

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

Intérêt des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* dans la qualité de la semence chez le lapin.

Soutenu le 01 /10/2020

Présenté par : M^{lle} DJEGHBOUB Meriem

Devant le Jury :

Mr. KHELEF D.	PR	U. Blida 1	Président
M ^{me} MIMOUNE N.	MCA	U. Blida 1	Examinatrice
Mr. KAIDI R.	PR	U. Blida 1	Promoteur
Mr. KALEM A.	MCB	U. Blida 1	Co-promoteur

Remerciements

Avant toute chose je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m' avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Puis je tiens tout particulièrement à adresser mes plus vifs remerciements, à mon promoteur, Monsieur Kaidi Rachid (professeur à l'institut vétérinaire de Saad dahleb Blida) d'avoir accepté de m' encadrer et de m' avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de mon travail, tout en y gardant un œil critique et avisé.

J'exprime mes respectueux remerciement à Monsieur KHELEF D. d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Madame MIMOUNE N. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également mon co-promoteur Monsieur KALEM A..

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à...

Ma chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Que Dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

Mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin.

Que Dieu te donne longue vie et te protège.

Mon très cher frère Hicham : il représente pour moi le symbole de courage, et la source de tendresse.

Ma chère sœur Souad qui ma soutenue durant toutes mes années d'étude.

Ma chère petite sœur à qui je souhaite de réussir dans la vie.

A la mémoire de mon PAPI (mon grand père) Ali qui m'a toujours tenu la main et qui ne m'a

jamais lâché de son existence.

Que Dieu, tout puissant, te garde dans son vaste paradis.

Mes collègues

Mes chères amis.

Résumé

Chez le lapin le stress oxydatif pendant le stockage de la semence à 4°C est un problème majeur, pour améliorer la qualité du sperme réfrigéré pendant le stockage, de nombreux antioxydants synthétiques ont été examinés, mais différents résultats ont été étudiés en fonction des propriétés antioxydantes.

L'intérêt croissant pour les huiles essentielles découle de leurs capacités biologiques qui comprennent des effets antibactériens et antioxydants. Ces propriétés peuvent être extrêmement utiles dans le domaine reproductif.

Le romarin est largement utilisé pour son activité antioxydante, et ses propriétés antimicrobiennes.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les effets protecteurs de l'huile essentielle (HE) de *Rosmarinus officinalis* lors de la conservation du sperme de lapin à 4°C.

On a pu avoir un seul prélèvement de sperme, puis on a réalisé une dilution utilisant la solution de GALOPE (1160 µl de Galope + 40 µl de la semence) à partir de cette dilution nous avons effectué la première analyse considérée comme témoin.

le mouvement des SPZ est estimé directement après la collecte. La semence récoltée ont une bonne motilité massale et le sperme est de bonne qualité. Il présente 84% de SPZ mobiles puis on a pris 1 ml de la dilution préparée sur laquelle nous avons ajouté 10 µl de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. puis on a effectué la deuxième analyse pour tester l'effet de cette concentration sur les spermatozoïdes. La première analyse a été effectuée à T0 a montré une mortalité totale des spermatozoïdes ce qui prouve que l'huile essentielle avait un effet spermicide à une concentration de 10 µl.

Mot clés : Huiles essentielles, Sperme, milieu de conservation, antioxydant.

Abstract

In rabbits, oxidative stress during semen storage at 4C ° is a major problem, to improve the quality of refrigerated semen during storage, many synthetic antioxidants have been examined, but different results have been studied depending on the antioxidant properties.

The growing interest in essential oils stems from their biological abilities which include antibacterial and antioxidant effects. These properties can be extremely useful in the reproductive field.

Rosemary is widely used for its antioxidant activity and its antimicrobial properties.

The objective of this study is to assess the protective effects of essential oil (Eo) of *Rosmarinus officinalis* when storing rabbit semen at 4 ° C.

We were able to have a single sperm sample, then a dilution was carried out using the GALOPE solution (1160 µl of Galope + 40 µl of the semen) from this dilution we carried out the first analysis considered as a control.

SPZ movement is estimated directly after collection. The collected semen has good mass motility and the semen is of good quality. It has 84% mobile SPZ and then we took 1 ml of the prepared dilution to which we added 10 µl of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. Then we performed the second analysis to test the effect of this concentration on the sperm. The first analysis, carried out at T0, showed total sperm mortality, which proves that the essential oil had a spermicidal effect at a concentration of 10 µl.

Keywords: Essential oils, Sperm, preservation medium, antioxidant.

ملخص

في الأرناب ، يعتبر الإجهاد التأكسدي أثناء تخزين السائل المنوي عند 4 درجات مئوية مشكلة كبيرة ، لتحسين جودة السائل المنوي المبرد أثناء التخزين ، تم فحص العديد من مضادات الأكسدة الاصطناعية ، ولكن تمت دراسة نتائج مختلفة اعتمادًا على خصائص مضادات الأكسدة .

ينبع الاهتمام المتزايد بالزيوت الأساسية من قدراتها البيولوجية التي تشمل التأثيرات المضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة. يمكن أن تكون هذه الخصائص مفيدة للغاية في مجال التكاثر .

يستخدم إكليل الجبل على نطاق واسع في نشاطه المضاد للأكسدة وخصائصه المضادة للميكروبات.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الآثار الوقائية للزيت العطري (ET) لـ *Rosmarinus officinalis* عند تخزين السائل المنوي للأرناب عند 4 درجات مئوية.

تمكنا من الحصول على عينة واحدة من الحيوانات المنوية ، ثم تم إجراء التخفيف باستخدام محلول GALOPE (1160 ميكرو لتر من Galope + 40 ميكرو لتر من السائل المنوي) من هذا التخفيف أجرينا التحليل الأول الذي تم اعتباره كعنصر تحكم.

تقدر حركة SPZ مباشرة بعد التجميع. يتمتع السائل المنوي بحركة جماعية جيدة والسائل المنوي ذو نوعية جيدة. يحتوي على 84 ٪ من SPZ المحمول ، ثم أخذنا 1 مل من التخفيف المحضر الذي أضفنا إليه 10 ميكرو لتر من الزيت العطري لـ *Rosmarinus officinalis*. ثم تم إجراء التحليل الثاني لاختبار تأثير هذا التركيز على الحيوانات المنوية. أظهر التحليل الأول ، الذي تم إجراؤه في T0 ، معدل الوفيات الكلي للحيوانات المنوية ، مما يثبت أن الزيت العطري له تأثير قاتل للنطاف بتركيز 10 ميكرو لتر.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية ، الحيوانات المنوية ، وسط الحفظ ، مضادات الأكسدة.

Liste des figures

	Page
Figure 1: Appareil reproducteur du lapin mâle	2
Figure 2 : Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins.....	3
Figure 3 : Testicule et épидидyme du lapin adulte	4
Figure 4: Portion libre de l'urètre : pénis du lapin	5
Figure 5: Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant	16
Figure 6 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	19
Figure 7: systématique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	27
Figure 8 : HE utilisée.....	34
Figure 9 : Micropipette	40
Figure 10 : vortex (agitateur).....	40
Figure 11 : Bain marie	41
Figure 12 : Schématisation des différents paramètres de mobilité du spermatozoïde	42
Figure 13 : préparation des vagins artificiels et les tubes de collecte.....	42
Figure 14 : récolte de la semence	43
Figure 15 : Evolution de la motilité à T0 pour le témoin et l'huile essentielle	46
Figure 16 : de la VCL ,VAP et VSL des spermatozoïdes du témoin et de L'hules essentielle	47

Liste des tableaux

	Page
Tableau I : La composition chimique du sperme chez le lapin.....	8
Tableau II : Détermination de la note de motilité massale du sperme.....	13
Tableau III : les composants et les propriétés adéquates du tris buffer utilisé pour le lapin...	36
Tableau IV : . les composantes de tris buffer	36
Tableau V : définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyser, CASA).....	39
Tableau VI : résultat de la motilité individuelle	45
Tableau VII : résultat des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyser, CASA).	46

Liste des abréviations

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis.

