

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIR-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Biologiques de l'Environnement
Filière: Sciences Biologiques
Option: Bio-Ressources Animales et Biologie Intégrative



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

MASTER

Thème

Etude de l'effet des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* et *Myrtus communis* sur la vitalité et les paramètres de mobilité du sperme humain

Présenté par :
Melle OUKACI LINDA
Soutenu le : jour **Juin 2017**

Devant le jury composé de :

	Grade	
M. RAMDANE Z.	Pr	Président
M. CHIKHOUNE A.	MCB	Encadreur
M. NAIT MOULOUD M.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr CHIKHOUNE A, mon encadreur, pour son aide, sa générosité, sa disponibilité dans ce projet et les nombreuses facilités qu'il n'a cessé d'accorder. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je remercie également

M. RAMDANE Z., Professeur à l'université de Bejaïa, d'avoir bien voulu accepter de présider ce jury.

M. NAIT MOULOUD M., Maitre-assistant à l'université de Bejaïa, d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Je présente mes sincères remerciements à tous mes enseignants du département des sciences biologiques de l'environnement particulièrement Mme BOULILA F. pour son soutien et ses précieux conseils.

Enfin, pour tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicace

«En vérité, le Chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout».

Albert Camus.

Je dédie ce travail à mes deux rayons de soleil, SHANA et SARA, j'espère qu'elles pourront me pardonner de les avoir négligées. Que dieu vous garde pour moi.

A mes chers parents pour leur soutien inconditionnel dans toutes les étapes de ma vie, à ma mère d'être toujours là pour moi et mes filles. Merci de m'avoir toujours laissé faire mes choix et les assumer.

A mon cher époux RAHIM pour sa patience et sa compréhension.

A mes chers frères et sœurs.

A mes neveux et ma chère nièce TINA.

A ma belle-famille et surtout mon défunt beau-père.

Et enfin à ma chère amie FATMA pour son soutien, sa générosité. Je n'y serais jamais arrivée sans elle.

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

Liste des abréviations

•CASA:	Computer Assisted Sperm Analysis.
•HE:	Huile essentielle.
•OMS:	Organisation Mondiale de la Santé.
•ml:	Millilitre.
•cm:	Centimètre.
•µg:	Microgramme.
•g:	Gramme.
•kg:	kilogramme.
•µm:	Micromètre.
•S:	Seconde.
•VSL:	Straight Line Velocity.
•VAP:	Average Path Velocity.
•ALH:	Amplitude of Lateral Head Displacement.
•BCF:	Beat-Cross Frequency.
•AFNOR:	Association Française de Normalisation.
•HD:	Hydrodistillation.
•CPG:	Chromatographie en Phase Gazeuse.
•FSH:	Follicle Stimulating Hormone
•LH:	Luteinizing Hormone
•DME:	Dose Minimale Effective.
•DMSO:	Diméthyl Sulfoxyde.

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Introduction générale.....	1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Sperme humain

1. Définition.....	3
2. Composition.....	3
3. La structure générale d'un spermatozoïde.....	3
4. Analyse du sperme.....	4
4.1 le spermogramme.....	4
4.1.1 l'examen macroscopique.....	4
4.1.2 L'examen microscopique.....	5
4.2 Le spermocytogramme.....	7
5. Analyse semi-automatique.....	7

Chapitre II : Les huiles essentielles

1. Définitions.....	8
2. Méthodes d'extraction.....	8
3. Méthodes d'analyse.....	9
4. Composition chimique.....	10
5. Toxicité.....	10
6. Bioactivité.....	10

Chapitre III : Monographies des espèces étudiées

1. Le Thuya de Berbérie.....	11
1.1 Généralités et description.....	11
1.2 Classification botanique.....	11
1.3 Répartition géographique.....	12

1.4 Huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i>	12
1.5 Utilisations.....	13
2. Le myrte commun.....	13
2.1 Généralités et description.....	13
2.2 Classification botanique.....	13
2.3 Répartition géographique	
2.4 Huile essentielle de <i>Myrtus communis</i>	14
2.5 Utilisations.....	14

Chapitre IV : Interaction substances actives-spermatozoïdes

1. Effets des huiles essentielles.....	15
1.1 Effets protecteurs.....	15
1.2 Effets spermicides.....	15
2. Effets des extraits aromatiques.....	16
2.1 Effets protecteurs.....	16
2.2 Effets spermicides.....	16

Partie 2 : Partie pratique

Chapitre I : Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal.....	18
1.1 Description des espèces étudiées.....	18
1.2 Cueillette et séchage.....	19
2. Extraction des huiles essentielles.....	19
2.1 Protocole d'extraction.....	20
2.2 Rendement de l'extraction.....	20
3. Etude de l'effet spermicide des HE extraites des plantes étudiées.....	21
3.1 Méthodologie.....	21
3.2 Collecte du sperme humain.....	21
3.3 Interaction spermatozoïdes-huile essentielle.....	22
3.3.1 Test de vitalité.....	22
3.3.2 Test de mobilité sur CASA.....	22
4. Analyse statistique.....	23

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Rendement de l'extraction en HE	24
1.1 <i>Tetraclinis articulata</i>	24
1.2 <i>Myrtus communis</i>	24

2. Etude de l'effet spermicide des HE de <i>T. articulata</i> et <i>M. communis</i>	25
2.1 Effets des HE de <i>T. articulata</i> et <i>M. communis</i> sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes.....	25
2.1.1 Effet sur la mobilité.....	25
2.1.2 Effet sur la vitalité.....	27
3. Analyse de la cinétique du mouvement du sperme exposé aux HE étudiées	28
3.1. La vitesse moyenne de trajet (VAP)	28
4. Discussion.....	33
Conclusion et perspectives.....	36

Références bibliographiques

Liste de figures

Figure 1 : Structure d'un spermatozoïde.....	4
Figure 2 : Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA.....	6
Figure 3: Le myrte commun (<i>Myrtus communis</i>).....	18
Figure 4 : Le thuya (<i>Tétracelinis articulata</i>).....	19
Figure 5 : Montage d'hydrodistillation de Clevenger modifié.....	20
Figure 6: Computer Assisted Sperm Analysis.....	21
Figure 7 : Image captée par le CASA.....	23
Figure 8 : Analyse du sperme par le logiciel	23
Figure 9: L'effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>T. articulata</i> sur la proportion des spermatozoïdes mobiles.....	25
Figure 10: L'effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>M.communis</i> sur la proportion des spermatozoïdes mobiles.....	26
Figure 11 : L'effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>T. articulata</i> sur la vitalité du sperme humain	27
Figure 12 : L'effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>M.communis</i> sur la vitalité du sperme humain.....	28
Figure 13: Effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>T. articulata</i> sur la VAP Moyenne des spermatozoïdes.....	29
Figure 14 : La fréquence des classes de spermatozoïdes en fonction de la VAP lors de l'exposition à l'huile essentielle de <i>T. articulata</i>	30
Figure 15 : Effet <i>in vitro</i> de l'HE de <i>M. communis</i> sur la VAP des spermatozoïdes.....	31
Figure 16 : La fréquence des classes de spermatozoïdes en fonction de la VAP lors de l'exposition à l'huile essentielle de <i>M. communis</i>	32

Liste de tableaux

Tableau I : composés majoritaires de l'huile essentielle de *T. articulata*..... 12

Tableau II : principaux composants de l'huile essentielle de *M. communis*.....14

Introduction Générale

Introduction Générale

La contraception est une préoccupation majeure de santé publique. Dans les pays occidentaux, la contraception est principalement féminine. Actuellement, l'éventail des méthodes de contraception en cours d'expérimentation est large, mais les options de contraception masculine restent limitées comparées à celles de la contraception féminine.

Les recherches en contraception masculine sont menées dans 4 axes : l'inhibition de la spermatogenèse, l'inhibition de la fonction du spermatozoïde, l'interruption du transport du spermatozoïde, la prévention du dépôt de sperme dans le vagin (**Huyghe et al., 2007**)

Plusieurs approches possibles pour la contraception masculine ont été étudiées pendant longtemps, y compris l'approche hormonale et l'approche chirurgicale par vasectomie. Les composés chimiques affectant la spermatogénèse incluent différents groupes comme les stéroïdes et les non-stéroïdes, mais l'application de tous ces composés a été sérieusement mise en doute, en raison de leur toxicité à la fois à court et à long terme sur les organes reproducteurs. Pour la vasectomie ou la stérilisation masculine, qui consiste chez l'homme en une ligature des canaux déférents, se différencie des autres moyens de contraception dans la mesure où cette contraception chirurgicale est le plus souvent irréversible. par ailleurs , des efforts récents sont en cours pour explorer la richesse cachée dans les plantes médicinales à usage contraceptif (**Gupta et Sharma, 2006**).

Une enquête sur une période de 25 ans (1980-2005) a révélé qu'il y a environ 105 plantes qui possèdent une activité spermicide. L'extraction de composés bioactifs à partir de ces plantes permettent l'étude de leur activité biologique. Les huiles essentielles, riches en terpènes et en composés non-terpéniques, possèdent des propriétés biologiques diverses et intéressantes. Elles constituent une grande source d'agent antioxydants et antimicrobiens naturels. En conséquence, les huiles essentielles (HE) et autres extraits végétaux commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. En plus de ces propriétés biologiques, des études récentes se sont intéressées à leur effet inhibiteur de la fonctionnalité spermatique (**Shweta et al., 2011**). Parmi ces études, l'étude de **Bansal et al. (2010)** faite sur l'effet spermicide de l'HE du neem (*Azadirachta indica*).

Parmi ces plantes médicinales, notre choix s'est porté sur le Thuya de Berbérie et le myrte commun, ce sont des plantes très répandues en méditerranée et particulièrement en Algérie. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet spermicide de ces deux plantes en réalisant des tests *in vitro* sur la vitalité et la mobilité spermatique chez l'homme. Nous avons

choisi une gamme de concentrations d'huile essentielle allant de 1 à 10 mg/ml. Nous nous sommes aussi particulièrement intéressés à l'effet de ces HE sur certains paramètres de la mobilité en effectuant une analyse informatisée de la cinétique des spermatozoïdes (CASA) (Computer Assisted Sperm Analysis).

Pour la présente étude, nous proposons un plan en deux parties : la première est une synthèse bibliographique qui donnera un aperçu sur les différentes notions abordées dans ce travail, divisée en quatre chapitres : le premier est dédié au sperme humain, le deuxième aborde des généralités sur les huiles essentielles (HEs), le troisième est consacré à la monographie des espèces étudiées. Et enfin, le dernier chapitre dévoile l'interaction entre substances actives et spermatozoïdes.

Dans la seconde partie réservée à l'étude expérimentale, nous détaillerons le matériel et les méthodes employés et nous décrirons les tests réalisés dans l'évaluation de l'effet spermicide des HE dans un premier chapitre. Le deuxième chapitre présentera les résultats obtenus dans l'étude *in vitro* de l'effet spermicide des HE de *T. articulata* et *M. communis* sur la vitalité et les paramètres de mobilité.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Sperme humain

1. Définition

Le sperme est un liquide biologique complexe composé d'une phase liquide ; le plasma séminal et d'une phase cellulaire ; les spermatozoïdes et les cellules rondes. Le plasma séminal est la résultante des sécrétions testiculaires, épидидymaires et des glandes annexes : la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Littré et de Cowper. Les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme et seront introduits dans le plasma séminal pour composer le sperme (**Jumeau, 2013**).

Le spermatozoïde tire son nom du préfixe grec « *sperma* » désignant la « semence, la graine » et du suffixe « zoïde » signifiant « ce qui est semblable à un animal ». Découvert en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine Van Leeuwenhoek (**Boitrelle, 2014**).

2. Composition

Le sperme a une composition biochimique riche et complexe. Certains composants constituent des marqueurs des fonctions glandulaires et peuvent être dosés au cours de l'exploration biochimique. Le sperme se liquéfie sous l'action de plusieurs enzymes protéolytiques d'origine testiculaire et prostatique (spermine). En plus des spermatozoïdes, le sperme comporte aussi une faible quantité de cellules rondes correspondant à des cellules immatures de la lignée germinale, quelques cellules épithéliales desquamées à partir des voies excrétrices, des fragments cellulaires et un nombre variable de polynucléaires (**Androutsos, 2004**).

Il contient aussi des sucres (fructose et sorbitol), des vitamines (C et B₁₂), de nombreux sels minéraux (Ca, Mg, P, K, Na, et du Zn), protéines et cholestérol. Il comporte des traces de testostérone et d'autres hormones. Ces différents éléments proviennent des sécrétions des cellules glandulaires du tractus génital mâle ; à savoir la prostate, vésicules séminales, glandes de Cowper (**Konate, 2009**).

3. La structure générale d'un spermatozoïde

Le spermatozoïde humain est une cellule hautement différenciée, effilée, constituée d'une tête et d'un flagelle (**figure 1**). La tête se divise en deux parties : l'acrosome, vésicule fondamentale à la fécondation et le noyau dont la chromatine est hypercompactée. Le flagelle, moteur de la mobilité, comporte 3 parties : les pièces intermédiaire, principale et terminale. La pièce connectrice fait le lien entre la tête et l'axonème, présent sur toute la longueur du flagelle. Dans les pièces intermédiaire et principale, les fibres denses entourent l'axonème. La pièce

intermédiaire comprend l'hélice mitochondriale. Dans la pièce principale, l'axonème est recouvert d'une gaine fibreuse. Le cytosquelette se désorganise progressivement dans la pièce terminale (Jouannet et Serres, 1995).

