et al., 2023*)

5.1 Effets du stress oxydatif sur le nombre, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes

5.1.1 Nombre de spermatozoïdes

Le stress oxydatif a été associé à une diminution du nombre de spermatozoïdes, une affection connue sous le nom d'oligospermie. Des niveaux élevés d'ERO peuvent induire des dommages oxydatifs aux spermatozoïdes, conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Cette mort cellulaire peut réduire le nombre total de spermatozoïdes, affectant la fertilité masculine (*Walke et al., 2023*)

5.1.2 Motilité des spermatozoïdes

Le stress oxydatif peut altérer leur motilité, c'est-à-dire leur capacité à se déplacer et à nager efficacement. Les ERO peuvent affecter le mouvement flagellaire des spermatozoïdes, réduisant leur progression et entravant leur navigation dans l'appareil reproducteur féminin. La

réduction de la motilité des spermatozoïdes, appelée asthénospermie, peut avoir un impact significatif sur leur capacité à atteindre et à pénétrer l'ovule lors de la fécondation ([Walke et al., 2023](#))

5.1.3 Morphologie des spermatozoïdes

Le stress oxydatif peut également contribuer à une morphologie anormale des spermatozoïdes, une affection appelée tératospermie. Les ERO peuvent provoquer des anomalies structurelles des spermatozoïdes, affectant leur forme et altérant leur potentiel de fécondation. Une morphologie anormale des spermatozoïdes peut entraver la fécondation et diminuer les chances d'une grossesse saine ([Walke et al., 2023](#))

5.1.4 Stress oxydatif et dommages à l'ADN dans le sperme

L'ADN des spermatozoïdes est très sensible au stress oxydatif, ce qui le rend particulièrement vulnérable aux dommages à l'ADN. Contrairement aux autres cellules de l'organisme, les spermatozoïdes ont des mécanismes de réparation limités, ce qui contribue à leur sensibilité. Les conséquences du stress oxydatif sur l'ADN des spermatozoïdes peuvent affecter significativement la fertilité et les résultats de la reproduction. L'un des principaux effets du stress oxydatif sur l'ADN des spermatozoïdes est la fragmentation de l'ADN. Le stress oxydatif peut induire des cassures et une fragmentation des brins d'ADN dans les spermatozoïdes. Ces dommages à la structure de l'ADN peuvent altérer la capacité des spermatozoïdes à féconder un ovule. De plus, la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été associée à un risque accru d'anomalies embryonnaires, telles que des réarrangements chromosomiques ou des mutations génétiques. Ces anomalies peuvent affecter le développement embryonnaire, pouvant entraîner un échec d'implantation ou une fausse couche précoce. De plus, il a été démontré que la fragmentation de l'ADN réduit les taux de grossesse dans les techniques de procréation médicalement assistée ([Walke et al., 2023](#)).

5.2 Définition et types d'antioxydants

Les antioxydants sont des composés capables de neutraliser ou d'inhiber les effets nocifs des ROS, réduisant ainsi le stress oxydatif. Ils agissent soit en éliminant directement les radicaux libres, soit en renforçant l'activité du système de défense antioxydant endogène de l'organisme. Différents types d'antioxydants jouent un rôle important dans le maintien de la santé reproductive. ([Walke et al., 2023](#))

5.2.1 Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques jouent un rôle crucial dans la défense contre le stress oxydatif. Ils comprennent des enzymes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). La SOD catalyse la conversion des radicaux superoxydes en H_2O_2 , tandis que la catalase et la GPx décomposent ensuite H_2O_2 en eau et en oxygène. En facilitant ces réactions enzymatiques, ils neutralisent efficacement les ROS et préviennent leurs effets nocifs sur les spermatozoïdes ([Walczak-Jedrzejowska et al., 2013](#) ; [Walke et al., 2023](#)).

5.2.2 Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques comprennent un large éventail de composés essentiels à la capture directe des radicaux libres et à la protection contre les dommages oxydatifs. Cette catégorie diversifiée comprend les vitamines, les minéraux, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Notamment, certaines vitamines, comme les vitamines C et E, présentent de puissantes propriétés antioxydantes en donnant des électrons pour neutraliser les radicaux libres. Outre les vitamines, des minéraux comme le sélénium et le zinc sont également indispensables au maintien du système de défense antioxydant et au soutien de l'activité des antioxydants enzymatiques. Ces minéraux agissent comme des coenzymes essentiels à diverses réactions enzymatiques métaboliques, contribuant de manière significative au mécanisme global de défense antioxydante. Les caroténoïdes, comme le bêta-carotène et le lycopène, jouent également un rôle essentiel dans cette catégorie grâce à leurs propriétés antioxydantes robustes qui protègent efficacement contre la peroxydation lipidique. De plus, les flavonoïdes, présents en abondance dans les fruits et légumes, présentent des effets antioxydants et réduisent le stress oxydatif ([Walczak-Jedrzejowska et al., 2013](#) ; [Walke et al., 2023](#)).

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Partie 1 : Solubilisation de l'huile essentielle de romarin

1. Objectif :

Cette première phase du travail visait à développer un système efficace de solubilisation de l'huile essentielle de *romarin* (*Rosmarinus officinalis* L.) dans un milieu aqueux, en utilisant des tensioactifs non ioniques à faible concentration. L'objectif était de trouver la formulation la plus performante, stable et économique, en vue d'une utilisation ultérieure dans des tests biologiques sur les spermatozoïdes caprins.

2. Matériel et réactifs

- Huile essentielle de Romarin (l'HE de romarin utilisée dans nos expérimentations provient d'une extraction industrielle. Elle a été mise à disposition par le professeur encadrant de ce projet. Bien que les données exactes sur sa composition n'aient pas été fournies par le fabricant, elle a été utilisée telle quelle, conformément aux conditions standard de stockage (flacon ambré, à l'abri de la lumière, à température ambiante))
- Tensioactifs : Tween 20, Tween 80, Span 60
- Polymères hydrosolubles : PEG 600, PEG 6000

Ces composés ont été fournis par une **doctorante du laboratoire (Lezrag, A)**. Ils ont été utilisés pour formuler des systèmes de solubilisation permettant d'incorporer l'huile essentielle de romarin dans une phase aqueuse. Aucune donnée ne précise sur le fournisseur ou la référence des produits n'a été disponible, mais les substances ont été utilisées conformément aux procédures classiques en formulation.

- Eau distillée
- Vortex, tubes à essai (20 ml), béchers
- Micropipettes mécanique à volume réglable de 0,5 à 10µl, de 10 à 100µl, de 100 à 1000µl.
- Plaque chauffante, thermomètre
- Microscope optique équipé d'une caméra
- Portoirs, feuilles d'aluminium, réfrigérateur

3. Préparation des formulations

Chaque tensioactif a été testé à quatre ratios différents, comme indiqué ci-dessous :

Table 4 : les ratios des formulations utilisé

Concentration	Proportion HE (%)	Proportion TA (%)
C1	10	90
C2	25	75
C3	35	65
C4	50	50

Protocole de préparation :

Pour la préparation de l'émulsion, 15 ml d'eau distillée ont été chauffés à 40 °C. Une fois la température atteinte, le tensioactif a été ajouté selon la concentration préétablie, puis le mélange a été soumis à une agitation au vortex pendant 7 minutes. Par la suite, 15 µl d'huile essentielle de romarin ont été incorporés à la solution, suivis d'une nouvelle agitation au vortex pendant 7 minutes afin d'assurer une dispersion homogène de l'huile dans le milieu aqueux. [\(Rao & McClements, 2012\)](#).

4. Caractérisation de la solubilisation :

L'émulsion obtenue a fait l'objet d'une observation macroscopique afin d'évaluer son homogénéité et sa transparence. Une analyse microscopique a ensuite été réalisée à l'aide d'un microscope optique doté à une caméra [\(Figure 12\)](#), permettant de déterminer la taille des particules formées [\(Figure 13\)](#). Des photographies ont été prises pour chaque concentration testée afin de documenter visuellement l'aspect de l'émulsion. Enfin, la stabilité de chaque formulation a été vérifiée après 24 heures de repos en répétant les mêmes observations. [\(Figure 14\)](#)