IA : Insémination Artificielle

SPZ : Spermatozoïde

HE : Huile Essentielle

LBRA : laboratoire de biotechnologie et de la reproduction animale

CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance

Ir : indice de rétention

SM : spectrométrie de masse

CPG : chromatographie en phase gaz

RMN : résonance magnétique nucléaire

µl : Microlitre

T : Temps

Tris : Tri-hydroxy-méthyl-aminométhane

VSL : Velocity Straight Line

VCL : Velocity Curvilinear Path

VAP : Velocity Average Path.

LN : Linearity

STR : Staightness

R.officinalis : *Rosmarinus officinalis*

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

Sommaire

	Page
Introduction.....	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : la reproduction chez le lapin.....	2
I-1- Anatomie de l'appareil génital mâle du lapin.....	2
I-1-1- Testicules.....	3
I-1-2-Portion tubulaire.....	3
I-1-2-1- Epididyme.....	4
I-1-2-2- Conduit déférent.....	4
I-1-2-3- Urètre.....	4
I-1-3-Portion copulatrice.....	5
I-1-3-1- Pénis.....	5
I-1-4- Glandes annexes.....	5
I-1-4-1-La vésicule séminale.....	5
I-1-4-2-La prostate.....	5
I-1-4-3- Les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper.....	6
I-1-4-4- Les Glandes inguinales.....	6
I-2- Composition du sperme du lapin.....	6
I-3- Spermatogenèse et production des spermatozoïdes.....	6
I-4 - Caractères influençant sur le sperme du lapin.....	7
I-5-Caractéristiques physico-chimique du sperme de lapin adulte.....	8
I-5-1- La photopériode.....	8
I-5-2- Le protocole d'alimentation.....	9
I-5-3-L'Age.....	9
I-5-4- La température.....	10
I-5-5- L'état de santé.....	10
I-5-6- La fréquence de collecte.....	10
I-5-7- Le comportement.....	10
I-6- La Collecte du sperme	11
I-6-1- Le vagin artificiel (VA).....	11
I-6-2-Technique de récolte.....	11

Chapitre II : La cryoconservation

II-1-Les étapes.....	12
II-1-1- La collecte du sperme	12
II-1-2- Analyse de la qualité du sperme récolté	12
II-1-2-1-L'examen macroscopique	12
II-1-2-2- L'examen microscopique.....	12
II-1-3- La conservation du sperme	13
II-1-3-1- La dilution.....	13
II-1-3-2- La conservation à court terme 4°C.....	14
II-1-3-3- La conservation à long terme	14
II-2- Amélioration des milieux de conservation	14
II-2-1- Le stress oxydatif.....	14
II-2-2- Origine du stress oxydatif	15
II-2-2-1- Les radicaux libres	15
II-2-2-2- Sources de production des radicaux libre	15
II-2-2-3- Les différentes cibles des espèces réactives (ER)	15
II-2-3- Système de défense antioxydante	15

Chapitre III : Les huiles essentielles

III-1-Définition	17
III-2-Répartition et localisation des huiles essentielles.....	17
III-3-Caractéristique physique.....	17
III-4-Composition chimique.....	17
III-5-Méthodes d'extraction.....	18
III-5-1- Distillation et entrainement à la vapeur.....	18
III-5-2- Hydrodistillation.....	19
III-5-3- Extraction par solvants volatils.....	19
III-5-4- Extraction par enfleurage.....	20
III-6-Méthodes d'analyse.....	20
III-6-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	20
III-6-2- Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)	21

III-6-3- Acquisition et traitement des données	21
III-7-Domains d'utilisation des huiles essentielles.....	22
III-7-1- En pharmacie.....	22
III-7-2- En cosmétologie.....	23
III-7-3- En industries agroalimentaires.....	23
III-7-4- En agriculture.....	23
III-8-Conservation des huiles essentielles.....	23
III-9-Toxicité et précautions d'emploi des huiles essentielles.....	23
III-10-L'encapsulation des HE (solubilisation)	24
III-11- Les cyclodextrines.....	25
Chapitre IV : L'huile essentielle du Romarin	
IV-1-Description.....	26
IV-2- Répartition géographique.....	26
IV-3-Variétés et espèces.....	26
IV-4-L'huile essentielle du Romarin	28
IV-4-1-Composition chimique.....	28
IV-4-2- Composition phénolique.....	28
IV-4-3- Utilisation.....	28
IV-4-4-Les différentes activités biologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
IV-5-Interaction substances actives-spermatozoïdes.....	30
IV-5-1- Effets des huiles essentielles	30
IV-5-1-1- Effets protecteurs.....	30
IV-5-1-2-Effets spermicides.....	31
IV-5-2- Effets des extraits phénoliques	31
IV-5-2-1- Effets protecteurs.....	31
IV-5-2-2- Effets spermicides.....	31

Partie pratique	
I-Matériel et méthodes	33
I-1- Matériel	33
I-1-1-Matériel biologique	33
I-1-2- Matériel non biologique	34
II-Méthodes	35
II-1-Préparation du complexe CD-HE	35
II-2-Préparation des milieux de conservation	35
II-2-1-Protocole de préparation du dilueur	35
II-2-2-Protocole de préparation des traitements de conservation	37
II-3- Processus de la collecte du sperme	37
II-4- Protocole expérimental	37
II-5-L'analyse du sperme collecté :	38
II-5-1- Analyse macroscopique :	38
II-5-2- Analyse microscopique	38
II-6- Analyse de la mobilité :	38
II-6-1- Analyse assistée par ordinateur (C.A.S.A)	38
II-7-Méthode d'analyse	39
I-1-8- Matériel de laboratoire	40
I-2-9- Méthodes	42
I-2-10- La récolte de la semence	42
I-2-11- Préparation des solutions	43
I-2-12- Analyse microscopique	44

I-2-13- Motilité massale	44
II-Résultats et discussion.....	45
II-1-Résultats	45
II-1-1 Examen macroscopique.....	45
II-1-2- Examen microscopique.....	45
II-1-3-Résultats de l'effet de l'huile essentielle sur l e sperme collecté.....	46
II-2-discussion.....	47
Conclusion	52
Référence bibliographique	54

INTRODUCTION

Introduction

Chez n'importe quelle espèce animale la qualité ainsi que la quantité des spermatozoïdes est nécessaire à l'expression de leur fonction de fécondation de l'ovocyte.

Des dysfonctionnements d'origine interne ou dépendants de facteurs externes peuvent perturber la mobilité des spermatozoïdes et donc être responsables d'infertilité (**Pierre et Serres., 1995**).

La biotechnologie de la reproduction a connu un progrès important et rapide ces dernières décennies. Elle inclue des techniques comme l'insémination artificielle, la cryoconservation et autres.

Ces biotechnologies permettent dans certains cas de valoriser et d'amplifier le progrès génétique des reproducteurs les plus demandés (**Mocé et Vicente., 2009**), ainsi que la préservation de la biodiversité. Dans ce sens, le transport de la semence sur de longues distances ou pour de longues durées nécessite des techniques de conservation performantes (**Decuadro-Hansen., 2004**) que se soit pour la conservation à l'état frais ou congelé. Après conservation, le sperme connaît cependant une faible fertilité par rapport au sperme frais.

Des altérations membranaires sont observées après une conservation à 4C° , ce qui les rend plus vulnérables aux éléments toxiques, notamment le stress oxydatif, avec ainsi une perte de motilité spermatique (**Decuadro-Hansen., 2004**).