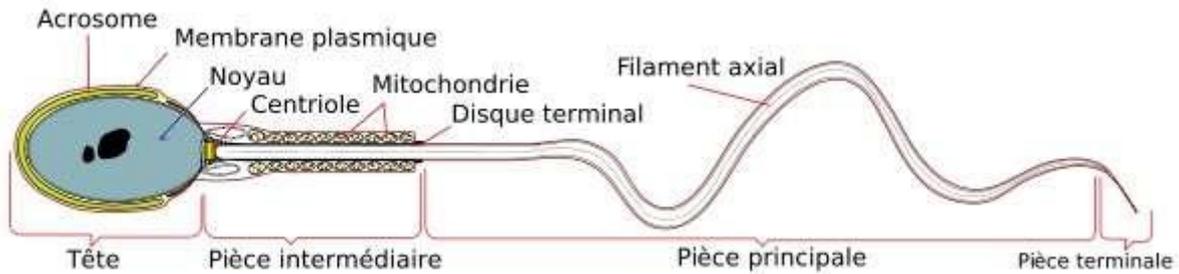


Figure 1 : Structure d'un spermatozoïde (d'après Google image).

4. Analyse du sperme

Le spermogramme-spermocytogramme est l'examen de 1^{ère} intention pour évaluer la qualité du sperme dont l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a défini les limites basses de références (Jumeau, 2013).

4.1. Le spermogramme

4.1.1. L'examen macroscopique

- **Aspect**

L'éjaculat est observé à température ambiante, juste après liquéfaction. Un sperme normal présente un aspect homogène, gris opalescent. Toute coloration rosée ou brunâtre peut traduire la présence d'hématies (Hamamah *et al.*, 2004).

- **Volume**

Il traduit essentiellement les capacités sécrétoires des glandes annexes. Le volume de l'éjaculat est noté de façon précise au moyen d'une pipette calibrée, la mesure est faite à 0,1 ml près. Le volume moyen est de 2ml (Cabannes, 2008).

- **Viscosité**

La viscosité ou consistance, est généralement évaluée par aspiration douce au moyen d'une pipette de 5 ml, en notant la façon dont le sperme s'écoule par simple gravité à l'extrémité de la pipette. Si le sperme a une consistance normale, il s'écoule de la pipette en formant des gouttes séparées les unes des autres. Si la viscosité est augmentée, entre chaque goutte, il se

forme des filaments de plus de 2cm. On attribue une note d'une croix à trois croix (**Jumeau, 2013**).

- **pH de l'éjaculat**

Une goutte de sperme est déposée sur du papier pH et le pH est déterminé au moyen de l'échelle colorée. Il est important de procéder à cette mesure toujours au même moment et dans l'heure suivant l'éjaculation. Le pH se situe généralement entre 7,2 et 8 (**Cabannes, 2008**).

4.1.2. L'examen microscopique

a) Mobilité

La mobilité est évaluée dans l'heure qui suit la collecte (après liquéfaction) et quatre heures après éjaculation. La mobilité individuelle est estimée en plaçant, au moyen d'une micropipette, une microgoutte de sperme calibrée à 10 µl sur une lame de verre. Une lamelle de verre est ensuite déposée sur la goutte de sperme. La lame est examinée rapidement à l'agrandissement X100 puis observée au grossissement x 400, sur une dizaine de champs répartis sur la lame. Le mouvement des spermatozoïdes observés est classé dans les catégories suivantes (**Trevor, 2010**).

* Rapide et progressif : **a** ; * Lent et progressif : **b** ;

* Mobile mais non progressif : **c** ; * Immobile : **d**.

De grandes différences peuvent apparaître selon les observateurs ce qui fait qu'actuellement la mobilité est souvent mesurée à l'aide d'un analyseur d'images CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), rendant ainsi l'analyse plus objective.

Le système d'analyse CASA

Ces appareils ont connu un essor important ces dernières années. Leur principe est basé sur l'étude des trajectoires de la tête du gamète qui sont un bon reflet de l'activité flagellaire. Après acquisition (enregistrement avec une fréquence de l'ordre de 40 hertz) et mémorisation des images des têtes spermatiques, les données sont analysées par un logiciel spécifique à chaque système. L'étude d'une trajectoire peut se faire de façon précise à partir de 30 points. Une centaine de trajectoires peuvent être analysées en quelques minutes.

Les paramètres couramment retenus pour l'évaluation du mouvement sont la VCL (Curvilinear Velocity) reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation. La VSL (Straight-Line Velocity) est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite. Enfin la VAP (Average Path Velocity) correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation. L'ALH (Amplitude of Lateral Head displacement) correspond à l'amplitude du

déplacement latéral de la tête. La BCF (Beat Cross Frequency) est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne ; elle est mesurée en Hertz (**Figure2**) (**Grizard et Jimenez, 1997**).

Ces systèmes ne doivent a priori pas remplacer le spermogramme classique car, il peut y avoir une surestimation du nombre de spermatozoïdes mais ils permettent de mettre en évidence certaines anomalies du mouvement non décelables par l'observation simple.

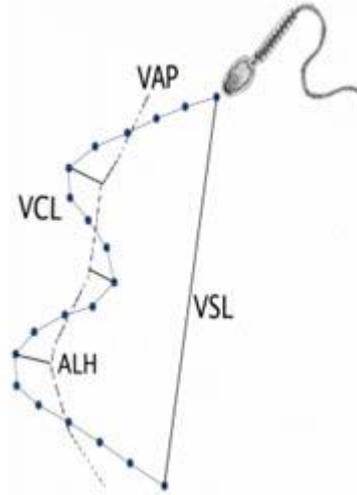


Figure 2 : Les différents paramètres de trajectoires calculés par CASA

b) Vitalité des spermatozoïdes

1) Coloration vitale :

Une coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants, une heure après récolte du sperme. 10 μ l de sperme et 20 μ l d'éosine sont mélangés avec précaution. Après 30 secondes, 30 μ l de nigrosine sont ajoutés et le tout est à nouveau mélangé. 10 μ l de ce mélange sont étalés sur lame de verre, le séchage se fait à l'air libre et l'observation est réalisée au microscope, grossissement x1000, à immersion. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose. On compte le nombre de spermatozoïdes morts et vivants sur un total d'au moins 100 spermatozoïdes (**Agarwal et Said., 2011**).

2) Test de gonflement hypo-osmotique

Les spermatozoïdes vivants plongés dans un milieu hypo-osmotique réagissent par un gonflement au niveau du flagelle, et ceci est lié à un afflux d'eau à travers leur membrane semi perméable, ce test est simple et aisément quantifiable (**Zorn et al., 2005**).

c) Concentration

La concentration en spermatozoïdes est évaluée en utilisant un hémocytomètre. Le sperme est dilué au 1/20ième en ajoutant à 50 μ l de sperme 950 μ l du milieu de dilution (5g de

bicarbonate de sodium, 1 ml de formol et eau distillée QSP 100ml). Si le sperme est très peu concentré, on diluera seulement au ½ ou 1/10^{ième}. Ce mélange provoque la mort des spermatozoïdes et leur immobilisation, ce qui facilite leur comptage. Le mélange est introduit par capillarité dans les compartiments de la cellule de Malassez et laissé dix minutes dans une chambre humide pour permettre la sédimentation des cellules. Le comptage s'effectue au microscope à contraste de phase au grossissement x 200 ou x 400. Le nombre de carreaux comptés est fonction de la concentration en spermatozoïdes (**Cabannes, 2008**).

4.2. Le spermocytogramme

Le spermocytogramme est l'appellation usuelle pour définir l'analyse morphologique des spermatozoïdes humains qui évalue les anomalies morphologiques et notamment le pourcentage de formes typiques (FT). Plusieurs classifications sont utilisées dans le monde : classification de David et classification de Kruger, classification internationale recommandée par l'OMS (**Le Coz, 2014**).

5. Analyse semi-automatisée

Le principe d'analyse d'images a le potentiel d'apporter des avancées majeures en terme de quantification, d'objectivité et de reproductibilité pour l'analyse de la morphologie spermatique. Plusieurs systèmes sont actuellement commercialisés. Ils réalisent l'analyse de la morphologie de la tête et de la pièce intermédiaire du spermatozoïde et parfois de la pièce principale. Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) classe généralement la tête et la pièce intermédiaire du spermatozoïde comme normale ou anormale. Le résultat donne aussi la moyenne des dimensions de la tête et de la pièce intermédiaire, l'ellipticité et la régularité de la tête ainsi que la mesure de l'aire de l'acrosome. (**Roulet-Coudrier, 2013**).

Chapitre II : Les Huiles Essentielles

1. Définitions

L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerie frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (AFNOR, 2000).

C'est un liquide odoriférant d'aspect fluide à épais et de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite. Elle est sécrétée par des cellules spécialisées se trouvant aussi bien dans les feuilles (menthe poivrée, basilic grand vert), les fleurs (lavande, ylang ylang), le bois (cèdre Atlas, santal blanc), les racines (gingembre, valériane, vetiver), les graines (coriandre, anis vert, carotte) (Festy, 2015).

Les huiles essentielles sont des messagers chimiques utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement. Les huiles essentielles permettent d'éloigner les maladies, les parasites, mais aussi jouent un rôle protecteur face aux rayonnements du soleil. Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs (Ouis, 2015).

2. Méthodes d'extraction

Il existe plusieurs modes d'extraction comme l'hydrodistillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvants organiques, l'extraction par ultra-sons etc... Deux procédés sont principalement employés et font l'objet d'une monographie à la Pharmacopée : l'hydrodistillation/distillation à la vapeur d'eau et l'expression à froid. (Pierron, 2014).

a) Hydrodistillation (HD)

Dans le cas de l'HD, la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale. La vitesse de vaporisation des composés volatiles par l'hydrodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau (Sutour, 2011).

b) Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Cette technique utilise l'entraînement des substances aromatiques par la vapeur d'eau. Les plantes sont disposées entières ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs comme les racines ou les écorces) dans un appareil de type Clevenger ou dans un alambic (obtention à l'échelle industrielle). Pour l'obtention à l'échelle industrielle, un courant de vapeur d'eau traverse l'alambic et sous l'effet d'une source de chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui traverse alors la cuve contenant les plantes aromatiques. La vapeur d'eau ayant volatilisé et entraîné l'HE se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant et retourne donc à l'état liquide pour se séparer dans l'essencier ou vase florentin. L'HE étant hydrophobe et souvent moins dense que l'eau, surnage dans la majorité des cas à sa surface et est recueillie après décantation. Il est impératif que la distillation soit complète pour que tous les constituants aromatiques de l'HE soient récupérés. Par conséquent, les durées de distillation sont généralement longues. Elles varient en fonction des organes distillés de 1 à 24 heures (Velé, 2015).

c) Expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau (Herzi, 2013).

3. Méthodes d'analyse

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

Si aujourd'hui ces méthodes d'identification sont précises, rapides et fiables, il n'en était pas de même au début du XX^{ème} siècle. En effet, les seuls moyens connus étaient : l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, la densité, le pH, l'absorption UV/visible que l'on associait aux différentes méthodes de contrôles chimiques tel que l'indice de carbonyle, d'ester, d'acide, d'alcool et de phénol. De nos jours, ces contrôles physicochimiques sont encore utilisés, par

exemple pour connaître l'indice d'acide d'une huile essentielle de lavande mise sur le marché. Par contre, les nouvelles techniques de séparation, en particulier la chromatographie en phase gazeuse (CPG), sont les mieux adaptées à l'analyse des constituants volatils dans les extraits aromatiques. La CPG peut être couplée à des méthodes spectrales, telles que l'infra-rouge ou la spectrométrie de masse qui est de loin la plus utilisée (**Figueredo, 2007**).

4. Composition chimique

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses. Ainsi, par l'analyse instrumentale moderne (chromatographie gazeuse capillaire, couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse), il n'est pas rare de reconnaître plusieurs dizaines voire une ou deux centaines et parfois plus de constituants dans une huile essentielle (huiles essentielles de vétiver, de patchouli, de géranium). Par contre, certaines huiles ne contiennent que quelques composés, avec, généralement, la prédominance d'un composé. Enfin les propriétés odorantes de ces huiles sont souvent sous l'influence de plusieurs composés qui ne sont présents qu'à de très faibles proportions. L'ensemble de ces composés peut être divisé en deux grands groupes : les hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), les composés oxygénés, qui sont considérés comme substances aromatiques, de type phénylpropanoïde (**Besombes, 2008**).

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

5. Toxicité

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines). D'autres huiles essentielles peuvent aussi être à l'origine d'une hépatotoxicité et neurotoxicité avec somnolence, coma et convulsions. Les cétones comme l'*l*-thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (**Zenasni, 2014**).