Figure 13: microscope optique équipée à une caméra

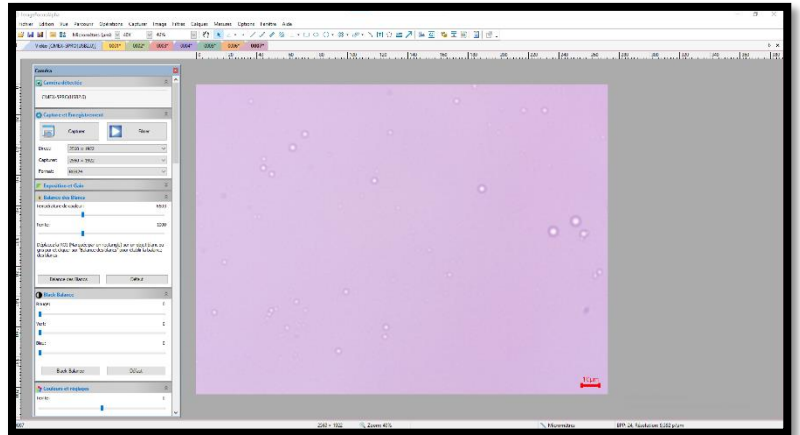


Figure 12: logiciel de mesure les tailles des particules

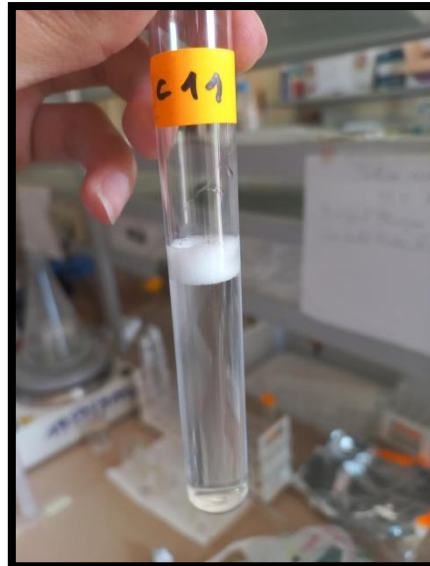


Figure 14: solution préparé après homogénéisation

5. Détermination des formulations optimales :

Les critères de sélection étaient :

- Aspect visuel homogène et stable
- Taille de particules fine et homogène
- Utilisation minimale de tensioactif
- La richesse en gouttelette

Table 4: Description de critère de la richesse en gouttelette

Code	Description de la richesse en gouttelettes
0	Absence de particules visibles (formulation claire)
1	Faiblement chargée en gouttelettes (rares particules visibles)
2	Moyennement chargée en gouttelettes (présence modérée)
3	Très riche en gouttelettes (nombreuses particules visibles)

Formulations retenues :

- **Tween 20** : 15 µl HE + 15 µl TA (50:50)
- **PEG 600** : 15 µl HE + 28 µl TA (35 % HE / 65 % PEG 600)

Partie 2 : Application des systèmes solubilisés sur les spermatozoïdes caprins

1. Objectif :

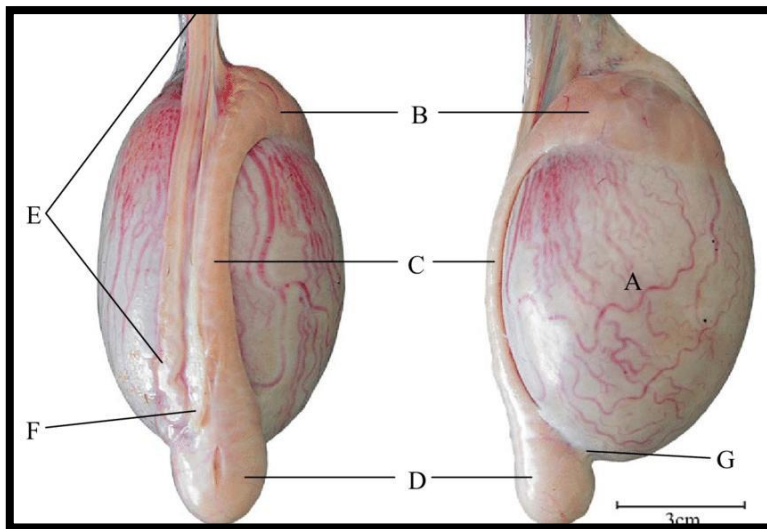
Cette seconde partie de l'étude visait à évaluer la toxicité, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes caprins soumis à différents systèmes de solubilisation de l'huile essentielle de romarin. L'objectif ultime était d'identifier les formulations les plus compatibles avec la cryoconservation, c'est-à-dire permettant de maintenir une viabilité et une motilité optimales pendant une conservation à 4 °C.

2. Matériel biologique :

Des testicules caprins frais ont été obtenus auprès d'un boucher local après abattage (**Figure 15**). La récolte du sperme a été réalisée par méthode retrograde-flushing :

La collecte du sperme épидидymaire a été réalisée selon une procédure stérile. Dans un premier temps, la tunique vaginale entourant le testicule a été soigneusement retirée à l'aide d'une lame chirurgicale stérile. Ensuite, l'épididyme et le canal déférent (E) ont été délicatement séparés du testicule. La queue de l'épididyme (D) a été sectionnée afin de faciliter l'accès au contenu spermatique (**Figure 16**). Une seringue stérile contenant une solution tamponnée à base de Tris a ensuite été introduite dans le canal déférent (E), permettant l'expulsion du sperme par une ouverture préalablement réalisée dans l'épididyme. Le sperme a

été collecté dans un tube Eppendorf stérile en vue d'analyses ultérieures. (Figure 17) (Benberkane et al., 2019).



- A. Testicule.
- B. Tête épидидymaire.
- C. Corps épидидymaire.
- D. Queue épидидymaire.
- E. Canal déférent.
- F. Site d'attache du « ligament épидидymaire » (mésorchium) reliant l'épididyme à la tunique vaginale
- G. «Ligament épидидymaire» (mésépидидyme) reliant la queue de l'épididyme au testicule.

Figure 15: Testicule du caprin



Figure 16: La queue de l'épididyme



Figure 17: Le sperme collecté

Les échantillons ont été maintenus à 37 °C pendant la manipulation, puis conservés à froid. Toutes les manipulations ont été réalisées au **Laboratoire des Écosystèmes Marins et Aquacoles de l'Université de Béjaïa (Algérie)**.

Préparation de la solution Tris :

La solution Tris utilisée comme milieu de dilution et de conservation des spermatozoïdes a été préparée selon la formulation suivante :

- 3,028 g de Tris (hydroxyméthyl-aminométhane)
- 1,7 g d'acide citrique monohydraté
- 1,25 g de fructose
- 100 mg de pénicilline antibiotique
- Dissous dans 100 ml d'eau distillée

La solution a été conservée à 4 °C jusqu'à son utilisation.

3. Préparation des formulations testées

Deux systèmes solubilisés ont été sélectionnés pour les tests, selon les conditions optimales identifiées en phase 1 :

- Tween 20 : 50 % HE / 50 % TA

- PEG 600 : 35 % HE / 65 % TA

Quatre concentrations ont été testées pour chaque formulation. Le tampon Tris (pH $\approx$ 7,2) a été utilisé comme milieu de dilution. Les volumes finaux ont été ajustés à 10 ml de solution Tris, contenant 15 μ l de sperme par tube.

a. Formulations à base de Tween 20 (50 % HE / 50 % TA)

Table 5: Formulations à base de Tween 20

Code	HE (μ l)	TA (μ l)
T_1	10	10
T_2	5	5
T_3	1	1
T_4	0,1	0,1

b. Formulations à base de PEG 600 (35 % HE / 65 % TA)

Table 6: Formulations à base de PEG 600

	Code	HE (μ l)	TA (μ l)
	P_1	10	19
	P_2	5	9
	P_3	1	1,9
	P_4	0,1	0,19

4. Groupes témoins :

Pour comparer l'effet des formulations solubilisées, plusieurs groupes témoins ont été établis :

- **Témoin négatif (Contrôle)** : Tris + 15 μ l de sperme
- **Témoins tensioactif seuls** :
 - **Tween 20 seul** : 10 μ l / 10 ml Tris ; 0,5 μ l / 5 ml Tris
 - **PEG 600 seul** : 19 μ l / 10 ml Tris ; 0,5 μ l / 5 ml Tris
- **Témoins HE seule** :
 - 10 μ l / 10 ml Tris ; 1 μ l / 10 ml Tris ; 0,1 μ l / 10 ml Tris

Tous les mélanges (formulations + témoins) ont été conditionnés dans des tubes Eppendorf stériles, et conservés à 4 °C pour simuler la cryoconservation.

5. Paramètres évalués :

- **Motilité spermique** : Analysée à l'aide d'un système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (SCA, Microptic S. L., Barcelona, Spain), à 37 °C. Les paramètres mesurés comprenaient VCL (vitesse curvilinéaire), VSL (vitesse linéaire), ALH (amplitude du déplacement latéral de la tête), etc.

- **Durée de vie** : la motilité a été suivie à plusieurs temps d'incubation : t_0 , $t_{30 \text{ min}}$, $t_1 \text{ h}$, $t_2 \text{ h}$, $t_{24 \text{ h}}$, $t_{72 \text{ h}}$, $t_{96 \text{ h}}$.

Chaque condition a été testée en une seule répétition ($n = 1$).

6. Analyse statistique

Le logiciel CASA a permis la mesure automatique de la vitesse linéaire (VSL), indicateur clé de la motilité progressive, en analysant plusieurs champs microscopiques et un nombre représentatif de spermatozoïdes pour chaque condition

Les résultats sont exprimés sous forme des Histogrammes. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Statview.

Résultats et discussion :

Cette partie se divise en deux : d'abord l'évaluation du diamètre des gouttelettes et de la richesse en gouttelette dans les formulations, puis l'analyse des paramètres cinétiques des spermatozoïdes, à savoir la VSL et la motilité progressive rapide.