Pour limiter les dommages et garder la même qualité des SPZ après la conservation, une grande variété d'antioxydants a été utilisée dans les milieux de conservation du sperme et les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées comme alternative naturelle dans ce dernier .

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

Dans le présent travail, notre choix s'est porté sur le Romarin (*Rosmarinus officinalis*), qui est l'une des plantes les plus répandues en méditerranéen et particulièrement en Algérie.

Le but de ce travail , est d'évaluer l'effet des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation des SPZ de lapin à 4 C°.

Partie

Bibliographique

CHAPITRE I

La reproduction chez le lapin

I-1- Anatomie de l'appareil génital mâle du lapin

Chez le lapin, l'appareil génital est similaire à celui des autres rongeurs. Il comporte 3 Grandes portions qui sont: la portion glandulaire constituée par les testicules, la portion Tubulaire constituée par l'épididyme, le canal déférent, l'urètre et la portion copulatrice Constituée par le pénis (**Barone, 1976**). Mais aussi avec la présence des glandes annexes. La **figure N°1** montre l'appareil reproducteur mâle du lapin.

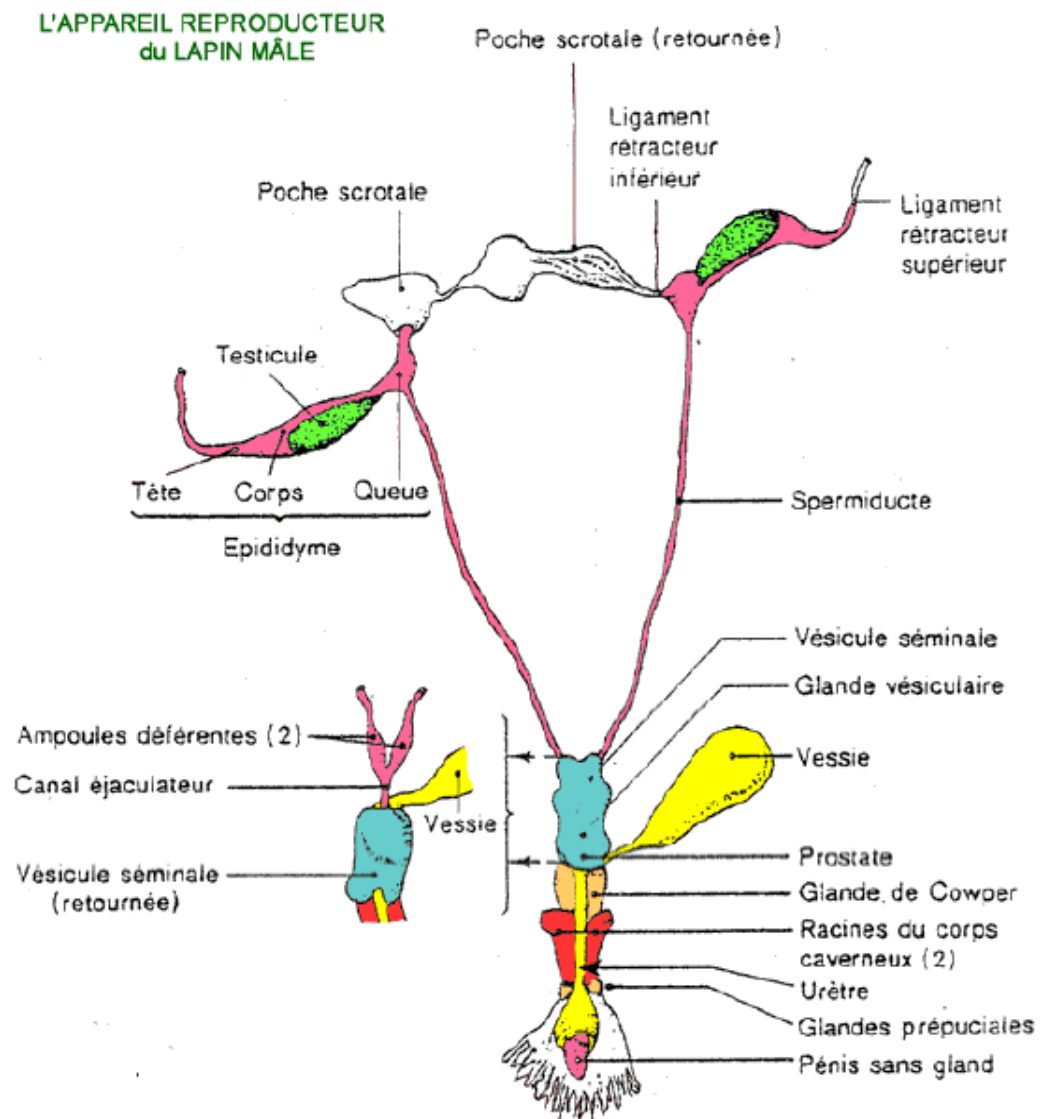


Figure N°1 : Appareil reproducteur du lapin mâle (Lebas, 1996)

I-1-1- Testicules

Ce sont des organes pairs, de forme ovale et allongé, amincis aux extrémités et sont légèrement comprimés. Le testicule a une longueur de 3 à 3,5 cm et une largeur de 1,5 cm pour un lapin de 4,5 kg et leur poids est de 1,5 à 2 g. Ils sont de couleur rosée et de consistance ferme et élastique et sont logés dans les enveloppes testiculaires (**Barone, 1984**). Comme la plupart des mammifères, le lapin a un petit diverticule de la cavité abdominale appelé le scrotum, c'est là où les testicules vont se loger après une migration de l'avant (position intra-abdominale) vers l'arrière (position extra-abdominale).

Cette position extra-abdominale conditionne la réussite de la spermatogenèse (**Van praag, 2002**). Le testicule est entouré d'une enveloppe à membrane fibreuse résistante, épaisse et blanchâtre appelée Albuginée. Celle-ci émet des cloisons qui divisent le tissu conjonctif sous-jacent en lobules. On peut compter dans un testicule 200 à 300 lobules spermatiques communicants. Dans chaque lobule, on a des tubes séminifères qui sont des conduits très flexueux comportant une partie contournée et une partie droite qui se raccorde au rete-testis et forme la partie initiale des voies d'excrétions des spermatozoïdes (**figure N°2**).