6. Bioactivité

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour leurs propriétés antiseptiques, antiparasitaires, antispasmodiques et antioxydantes. De nombreuses études traitent des activités des HE, qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés où présentés lors de congrès d'aromathérapie scientifique (**Abi-ayad, 2009**).

Chapitre III : Monographies des espèces étudiées

1. Le Thuya de Berbérie : *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

1.1. Généralités et description

Le Thuya de Berbérie, *Tetraclinis articulata*, est une endémique d'Afrique du nord occidentale (Maroc, Algérie et Tunisie). En dehors de cette zone, on rencontre quelques petites localités au sud-est de l'Espagne (province de Carthagène) et à l'île de Malte (**Bourkhiss et al., 2007**).

Le Thuya est une espèce résineuse à croissance très lente, longévive et qui peut dépasser 400 ans. En hauteur, l'accroissement annuel est estimé de 20 cm/an jusqu'à 25 ans, et de 10 cm/an jusqu'à 60 ans. En diamètre, il est de 3 à 4 mm/an jusqu'à 30 ans et de 1,5 à 2,5 mm/an jusqu'à 60 ans (**El mouridi, 2011**).

Il est caractérisé par une cime claire et un port pyramidal irrégulier, son feuillage est persistant ; les feuilles paraissent verticillées par quatre, longuement soudées à la tige. Les rameaux, verts, aplatis et couverts par feuilles, sont articulés, d'où leur nom de *T. articulata* (**Hedjal, 2014**).

Sa floraison a lieu au printemps, entre mars et mai. Le fruit est un cône liégeux de forme générale cubique constituée de quatre volves ornées d'un ombilic près du sommet (**Herzi, 2013**).

1.2. Classification botanique

Le Thuya de Berbérie appartient à la famille des Cupressaceae et au genre *Tetraclinis* qui ne comprend qu'une seule espèce *T. articulata* (**Kerbouche, 2010**). Le Thuya de Berbérie appartient au :

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	Spermatophytes
Sous embranchement :	Gymnospermes
Classe :	<i>Pinopsida</i>
Ordre :	Pinales
Famille :	<i>Cupressaceae</i>
Genre :	<i>Tetraclinis</i>
Espèce :	<i>Tetraclinis articulata</i>

1.3. Répartition géographique

a) Dans le monde

Tetraclinis articulata est une essence endémique de la méditerranée dont la majeure partie est en méditerranée occidentale. Cette espèce se cantonnant essentiellement dans la partie méridionale du bassin méditerranéen, à l'exception de deux îlots, l'un au Sud-est de l'Espagne (Almeria) et l'autre à l'île de Malte (Abi-ayad, 2009). En Afrique du Nord, il occupe une superficie d'environ 30000 ha en Tunisie et 143000 ha en Algérie. C'est au Maroc où cette espèce couvre une aire beaucoup plus étendue qui représente 80% des tetraclinaies Nord Africaines, où ses peuplements occupent une superficie d'environ 566000 ha (El Mouridi, 2011).

b) En Algérie

Le Thuya de Berbérie reste une espèce peu estimée en Algérie. En 1950, il occupe une superficie de 161 000 ha. Ces dernières décennies, il s'étend encore sur un peu plus de 140 000 ha et occupe la quatrième place en matière de superficie, après le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne-liège. Les agressions permanentes (coupes, dégradation, parcours et surtout incendies) qu'a subit cette essence forestière rustique et utile dans des zones marginales, sont à l'origine de son déclin. Il est important dans le Tell Oranais et dans l'Ouarsenis. Toutefois, il existe par pieds isolés ou par petits bouquets jusqu'à l'entrée de la Kabylie (Dellys et Lakhdaria), dans la vallée de l'oued Sahel jusqu'au M'Chedallah ainsi que dans les gorges de Kherrata. Il manque dans le Tell constantinois et dans la partie centrale et orientale du tell Algérois (Chikhouné et al., 2013).

1.4. Huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Le tableau I présente les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.

Tableau I : composés majoritaires de l'huile essentielle de *T. articulata*

Origine de l'huile	Partie de la plante	Composés majeurs	Teneur (%)	Références
Algérie	Feuilles	Acétate de bornyle	40,2	Chikhouné et al., 2013
		-pinène	24,9	
Algérie	Fruits	-pinène	57,5	Bourkhiss et al., 2007
		Limonène	20,9	
Maroc	Rameaux	-pinène	30,22	Tékaya-karoui et al., 2007
		Limonène	22,29	
Tunisie	Branches	Camphène	43,23	Herzi et al., 2013
Tunisie	Feuilles	Cédrole	28,2	Herzi et al., 2013
		Camphre	19,1	

1.5. Utilisations

Le bois de Thuya est surtout utilisé dans le secteur artisanal en menuiserie et en ébénisterie ou comme bois de chauffage. En phytothérapie, différentes parties de la plante sont utilisées contre les fièvres infantiles, les douleurs gastriques, les fortes diarrhées, le diabète, l'hypertension, etc. (**Bourkhiss et al., 2007**). La gomme sandaraque qui y est produite est totalement exportée à l'étranger. Elle est utilisée dans la fabrication de vernis de luxe et en industrie pharmaceutique et cosmétique (**Hadjadj et Letreuch, 2015**).

2. Le myrte commun : *Myrtus communis* L.

2.1. Généralités et description

Le myrte commun est un arbrisseau à tige ligneuse qui reste vert tout au long de l'année. De la famille des Myrtaceae qui regroupe plus de 5650 espèces, il est appelé Achelmûn en berbère et Ar-Raihan en arabe (**Bouzabata et al., 2013**). Il mesure de un à trois mètres de hauteur. Sa croissance est lente, ces arbrisseaux peuvent atteindre une longévité de 300 ans (**Franceschini, 2016**). Le rhytidome de cet arbrisseau est roux, mince, presque lisse, écailleux et caduc. Le myrte commun possède des feuilles persistantes, opposées et subsessiles. Ses feuilles sont coriaces, luisantes, de forme ovales et lancéolées. Elles mesurent entre 20 et 24 mm de long et 4 à 11 mm de large. Les fleurs blanches, fortement odorantes, sont disposées à l'aisselle des feuilles. Le fruit, noir bleuâtre à maturité, est ovoïde et charnu (**Bouaziz, 2015**).

2.2. Classification botanique

La taxonomie du myrte commun selon **Chaouche (2010)** est la suivante :

Règne	: <i>Plantae</i>
Embranchement	: <i>Spermaphytæ</i>
Classe	: <i>Dicotylédonæ</i>
Ordre	: Myrtales
Famille	: <i>Myrtaceæ</i>
Genre	: <i>Myrtus</i>
Espèce	: <i>Myrtus communis</i> L.

2.3. Répartition géographique

a) Dans le monde

Le myrte commun se retrouve spontanément en Europe méditerranéenne, Asie occidentale et Afrique septentrionale (**Franceschini, 2016**). Sa distribution horizontale très large de la Macaronésie jusqu'au Pakistan, peut être expliquée par la variabilité génétique au sein des populations de l'espèce (**Benjelloun et al., 2013**).

b) En Algérie

En Algérie, *M. communis* L. est largement répandue dans l'Atlas Tell et dans les régions côtières d'Alger Et Constantine. Une autre espèce de myrte (*Myrtus nivellei* Batt. & Trab) se trouve également dans le centre du Sahara (Hoggar) appelé localement Tefeldest (**Bouaziz, 2015**).

2.4. Huile essentielle de *Myrtus communis*

Les principaux composants de l'HE de *M. communis* sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : principaux composants de l'huile essentielle de *M. communis*

Origine de l'huile	Partie de la plante	Composés majeurs	Teneur (%)	Références
Algérie	Feuilles	1,8-cineol	46,98	Djenane <i>et al.</i> , 2011
Algérie	Feuilles	-pinène 1,8-cinéol	40,50 10,90	Bouzabata <i>et al.</i> , 2010
Maroc	Feuilles	-pinène	19,20	Cherrat <i>et al.</i> , 2013
Tunisie	Feuilles	1,8-cinéol	15,96	Messaoud <i>et al.</i> , 2005
France	Fruits	-pinène 1,8-cinéol	45,3 25,0	Barboni <i>et al.</i> , 2010

2.5. Utilisations

Dès le 1er siècle, Dioscoride, médecin grec, indiquait de nombreuses applications médicales et avait qualifié le Myrte d'ami de l'estomac. Aujourd'hui, les feuilles et l'huile essentielle sont utilisées notamment en cas d'affection respiratoire (**Brada *et al.*, 2012**).

Couramment utilisée pour ses propriétés digestives et antispasmodiques, antiseptiques et antimicrobiennes, astringentes et tonifiantes, ainsi que ses propriétés antiparasitaires. Le myrte est très connu aussi pour ses propriétés anti-génotoxiques, en plus de son pouvoir hemagglutinant, anti-hyperglycémiant, hypocholestérolémiant et anti-inflammatoire (**Touaibia et Chaouch, 2014**).

Dans le nord de l'Algérie dans la région de M'Sila, **Boudjelal *et al.* (2013)** a interrogé 83 herboristes. 19% d'entre eux déclarent utiliser *Myrtus communis* comme traitement de l'hypertension et du diabète. Pour cela, ils utilisent les parties aériennes sous forme d'infusion ou de décoction.

Chapitre IV : Interaction substances actives – spermatozoïdes

Les plantes sont utilisées par les êtres humains depuis les temps anciens, elles ont été considérées comme les seuls moyens disponibles pour guérir des maladies. Dans le domaine de la régulation de la fécondité, on a rapporté qu'un grand nombre de plantes possédaient des composants contraceptifs (**Saraswat, 2011**).

1. Effets des huiles essentielles

Le contrôle de la fertilité est une question d'intérêt pour la santé publique à l'échelle mondiale et nationale. De nombreuses études ont été faites sur la contraception masculine. L'usage traditionnel Des plantes médicinales pour traiter différentes sortes de maladies, y compris les problèmes liés à la fertilité, est répandu dans le monde entier, car de nombreuses substances végétales sont connues pour leurs interférences avec le système reproducteur masculin (**Gupta et Sharma, 2006**).

1.1. Effets protecteurs

Les effets protecteurs des HE à l'égard du spermatozoïde ne sont pas documentés par des études in vitro. La quasi-totalité des publications rapportent en effet des effets cytotoxiques de ces huiles in vitro (**Adeiza et al., 2011**).

Cependant une étude a été entreprise pour étudier l'effet de l'huile essentielle de la sarriette (*Satureja khuzestanica*) sur des rats mâles. L'HE a été administré par voie orale à des doses de 75, 150 et 225 mg / kg / jour pendant 45 jours. Les rats traités et contrôlés ont été accouplés au jour 45 du traitement. Et elle a considérablement amélioré tous les paramètres évalués tels que la puissance, la fécondité, l'indice de fertilité et la taille de la litière. En outre, les concentrations de FSH et de testostérone ont été significativement augmentées dans les groupes traités avec l'HE de la sarriette. De même, le poids des testicules, des vésicules séminales et de la prostate a été augmenté (225 mg / kg). L'analyse histopathologique a montré que chez les rats mâles traités par cette huile (150, 225 mg / kg), le nombre de spermatogonies, de cordes spermatiques, de cellules de Leydig et de spermatozoïdes a été augmenté (**Haeri et al., 2006**).

1.2. Effets spermicides

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

minutes à cette concentration. Plusieurs recherches ont été faites sur l'huile de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) *in vitro*. Elle s'est révélée être un agent spermicide fort. Les spermatozoïdes humains sont devenus totalement immobiles dans les 30 secondes après un contact avec l'huile non diluée. La dose minimale effective est de 25 µl pour les rats. Un mois après l'arrêt de l'application de l'huile de Neem, il y a eu une réversibilité totale de la fertilité (Bansal *et al.*, 2010).

2. Effets des extraits aromatiques

2.1. Effets protecteurs

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

Une autre étude sur la fertilité des rats mâles avec un extrait alcoolique de graine de *N. sativa* à 0,5 et 1,5 g/kg pendant 53 jours, a montré son action bénéfique. Une stimulation hormonale de la spermatogénèse a été observée par les différents paramètres cités ci-dessus. Plus tard, en 2010, les mêmes paramètres ont été étudiés chez le lapin. Chaque repas était constitué de moitié par des graines de nigelle et on en est arrivé aux mêmes conclusions (Toparlan, 2012).

2.2. Effets spermicides

Au cours des dernières années, un certain nombre d'articles ont été publiés sur des plantes médicinales et beaucoup d'entre elles ont des activités spermicides, abortives ou antiandrogènes. La majorité des composés spermicides étaient des saponines triterpéniques de plusieurs types de structures, des flavonoïdes et des polyphénols (Farnsworth et Waller, 1982).

Les saponines du cyclamen (*Cyclamen persicum*), la primevère (*Primula vulgaris*) et Le Gypsophile paniculé (*Gypsophyla paniculata*) ont été signalés comme causant une immobilisation presque instantanée des Spermatozoïdes humains dans les 20 secondes après administration (Primorac *et al.*, 1985).

La fraction purifiée de l'extrait d'*Echeveria gibbiflora* (Delgado *et al.*, 1999) et de l'extrait de graines de la papaye (*Carica papaya*) (Lohiya *et al.*, 2000) ont également manifesté le même effet *in vitro*.