Partie 1 :

1. Le diamètre :

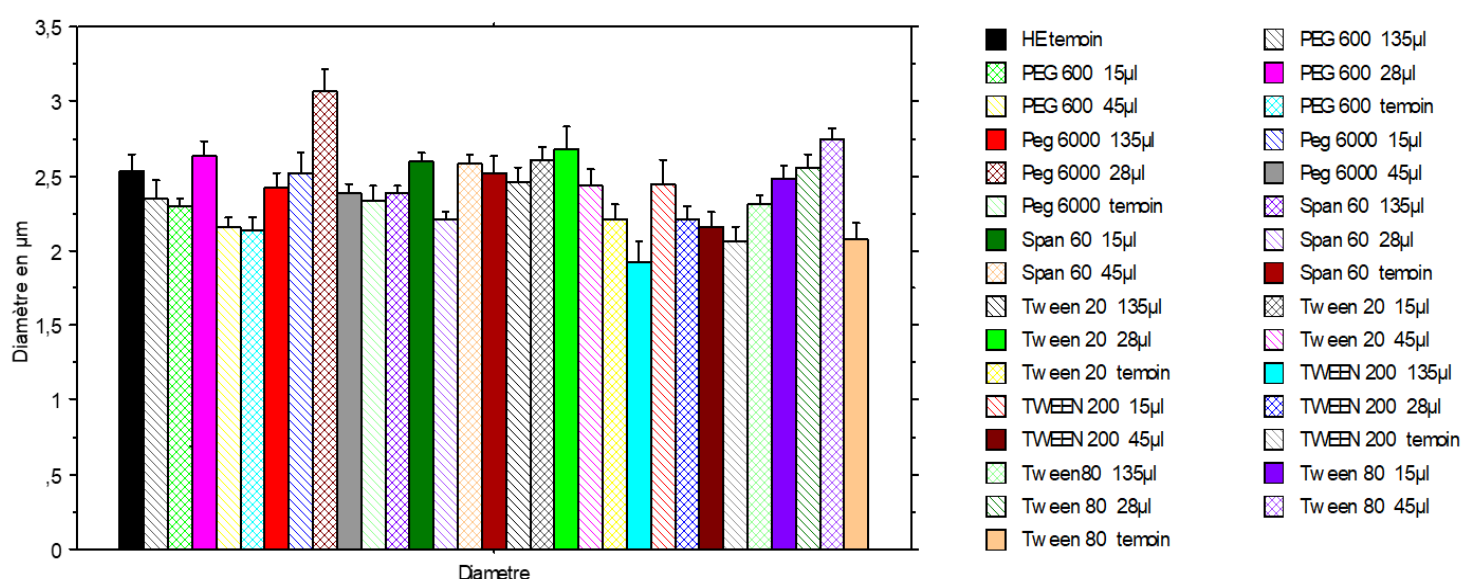


Figure 18 : histogramme représentant le diamètre moyen des gouttelettes (μm) obtenu dans différentes formulation contenant de l'huile essentielle (romarin) associée à divers tensioactifs a différentes concentrations

L'analyse granulométrique des différentes formulations a permis de comparer l'efficacité des systèmes de solubilisation à base de tensioactifs. Comme la montre la figure ci-dessus, les diamètres des gouttelettes varient significativement selon la nature du tensioactif utilisé.

La formulation témoin, constituée uniquement de l'huile essentielle non solubilisée (barre noire), présente un diamètre moyen de gouttelettes d'environ $2.75 \mu\text{m}$, ce qui indique une dispersion grossière et instable. En comparaison, l'ajout de tensioactifs a significativement réduit la taille des particules, cela indique la présence de la solubilisation à l'exception des formulations de PEG 6000 $28 \mu\text{l}$, Tween80 $45 \mu\text{l}$, Tween20 $28 \mu\text{l}$, PEG 600 $28 \mu\text{l}$.

La formulation à base de Tween 200 (135 μ l) a montré le diamètre le plus faible, inférieur à 2 μ m, traduisant une dispersion fine et homogène donc une forte solubilisation. À l'inverse, la formulation avec PEG 6000 (28 μ l), généré une taille de particules plus grande (plus de 3 μ m), suggère une capacité de solubilisation plus faible.

Dans les formulations contenant du PEG 600, les diamètres des gouttelettes sont généralement inférieurs à ceux du témoin, à l'exception de la concentration de 28 μ l, où le diamètre dépasse légèrement celui du témoin. Cela indique que le PEG 600 agit globalement comme un bon agent de solubilisation de l'huile essentielle.

Les formulations à base de PEG 6000 présentent, dans l'ensemble, des diamètres de gouttelettes inférieurs à ceux observés dans l'échantillon témoin, traduisant une efficacité notable en matière de solubilisation de l'huile essentielle. Toutefois, une exception est observée à la concentration de 28 μ l, où le diamètre des gouttelettes dépasse significativement celui du témoin, suggérant une baisse d'efficacité du solubilisant à cette concentration spécifique.

Dans les formulations contenant du Span 60, les concentrations de 135 μ l et 28 μ l conduisent à des diamètres de gouttelettes inférieurs à ceux du témoin, traduisant une meilleure dispersion. En revanche, aux concentrations de 15 μ l et 45 μ l, les diamètres observés dépassent ceux du témoin, suggérant une efficacité moindre du Span 60 à ces dosages.

Dans les formulations à base de Tween 20, les concentrations de 135 μ l et 45 μ l ont généré des diamètres de gouttelettes inférieurs à ceux du témoin, indiquant une bonne capacité de solubilisation. En revanche, aux concentrations de 15 μ l et 28 μ l, les diamètres sont légèrement supérieurs à celui du témoin, ce qui pourrait traduire une efficacité légèrement réduite à ces dosages.

Dans les formulations contenant du Tween 200, l'ensemble des concentrations testées a conduit à des diamètres de gouttelettes inférieurs à ceux du témoin. Ces résultats traduisent une efficacité constante et élevée du Tween 200 en tant qu'agent solubilisant de l'huile essentielle.

Pour les formulations à base de Tween 80, les concentrations de 45 μ l et 28 μ l ont entraîné des diamètres de gouttelettes supérieurs à celui du témoin, indiquant une efficacité réduite à ces niveaux. En revanche, à 135 μ l, une diminution notable du diamètre a été observée, traduisant une meilleure performance de solubilisation. La concentration de 15 μ l, quant à elle, donne un diamètre quasi équivalent à celui du témoin, suggérant une capacité de dispersion similaire.

2. La richesse en gouttelettes des différentes formulations

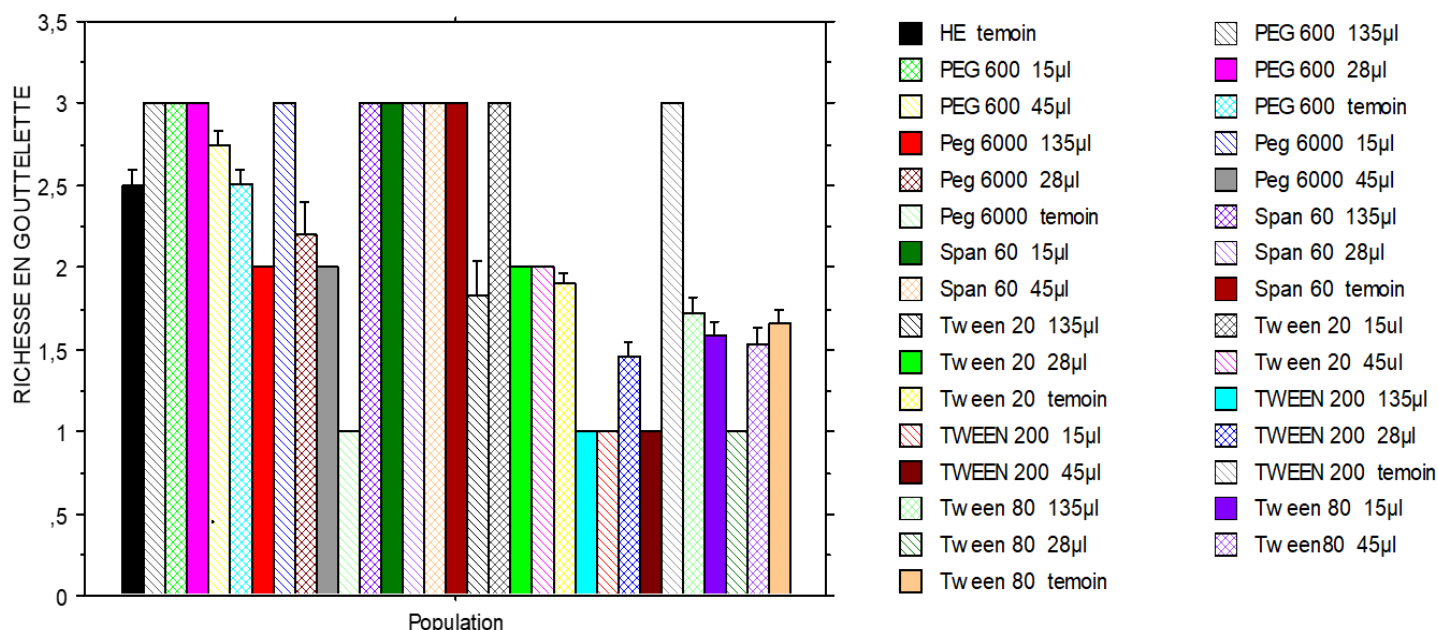


Figure 19: histogrammes représentant la richesse en gouttelettes des différentes formulations contenant de l'huile essentielle (romarin) associée à divers tensioactifs à différentes concentrations

La richesse en gouttelettes traduit la quantité ou densité des microgouttelettes formées dans la formulation, Comme la montre la figure ci-dessus. Une richesse élevée reflète une meilleure dispersion, donc une efficacité de solubilisation supérieure.