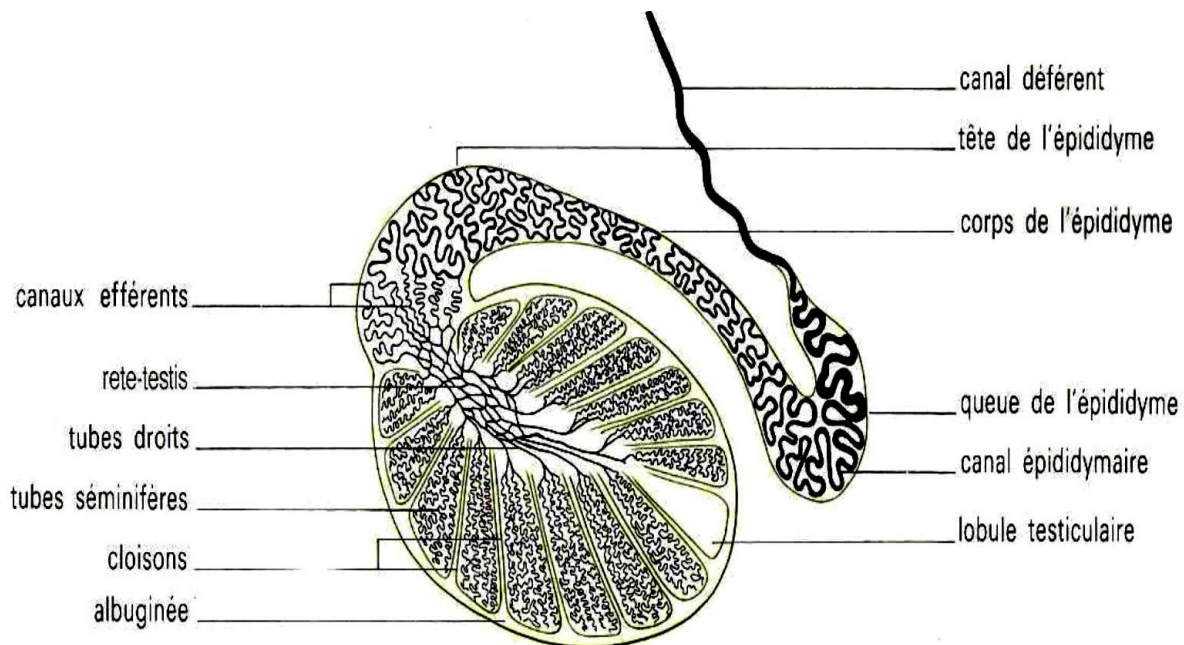


Figure N°2 : Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins (**Bonnes et al.,1988**)

I-1-2-Portion tubulaire

Cette portion est constituée par : l'épididyme, le conduit déférent et l'urètre.

I-1-2-1- Epididyme

C'est un canal extrêmement replié sur lui-même à l'intérieur d'une tunique conjonctive qui lui confère une forme globale allongée en croissant d'un pôle à l'autre du côté dorsal du testicule avec une longueur allant de : 1,5 à 3 cm, il comporte 3 parties (**figure N°3**):

- une tête volumineuse, qui coiffe largement l'extrémité capitée du testicule ;
- un corps représentant la portion moyenne. Il est épais chez le lapin ;
- une queue qui forme un appendice globuleux et mobile. (**Grasse, 1971 ; Barone, 1978**).

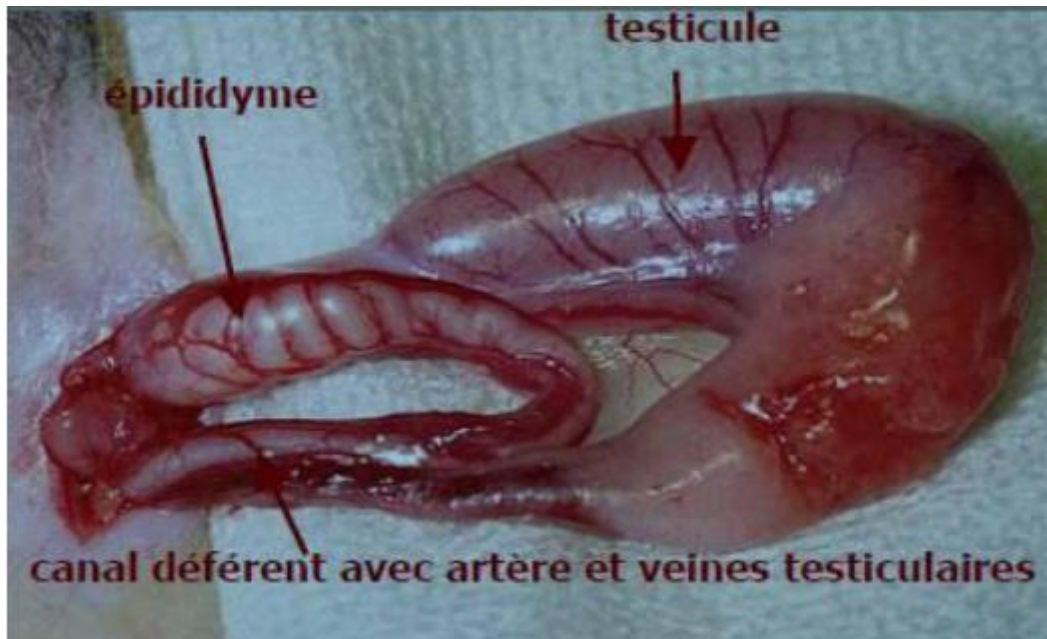


Figure N°3 : Testicule et épидидyme du lapin adulte (**Van praag, 2002**)

Les canaux du Rete-testis et les canaux efférents se prolongent dans le premier lobule de la tête de l'épididyme où ils se replient sur eux-mêmes. (**Bonnes et al., 1988 ; Abraham et Kierszenbaum, 2002 ; Welsch, 2002**) (**figure N°2**).

I-1-2-2- Conduit déférent

Long, de 12 à 15 cm, et relativement épais. Il s'étend de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre. Le conduit déférent, présente une ampoule assez nette, de 2 cm environ qui s'ouvre dans la partie caudale de la vésicule séminale par un orifice assez large et impair porté par le colliculus seminalis. C'est par l'intermédiaire de ce bref conduit que se fait la communication avec l'urètre (**Barone, 1978**).

I-1-2-3- Urètre

L'urètre au niveau de l'appareil génital, forme la partie extra-pelvienne qui constitue le pénis. Au niveau du deuxième segment de l'urètre, se trouvent deux masses musculaires ; les muscles ischio-caverneux ou muscles érecteurs du pénis. Un épais corps caverneux

l'entoure. L'urètre pénien va de la symphyse ischio-pubienne et se termine par l'ostium externe de l'urètre (**Barone, 1978**).

I-1-3-Portion copulatrice

I-1-3-1- Pénis

Le lapin est une espèce à pénis rétrofléchi. Il est logé dans le prépuce et ne sort que lors de l'accouplement. C'est un organe court, en forme de tube légèrement en pointe qui mesure environ 8 cm de long (**Roger, 2002**) (**figure N°4**).

Le pénis est suspendu par un ligament suspenseur, le ligament suspenseur du pénis est doublé par une paire de forts muscles subischio-caverneux qui n'existent chez aucune autre espèce domestique (**Barone, 1978**).

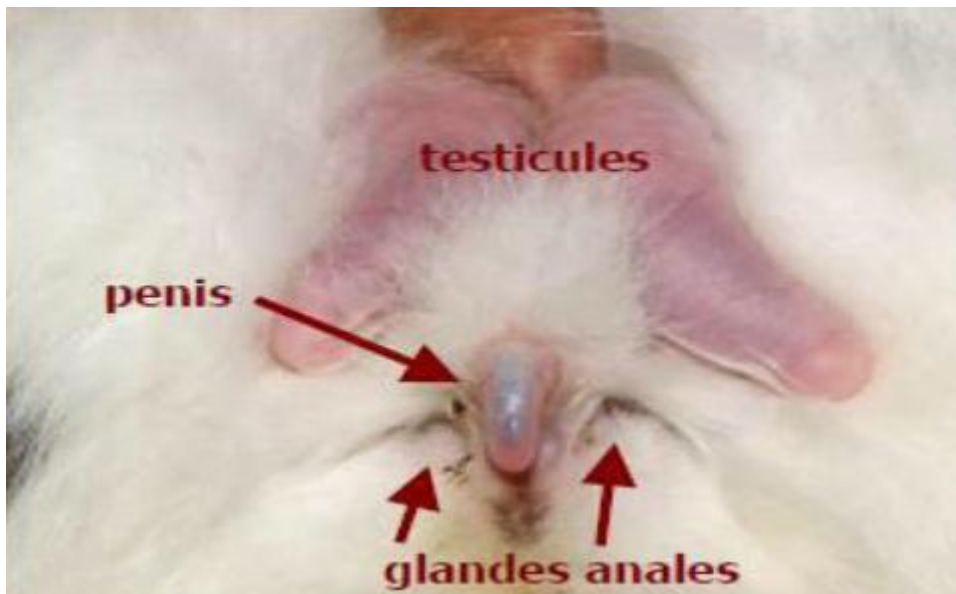


Figure N°4 : Portion libre de l'urètre : pénis du lapin (**Shinkichi et Akira, 2004**)

I-1-4- Glandes annexes

I-1-4-1-La vésicule séminale

Chez le lapin, la vésicule séminale est impaire mais bilobée à son extrémité, sa longueur est d'environ 2,5 cm avec un aspect ajouré (**Abraham et Kierszenbaum, 2002 ; Welsch, 2002**). Elles débouchent dans le conduit déférent (**Roger, 2002**).