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

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

Un mélange de deux saponines triterpénoïdes partiellement isolées de graines en poudre d'*Acacia auriculiformis* (Acaciaside A et B) ont montré une activité spermicide avec une concentration de 0,35 mg / ml (Heeshma *et al.*, 2008).

Chapitre I : Matériel et Méthodes

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de deux espèces ; le thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) et le myrte commun (*Myrtus communis*), et les huiles essentielles testées ont été obtenu à partir des feuilles.

1.1. Description des espèces étudiées

a) Le myrte commun (*M. communis*)

Arbrisseau de 1 à 3 mètres, inerme, aromatique et toujours vert ; feuilles opposées, très rapprochées, subsessiles, ovales-lancéolées aiguës, entières, coriaces, persistantes, glabres et luisantes, sans stipules ; fleurs blanches, axillaires, solitaires, longuement pédonculées, odorantes; baie à peine charnue, ovoïde, d'un noir bleuâtre (**figure3**).



Figure 3: Le myrte commun (*Myrtus communis*). (D'après Google image).

b) Le thuya de Berbérie (*T. articulata*)

Le thuya est un arbre monoïque, de 15-25 m de hauteur, au port d'abord pyramidal, élancé, puis au feuillage diffus et léger. Son tronc est droit à rhytidome gris clair, puis devenant plus sombre, fendillé longitudinalement, à rameaux dressés et minces, composés de petites branches plates, vertes, articulées selon la disposition des feuilles. Les feuilles sont en aiguilles bleutées, de 1-2 cm chez les jeunes plantes. Elles vont ensuite, chez les plantes adultes, laisser la place aux feuilles en écailles, persistantes, opposées et plus ou moins verticillées par 4,

enveloppant le rameau aplati inégal, 2 larges alternant 2 étroites. Les fleurs sont groupées à l'extrémité des rameaux courts. Les cônes plus ou moins globuleux, constitués de 4 écailles ligneuses, en 2 paires, en forme de cœur (**figure 4**).



Figure 4 : Le thuya (*Tetraclinis articulata*). (D'après Google image).

1.2. Cueillette et séchage

Les feuilles du myrte commun ont été récoltées dans la région de Tifra commune de Bejaia et ceux du thuya proviennent de la wilaya de Blida plus exactement à Hammam Mélouane. L'échantillonnage est réalisé pendant la période de floraison au mois de Juillet 2015. La récolte est séchée à l'abri de la lumière et à température ambiante.

2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HE a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation au niveau du laboratoire de physico-chimie des aliments de l'université de Bejaia. Cette dernière est retenue par la Pharmacopée Européenne (**Amira et al., 2012**). L'extraction des HE est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié (**figure 5**).



Figure 5 : Montage d'hydrodistillation de Clevenger modifié

2.1. Protocole d'extraction

La matière végétale sèche (100g) de chaque échantillon (feuilles de *T. articulata* et feuilles de *M. communis*) sont introduites dans un ballon de 2 litres rempli d'eau jusqu'à deux tiers (2/3) de son volume. Le tout est porté à l'ébullition pendant 3 heures. Des vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant se condensent et chutent dans l'ampoule à décanter. Les HE séparées de l'eau par différence de densité, sont traitées par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour chasser les molécules d'eau restantes. Enfin, les huiles extraites sont conservées à une température de 4°C dans des flacons en verre opaque fermés hermétiquement (Brada *et al.*, 2012).

2.2. Rendement de l'extraction

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport en pourcentage entre le volume de l'HE récupérée (ml) et la masse de la matière végétale sèche (g). Le rendement en HE est donné par la relation suivante :

$$\text{Rdt \%} = (\text{VHE} / \text{Mvs}) * 100$$

Avec :

Rdt % : Rendement en HE.

VHE: Volume de l'HE (ml).

Mvs : Masse de la matière végétale sèche (g).

3. Etude de l'effet spermicide des HEs extraites des plantes étudiées

3.1. Méthodologie

Dans le présent travail, le recours à l'utilisation du sperme humain vise à étudier l'effet probable de l'HE de *T. articulata* et du *M. communis* sur les paramètres de mobilité et de vitalité des spermatozoïdes. Pour quantifier cet effet nous avons recouru aux différentes dilutions de l'HE dans du DMSO 5%, afin de comparer leurs effets sur les spermatozoïdes humains, comme il est coutume dans ce genre d'expérimentation (Sharma *et al.*, 1996; Paul et Kang, 2011; Affonso *et al.*, 2012). Cependant, dans notre approche nous avons évalué cet effet spermicide par l'évaluation de la semence à travers ses paramètres de mobilité mesurés par l'analyse informatique du sperme en utilisant le «Computer Assisted Sperm Analysis» (figure 6).

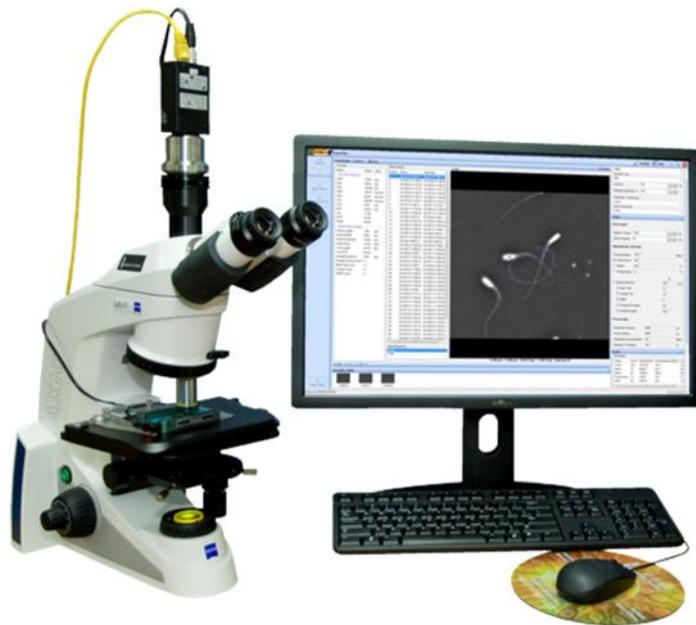


Figure 6: Computer Assisted Sperm Analysis. (D'après Google image).

3.2. Collecte du sperme humain

Des échantillons de sperme ont été obtenus par masturbation de 05 sujets volontaires âgés entre 22-35 ans, avec une morphologie normale des spermatozoïdes de plus de 60% et une motilité de plus de 40%, avec une viabilité supérieure à 50%. Ces échantillons de sperme ont été obtenus après 3 à 5 jours d'abstinence sexuelle, selon les instructions standards (OMS, 2010). Tous les échantillons ont été recueillis au niveau du laboratoire d'analyses médicales dans la ville de Bejaia. L'analyse courante du sperme a été réalisée juste après sa liquéfaction pendant 30 min à température ambiante (25 °C) (Saïdi *et al.*, 2008).

3.3. Interaction spermatozoïdes-huile essentielle

Les différents échantillons à analyser ont été dilués dans un milieu isotonique (NaCl 0,9%).

- Le contrôle contient uniquement 5% de DMSO.
- Echantillons qui contiennent 5 % de DMSO et de l'HE du thuya avec des concentrations allant de 1 à 10 mg/ml.
- Echantillons qui contiennent 5 % de DMSO et de l'HE du myrte commun avec des concentrations allant de 1 à 6 mg/ml.

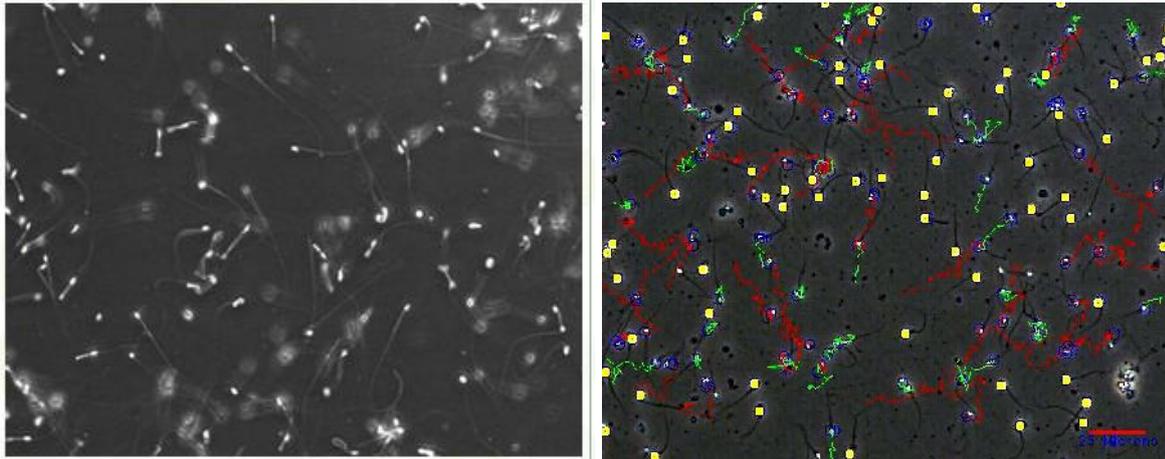
Chaque concentration d'huile a été mélangée à la semence avec un rapport de 1:1 (v/v) (**Ravikumar et al., 2011**).

3.3.1. Test de vitalité

Ce paramètre est évalué à l'aide d'un colorant vital «l'éosine-nigrosine» où 10µL du mélange (sperme/ huiles, contrôle) sont additionnées de 20µL d'éosine 1 %. Après 30 secondes, 40 µL de nigrosine à 10 % sont ajoutés. Par la suite, un frottis est réalisé pour chaque traitement et 100 spermatozoïdes sont comptés sur différents champs du frottis et le pourcentage de ceux qui sont morts " roses " ou vivants " blancs " est évalué sous un microscope optique à lumière blanche avec un grossissement X40 en utilisant un compteur de laboratoire. Ce test est réalisé juste après la mise en contact des spermatozoïdes avec les différentes concentrations en HE (t= 0 min) et après 30 min d'incubation à température ambiante (t= 30 min) (**Trevor, 2010**).

3.3.2. Test de mobilité sur CASA

L'effet de l'HE de *T. articulata* et de *M. communis*, sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes humains (pourcentage de mobiles et VAP) a été suivi à différents temps de contact: 0 et 30 min. Le protocole consiste à déposer un aliquote de 06 µl du mélange (sperme/ huiles, contrôle) sur une chambre de comptage à usage unique de 20 µm de profondeur. Cette dernière est mise à l'observation au CASA juste après le dépôt du mélange (**Comhaire et Mahmoud, 2006**). Les figures 7 et 8 montrent un exemple des images captées et analysée par le CASA montrant les différents types des spermatozoïdes observés.

**Figure 7 : Image captée par le CASA****Figure 8 : Analyse du sperme par le logiciel**

(D'après Google image)

4. Analyse statistique

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité spermicide ont fait l'objet d'une étude statistique. La comparaison des moyennes des résultats de l'action de l'HE du thuya et du myrte commun sur les paramètres de vitalité et de mobilité du sperme humain sont réalisées par le Test de Student (Test t). Tous les graphes et les histogrammes représentés dans le document ont été réalisés en utilisant le logiciel : Excel (Microsoft Office 2007).

Chapitre II : Résultats et Discussion

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Rendement de l'extraction en HE

1.1. *Tetraclinis articulata*

Le rendement d'extraction en HE des feuilles de *T. articulata* de la région de Hammam Mélouane exprimé en pourcentage poids par rapport à la matière végétale sèche, est de **0,40%**.

Le rendement en HE des feuilles de *T. articulata* obtenu est inférieur à celui rapporté par **Barrero et al. (2005)** lors d'une étude réalisée sur les feuilles de la même espèce provenant du Maroc. La teneur obtenue par ces auteurs pour une durée d'extraction de 6 heures est de 0,70% mais supérieur à celui cité par **Bourkhiss et al. (2007, 2009)** en travaillant sur la même espèce qui provenait du Maroc (0,22 %) et à ceux rapportés par **Tékaya-Karaoui et al. (2007)**; **Ben Jemia et al. (2012)** en travaillant sur la même espèce poussant en Tunisie. Les rendements obtenus par ces auteurs sont respectivement de 0,11 et 0,20%.

Les résultats obtenus par **Chikhouné et al. (2013)** montrent que les fruits présentent un rendement d'extraction plus important en HE (0,80) par rapport à celui obtenu à partir des feuilles (0,40).

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

1.2. *Myrtus communis*

Le rendement d'extraction en HE de feuilles de *M. communis* L. de la région de Tifra, exprimé en pourcentage ; poids par rapport à la matière végétale sèche est de **0,30%**.

Le résultat trouvé est largement supérieur à celui trouvé par **Barboni et al. (2010)** en travaillant sur la même espèce qui provenait de la région de Corse (France), mais inférieur à celui signalé par **Aidi-Wannes et al. (2010)** pour la même espèce de la région de Jbal Stara Haouaria (Nord-est de la Tunisie). Les rendements obtenus par ces auteurs sont respectivement de 0,04 et 0,61 %.