Le témoin (barre noire) montre une richesse en gouttelettes modérée, ce qui sert de référence pour évaluer l'effet des tensioactifs.

Dans le cadre de la comparaison des différents groupes de tensioactifs, il ressort que le PEG 600 présente une richesse en gouttelettes nettement supérieure au témoin à toutes les concentrations testées, traduisant ainsi une excellente capacité de dispersion de l'huile essentielle. En revanche, le PEG 6000 affiche une richesse relativement faible à l'ensemble des concentrations, à l'exception de celle de 15 µl, où une légère amélioration est observée par rapport au témoin, ce qui suggère une efficacité limitée et concentration dépendante. Le Span 60, quant à lui, se distingue par une richesse élevée et constante en gouttelettes à toutes les concentrations, systématiquement supérieure au témoin, indiquant une bonne stabilité de l'émulsion et une capacité de solubilisation efficace. Le Tween 20 montre une richesse notable à 15 µl, mais ses performances diminuent aux autres concentrations, ce qui traduit une efficacité variable selon le dosage. À l'inverse, le Tween 200 présente une richesse très faible à toutes les concentrations étudiées, témoignant d'une faible aptitude à solubiliser l'huile essentielle. Enfin,

le Tween 80 révèle également une faible richesse en gouttelettes, quel que soit le dosage, ce qui le classe parmi les tensioactifs les moins performants dans ce contexte expérimental.

Afin de compléter l'analyse des paramètres physico-chimiques, une évaluation visuelle des différentes formulations a été réalisée. Les images obtenues (**Figure 20 et 21**) permettent d'apprécier l'homogénéité, la stabilité et la transparence ou opalescence des émulsions. Ces observations visuelles constituent un critère qualitatif important, notamment pour identifier les formulations susceptibles de rester stables dans le temps sans séparation de phases ni précipitation.



Figure 21 : solution présente un aspect visuel transparent (ex : Tween20 15 μ l)



Figure 20 : solution présente un aspect visuel trouble (ex : Span60 15 μ l)

3. Formulations retenues

Dans l'objectif d'optimiser les formulations à base de tensioactifs pour une application spermatique, deux critères physico-chimiques majeurs ont été analysés : le diamètre des gouttelettes et la richesse en gouttelettes. Un diamètre réduit indique une meilleure dispersion de l'huile essentielle, favorable à la stabilité de l'émulsion, tandis qu'une richesse en gouttelettes élevée reflète une bonne homogénéité du système, ce qui est essentiel pour une interaction efficace avec les spermatozoïdes. Afin de raffiner le choix des formulations, des critères complémentaires ont été pris en compte, notamment l'aspect visuel ainsi que la concentration minimale en tensioactif nécessaire à obtenir une émulsion stable.

Deux formulations ont été sélectionnées comme les plus optimales pour une application spermatique. Il s'agit de :

- **Tween 20:** 15 µl HE + 15 µl TA (50:50)
- **PEG 600:** 15 µl HE + 28 µl TA (35 % HE / 65 % PEG 600)

A partir de ces deux solution mère, nous avons prélevé des volumes différents que nous avons ajouté à chaque fois dans 10 ml de tris pour

- **Le tween 20** (T1 = 10 µl HE + 10 µl TA / T2 = 5 µl HE + 5 µl TA / T3 = 1 µl HE + 1 µl TA / T4 = 0.1 µl HE + 0.1 µl TA)
- **Le PEG 600** (P1 = 10 µl HE + 19 µl TA / P2 = 5 µl HE + 9 µl TA / P3 = 1 µl HE + 1.9 µl TA / P4 = 0.1 µl HE + 0.19 µl TA).

Ces deux formulations ont été retenues en raison de leur équilibre optimal entre stabilité physico-chimique, aspect visuel homogène et transparence, et grâce à leur concentration réduite en tensioactif limitant ainsi les risques d'effet toxique potentiel sur les paramètres de qualité spermatique.

Discussion

L'effet de la concentration en tensioactifs sur la taille des particules d'huile essentielle encapsulée suit une relation dose-dépendante complexe. À des concentrations d'huile plus faibles (0,15 g), l'augmentation de la concentration en tensioactif entraîne une réduction significative de la taille des gouttelettes, traduisant une meilleure solubilisation de l'huile essentielle dans le milieu. ([Sarheed et al., 2020](#))

Contrairement à nos résultats, une étude menée par ([Bonou-Selegbe et al., 2023](#)) a montré que l'utilisation du tensioactif Tween 80 pour la solubilisation de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* favorisait la formation de nanoémulsions stables, avec des diamètres de gouttelettes inférieurs à 200 nm.

Selon [Handa et al, \(2021\)](#), l'emploi de PEG 400 comme Co surfactant pour l'émulsification de l'huile de pin a donné des gouttelettes de taille inférieure à 500 nm, tandis que l'association Tween 80 : éthanol a permis d'obtenir des gouttelettes d'environ 14 nm, démontrant ainsi une meilleure capacité de solubilisation du Tween 80 dans cette étude.

Partie 2 :

Etude de l'effet de l'huile essentielle sur la mobilité spermatique

1. Analyse de VSL des spermatozoïdes selon le milieu et la durée de conservation

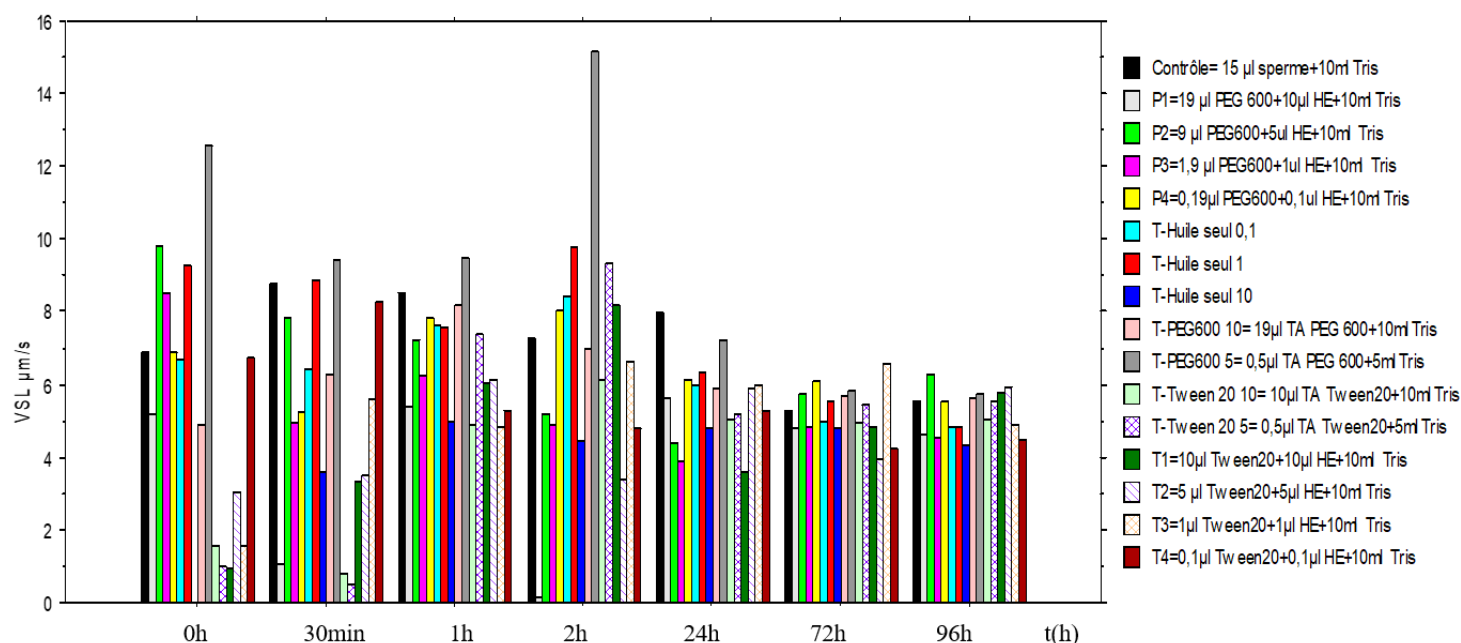


Figure 22: Évolution de la vitesse linéaire droite (VSL) des spermatozoïdes en fonction du temps dans différents milieux de conservation

L'évolution de la vitesse linéaire droite (VSL) des spermatozoïdes a été analysée à différents temps d'incubation (0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 24 h, 72 h et 96 h). L'histogramme (Figure 22) permet de visualiser les variations de la VSL en fonction du temps dans chaque milieu expérimental testé.