Sa partie caudale fusionne avec les canaux déférents pour former un canal éjaculateur impair qui s'ouvre dorsalement dans l'urètre au niveau du colliculus seminalis. (**Barone, 1984**).

I-1-4-2-La prostate

Chez le lapin, elle est remplacée par un complexe de plusieurs glandes (**Lebas, 1996**), toutes développées à partir de diverticules de la paroi urétrale au voisinage du colliculus

seminal. Elle présente une partie diffuse disséminée dans la paroi de l'urètre et une partie conglomérée (**Roger, 2002**).

I-1-4-3- Les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper

Ce sont des formations sphériques paires, bilobées placée postérieurement à la prostate et dorsalement à l'urètre dans lequel elle s'ouvre par au moins 4 canaux (**Sabbagh, 1983**).

Chaque glande est entourée par un corpuscule conjonctif (**Roger, 2002**).

I-1-4-4- Les Glandes inguinales

Ces glandes ne se rencontrent que chez le lapin. Elles forment un groupe très important de glandes qui s'étalent sous la peau dans la région inguinale et sont bien développées (**Roger, 2002**).

I-2- Composition du sperme du lapin

Le sperme du lapin se compose de deux parties principales, une partie gélatineuse qui empêche la semence de s'écouler hors du vagin après éjaculation (**Mukherjee et al., 1951**).

Et une partie liquide composée d'un plasma séminal accompagné de spermatozoïdes.

Le plasma seminal a un rôle dans le transport des gamètes lors de l'éjaculation. Il est composé de glycoprotéines, fructose, sorbitol, acide citrique, acide gras, des ions (Na,K,Ca,Mg) et de l'inositol, mais il est très pauvre en glucose (**Boussit, 1989**).

Le sperme du lapin contient aussi des petites granules séminales (0,5 à 6 µm de diamètre) produit par la prostate, Il a été postulé que ces particules modulent le processus de capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes par la libération du cholestérol (**Castellini, 2008 et Davis, 1974**), la cinétique de sperme (**Stegmayr et Rönquist, 1982 ; Fabiani et al., 1995**) ainsi que le transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle.

I-3- Spermatogenèse et production des spermatozoïdes

La spermatogenèse est la production de spermatozoïdes matures haploïdes, à partir de cellules souches (spermatogonies) diploïdes au niveau des tubes séminifères des testicules. Elle se déroule en trois phases : la phase de multiplication, phase d'accroissement et la phase de maturation au niveau de l'épididyme (**Boussit, 1989**).

Il existe peu de données dans la littérature à propos de la spermatogenèse chez le lapin.

May et al., (1975) mentionnent un début d'activité de la spermatogenèse vers 63 jours d'âge.

Cependant, il faut attendre l'âge de 84 jours pour que tous les tubes séminifères soient concernés (**Leeson et al., 1970** cités par **Martinet, 1973**).

Pour certains auteurs français, la spermatogenèse commence plus précocement vers l'âge de 40 à 50 jours. Mais les premières divisions zoniales ne donneront des spermatozytes que vers 60 jours (**Martinet, 1973**).

Les premiers spermatozoïdes n'apparaissent dans la tête de l'épididyme qu'à 112 jours (**Leeson et Leeson, 1970**).

L'éjaculat contiendra des spermatozoïdes dès 120 jours au moins.

Ces données ont été confirmées en **1996** par **Lebas** et ses collaborateurs qui disent que la spermatogénèse commence entre 40 et 50 jours, les tubes testiculaires sont actifs vers 84 jours et les premiers spermatozoïdes sont présents dans l'éjaculat vers 110 jours.

La maturité sexuelle se définit comme le moment où la production quotidienne de sperme n'augmente plus.

La durée de la spermatogénèse est de 38 à 41 jours (**Martinet, 1973**).

I-4- Caractéristiques physico-chimique du sperme de lapin adulte

D'après **Orgebin-Crist (1968)** et **Cole et Cupps (1977)**.

- Volume éjaculé: 0,6 à 1 ml.

Concentration en spermatozoïdes : 10 à 1 000 x 10⁶ spermatozoïdes/ml de sperme

- Nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat 200 x 10⁶ spermatozoïdes

- Pourcentage de spermatozoïdes mobiles : 80 %

- Pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux 80 %.

- Nombre d'éjaculats possibles par semaine: 6.

- Nombre moyen de spermatozoïdes par testicule : 350 x 10⁶ spermatozoïdes.

- Production de spermatozoïdes par jour 170 x 10⁶ spermatozoïdes.

- Production de spermatozoïdes par gramme de testicule 24 x 10⁶ spermatozoïdes.

Après 20 ans environs, d'autres études **Lebas et al., (1996)** ont rapporté des données différentes. Ils ont noté que Le volume des éjaculats est de l'ordre de 0,3 à 1 ml et varie en fonction de la race, de l'état physiologique et de la fréquence de la collecte. Quant à la concentration est évaluée de 150 x 10⁶ à 500 x 10⁶ spermatozoïdes par millilitre, mais le volume et la concentration sont susceptibles de variations.

De fausses montes, une ou deux minutes avant le coït, augmentent la concentration des éjaculats. Si on pratique deux accouplements successifs, la première monte sert de préparation à la seconde, qui est caractérisée par un volume moindre et une concentration améliorée.

La composition chimique du sperme chez le lapin diffère d'une race à l'autre, le pH du plasma séminal varie entre 6,8 et 7,3 (**Francisco et Louis, 2003**), alors que la pression osmotique semble proche de 308 milliosmose (**Boussit, 1989**), le **tableau 1** regroupe les différentes substances et leurs concentrations :

Substance	Concentration dans le plasma séminal
Na	140-160 mg/100ml
K	70-85 mg/100ml
Ca	5-7 mg/100ml
Mg	22-31 mg/100ml
Substance	Concentration intracellulaire des spermatozoïdes
Fructose	40-400 mg/100ml
Glucose	traces parfois
Glycérylphosphorylcholine	280 mg/100ml
Inositol	30 mg/100ml
Acide citrique	110-550 mg/100ml
Sorbitol	80 mg/100ml
Acides gras libres	0,001 meq/100ml
Acides gras volatils	0,134 meq/100ml
Protéines totales	6 g/100ml
Catalase	27,5 mg/100ml

Tableau I : La composition chimique du sperme chez le lapin (**Boussit, 1989**)

I-5- Caractères influençant sur le sperme du lapin

La variabilité des caractéristiques du sperme chez les lapins mâles est généralement élevée (**Moce et al., 2005**) ; cependant, les caractères du sperme de certaines souches génétiques sont exposés à des protocoles stricts d'élevage qui ont montré une plus faible variabilité au sein des mâles (**Theau-Clément et al., 2003**) ce qui contribue à donner à ces facteurs une importance capitale en reproduction chez cette espèce animale. Ces facteurs sont :

I-5-1- La photopériode

On sait déjà que pour **Walter et al., (1968)**, il est possible de provoquer une diminution de la concentration du sperme en spermatozoïdes et une baisse du poids des testicules grâce à une photopériode de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. C'est ainsi que le volume des éjaculats et leur concentration en spermatozoïdes sont maximum en mars (**Frolich, 1948**) et minimum en juillet (**Brambell, 1944**). Ces variations s'accompagnent d'une réduction de la taille des testicules de mars à juillet, de l'ordre de 60% du poids maximum et d'un accroissement testiculaire dès août. Il s'en suit une "stérilité estivale" associée à une augmentation du pH du sperme, une baisse de la motilité des spermatozoïdes, une diminution de la concentration en spermatozoïdes, une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux et une baisse de la libido (**Hiroe et Tomizuka ,**

1965).