Cet écart est probablement attribué à la différence de provenance de la matière végétale ainsi qu'à la période de récolte.

2. Etude de l'effet spermicide des HE de *T. articulata* et *M. communis*

2.1. Effets des HE de *T. articulata* et *M. communis* sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes

Les échantillons du sperme humain de cinq personnes présentant des paramètres normaux selon les normes de l'OMS, ont été incubés avec un volume égal de l'HE de *T. articulata* diluée de 1 à 10 mg / ml et de 1 à 6mg/ml pour l'HE de *M. communis* dans le DMSO 5% (DMSO /HE). Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes viables a été déterminé pour chaque dilution, immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t =30 min).

2.1.1. Effet sur la mobilité

a. *Tetraclinis articulata*

Les résultats de l'effet de l'HE de *T. articulata* sur la mobilité du sperme humain, basé sur la détermination de la proportion des spermatozoïdes mobiles sont illustrés dans la figure 9.

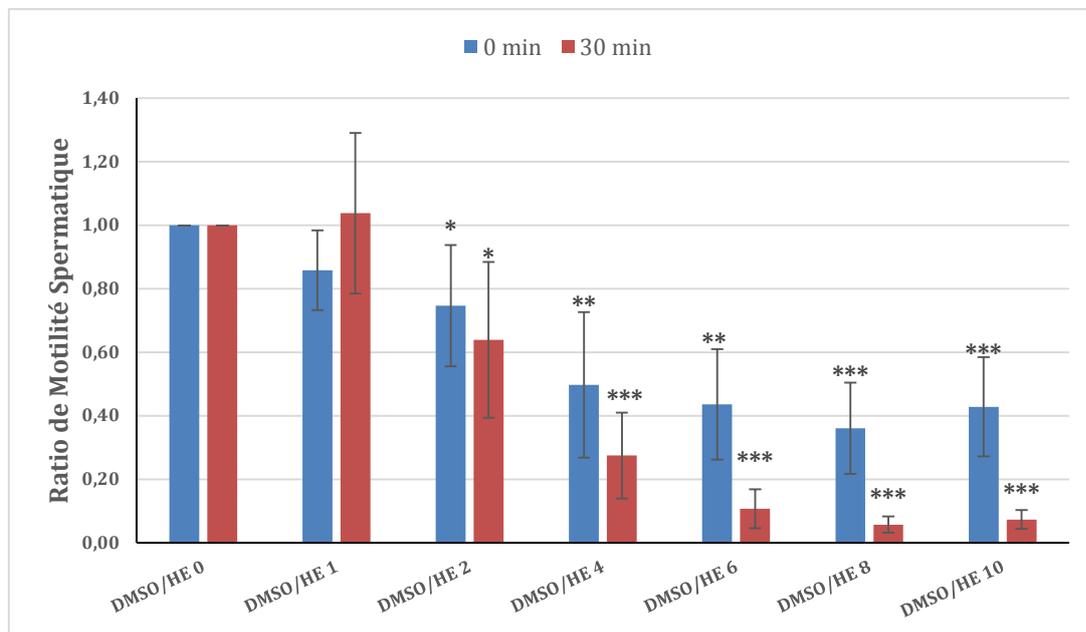


Figure 9: L'effet *in vitro* de l'HE de *T. articulata* sur la proportion des spermatozoïdes mobiles

Légende : Les dilutions des HE ont été préparées dans le DMSO 5% pour une gamme de concentrations de 1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml. Le ratio de la motilité de chaque dilution a été calculé par rapport au contrôle (DMSO/HE 0) immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 5). (*) indiquent des valeurs "p": * significatif (p<0,05); ** Hautement significatif (p<0,01); *** Très Hautement significatif (p<0,001).

D'après la **figure 9**, un effet d'immobilisation significatif des spermatozoïdes par l'HE a été observé, présentant un effet dose dépendant. Cependant, un effet plus prononcé est observé après 30 minutes d'exposition marquant ainsi une action immobilisatrice significative de l'HE du thuya de Berbérie, et cet effet a été observé avec une concentration d'huile essentielle supérieure ou égale à 2 mg/ml (0,75).

b. *Myrtus communis*

Les résultats de l'effet de l'HE de *M. communis* sur la mobilité du sperme humain, basé sur la détermination du pourcentage en spermatozoïdes mobiles sont illustrés dans la **figure 10**.

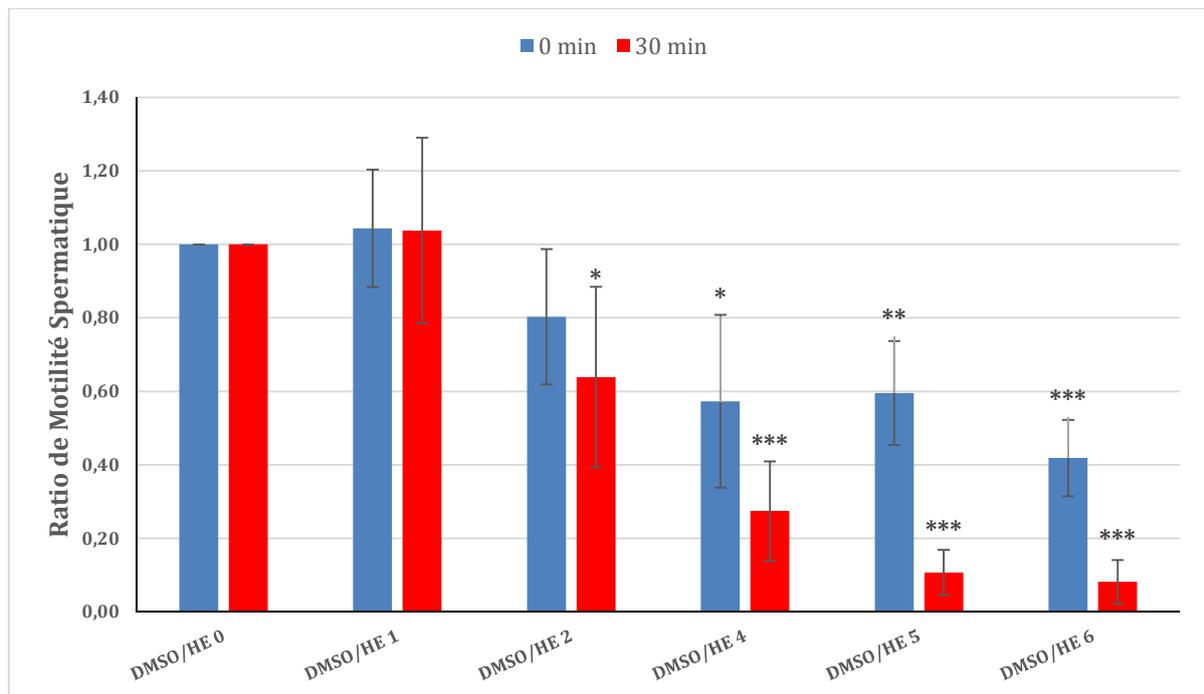


Figure 10: L'effet *in vitro* de l'HE de *M.communis* sur la proportion des spermatozoïdes mobiles

Légende: Les dilutions des HE ont été préparées dans le DMSO 5% pour une gamme de concentrations de 1, 2, 4, 5 et 6 mg/ml. Le ratio de la motilité de chaque dilution a été calculé par rapport au control (DMSO/HE 0) immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 5). (*) indiquent des valeurs "p": * significatif (p<0,05); ** Hautement significatif (p<0,01); *** Très Hautement significatif (p<0,001).

D'après la **figure 10**, un effet d'immobilisation significatif des spermatozoïdes par l'HE a été observé avec une concentration d'HE supérieur à 2 mg/ml après 30 mn (0,57), présentant un effet dose dépendant. Et parallèlement, un effet plus prononcé est observé après 30 minutes d'exposition marquant ainsi une action immobilisatrice significative à partir de la concentration de 2 mg/ml (0,64).

2.1.2. Effet sur la vitalité

a. *Tetraclinis articulata*

Les résultats de l'effet de l'HE de *T.articulata* sur la vitalité du sperme humain, déterminée en utilisant la méthode de coloration «Eosine-Nigrosine» sont illustrés dans la **figure 11**.

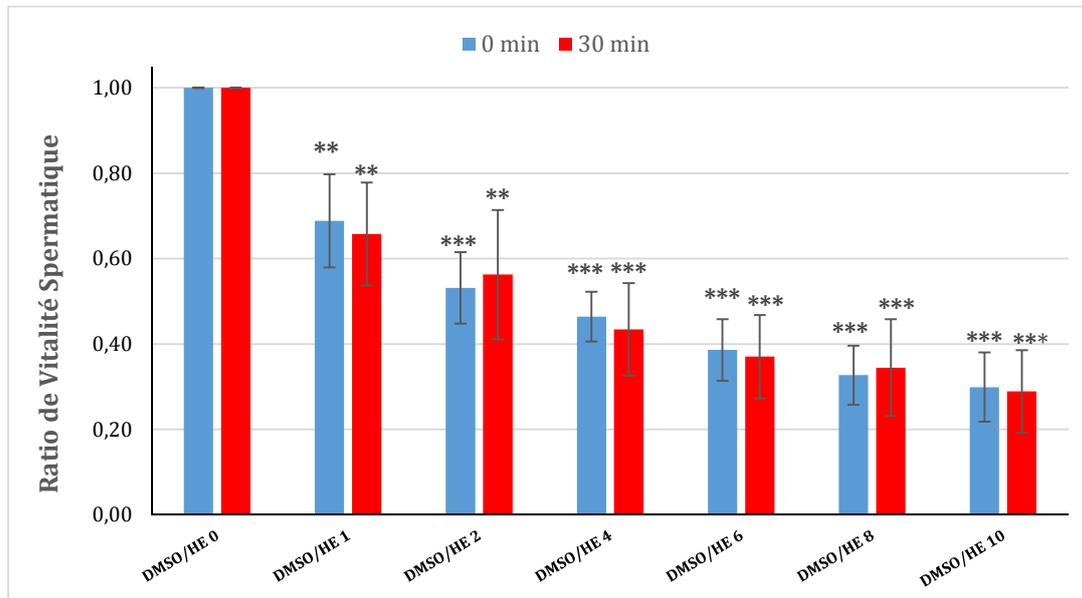


Figure 11 : L'effet *in vitro* de l'HE de *T. articulata* sur la vitalité du sperme humain

Légende : Les dilutions des HE ont été préparées dans le DMSO 5% pour une gamme de concentrations de 1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml. Le ratio de la vitalité de chaque dilution a été calculé par rapport au control (DMSO/HE 0) immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 5). (*) Indiquent des valeurs "p": * significatif (p<0,05); ** Hautement significatif (p<0,01); *** Très Hautement significatif (p<0,001).

La viabilité du sperme a été évaluée sur les mêmes préparations que celles utilisées lors du test de la mobilité. D'après les résultats de la **figure 11** et indépendamment du temps d'exposition, il apparait clairement une diminution de façon significative du nombre de spermatozoïdes viables à partir de la concentration de 1 mg/ml d'HE du thuya de Berbérie (0,69).

b. *Myrtus communis*

Les résultats de l'effet de l'HE de *M. communis* sur la vitalité du sperme humain, déterminée en utilisant la méthode de coloration «Eosine-Nigrosine» sont illustrés dans la **figure 12**.

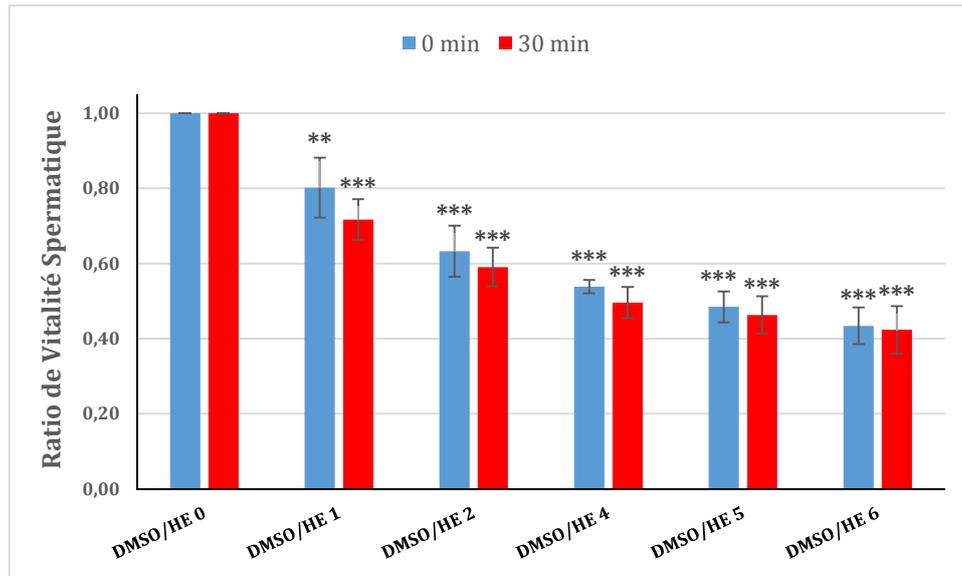


Figure 12 : L'effet *in vitro* de l'HE de *M.communis* sur la vitalité du sperme humain

Légende : Les dilutions des HE ont été préparées dans le DMSO 5% pour une gamme de concentrations de 1, 2, 4, 5 et 6 mg/ml. Le ratio de la motilité de chaque dilution a été calculé par rapport au control (DMSO/HE 0) immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n = 5). (*) indiquent des valeurs "p": * significatif (p<0,05); ** Hautement significatif (p<0,01); *** Très Hautement significatif (p<0,001).