À 0 h, les valeurs de la vitesse linéaire droite (VSL) reflètent l'effet immédiat des formulations sur la motilité des spermatozoïdes. Comme l'indique l'histogramme (Figure 22), plusieurs tendances distinctes se dégagent :

- Les milieux **P2, P3, T-huile seule 1** et **T-PEG600 5** présentent les valeurs de VSL les plus élevées, supérieures à celle du témoin. Cela suggère une bonne tolérance et une action favorable immédiate sur la motilité spermatique. La formulation de ces milieux semble créer un environnement physicochimique favorable à la mobilité, probablement

grâce à une concentration optimale en huile essentielle ou à la nature des excipients (ex. **PEG 600**).

- Les milieux **P4** et **T-huile 0.1** montrent des valeurs similaires à celles du contrôle, ce qui suggère une absence d'effet immédiat marqué, soit par une concentration trop faible des composés actifs, soit par une stabilité modérée des systèmes de solubilisation.
- Le milieu **P1**, contenant une dose élevée de **10 µl** d'huile essentielle, présente une VSL inférieure à celle du contrôle. Cela laisse supposer un effet toxique à court terme, probablement dû à une concentration excessive en composés lipophiles (HE).
- Enfin, l'ensemble des milieux à base de **Tween 20** affiche des valeurs de VSL inférieures au témoin, ce qui indique une inefficacité globale de ce solubilisant dans les conditions testées. (Il est possible que le **Tween 20** ait un effet déstabilisant sur la membrane plasmique des spermatozoïdes, ou qu'il interfère avec la motilité cellulaire.)

Après 30 minutes de conservation, on remarque plusieurs changements intéressants dans la VSL des spermatozoïdes :

- Le milieu témoin (contrôle) montre une légère amélioration de la VSL par rapport à **0 h**. Cela peut être dû à un petit effet stimulant du milieu sur les spermatozoïdes, ou simplement au temps d'adaptation après la dilution.
- Le milieu **P3**, qui était très bon au début, montre une baisse nette de la VSL et devient inférieur au témoin. Cela peut indiquer que sa composition n'est pas stable, ou qu'elle devient un peu toxique après un court moment.
- Les milieux **T-PEG600 5**, **P1**, **P2**, **T-huile seule 1**, et **T4** ont des VSL presque égales à celle du contrôle, ce qui veut dire qu'ils ne perturbent pas la motilité à ce moment-là. Ils semblent donc bien tolérés par les spermatozoïdes pendant la première demi-heure.
- En revanche, les milieux contenant du **Tween 20** restent moins bons que le contrôle, ce qui montre qu'ils ne sont pas efficaces, même après un temps très court
- Les autres milieux, en particulier ceux contenant du Tween 20, restent en dessous du témoin, confirmant leur faible efficacité initiale, voire un effet négatif précoce sur la motilité.

Après une heure de conservation, la VSL des spermatozoïdes commence à diminuer légèrement dans la majorité des milieux, mais certains restent encore relativement efficaces :

- Les milieux **T-PEG600 5**, **P1**, **P2**, et **T-huile seule 1** gardent une bonne VSL, malgré une petite baisse par rapport aux valeurs précédentes. Cela montre que ces milieux sont capables de maintenir la motilité pendant au moins une heure, ce qui est un point positif pour une conservation à court terme.
- Cette légère diminution est normale, car avec le temps, les spermatozoïdes commencent à perdre de l'énergie et la stabilité des membranes peut être affectée.
- Les autres milieux, comme **P3**, **P4**, ou ceux contenant **Tween 20**, continuent à montrer des valeurs plus faibles, ce qui confirme qu'ils sont moins adaptés à la conservation, même à court terme.

Après 24 heures, on observe une baisse générale de la VSL dans tous les milieux. Cette diminution peut s'expliquer par la perte progressive de la qualité des spermatozoïdes, causée par une réduction de leur viabilité, une augmentation du stress oxydatif, ou des dommages aux membranes cellulaires dus au temps de stockage.

Dans l'ensemble, la VSL des spermatozoïdes diminue progressivement avec le temps, ce qui est normal pendant la conservation. Certains milieux comme **T-PEG600 5**, **P2**, **P1** (à dose modérée) et **T-huile seule 1** ont montré une bonne capacité à maintenir la motilité pendant les premières heures (jusqu'à 2 h), et même jusqu'à 24 h dans certains cas.

En revanche, les milieux contenant du Tween 20 et P1 à forte dose ont montré une faible efficacité, voire des effets négatifs précoces. À long terme (72 h et 96 h), seuls quelques milieux gardent une VSL très faible, indiquant une protection partielle mais limitée.

Ces résultats montrent que le choix du type de solubilisant et la concentration en huile essentielle sont des facteurs clés pour préserver la motilité des spermatozoïdes pendant la conservation.

2. Le pourcentage des spermatozoïdes à motilité rapide

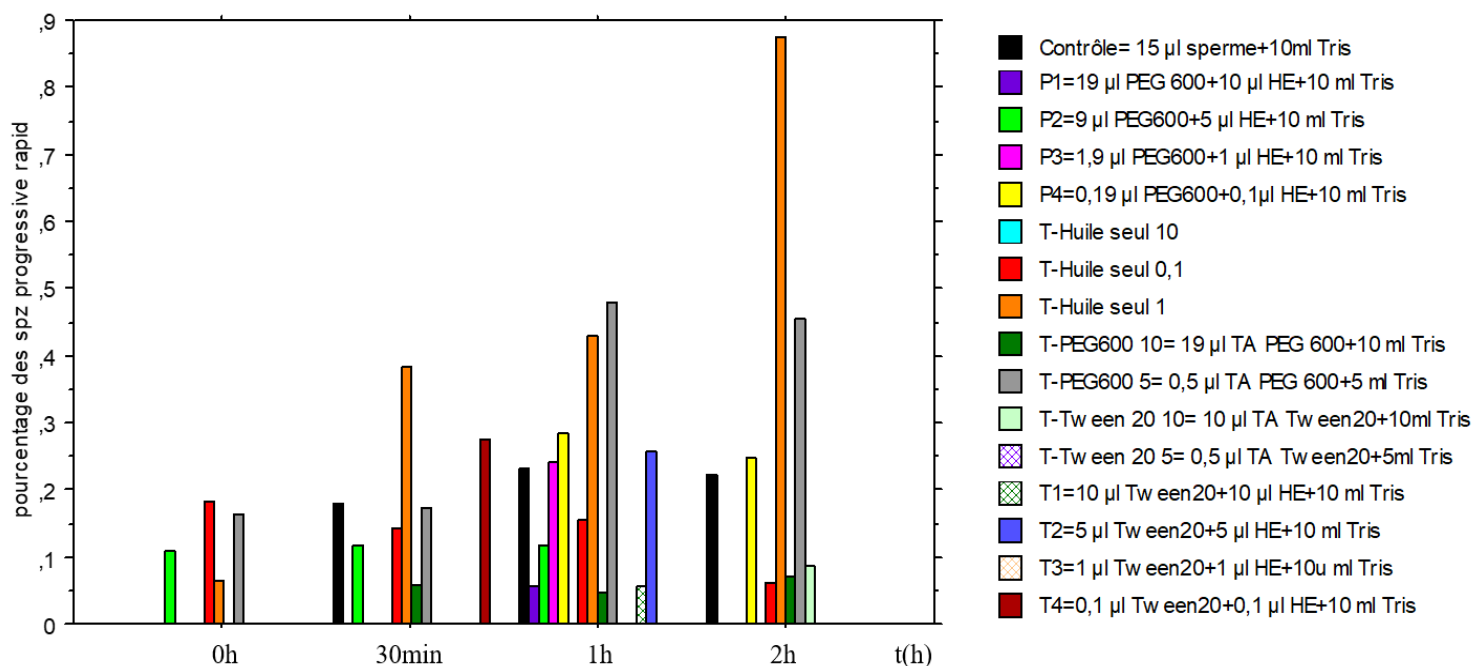


Figure 23: Pourcentage de spermatozoïdes à motilité rapide selon les formulations et le temps (0 h, 30min, 1 h, 2 h)

L'évaluation de la mobilité progressive rapide des spermatozoïdes conservés à 4 °C (**Figure 23**) a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de certaines formulations, en particulier celles intégrant l'huile essentielle (HE) et le polyéthylène glycol (PEG). La formulation contenant uniquement de l'huile essentielle à 1 µl a induit une augmentation significative de la mobilité progressive rapide, observable dès 30 minutes et se maintenant jusqu'à 2 heures de conservation. Ce résultat souligne l'intérêt de l'HE, probablement en lien avec ses propriétés antioxydantes, dans le maintien de la viabilité et de la fonctionnalité spermatique. Un effet bénéfique comparable a également été observé avec le PEG seul à faible concentration (formulation **T-PEG 5**), ce qui confirme le rôle protecteur du PEG à dose modérée, possiblement via un effet stabilisateur sur les membranes spermatiques. L'effet protecteur a été renforcé dans la formulation **P4**, qui associe une faible concentration de PEG600 à une très faible dose d'huile essentielle. Cette combinaison a permis une mobilité progressive rapide élevée et stable, traduisant une interaction favorable entre les deux composés. En revanche, les formulations à base de **Tween 20**, utilisées seules ou pour solubiliser l'huile essentielle, n'ont pas permis de préserver la mobilité progressive rapide. Dans la majorité des

cas, la mobilité était inférieure à celle du témoin, suggérant un effet toxique ou inhibiteur. Seule la formulation **T4** (Tween 0,1 µl + HE) a montré une légère amélioration temporaire à 1 heure de conservation.