I-5-2- Le protocole d'alimentation

En ce qui concerne la quantité d'aliments qui doit être administrée aux lapins mâles, **Luzi et al., (1996)** ont montré qu'un protocole alimentaire restreint réduit la libido et quelques caractères séminaux. Cependant, le facteur le plus important n'est pas la quantité de nourriture fournie, mais ses caractéristiques chimiques.

Des recommandations spécifiques pour les lapins mâles ne sont pas disponibles et que certaines exigences spécifiques ont été établies (**De Blas et Wiseman , 1998**). Sauf que les régimes avec plus de 15% de protéines brutes sont recommandés pour assurer la production de sperme approprié.

Dans les spermatozoïdes de mammifères, une très grande quantité de lipides sont des AGPI n-3 et n - 6 série (**Apel-Paz et al., 2003**), ces derniers sont associés à la fluidité de la membrane et de sa compétence. Les espèces animales ne sont pas capables de synthétiser des acides gras polyinsaturés essentiels donc leur régime alimentaire doit fournir des quantités adéquates de ces acides gras pour compensé ce déficit.

Des recherches ont montrés que l'ajout de AGPI n - 3 modifie plusieurs caractères des spermatozoïdes du lapin (**Castellini et al., 2003b ; Castellini et al., 2004**). Des modifications pertinentes en ce qui concerne la motilité et les qualités cinétiques des spermatozoïdes sont probablement attribuables à la hausse de l'élasticité de la membrane des spermatozoïdes chez les mâles recevant ce régime alimentaire (**Castellini et al., 2005**). Par contre, des niveaux élevés de cholestérol dans le régime alimentaire agissent négativement sur le métabolisme des cellules de Sertoli (**Yamamoto et al., 1999**) et le processus normal de la spermatogenèse (**Mann et Lutwak-Mann, 1981**).

I-5-3-L'Age

La maturité sexuelle survient à peu près à 5 mois (en fonction de la souche) et la qualité du sperme diminue généralement chez les lapins mâles les plus âgés. Récemment, quelques auteurs ont montré que la structure de la chromatine des spermatozoïdes des lapins entre 5 et 28 mois d'âge a changé de manière significative. Le plus bas pourcentage de spermatozoïdes avec endommagement de chromatine (1.7 à 2.4%) a été observé entre 6 et 16 mois d'âge.

La plus faible stabilité de la chromatine des spermatozoïdes a été trouvée dans les éjaculats pris de lapins mâles de moins de 5 mois et plus de 20 mois d'âge (**Gogol et al., 2002**).

Les spermatozoïdes des animaux âgés ont montré des membranes moins stables qui

semblent être plus vulnérable (**Castellini et al., 2003a**).

I-5-4- La température

Mis à part la concentration du sperme, il est possible d'influencer les différents facteurs qui accompagnent la "stérilité estivale" du lapin mâle par une baisse de la température ambiante. (**Hiroe et Tomizuka, 1965**), Toutefois aucune étude ne mentionne si, indépendamment de l'accroissement de la photopériode en été et l'augmentation de la température ambiante influe directement sur le poids testiculaire. **Chou et al. (1974)** démontrent que des lapins exposés pendant 20 mn par jour à 43°C durant 3 jours successifs ne présentent plus de spermatozoïdes ni de spermatides dans leurs tubes séminifères dès le 30ème jour après le traitement thermique et que le retour à la normale ne s'effectue que vers la 10ème et la 14ème semaine.

I-5-5- L'état de santé

Il est bien connu que l'inflammation de l'appareil reproducteur masculin (**O'Bryan et al., 2000**) aggrave diverses fonctions testiculaires et caractéristiques séminales en affectant la biosynthèse des eicosanoïdes pro-inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes) et des cytokines (**knapp, 1990**).

Une forte concentration de leucocytes au cours de la spermatogenèse ou après l'éjaculation provoquée par une inflammation ou une infection, peut profondément réduire l'intégrité de l'acrosome en augmentant la production des radicaux libres. La santé des mâles doit être contrôlée régulièrement principalement chez les individus âgés.

I-5-6- La fréquence de collecte

L'effet de la fréquence de collecte sur les caractéristiques du sperme est considérable et doit être consignés dans le détail. Deux éjaculats recueillis une fois par semaine (en une période d'au moins de 15 min) donne la meilleure production de sperme en termes de qualité et de quantité à la fois (**Bencheikh, 1995 ; Moce et al., 2000**). A l'inverse, si la fréquence de collecte prend plus de temps (tous les 14 jours) elle exerce un effet dépressif sur la production du sperme, probablement à cause de la diminution des stimuli sexuels suivis d'une réduction des androgènes. La fréquence de collecte affecte non seulement la production des spermatozoïdes, mais aussi la concentration des granules séminales (**Castellini et al., 2006 b**).

I-5-7- Le comportement

Il existe des corrélations entre le comportement sexuel et le volume de l'éjaculat ainsi que la concentration en spermatozoïdes.

Les mâles les plus agressifs ont un plus grand volume d'éjaculat, un taux de spermatozoïdes vivants plus élevé mais une concentration en spermatozoïdes moindre (**Hafez, 1960 ; Degerman et Kihlstrom, 1961**).

I-6- La Collecte du sperme

I-6-1- Le vagin artificiel (VA)

C'est un appareil simple et pratique. Il comporte deux parties : un cylindre en caoutchouc dur et épais (isolation thermique) ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon (**Hansen, 2011-2012**). Sa longueur est d'environ 3 à 5cm et son diamètre externe compris entre 2 et 7cm. Une chemise intérieure en latex ou en caoutchouc est introduite dans le cylindre et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique (**Bredderman et al., 1994**).

Le type de vagin artificiel influence l'adaptation du mâle à la collecte. Un vagin avec un orifice plus large facilite l'adaptation. Pour chaque collecte un vagin artificiel différent devrait être utilisé, il y a généralement beaucoup de contamination bactérienne à partir de l'environnement et il est important de rassembler l'échantillon de sperme dans des conditions hygiéniques (**Mercier et Rideaud, 1990**).

I-6-2-Technique de récolte

Le sperme du lapin est collecté à l'aide d'un vagin artificiel rempli de liquide chaud (environ 45°C). Une femelle est équipée de ce dispositif et présentée au mâle. Quelques auteurs ont rapporté que la stimulation précédente du mâle augmente la concentration du sperme, on laissant une femelle sur le camp du mâle pendant quelques minutes. (**Boiti et al., 2005**).

La collecte de sperme ne doit pas stresser l'animal. Il faut veiller à ne pas le bousculer et faire en sorte à ce qu'il s'adapte au collecteur. L'utilisation d'une femelle réceptive favorise l'excitation du mâle, et il faut toujours ramener la femelle dans la cage du mâle (**Boussit, 1989**).

Il est possible de substituer un mannequin ou une peau de lapine tannée à la femelle bote-en -train. L'opérateur recouvre l'avant- bras qui collecte, d'un leurre sur lequel le mâle saute .la personne qui collecte guide le VA vers le pénis du lapin. (**Boussit, 1989**).