La viabilité du sperme a été aussi évaluée et selon les résultats de la **figure 12** et indépendamment du temps d'exposition, on voit clairement que le nombre de spermatozoïdes viables a été considérablement diminué à partir de la concentration de 1 mg/ml d'huile essentielle du myrte commun avec un effet plus prononcé après 30 mn (0,72).

3. Analyse de la cinétique du mouvement du sperme exposé aux HE étudiées

3.1. La vitesse moyenne de trajet (VAP)

La VAP définit comme étant la distance parcourue par les spermatozoïdes, sur un trajet moyen pendant la durée d'observation. Ce paramètre est automatiquement calculé par l'analyseur du sperme (CASA).

a. *T. articulata*

L'histogramme de vitesse moyenne (VAP) par rapport aux différentes concentrations d'HE de *T. articulata* est illustré dans la **figure 13**.

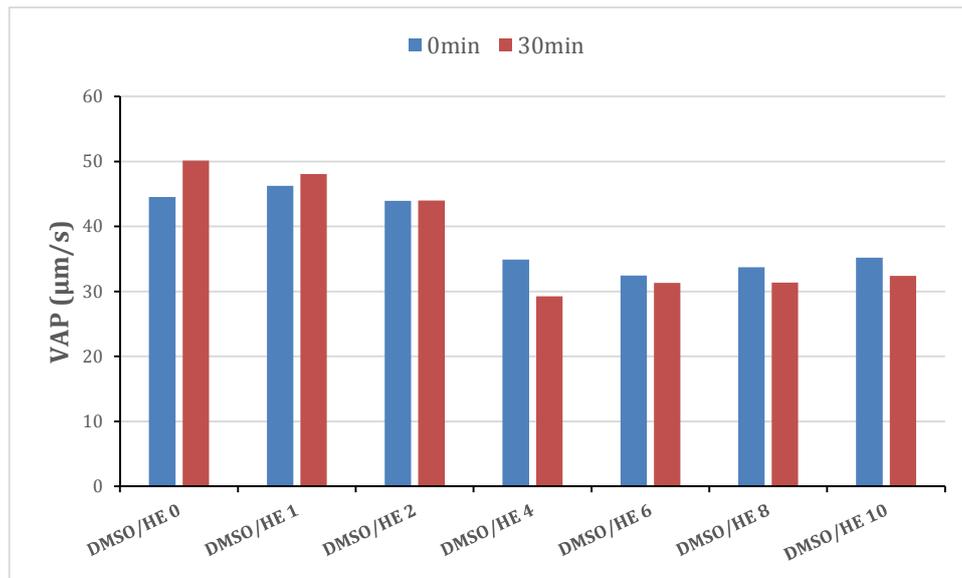


Figure 13: Effet *in vitro* de l'HE de *T. articulata* sur la VAP Moyenne des spermatozoïdes

La **figure 13** représente, la variation de la VAP en fonction des différents dosages de DMSO/HE du thuya de Berbérie. Nous pouvons voir que la valeur la plus élevée est retrouvée dans le contrôle (DMSO 5%) (50,14) et que la vitesse moyenne diminue avec l'augmentation des concentrations de DMSO/HE. La vitesse moyenne de trajet (VAP) a baissé des alentours de (45-50 $\mu\text{m/s}$) vers 32 $\mu\text{m/s}$.

Pour définir les caractéristiques du profil de déplacement de spermatozoïdes suite au contact avec les deux HE, nous avons effectué une analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA) sur des échantillons de sperme incubés avec différentes doses des huiles. Des paramètres du mouvement du sperme ont été évalués pour chaque échantillon, immédiatement ou 30 minutes après l'addition de l'HE : la vitesse moyenne de trajet (VAP) et la fréquence (nombre) de spermatozoïdes par rapport aux valeurs de la VAP (regroupées en classes) lors de l'exposition à l'HE de *T. articulata* sont illustrées dans la **figure 14**.

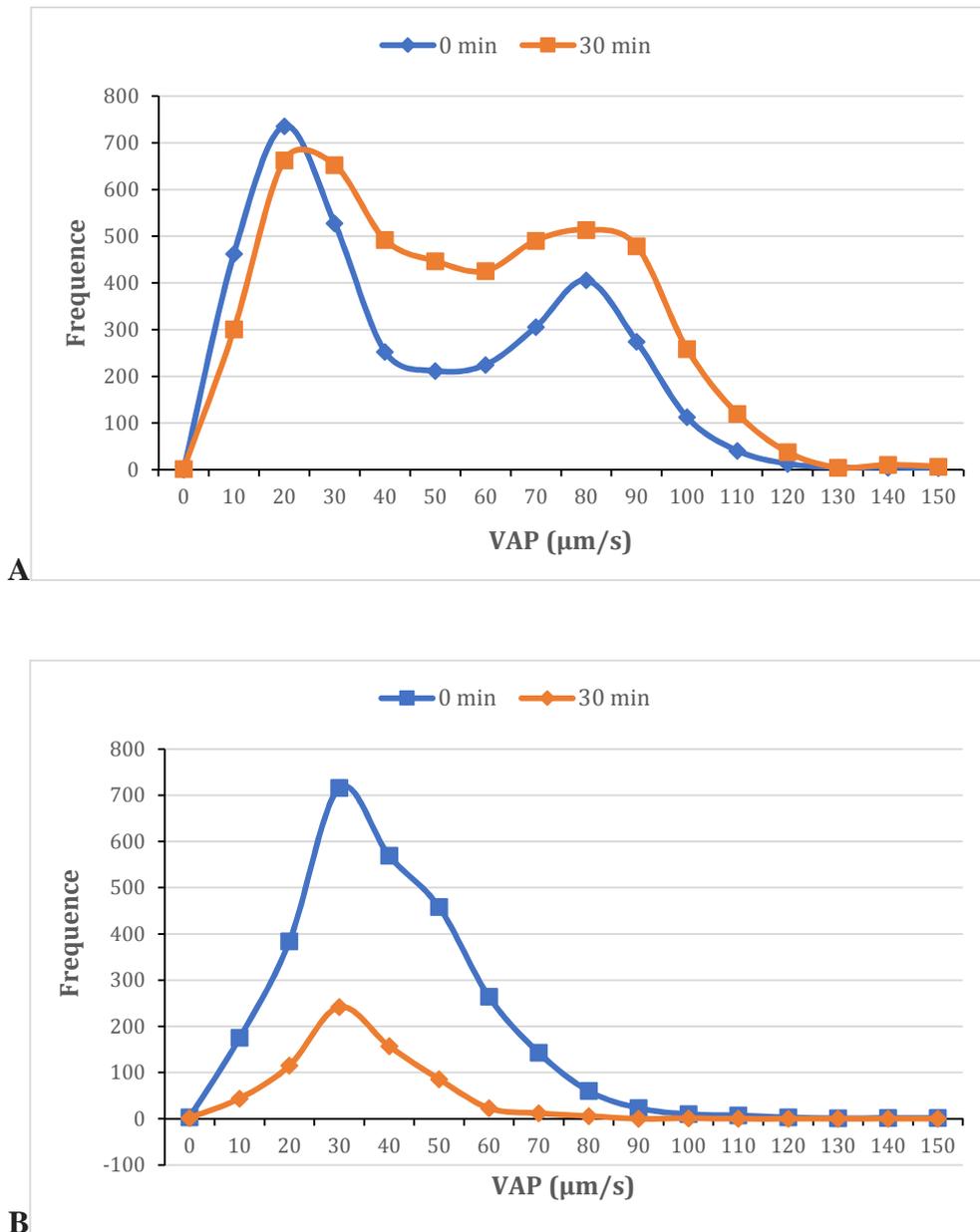


Figure 14 : La fréquence des classes de spermatozoïdes en fonction de la VAP lors de l'exposition à l'huile essentielle de *T. articulata*.

Légende : Les fréquences des classes de spermatozoïdes représentant les vitesses de trajet (VAP). (A): échantillon contrôle (DMSO 5%); (B): Echantillons contenant 4 mg/ml d'HE (dilué dans le DMSO 5%), immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min).

D'après la **figure 14**, les classes de VAP enregistré pour le contrôle (DMSO 5%) à 0 mn, a révélé la présence de deux populations correspondant aux populations de spermatozoïdes rapides et lents. Dans ces deux populations, la plupart des spermatozoïdes avait une VAP de 20 µm/s (spermatozoïdes lents) ou 80 µm/s (Spermatozoïdes rapides). Cependant après 30 mn de contact, on constate une légère augmentation de la VAP au niveau de la population des spermatozoïdes lents (30 µm/s). L'addition de l'huile essentielle de *T. articulata* a

principalement affecté la population de spermatozoïdes rapides pour laquelle une diminution significative de la VAP a été observée ; en particulier pour 4 mg/ml d'huile essentielle dans le DMSO 5%, qui a diminué la VAP de 80 à 30 $\mu\text{m/s}$, d'où l'apparition d'une population unique de spermatozoïdes lents (**Figure 14B**).

a. *M. communis*

L'histogramme de vitesse moyenne (VAP) par rapport aux différentes concentrations d'HE de *M. communis* est illustré dans la **figure 15**.

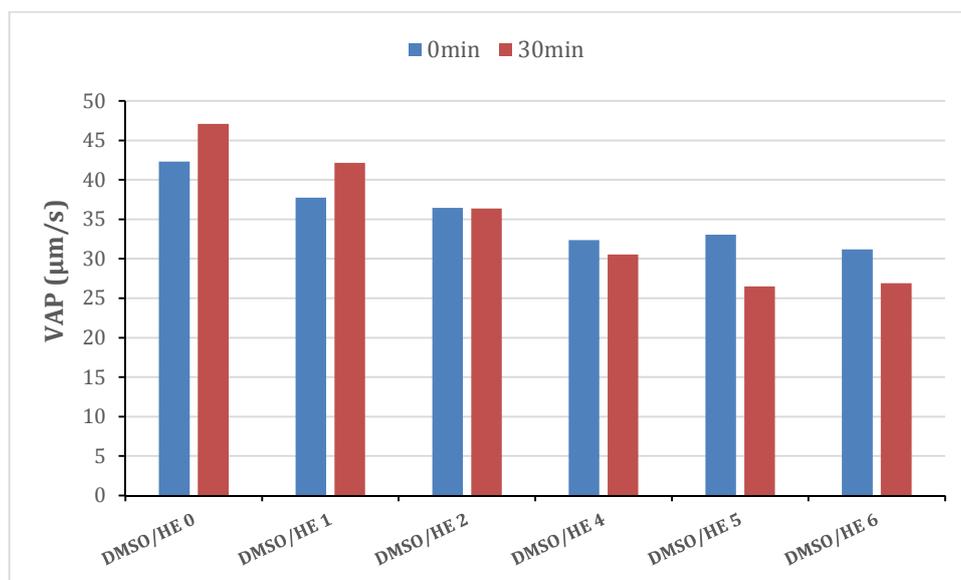


Figure 15 : Effet *in vitro* de l'HE de *M. communis* sur la VAP des spermatozoïdes

D'après les résultats de la **figure 15**, la variation de la VAP en fonction des différents dosages de DMSO/HE du myrte commun est en légère baisse par rapport au contrôle. On constate que la valeur la plus élevée est celle du contrôle (DMSO 5%) et que la vitesse diminue progressivement avec l'augmentation des concentrations de DMSO/HE. Cet effet d'inhibition de la vitesse est légèrement plus prononcé dans le cas de l'huile essentielle du myrte commun, sachant que la vitesse moyenne de trajet (VAP) a baissé des alentours de (42-47 $\mu\text{m/s}$) jusqu'à 26 $\mu\text{m/s}$, que dans le cas de l'HE du thuya de Berbérie. Ceci est probablement lié à une fragilité intrinsèque des spermatozoïdes les prédisposant à une vulnérabilité des huiles essentielles.

Le diagramme de la fréquence (nombre) de spermatozoïdes (regroupées en classes) par rapport aux valeurs de la VAP lors de l'exposition à l'huile essentielle de *M. communis* est illustré dans la **figure 16**.