Discussion

Les résultats observés dans ce travail peuvent s'expliquer par la forte activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin, qui est riche en composés bioactifs reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, tels que le 1,8-cinéole, le camphre, l' α -pinène ([Oualdi et al., 2021](#)). Grâce à cette composition, l'huile essentielle de romarin contribue efficacement à la préservation des paramètres spermatiques au cours de la conservation à 4 °C.

[Touazi et al., \(2018\)](#) ont mis en évidence l'effet protecteur des huiles essentielles in vitro, en étudiant notamment l'impact de l'huile essentielle de romarin sur la mobilité du sperme de coq conservé à 4 °C. Leurs résultats ont montré une amélioration de la mobilité spermatique, suggérant un rôle potentiel des composés bioactifs du romarin dans le maintien de l'intégrité cellulaire au froid.

L'ajout in vitro d'huiles essentielles de romarin à visée antioxydante lors de la cryoconservation du sperme peut s'avérer avantageux, en permettant de maintenir la qualité spermatique et de préserver le pouvoir fécondant post-décongélation ([Goujet et al., 2025](#)).

Selon l'étude menée par ([Kchikich et al., 2021](#)), qui a évalué l'effet de l'huile essentielle de *Thymus satureoides* sur la qualité du sperme de bouc de la souche Ben Arouss conservé à 4 °C, il a été démontré que l'impact de cette huile dépend fortement de la concentration utilisée. Une dose élevée (0,05 %) s'est révélée néfaste pour les paramètres spermatiques, tandis qu'une concentration plus faible (0,01 %) a montré un effet bénéfique, en améliorant significativement la qualité du sperme après décongélation.

([Eskandani et al., 2013](#)). Ont montré que, bien que le Tween 20 soit classé parmi les tensioactifs non ioniques sûrs, il peut, à des concentrations et des durées d'exposition croissantes, ralentir la croissance des cellules et provoquer leur mort par apoptose. Leurs travaux décrivent des cassures simple brin de l'ADN (test des comètes), une fragmentation de la chromatine et l'apparition d'anneaux d'ADN après marquage DAPI, ainsi qu'une activation de la voie apoptotique confirmée par cytométrie en flux. Ces observations suggèrent que le Tween 20 altère la membrane cellulaire, génère un stress oxydatif et fragmente l'ADN,

conduisant en fin à la mort programmée des cellules. Dans le contexte de la conservation spermatique, ces effets soulignent la nécessité de réévaluer l'usage du Tween 20 pour éviter toute altération de la viabilité et de l'intégrité génétique des spermatozoïdes.

Des études menées chez diverses espèces (poissons, bovins) montrent que les surfactants non ioniques tels que le Tween 20 ont un effet spermicide en solubilisant la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cette solubilisation entraîne une immobilisation rapide des cellules, suivie de leur dissolution progressive ([Dietrich et al., 2007](#) ; [Ollero et al., 1998](#)).

Une étude clé a montré que l'association de la vitamine E et du PEG 6000 protège efficacement le sperme de lapin pendant le refroidissement à 4 °C, chacun agit seul pour maintenir la motilité et limiter le stress oxydatif, mais leur combinaison donne les meilleurs résultats ([Amokrane et al., 2020](#)).

Dans une étude sur la cryoconservation du sperme de pétoncle géant (*Pecten maximus*), ([Suquet et al., \(2016\)](#)) ont montré qu'un ajout de 15 % à 20 % de PEG au milieu de congélation permettait d'obtenir un pourcentage significativement plus élevé de spermatozoïdes motiles après décongélation par rapport aux autres conditions testées

Le PEG 600 agit comme un cryoprotecteur en diffusant facilement à l'intérieur des cellules, ce qui réduit la pression osmotique interne et empêche la formation de cristaux de glace durant la congélation, protégeant ainsi l'intégrité cellulaire ([Patel et al, 2023](#) ; [Patel et al, 2024](#)).

Conclusion

Le présent mémoire avait pour objectif d'optimiser un système de solubilisation de l'huile essentielle de romarin à base des tensioactifs dans le but de voir son effet sur la cellule spermatique durant la conservation à 4°C.

Dans un premier temps, les résultats ont montré que les systèmes de solubilisation les plus performants pour les huiles essentielles étaient ceux à base de Tween 20 et de PEG 600, utilisés respectivement aux ratios de (50:50) et (35:65). Le choix de ces deux formulations repose sur leurs bonnes performances en termes de diamètre moyen réduit, de richesse en gouttelettes, d'aspect visuel homogène, ainsi que sur leur faible teneur en tensioactif, limitant ainsi les risques de toxicité. En particulier, le système au PEG 600 a montré une richesse nettement supérieure au témoin à toutes les concentrations testées, tandis que le système au Tween 20 a présenté une bonne dispersion à faible concentration, malgré des diamètres légèrement supérieurs. Ces résultats confirment leur potentiel en tant que formulations optimisées pour une application dans les milieux de conservation spermatique

Cependant, les tests biologiques ont révélé des différences notables entre les systèmes testés. Le Tween 20, qu'il soit utilisé seul ou comme solubilisant, a induit une toxicité cellulaire marquée, affectant négativement les paramètres de qualité spermatique. En revanche, un effet bénéfique a été observé avec le PEG 600 utilisé seul à faible concentration, notamment à travers l'amélioration de la vitesse en ligne droite (VSL) et de la mobilité progressive rapide des spermatozoïdes. De même, l'huile essentielle seule à 1 µl/ml a montré un effet favorable. Quant à la formulation P4 (huile essentielle solubilisée avec PEG 600 à faible concentration), elle a également présenté un effet positif, bien que légèrement inférieur à celui de l'huile essentielle seule, ce qui confirme l'intérêt de ces formulations à faibles concentrations pour préserver la qualité spermatique.

Au terme de ce travail, il ressort que l'huile essentielle de romarin, efficacement solubilisée par le PEG 600, présente une bonne stabilité physico-chimique et exerce un effet bénéfique sur les paramètres de la qualité spermatique, ce qui confirme son potentiel d'utilisation dans les milieux de conservation du sperme. Toutefois, il serait intéressant d'utiliser l'huile essentielle solubilisée avec du PEG 600 à des doses inférieures, afin de réduire la quantité de tensioactif tout en conservant son efficacité sur la qualité spermatique.

Liste des références

A

- Akhtar MF, Ahmad E, Mustafa S, Chen Z, Shi Z, Shi F. Spermiogenesis, Stages of Seminiferous Epithelium and Variations in Seminiferous Tubules during Active States of Spermatogenesis in Yangzhou Goose Ganders. *Animals (Basel)*. 2020;10(4):570. Published 2020 Mar 28. doi:10.3390/ani10040570)
- Amokrane, A., , Kaidi, R., , & Iguer-Quada, M., (2020). The Effect of Vitamin E and Poly Ethylene Glycol (PEG) Association on Chilled Rabbit Sperm: Impact on Sperm Motility and Oxidative Stress Status. *Cryo letters*, 41(1), 19–25.