CHAPITRE II

La cryoconservation

Chapitre II : La cryoconservation

II-1-Les étapes :

II-1-1- La collecte du sperme :

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

II-1-2- Analyse de la qualité du sperme récolté :

II-1-2-1-L'examen macroscopique :

Le volume : Varie selon l'espèce et pour une même espèce donnée, il est en fonction de l'état physiopathologique de l'individu, de l'âge, de la saison, de la race, de la méthode de récolte ou encore des conditions sanitaires et alimentaires. D'après **Orgebin-Crist (1968) et Cole et Cupps (1977)**.

Le volume du sperme varie entre 0,6 à 1 ml chez le lapin.

- ✚ **La couleur** : Est blanchâtre d'aspect crémeux, et varier en fonction des causes pathologiques, elle peut être de couleur brunâtre, bleuâtre, rosâtre, jaunâtre, ou rougeâtre.
- ✚ **La viscosité** : Elle traduit la consistance du sperme et en même temps sa concentration en spermatozoïdes.

II-1-2-2- L'examen microscopique :

- ✚ **La motilité massale** : Elle s'apprécie au microscope au grossissement (x10). L'examen doit se faire rapidement après prélèvement. Une goutte du sperme non dilué est déposée sur une lame chauffée à 37°C, on observe le mouvement des spermatozoïdes dans le liquide séminal, dont l'ensemble forme un tourbillon. Ces mouvements sont notés, selon une échelle de notation allant de 0 à 5 (Tableau 1).

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

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

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

II-1-3- La conservation du sperme :

II-1-3-1- La dilution :

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

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

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

II-1-3-2- La conservation à court terme 4°C :

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à 4°C, ainsi le métabolisme des spermatozoïdes est réduit ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et la conservation de leurs mobilité restaurée après réchauffement. (**Decuadro,2004**).

II-1-3-3- La conservation à long terme :

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

II-2- Amélioration des milieux de conservation :

II-2-1- Le stress oxydatif :

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

II-2-2- Origine du stress oxydatif :

II-2-2-1- Les radicaux libres :

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

II-2-2-2- Sources de production des radicaux libre :

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

II-2-2-3- Les différentes cibles des espèces réactives (ER) :

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

II-2-3- Système de défense antioxydante :

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. On divise les antioxydants en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme (Figure 5).

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

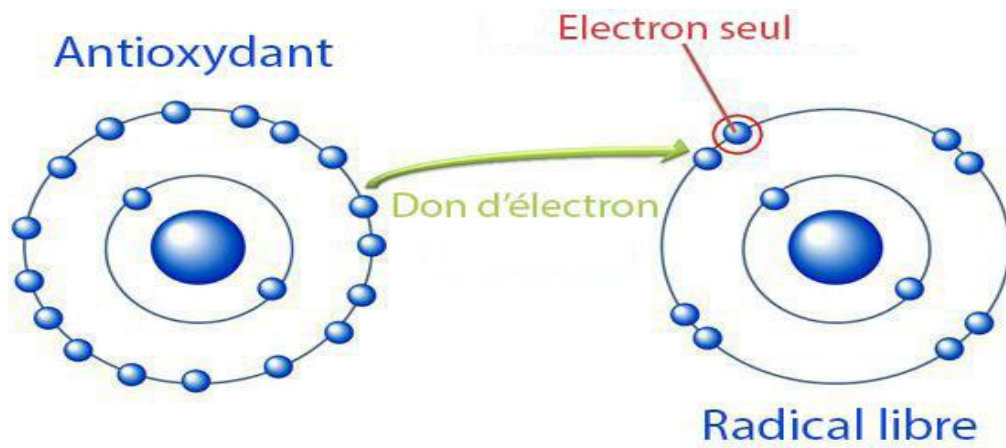


Figure N°5 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant. (Google image)

Chapitre III

Les huiles essentielles

Chapitre III : les huiles essentielles**III-1-Définition**

Une huile essentielle appelée aussi essence est un mélange de substances aromatiques volatiles peu complexe issue et produit par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytopathogènes (**Lahlou, 2004**).

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. La matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre citrus qui sont toujours traités à l'état frais (**Ollier, 2011**).

III-2-Répartition et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être présentes dans différents organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines des rhizomes, fruits et graines (**Bruneton, 1999**).

III-3-Caractéristiques physiques des huiles essentielles

Les HE possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques (**Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999**) :

- Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques.
- La densité est généralement inférieure à celle de l'eau.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation.
- Elles sont liquides à température ambiante.
- Elles sont incolores ou de couleur jaune pale.
- Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes (**Roux et Catier, 2007**).

III-4-Composition chimique

La composition des huiles essentielles est très complexe, ce sont des mélanges fortement variables et analysables, ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par les origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés

aromatiques dérivés du phenylpropane, elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Benayad, 2008 ; Guinoisseau, 2010**).

D'après la littérature plus de 30 000 terpènes sont connus jusqu'à présent. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (2-méthyl-1,3-butadiène : C₅H₈), ou par couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C₅H₈), soit deux unités pour les monoterpènes (C₁₀H₁₆) et trois unités concernant les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄). Exceptionnellement, quelques diterpènes (C₂₀H₃₂) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (**Vila et Coll., 2002 ; Newman, 1972 ; Pridham, 1967**).

En général, une huile essentielle est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures (**Rhayour, 2002**). La structure varie en fonction du (**Pibiri, 2006**) :

- nombre d'atomes de carbone qui la constitue,
- caractère saturé ou insaturé des liaisons, et leur agencement : linéaire ou cyclique,
- la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...),
- la nature des groupes fonctionnels : terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols.

III-5-Méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes :

III-5-1- Distillation et entrainement à la vapeur

C'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences (**Bego, 2001**). Le matériel végétale n'est pas en contact avec l'eau, son principe réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau- huile essentielle » dispersé dans la matière végétale (**Lucchesi, 2005**). Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entrainant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation, le produit de la distillation

se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (**Belaiche, 1979 ; Benjilali, 2004**).

III-5-2- Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode qui se définit pour l'extraction des huiles essentielles (Lucchesi, 2005). Selon Bruneton (1999), l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à l'ébullition, les vapeurs hétérogènes condensées sur une surface froide se transforme à l'état liquide, le mélange l'huile- eau se sépare par différence de densité. Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants (Haekel et Omar, 1993). (Figure6)

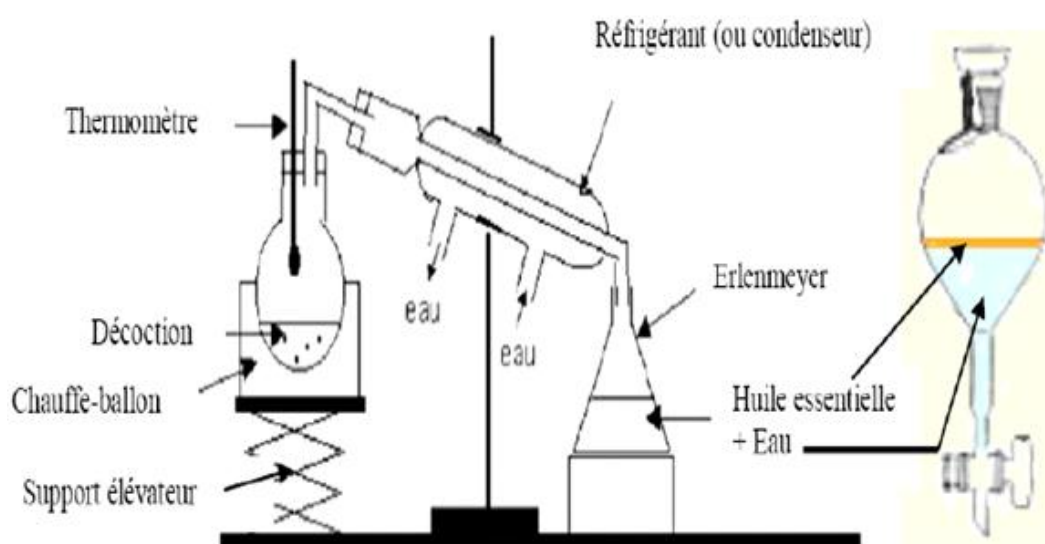


Figure N° 6 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Lagunez, 2006).