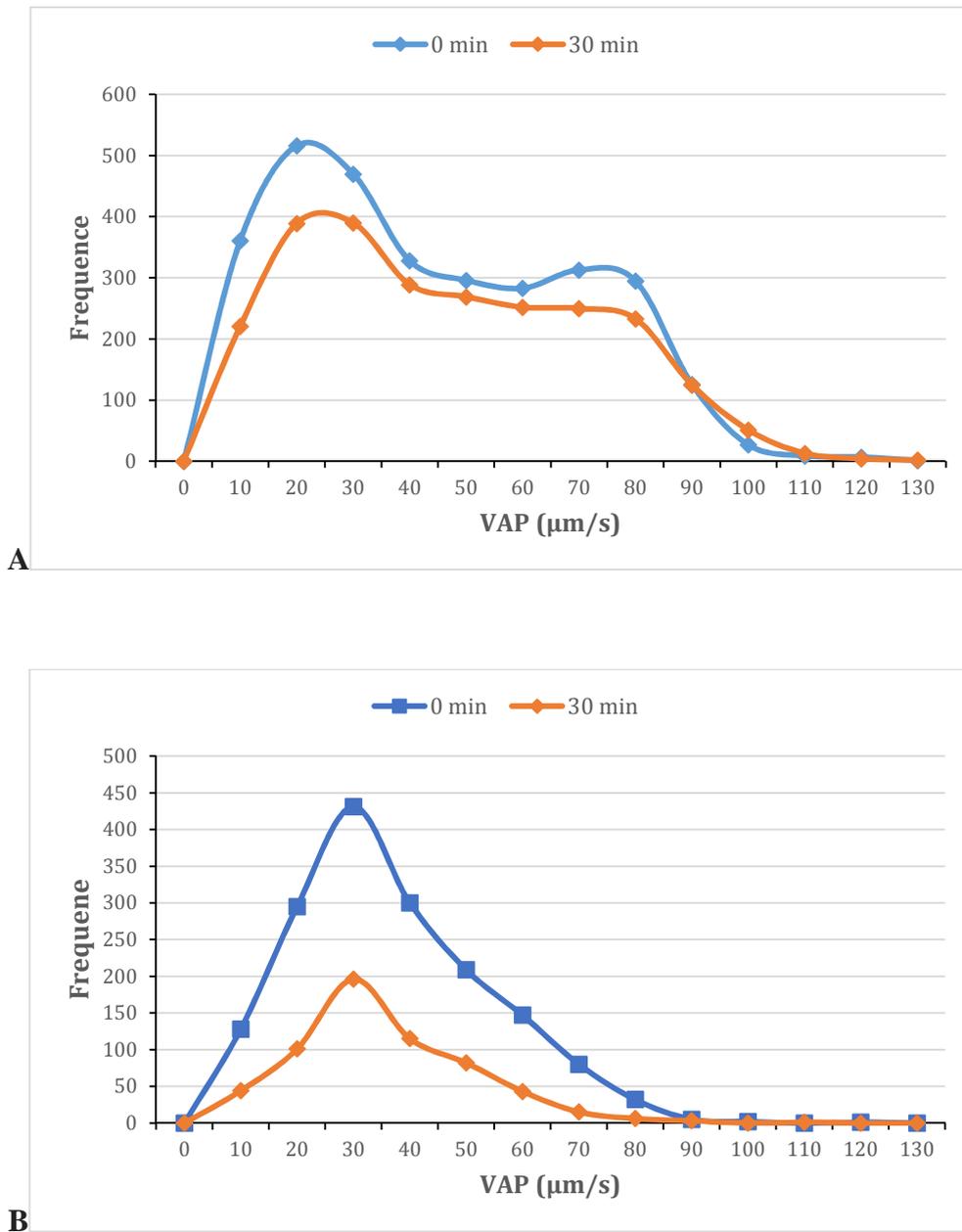


Figure 16 : La fréquence des classes de spermatozoïdes en fonction de la VAP lors de l'exposition à l'huile essentielle de *M. communis*

Légende: Les fréquences des classes de spermatozoïdes représentant les vitesses de trajets (VAP). (A): échantillon contrôle (DMSO 5%); (B): Echantillons contenant 4 mg/ml d'HE (dilué dans le DMSO 5%), immédiatement après l'addition de l'HE (t = 0 min) et 30 minutes après (t = 30 min).

D'après les résultats de **la figure 16**, il apparaît clairement que des tendances similaires à celle de l'HE de *T. articulata* sont observées. En absence de l'HE, la représentation graphique de la VAP du contrôle (DMSO 5%), a mis en évidence deux populations majeures de spermatozoïdes avec une VAP de 25 µm/s pour les spermatozoïdes lents et une VAP de 80 µm/s pour les rapides (**figure 16A**). Lors de l'addition de 4 mg/ml de l'HE de *M. communis*,

une disparition totale de la population des spermatozoïdes rapide a été constatée, ce qui a donné naissance à une seule population caractérisée par une VAP de 30 $\mu\text{m/s}$ (**figure 16B**).

4. Discussion

Le développement de nouveaux médicaments contraceptifs à partir de plantes médicinales est une proposition attrayante, car depuis les temps immémoriaux les humains se sont appuyés sur les plantes et leurs produits en tant que sources de médicaments et de soin, bien que ces derniers temps, les drogues de synthèse soient largement utilisées dans la médecine moderne. Au cours des dernières années, un certain nombre d'articles scientifiques ont été publiés sur des plantes médicinales et beaucoup d'entre elles possèdent une activité spermicide.

En tenant compte de la demande croissante pour l'utilisation des HE dans de nombreux pays en médecine traditionnelle, il apparaît essentiel de mieux caractériser ces composés et leurs propriétés biologiques *in vivo* et *in vitro*, par l'évaluation de leur impact direct sur les différents types cellulaires.

C'est ainsi, que nous nous sommes particulièrement intéressés dans le présent travail à analyser l'impact de ces HE sur les paramètres de la mobilité et la vitalité du sperme humain.

D'après les résultats obtenus dans cette étude, nous constatons que l'HE de *T. articulata* diminue de façon significative le nombre de spermatozoïdes viables à partir de la concentration de 1mg/ml (0,69 vers 0,39). Des résultats similaires sur la motilité spermatique ont été obtenus en présentant un effet inhibiteur de la mobilité et ce, à partir de la concentration de 2 mg/ml (0,75 vers 0,39). On a remarqué le même effet avec l'HE de *M. communis* mais avec des résultats légèrement plus faibles, une diminution de la vitalité avec une concentration supérieure ou égale à 1mg/ml (0,80 vers 0,43) et une baisse de la motilité à partir de 2mg/ml (0,80 vers 0,43). En comparant ces résultats, on remarque que l'effet délétère est légèrement plus prononcé avec l'HE de *Tetraclinis articulata* qu'avec l'HE de *Myrtus communis*.

L'activité biologique des HE pourrait être liée à des actions individuelles mais aussi à la synergie de plusieurs composés. En effet, la bioactivité d'une huile essentielle peut s'expliquer par son profil chimique (**Bourkhiss et al., 2007**). Et selon **Chikhouné et al. (2013)** les analyses chromatographiques de l'HE des feuilles de *T. articulata* provenant de la région H. Mérouane ont permis l'identification de composés phénoliques et terpéniques. Le composé majeur de l'huile du thuya est le bornyl acétate (40,2%). L'effet spermicide de cette huile n'a pas été étudié auparavant mais l'activité antibactérienne et antioxydante fut l'objet de nombreuses études. Les travaux de **Chikhouné et al. (2013)** sur l'HE du thuya testé sur trois souches de bactéries ont révélés une faible activité antimicrobienne. Des résultats similaires ont

été obtenus sur l'activité antioxydante. Alors qu'une autre étude sur l'HE de *T. articulata* avec l'acétate de bornyle (30,74%) comme composé majeur, a été réalisé par **Bourkhiss et al. (2007)** sur l'activité antimicrobienne et antifongique. Une forte activité inhibitrice vis-à-vis de tous les microorganismes utilisés a été enregistrée.

Après les analyses chromatographiques de l'HE des feuilles du myrte commun provenant de la région de Tifra, l'eucalyptol (1,8-cineol) est le composé majoritaire de cette huile (**Chikhouné, 2014**). L'effet inhibiteur de l'eucalyptol a été déjà signalé dans des études antérieures par **Jaroslav et al. (2010)**. Dans ce sens, une étude publiée par **Akin et al. (2010)** a montré que l'eucalyptol (1,8-cinéol) composé majeur de l'HE de *M. communis* est peut être responsable de l'activité antimicrobienne de l'huile étudiée. Des travaux similaires sur l'HE du myrte commun poussant en Iran ont rapporté qu'elle présente un fort pouvoir antibactérien contre les bactéries Gram positif (**Pirbalouti et al., 2010**). En plus, une autre étude sur la même huile a montré que cette dernière possède une activité antibactérienne relativement élevée contre la plupart des microorganismes testés (**Amensour et al., 2010**). D'autres propriétés de l'HE du myrte ont été ciblées sur un autre type de cellules. Les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques de l'huile essentielle du *Myrtus communis* ont été validées «*in vivo*», l'injection sous cutanée de l'huile essentielle de *M. communis* d'Egypte (1,8-cinéole: 27,2%) à une dose de 0,1 ml/kg a montré une bonne inhibition de la formation d'œdème chez les souris, par rapport à l'indométacine utilisé comme contrôle (**Nassar et al., 2010**). La cytotoxicité de *Myrtus communis* et son potentiel pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses a été démontrée. Il a montré un effet antiprolifératif et inhibiteur de la migration des cellules cancéreuses (**Hans et al., 2015**).

L'activité spermicide aussi a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs et des travaux ont été réalisés sur plusieurs HE, la majorité de ces travaux sont portés sur l'huile essentielle du neem (*Azadirachta indica*). Une étude faite sur cette dernière par **Khillare** et son collaborateur (**2011**) a démontré la forte activité spermicide de celle-ci en causant l'immobilisation totale des spermatozoïdes à la dose de 3 µg/ml après 20s. Et une autre étude plus récente sur l'HE du thym (*Thymus munbyanus*) et le thymol; son composé majoritaire (52%); a révélé que l'effet spermicide de cette huile commence à apparaître à la dose de 200 µg/ml et l'arrêt quasi-total de la mobilité est observé à partir de 780 µg/ml. Cependant, pour un effet inhibiteur similaire à celui de l'HE du thym, il fallait une dose de 223µg/ml du thymol (**Chikhouné et al., 2015**). De ce fait la forte activité spermicide de l'HE du thym peut être expliquée par sa richesse en thymol.

Divers auteurs ont rapportés que les extraits éthanoliques possèdent des activités biologiques plus fortes que les HE (**Touaibia et al., 2014 ; Al-Anbori et al., 2008**). Dans ce

sens, l'effet des extraits des feuilles de mahwa (*Madhuca indica*) sur des rats mâles a été étudié. L'extrait a réduit la fertilité à 0% après 20 jours d'administration d'une dose de 200mg/kg (**Shivabasavaiah et al., 2011**). Et une autre étude réalisée par **Paul et Kang (2011)** sur l'HE extraite des fruits de l'Ajowan (*Trachyspermum ammi*), a révélé que l'huile testée induisait en plus des dommages de la membrane cytoplasmique, des dommages considérables de l'ADN.

Toutes ces études parlent de la forte activité spermicide de ces HE obtenue avec des concentrations plus faibles que celles utilisées dans cette étude, cela nous mène à conclure que l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* et celle de *Myrtus communis* ont une faible activité spermicide.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif majeur de ce travail est la valorisation des plantes utilisées en médecine traditionnelle en Algérie. Nous avons pour cela sélectionné deux plantes aromatiques médicinales utilisées par les populations dans le traitement de divers pathologies : *Tetraclinis articulata* et *Myrtus communis*. Nos efforts ont porté sur leur valorisation par le biais de la mise en évidence de leurs propriétés spermicides en évaluant *in vitro* leur impact sur la vitalité et la mobilité du sperme humain.

Les huiles essentielles issues des feuilles des plantes étudiées, ont été extraites à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger modifié. Le rendement en huiles des feuilles de *T. articulata* de la région de Hammam Mélouane et des feuilles de *M. communis* L. de la région de Tifra, est de 0,40% et 0,30% respectivement.

Dans l'évaluation de l'activité spermicide de ces HE sur les spermatozoïdes humains, les résultats nous ont permis d'observer une baisse proportionnelle de la motilité par rapport aux doses utilisées d'HE de *T. articulata* et *M. communis* et également une diminution significative de la viabilité des spermatozoïdes à partir de la concentration de 1mg/ml avec les deux HE étudiées. Ceci est vérifié aussi bien par la vitesse moyenne de trajet (VAP) que par la fréquence des classes de spermatozoïdes mobiles et lents. Ces résultats peuvent être considérés comme objectifs car obtenus par l'utilisation de l'analyse assistée par ordinateur reconnue aujourd'hui comme méthode fiable.

En perspectives, il serait intéressant d'explorer de nouvelles avenues notamment :

- ✓ L'étude de l'effet des extraits de ces plantes sur la vitalité et la mobilité du sperme humain.
- ✓ L'étude de l'action individuelle et en association des composés chimiques de ces HE sur divers activités biologiques en particulier l'effet spermicide.
- ✓ L'étude de la cytotoxicité des huiles testées de même leurs tolérances biologiques. Ces molécules pourront servir de base à la production de médicaments traditionnels améliorés qui serviront de base au développement de nouveaux contraceptifs.
- ✓ Une évaluation plus profonde de la qualité des gamètes en utilisant les tests hypo-osmotique (HOS), qui évalue la fonctionnalité membranaire et la microscopie électronique pour mieux caractériser les altérations ultra-structurales.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A.