B

- Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcıoğlu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. (2018). Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from oregano (*O. onites* L.). *BioMed research international*, 2018(1), 6147315. <https://doi.org/10.1155/2018/6147315>
- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Bashiri, S., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Dehghannya, J., Ehsani, A., & Ozyurt, H. (2020). Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. *Food Bioscience*, 35, 100526.
- Begum, A., Sandhya, S., Vinod, K. R., Reddy, S., & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*, 12(1), 61-74.
- Benberkane, A., , Khellouf, A., , Benhenia, K., , Fatmi, S., , & Iguer-Ouada, M., (2019). *Rosmarinus officinalis* Essential Oil Preloaded in β -Cyclodextrin: Effect on Ram Spermatozoa Motility, Membrane Integrity and Oxidative Status During 4°C Storage. *Cryo letters*, 40(4), 219–225.
- Bessah, R., & Benyoussef, E. H. (2015). La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Journal of Renewable Energies*, 18(3), 513-528.
- Bily NEBIE, Composition chimique et activités biologiques d'huiles essentielles obtenues par Co-distillation de quelques plantes aromatiques du Burkina Faso, Thèse, Chimie

Liste des références

Organique/ Substances naturel, UNIVERSITE NAZI BONI BURKINA FASO, 04 septembre 2023, 28

- Bülbül, E. Ö., Eleftheriadou, K., Okur, N. Ü., & Siafaka, P. (2020). An update on cyclodextrins as drug vehicles for antimicrobial applications. *Journal of Pharmaceutical Technology*, 1(1), 18-24.
- Bobo, G., 2017. L'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux. *Sciences pharmaceutiques*. dumas-01974084 <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01974084v1>
- Bolouri P, Salami R, Kouhi S, Kordi M, Asgari Lajayer B, Hadian J, Astatkie T. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*. 2022 Dec 16;27(24):8999. doi:10.3390/molecules27248999. PMID: 36558132; PMCID: PMC9781695.
- Bonou-Selegbe, I., Yameogo, J. B. G. ., Zime Diawara , H. ., Ouédraogo, S. ., Sombié , C. B. ., & Semdé , R. (2023). P28 Optimisation de la préparation de nanoémulsions d'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* (DC. *Journal Africain De Technologie Pharmaceutique Et Biopharmacie (JATPB)*, 2(3). <https://doi.org/10.57220/jatpb.v2i3.160>
- Borate, G. M., & Meshram, A. (2022). Cryopreservation of Sperm: A Review. *Cureus*, 14(11), e31402. <https://doi.org/10.7759/cureus.31402>
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2018). *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2018.09.038
- Bouras, M, Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques, Thèse, MICROBIOLOGIE, Biologie Moléculaire et Cellulaire, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA, 2019 ,7
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry science*, 16(1), 19-24.
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary world*, 14(5), 1220–1233.

C

- Chaal, L. (2005). Caractérisation d'un composé tensioactif réducteur de frottement hydrodynamique et application à l'inhibition de l'érosion-corrosion du cuivre en présence

Liste des références

d'écoulements forts (Doctoral dissertation, Université Pierre & Marie Curie-Paris 6; Université Abderrahmane Mira de Béjaïa (Algérie)).

D

- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046
- de Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13(7), 1144. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>
- Dietrich, G. J., Zabowska, M., Wojtczak, M., Słowińska, M., Kucharczyk, D., & Ciereszko, A. (2007). Effects of different surfactants on motility and DNA integrity of brown trout (*Salmo trutta fario*) and common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Reproductive Biology*, 7(2), 127-142.

E

- El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FN, Elaissari A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*. 2015 Apr 10;48 3(1-2):220-43.
- Eskandani, M., Hamishehkar, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2013). Cyto/Genotoxicity study of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (tween 20). *DNA and cell biology*, 32(9), 498–503. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2059>
- Et-tanteney, R., El Amrani, B., Manssouri, I., & Limami, H. *Cleaner Engineering and Technology*. 2024

F

- (Ferih, H. (2020). L'évaluation De L'effet Préservateur De L'huile Essentielle De Rosmarinus Officinalis Sur La Semence Caprine Après Cryoconservation [Mémoire de Master, Université Saad Dahleb - Blida].)

G

- Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17-27.

Liste des références

- Glazar, A. I., Mullen, S. F., Liu, J., Benson, J. D., Critser, J. K., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2009). Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, 59(2), 201–206.
- Goujet, H., Kaarouch, I., Malki, A., Mbaye, M. M., Cabry, R., Louanjli, N., Rhouda, T., & Benkhalifa, M. (2025). Effects of Essential Oils as Antioxidant and Cryoprotective Agents in Improving Frozen and Thawed Human Sperm Criteria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 14(1), 75. <https://doi.org/10.3390/antiox14010075>

H

- Handa, M., Ujjwal, R. R., Vasdev, N., Flora, S. J. S., & Shukla, R. (2021). Optimization of surfactant- and cosurfactant-aided pine oil nanoemulsions by isothermal low-energy methods for anticholinesterase activity. *ACS Omega*, 6(1), 559–568. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05033>
- Helsinta, N., Halim, A., Octavia, M. D., & Rivai, H. (2021). Solid Dispersion of Fenofibrate Using Poly Ethylene Glycol 6000. *Int. J. Pharm. Sci. Med.*, 6(6), 42-51.
- Hendy, R. J., Butterworth, K. R., Gaunt, I. F., Kiss, I. S., & Grasso, P. (1978). Long-term toxicity study of sorbitan monostearate (Span 60) in mice. *Food and cosmetics toxicology*, 16(6), 527-534.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A. S., Jabbar, A., Mahboob, S., & Nigam, P. S. (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1070-1078.

J

- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 143-172.

K

- Kchikich, A. ; Kirschvink, N. ; El Kadili, S. ; Raes, M. ; El Otmani, S. ; Bister, JL ; El Amiri, B. ; Barrijal, S. ; Chentouf, M. Les huiles essentielles de *Thymus satureioides* et d'*Origanum majorana* améliorent la qualité du sperme de bouc Beni Arouss pendant le stockage à 4 °C. *Reprod. Domest. Anim.* 2021, 56, 1572–1581.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2010). Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(36), 6288–6308.

Liste des références

- Kumar, A., Gupta, M., & Braya, S. (2021). Liposome Characterization, Applications and Regulatory landscape in US. *International Journal Of Drug Regulatory Affairs*, 9(2), 81-89.

L

- Lange-Consiglio, A., Meucci, A., & Cremonesi, F. (2013). Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. *Open veterinary journal*, 3(1), 21-35.

M

- Merck & Co., Inc. (2024, septembre). Overview of Breeding Soundness Examination of the male animal. In *Merck Veterinary Manual*. Récupéré le 11 juin 2025, de <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/breeding-soundness-examination-of-the-male/overview-of-breeding-soundness-examination-of-the-male-animal>
- Mersin, Burçin & Çitoğlu, Gülçin. (2022). *Rosmarinus officinalis* L.. DOI: 10.1007/978-3-031-07753-1_34
- Meziane, H., Zraibi, L., Albusayr, R., Bitari, A., Oussaid, A., Hammouti, B., & Touzani, R. (2025). *Rosmarinus officinalis* Linn.: unveiling its multifaceted nature in nutrition, diverse applications, and advanced extraction methods. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 11(1), 9-37.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Mircu, C., Cernescu, H., Igna, V., Knop, R., Frunza, I., Ardelean, V., ... & Ardelean, A. (2008). Boar semen evaluation using CASA and its relation to fertility. *Medicina Veterinara*, 41, 203-212.
- Mortimer, S. T., van der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*, 17(4), 545–553.

N

- Naeem, A., Abbas, T., Ali, T. M., & Hasnain, A. (2018). Essential oils: Brief background and uses. *Ann. Short Rep*, 1(6).
- Niculescu, A. G. (2020). Cyclodextrins – Development and Applications of These Versatile Oligosaccharides. *Biomaterials and Tissue Engineering Bulletin*, 7(1), 138–150.

Liste des références

- Nii, T., & Ishii, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International journal of pharmaceutics*, 298(1), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.029>
- Nikorn, S., Krongsuk, S., & Namuangruk, S. (2022). Microhydration of sorbitan monostearate (Span 60) investigated using hybrid QM/MM calculations in the gas phase. *Surface Science*, 716, 121977.
- Nurhaliza, S., Yunus, M., & Adriana, A. (2023). THE EFFECT OF EMULSIFIER SPAN 60 (Sorbitan Monostearate) ON THE HOMOGENEITY PROPERTIES OF LOTION GEL MADE Virgin Coconut Oil (VCO) AND ALOE VERA. *Jurnal Sains dan Teknologi Reaksi*, 21(02), 49-57.

O

- Ollero, M., Bescós, O., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (1998). Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, 49(3), 547–555. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00006-5)
- Oualdi, I., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaoui, S., Tahani, A., & Oussaid, A. (2021). Rosmarinus officinalis from Morocco, Italy and France: Insight into chemical compositions and biological properties. *Materials Today: Proceedings*, 45, 7706-7710.

P

- Paul, S., El Bethel Lalthavel Hmar, J. H., & Zothantluanga, H. K. S. (2020). Essential oils: A review on their salient biological activities and major delivery strategies. *microcirculation*, 5, 9.
- Patel, M., Park, J. K., & Jeong, B. (2023). Rediscovery of poly(ethylene glycol)s as a cryoprotectant for mesenchymal stem cells. *Biomaterials research*, 27(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00356-z>
- Patel, M., Vernon, B., & Jeong, B. (2024). Low-Molecular-Weight PEGs for Cryopreservation of Stem Cell Spheroids. *Biomaterials Research*, 28, 0037. DOI: [10.34133/bmr.0037](https://doi.org/10.34133/bmr.0037)
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10(1), 135.

Liste des références

- Pezantes-Orellana, C., German Bermúdez, F., Matías De la Cruz, C., Montalvo, J. L., & Orellana-Manzano, A. (2024). Essential oils: a systematic review on revolutionizing health, nutrition, and omics for optimal well-being. *Frontiers in medicine*, 11, 1337785. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1337785>
- Poirot, T. (2016). Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Mémoire de thèse, UNIVERSITE DE LORRAINE, Faculté de pharmacie, 97.
- Poonia, N., Kharb, R., Lather, V., & Pandita, D. (2016). Nanostructured Lipid Carriers: Versatile Oral Delivery Vehicle. *Future Science OA*, 2(3).
- Pérez-Rosés, R., Risco, E., Vila, R., Peñalver, P., & Cañigüeral, S. (2015). Antioxidant activity of Tween-20 and Tween-80 evaluated through different in-vitro tests. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(5), 666-672.

R

- Rahbardar, M. G., & Hosseinzadeh, H. (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iranian journal of basic medical sciences*, 23(9), 1100.
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239-245.
- Rajesh, K. S. (2024). ROSMARINUS OFFICIALIS L.(ROSEMARY): AN ANCIENT MEDICINAL PLANT USES AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES: A REVIEW.
- Rao, J., & McClements, D. J. (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 268-276
- Rosato, M. P., Cinone, M., Manchisi, A., Meluzzi, A., & Iaffaldano, N. (2006). *Changes on the quality characteristics of stored semen during reproductive period of hybrid toms*. In *World's Poultry Science Journal*

S

- Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary medicine international*, 2022(1), 7378379.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 77-111.

Liste des références

- Sandra Thompson, «Spiritual practice and essential oil therapy: exploring the history and individual preferences among specific plant sources», *The International Journal of Aromatherapy* 2003 Vol 13 No 2/3
- Saratsi, A., Samartzi, F., Tsiokos, D., Theodosiadou, E. K., Panagiotidis, I., Ligda, C., & Rekkas, C. A. (2024). Effect of Three Commercially Available Extenders Containing Phospholipids of Different Sources on Skopelos Buck Liquid-Stored Sperm Quality. *Veterinary sciences*, 11(10), 494.
- Sarheed, O., Dibi, M., & Ramesh, K. V. R. N. S. (2020). Studies on the Effect of Oil and Surfactant on the Formation of Alginate-Based O/W Lidocaine Nanocarriers Using Nanoemulsion Template. *Pharmaceutics*, 12(12), 1223.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121223>
- S. BOUKHECHEM, Notes de cours « L'insémination Artificielle » A5 © Institut des Sciences Vétérinaires de Constantine – Année Universitaire 2023-2024
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., ... & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70.
- Sharma, A., & Sood, P. (2020). *Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 6(1).
<https://doi.org/10.17582/journal.vsr/2020/6.1.46.57>
- Sheikh, A. R., Wu-Chen, R. A., Matloob, A., Mahmood, M. H., & Javed, M. (2024). Nanoencapsulation of volatile plant essential oils: a paradigm shift in food industry practices. *Food Innovation and Advances*, 3(3), 305-319.
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2013). Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of liposome research*, 23(4), 268–275.
<https://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888>
- Suquet, M., Malo, F., Gourtay, C., Ratiskol, D., Riobe, M., Le Grand, J., ... & Mingant, C. (2016). Optimizing sperm cryopreservation in great scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources*, 29(2), 206. <https://doi.org/10.1051/alr/2016017>
- Simonik, O., Bubenickova, F., Tumova, L., Frolikova, M., Sur, V. P., Beran, J., Havlikova, K., Hackerova, L., Spevakova, D., Komrskova, K., & Postlerova, P. (2022). Boar Sperm Cryopreservation Improvement Using Semen Extender Modification by Dextran and Pentaisomaltose. *Animals*, 12(7), 868. <https://doi.org/10.3390/ani12070868>

Liste des références

- Stigliani, S., Amaro, A., Reggiani, F. *et al.* The storage time of cryopreserved human spermatozoa does not affect pathways involved in fertility. *Basic Clin. Androl.* **34**, 15 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12610-024-00231-4>
- Szymczyk, K., Zdziennicka, A., & Jańczuk, B. (2018). Adsorption and aggregation properties of some polysorbates at different temperatures. *Journal of solution chemistry*, **47**, 1824-1840.

T

- Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. (2021). Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. *Animal bioscience*, **34**(8), 1253–1270. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>
- Taouzinet, L. (2021). *Encapsulation de la vitamine E par des cyclodextrines, liposomes et PEG. Application dans la cryoconservation spermatique animale* [Thèse de doctorat, Université A. Mira de Béjaïa]. Université A. Mira de Béjaïa.
- Torchilin, V. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 145–160 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Touazi, L., Aberkane, B., Bellik, Y., Moula, N., & Iguer-Ouada, M. (2018). Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4 C short-term storage. *Veterinary world*, **11**(5), 590.
- Touazi, L. H., & Iguer-Ouada, M. (2019). Optimisation de la conservation du sperme aviaire dans les élevages de reproducteurs : analyse, conservation et insémination (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure Vétérinaire).

U

- Uvanesh, K., Sagiri, S. S., Senthilguru, K., Pramanik, K., Banerjee, I., Anis, A., ... & Pal, K. (2016). Effect of Span 60 on the microstructure, crystallization kinetics, and mechanical properties of stearic acid Oleogels: An in-depth analysis. *Journal of Food Science*, **81**(2), E380-E387.

W

- Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., & Rao, R. (2017). Essential oil–cyclodextrin complexes: An updated review. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, **89**, 39-58.

Liste des références

- Walczak-Jedrzejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska-Hilczer, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European journal of urology*, 66(1), 60–67. <https://doi.org/10.5173/ceju.2013.01.art19>
- Walke, G., Gaurkar, S. S., Prasad, R., Lohakare, T., & Wanjari, M. (2023). The Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function: Exploring the Role of Antioxidant Supplementation. *Cureus*, 15(7), e42583. <https://doi.org/10.7759/cureus.42583>
- Wang, H., Zheng, Y., Tang, X., & Zhang, T. (2023). Formulation of a Stable Oil-in-Water Microemulsion of *Torreya grandis* cv. *Merrillii* Aril Essential Oil and Its Application in Loquat Fruit Preservation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(21), 4005.

Z

- Zhao, Q., Kuang, W., Long, Z., Fang, M., Liu, D., Yang, B., & Zhao, M. (2013). Effect of sorbitan monostearate on the physical characteristics and whipping properties of whipped cream. *Food Chemistry*, 141(3), 1834-1840.
- Zohra, B. F., Kheira, L., & Lilia, M. R. (2021). Caractérisation du polyéthylène glycol en vue de l'utiliser autant qu'agent antibactérien (Doctoral dissertation, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie).

Résumé

Bien que les huiles essentielles soient connues pour leurs effets bénéfiques, notamment antioxydants, leur utilisation dans les milieux de conservation de la semence reste encore peu explorée en raison de leur faible solubilité en milieu aqueux. L'objectif principal de ce travail est d'optimiser un système de solubilisation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à base de tensioactifs non ioniques et de polyéthylène glycol, afin d'évaluer leur impact sur la qualité des cellules spermatiques de caprin conservées à 4 °C.

Parmi les systèmes de solubilisation testés, deux formulations ont été retenues sur la base de critères physico-chimiques tels que le faible diamètre des gouttelettes, une bonne richesse particulaire, un aspect visuel homogène et une faible teneur en tensioactif : le Tween 20 (50:50) et le PEG 600 (35:65). Ces deux systèmes ont ensuite été évalués biologiquement. Les résultats ont révélé une toxicité notable du Tween 20, utilisé seul ou en formulation, tandis que le PEG 600, utilisé à faible concentration ou comme vecteur de l'huile essentielle, a amélioré significativement les paramètres de mobilité, notamment la VSL et la proportion de spermatozoïdes à progression rapide. L'huile essentielle à la dose de 1 µl, a également montré un effet bénéfique.

Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel intéressant de l'huile essentielle de romarin et du PEG 600, utilisés seuls ou en association, dans la conservation du sperme à 4 °C, probablement en raison de leur puissant pouvoir antioxydant.

Mots clés : Huile essentielle de romarin, Solubilisation, Conservation du sperme, Antioxydant, Tensioactif non ionique, Polyéthylène glycol.

Abstract

Although essential oils are known for their beneficial properties, particularly their antioxidant effects, their use in semen preservation media remains relatively unexplored due to their low solubility in aqueous environments. The main objective of this study was to optimize a solubilization system for *Rosmarinus officinalis* essential oil using non-ionic surfactants and polyethylene glycol, in order to assess their impact on the quality of caprine sperm cells stored at 4 °C.

Among the tested solubilization systems, two formulations were selected based on physicochemical criteria such as small droplet size, high particulate density, homogeneous visual appearance, and low surfactant content: Tween 20 (50:50) and PEG 600 (35:65). These two systems were subsequently evaluated for their biological effects. The results revealed a significant toxicity of Tween 20, whether used alone or in formulation, while PEG 600, used at low concentration or as a carrier for the essential oil, significantly improved motility parameters, particularly VSL and the proportion of rapidly progressive spermatozoa. The essential oil at a dose of 1 µl also demonstrated beneficial effects.

These findings highlight the promising potential of rosemary essential oil and PEG 600, used alone or in combination, in sperm preservation at 4 °C, likely due to their strong antioxidant properties.

Keywords: Rosemary essential oil, Solubilization, Sperm preservation, Antioxidant, Non-ionic surfactant, Polyethylene glycol.