Abi-ayad F Z., 2009. Analyse de l'huile essentielle du thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de magister, Univ de Tlemcen, 112.

Adeiza A., Abubakar. et Minka N S., 2011. Effects of methanol extract of *Ximenia americana* on sexual behaviour, testicular weight, sperm count and sperm morphology of wister rats. Annals of Biological Research, 2, 107-113.

Afnor, 2000. Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, paris.

Akin M., Aktumsek A. et Nostro A., 2010. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis dehn.* and *Myrtus communis* l. growing in northern Cyprus. African Journal of Biotechnology, 9, pp. 531-535.

Amensour M., Bouhdid S., Fernández-López J., Idaomar M., Skali Senhaji N. et Abrini J., 2010. Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Properties, 13:1215–1224.

Androutsos G., 2004. Autouvan Leenwenkoek (1632- 1723) et la première description du spermatozoïde. Andrologie, 14 n03, 336-342.

Agarwal A. et Said T M., 2011. Interpretation of basic semen analysis and advanced semen testing. The Toronto Institute for Reproductive Medicine, 15-22.

B.

Bansal P., Bansal R. et Gupta V., 2010. Antifertility effects of *Azadirachta Indica* (Neem). Annals of Biological Research, 1 (2) :108-113.

Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J-M., Chiaramonti N. et Costa J., 2010. Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from corsican *Myrtus communis* berries. Food Chemistry, 122, 1304-1312.

Benjelloun M., Rais C., Wahid N., El Ghadraoui L. et Alaoui Mhamdi M., 2013.

Evaluation de la tolérance de *Myrtus communis* L. au stress hydrique au stade germinatif. Bulletin De l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences De La Vie, 35, 19-26.

Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle, France, 289p.

Boitrelle F., 2014. Liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain. Thèse de doctorat, Université de Versailles, France, 148p.

Bouaziz A., 2015. Screening of the antioxidant and hypotensive activities of some medicinal plants in relation to their polyphenolic contents. Thèse de doctorat, Université de Sétif, 226p.

Boudjelal A., Henchiri C., Sari M., Sarri D., Hendel N., Benkhaled A. et Giuseppe R., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'sila (north Algeria): an ethnopharmacology survey. Journal of Ethnopharmacology, 148, 395-402.

Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B. et Farah A., 2007. Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146, 75-84.

Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bouachrine M., Farah A., Satrani B., Ouhssine M., Chaouch A. et Costa J., 2012. Fractionnement et valorisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc. Phytothérapie, 10, 222-228.

Bouzabata A., Boussaha F., Casanova J. et Tomi F., 2010. Composition and chemical variability of leaf oil of *Myrtus communis* from north-eastern Algeria. Nat Prod Commun, 5, 659-662.

Bouzabata A., Castola V., Bighelli A., Abed L., Casanova J. et Tomi F., 2013. Chemical variability of algerian *Myrtus communis* L. Chemistry & Biodiversity, 10, 129-137.

Brada M., Tabti N., Boutoumi H., Wathelet J.P. et Lognay G., 2012.

Composition of the essential oil of leaves and berries of algerian myrtle (*Myrtus communis* L.). Journal of Essential Oil Research, 24, 1-3.

C.

Cabannes C R., 2008. Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, 107p.

Chaouche M., 2010. Recherche et détermination structurale des composés flavoniques de l'espèce: *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). Mémoire de Magister, Université de Constantine, 116p.

Cherrat L., Espina L., Bakkali M., García-Gonzalo D., Pagán R. et Laglaoui A., 2013. Chemical composition and antioxidant properties of *laurus nobilis* L. and *myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Science of Food and Agriculture*, Vol 94, 6, 1197–1204.

Chikhoun A., Hazzit M., Kerbouche L., Baaliouamer A. et Aissat K., 2013. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, 25 :4, 300-307.

Chikhoun A., 2014. Composition chimique et activités biologiques des huiles essentielles et extraits éthanoliques de *Thymus munbyanus* Boiss. & Reut., *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters et *Myrtus communis* L. poussant en Algérie. Thèse Doctorat, Univ De Bejaia, 199p.

Chikhoun A., Stouvenel L., Iguer-Ouada M., Hazzit M., Schmitt A., Lorès P., Wolf J P., Aissat K., Auger J., Vaiman D. et Touré A., 2015. *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reproductive Biomedicine Online*, 31, 411–420.

D.

Dalia K A A., Marwan S M N. et Athraa M W., 2008. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Myrtus communis* L. leaves against salivary mutans streptococci. *Saudi Dental Journal*, Vol 20, No. 2, 83-87.

Delgado N M., Taboada R J., Ortega H A., Merchant-Larios H., Sánchez-Vázquez ML., Ramírez G. et Reyes R., 1999. Effects of a purified fraction from *Echeveria gibbiflora* aqueous crude extract on guinea-pig spermatozoa. *Phytother Res*, 13, 46-49.

Djenane D., Yangüela J., Amrouche T., Boubrit S., Boussad N. et Roncalés P., 2011. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci Technol Int.* 6, 505-515.

E.

EL Mouridi M., 2011. Caractérisation mécanique de la loupe de thuya (*tetraclinis articulata* (vahl) masters) en vue de sa valorisation. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 119.

F.

Farnsworth NR. et Waller DP., 1982. Current status of plant products reported to inhibit sperm. Res. Front Fert. Reg 2: 1-16.

Faye M., 2010. Nouveau procédé de fractionnement de la graine de neem (*Azadirachta indica* a.jussi) senegalais: production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France, 267p.

Festy D., 2015. Mon abécédaire illustré des huiles essentielles. Leduc.S Editions, Paris. 240p.

Figueredo G., 2007. Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université de Clermont-Ferrand, France, 417p.

Franceschini P., 2016. *Myrtus communis* L. en Corse et en méditerranée : de sa composition chimique jusqu'à ses utilisations thérapeutiques. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 2, France, 142p.

G.

Grizard G. et Jimenez C., 1997. Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. Progrès En Urologie, 7, 496-504.

Gupta R S. et Sharma R., 2006. A review on medicinal plants exhibiting antifertility activity in males. Natural Product Radiance, Vol 5(5), 389-410.

H.

Hadjadj k. et Letreuch B A., 2015. Influence des facteurs du milieu sur la productivité du thuya de Berbérie dans l'ouest algérien. Geo-Eco-Trop, 39, 317-328.

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

Hamamah S., Saliba E., Anahory T., Benahmed M. et Gold F., 2004. Médecine et biologie de la reproduction: des gamètes à la conception. Edi. Masson. 386 P.

Hans M., Charpentier M., Huch V., Jauch J., Bruhn T., Bringmann G. et Quandt D., 2015. Stereoisomeric composition of natural *Myrtus commulone* A. J. Nat. Prod. 78, 2381-2389.

Hedjal-Chebheb M., 2014. Identification des principes actifs des huiles essentielles de quelques résineux et plantes aromatiques de provenance algérienne et tunisienne : étude de leurs activités biologiques à l'égard d'un insecte ravageur des graines stockées, *Callosobruchus maculatus*. F 1775 (Coleoptera: bruchidae). Thèse de Doctorat, Université de Tizi Ouzou, 103p.

Heeshma C., Shah., Pratima T. et Kamalinder K S., 2008. Spermicidal agents. *Drug Discov Ther*, 2, 200-210.

Herzi N., 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au co₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de Doctorat, INP de Toulouse, France, 193p.

Herzi N., Bouajila J., Camy S., Romdhane M. et Condoret J.S., 2013. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 141, 3537–3545.

J.

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

Jouannet P. et Serres C., 1995. Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. *Médecine/Sciences*, 11, 555-562.

Jumeau F., 2013. Caractérisation du protéome du spermatozoïde humain. Thèse de Doctorat, Université de Lille 2, France, 250p.

K.

Kerbouche L., 2010. Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de labiacées et cupressacées. Mémoire de Magister, ENSA EL Harrach, 183p.

Khillare B. et Shrivastav TG., 2003. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. *Contraception*, 68, 225-229.

Konate H., 2009. Etude de la morphologie des spermatozoïdes au cours d'un bilan d'infertilité masculine au service de cytogénétique et de biologie de la reproduction à l'INRSP de Bamako-Coura. Thèse de Doctorat, Université de Bamako, Mali, 124p.

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

L.

Lakhdar L., 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro*. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 183p.

Le Coz S., 2014. Traitements actuels de l'infertilité en vue d'une procréation médicalement assistée. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France, 145p.

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

Lohiya NK., Kothari LK., Manivannan B., Mishra PK. et Pathak N., 2000. Human sperm immobilization effect of *Carica papaya* seed extracts: an *in vitro* study. *Asian J Androl*, 2, 103-109.

M.

Messaoud C., Zaouali Y., Ben Salah A., Khoudja M L. et Boussaid M., 2005. *Myrtus communis* in Tunisia: variability of the essential oil composition in natural populations. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 577–582.

N.

Nassar M., Aboutabl E.S., Ahmed R., El-Khrisy E.-D., Ibrahim K. et Sleem A., 2010. Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Research*, 2, 325.

O.

Ogbuewu I P., Unamba-Oparah I C., Odoemenam V U., Etuk I F. et Okoli I C., 2011. The potentiality of medicinal plants as the source of new contraceptive principles in males. *North American Journal of Medical Sciences*, 6, 255-263.

Ouis N., 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de Doctorat, Université d'Oran, 239p.

P.

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

Pierron C., 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 257p.

Pirbalouti A G., Jahanbazi P., Enteshari S., Maleekpoor F. et Hamedi B., 2010. Antimicrobial activity of some iranian medicinal plants. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 62, 633-642.

Primorac M., Sekulovic D. et Antonic S., 1985. *In vitro* determination of the spermicidal activity of plant Saponins. *Pharmazie*, 40, 585.

R.

Roulet-Coudrier B F., 2013. Impact de la morphologie des spermatozoïdes, analysée par une méthode semi-automatisée, sur les résultats de fécondation *in vitro* classique et d'insémination intra-utérine, Université de Limoges, France, 124p.

S.

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

Sharma S.K., Sairam M., Llavazhagan G., Devendra K., Shivaji S.S. et Selvamurthy W., 1996. Mechanism of action of nim-76: a novel vaginal contraceptive from neem oil. *Contraception*, 54, 373-378.

Shivabasavaiah., Krishna Ram H., Pavana T., Ramyashree M., Ramya M.C. et Manjunath R., 2011. Antifertility effects of madhuca indica leaves in male swiss albino rats. *Journal of Pharmacy Research*, 4, 323-326.

Sutour S., 2011. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France, 222p.

T.

Tékaya-Karoui A., Jannet H.B. et Mighri Z., 2007. Essential oil composition of terminal branches, cones and. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10, 2495-2499.

Toparslan C., 2012. À Propos De *Nigella sativa L.* Thèse de Doctorat, Université de lorraine, France, 136p.

Touaibia M. et Chaouch F Z., 2014. Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* l. obtenus *in situ* et *in vitro*. Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 10, 03-08.

Trevor G. C., (2010). Semen Analysis. Asian J Androl, 12, 118-123.

V.

Velé H., 2015. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments. Thèse de Doctorat, Université d'Angers, France, 255p.

Z.

Zenasni L., 2014. Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* coss et *d'Origanum compactum* benth et du genre nepeta et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 169p.

Zorn J-R., Savale M. et Canon-Yannotti M., 2005. Stérilité de couple. Editions Professionnelles du Livre, 54-57.

Chapitre I : Sperme Humain

Chapitre II : Huiles Essentielles

Chapitre III : Monographie des espèces étudiées

Chapitre IV : Interaction substances actives-spermatozoïdes

Partie Expérimentale

Résumé

L'objectif du présent travail est d'étudier l'effet spermicide des huiles essentielles du thuya de Berbérie et du myrte commun sur la vitalité et les paramètres de la mobilité du sperme humain. Dans cette étude, les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* et *Myrtus communis* ont été extraites par hydrodistillation et leur effet sur les spermatozoïdes humains *in vitro* a été analysé. Des échantillons de sperme ont été mélangés avec différentes concentrations d'huile essentielle, la vitalité et les paramètres de mobilité ont été mesurés par ordinateur (Computer Assisted Semen Analysis) à différent temps de contact. Un effet spermicide de ces HE a été constaté avec une baisse proportionnelle de la motilité et une diminution significative de la viabilité des spermatozoïdes à partir de la concentration de 1mg/ml.

Mots clés : Sperme, huile essentielle, *Tetraclinis articulata*, *Myrtus communis*, effet spermicide.

Abstract

The aim of this work is to study the spermicidal effect of essential oils of white cedar and common myrtle on the vitality and parameters of human sperm mobility. In this study, essential oils of *Tetraclinis articulata* and *Myrtus communis* were extracted by hydrodistillation and their effect on human spermatozoa *in vitro* was analyzed. Sperm samples were mixed with different concentrations of essential oil, vitality and mobility parameters were measured by Computer Assisted Semen Analysis at different contact times. A spermicidal effect of these OE was observed with a proportional decrease in motility and a significant decrease in the viability of the spermatozoa from the concentration of 1 mg / ml.

Keywords: Sperm, essential oil, *Tetraclinis articulata*, *Myrtus communis*, spermicidal effect.