III-5-3- Extraction par solvants volatils

C'est une méthode qui est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé « concrète ». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolu » (Belaiche, 1979 ; Duraffourd et al., 1990). Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale et pas trop faible pour éviter

les pertes, sécurité de manipulation c'est-à-dire non toxique ou inflammable (**Bruneton, 1999**).

III-5-4- Extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras, elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (pétale des roses) sur une couche mince de graisse. Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures à 72 heures. Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales frais jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaiche, 1979 ; France-Ida, 1996**).

III-6-Méthodes d'analyse

A cause de l'importance des huiles essentielles dans le marché des cosmétiques et des parfums, les besoins de l'industrie de luxe ont conduit les chimistes à analyser les composants de diverses huiles essentielles qui sont des produits de base pour la fabrication de matières premières odorantes. Le développement de la technique dans le monde industriel, ainsi que les exigences d'une législation de plus en plus complexe et sévère quant à la qualité et à la limitation des nuisances des produits industriels, confrontent le chimiste au double problème toujours croissant de la demande d'analyse et de leur complexité (**Laverdière et al., 1999**).

III-6-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

Dans une CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Barboni, 2006**).

III-6-2- Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) :

L'identification des composés volatils caractéristiques des plantes aromatique nécessite l'utilisation de méthodes dites couplées. Les extraits à étudier sont généralement tellement complexes que la simple utilisation des temps ou indices de rétention chromatographiques ne permet pas d'identifier certains des composés détectés.

Les méthodes couplées permettent d'associer la capacité séparative des méthodes chromatographiques (CPG, CLHP) au pouvoir de caractérisation des méthodes spectroscopique et spectrométrique (IR, RMN, SM). Ainsi, le couplage CPG/SM est devenu incontournable pour les laboratoires de recherche et contrôle qui étudient les huiles essentielles (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**). Le couplage CPG/SM impose peu de contraintes techniques. Seul l'hélium peut être utilisé comme gaz vecteur car les ions He⁺ formés lors de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyse en raison de leur faible rapport m/z. Tous les types d'injecteurs sont utilisables et les appareils actuels utilisent exclusivement des colonnes capillaires.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la première association réussie d'une méthode chromatographique à la spectrométrie de masse. Mis au point dès la fin des années 1950, il est régulièrement commercialisé depuis 1966. Ce couplage est totalement maîtrisé depuis 1980, le couplage CPG/SM est simple à mettre en oeuvre, et plusieurs appareils peuvent fonctionner simultanément sous la surveillance d'un seul responsable. Le domaine d'application des CPG/SM se confond avec celui de la CPG et tous les progrès récents de la CPG ont été transposés à la CPG/SM, notamment en termes de rapidité d'analyse.

En analyse qualitative, la CPG/SM produit en routine des spectres reproductibles, identifiables à ceux d'une bibliothèque, pour des quantités injectées de l'ordre de 10¹⁰g. En analyse quantitative, des dosages exacts et précis sont obtenus avec une très grande dynamique de réponse, et des limites inférieures de détection parmi les plus basses de toutes les techniques d'analyse chimique, à condition de connaître et de disposer au préalable des molécules à quantifier, afin d'établir un étalonnage (**Arpino, 2008**).

III-6-3- Acquisition et traitement des données

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatisants. La CPG sur colonne capillaire

constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique. Un grand nombre de méthodes d'ionisation et d'analyseurs de masse sont utilisables.

La méthodologie d'analyse est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE. L'analyse s'organise en deux étapes, d'une part le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés par CPG/Ir et, d'autre par l'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants correspondants (**Paolini, 2005**) (Figure 30).

Les fragmentations du chromatogramme sont minutieusement analysées, il faut avoir une meilleure concordance entre le spectre de masses (composé recherché et composés proposés) pour valider le choix d'une telle proposition. Quel que soit l'analyseur, le spectre final est comparé à ceux d'une bibliothèque, puis le résultat est donné sous forme de tableau où sont classées en ordre décroissant, les molécules dont les spectres ressemblent le plus à celui soumis à la recherche. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles.

III-7-Domains d'utilisation des huiles essentielles

III-7-1- En pharmacie

Le contenu des plantes en essence et la nature chimique des constituants leur confèrent de grandes perspectives d'application, ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique. En effet, les huiles essentielles ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries, et des levures (**Duarte et al., 2005**) et également des moisissures (**Koba et al., 2004**), de plus elles sont très efficaces sur les microorganismes résistants aux antibiotiques.

✚ Activité antibactérienne :

les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de microorganisme, ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains (**Remmal, 1993 ; Chami, 2005 ; Caillet et al., 2009**).

Activité antifongique :

le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux chercheurs contre les champignons pathogènes et opportunistes (**De Bellerbeck, 2002**).

III-7-2- En cosmétologie

Le secteur d'hygiène et l'industrie des cosmétiques sont également des consommateurs, la majorité des produits cosmétiques contiennent une quantité de l'huile essentielle comme élément parfumant et aussi élément assurant une odeur agréable (**Bruneton, 1999**).

III-7-3- En industries agroalimentaires

Les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées dans la conservation des denrées alimentaires et cela grâce à leur activité antimicrobienne à large spectre sans pour autant dénaturer le goût car ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires (**Kurita et Koike, 1982**).

III-7-4- En agriculture

Les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009**). Les huiles essentielles sont utilisées comme agent de lutte biologique dans plusieurs cas y compris le cas de niébé infectée par *Callosobruchus maculatus* (**Ilboudo, 2009**).

III-8-Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons opaques à l'abri de la chaleur et de la lumière (**Valnet, 2000**).

III-9-Toxicité et précaution d'emploi des huiles essentielles

Toxicité :

Ils procèdent de leur activité thérapeutique élevée à l'origine d'une toxicologie spécifique qui impose des règles d'utilisation précises des huiles essentielles. (**Ollier, 2011**). La toxicité des HE ne doit pas être sous-estimée en cas de mauvaise utilisation. Elle est directement liée à

leur composition chimique : les risques dépendent des familles biochimiques auxquelles ces composés appartiennent et de leur concentration dans l'HE (Ollier, 2011).

Précaution d'emploi :

L'aromathérapie n'est pas une thérapeutique anodine. Pour une utilisation sans risque des HE, des précautions d'emploi s'imposent :

- Utiliser des HE 100 % pures et naturelles, identifiées et conservées dans de bonnes conditions
 - En cas d'allergie ou d'antécédent d'épilepsie, un avis médical est conseillé avant d'employer des HE
 - Ne pas avaler les HE pures : elles peuvent brûler les muqueuses oropharyngées
 - Ne pas appliquer d'HE pures dans le nez, le conduit auditif et sur les zones anogénitales mais toujours diluées à une concentration maximale de 10 %
 - Ne jamais injecter d'HE par voie IV ou IM et ne jamais en mettre même diluées dans les yeux
 - Bien se laver les mains après avoir touché une HE ou une préparation en contenant pour éviter un contact accidentel avec l'oeil.
- En cas de contact avec l'oeil, rincer sous l'eau courante pendant 5 minutes puis appliquer un coton imprégné d'HV (huile d'amande douce)
- Ne jamais appliquer chez les enfants de moins de 6 ans d'HE de Menthe poivrée sur la peau (risque de spasme laryngé) ni chez l'adulte sur une grande surface car elle provoque une sensation glacée avec vasoconstriction
 - Ne pas laisser les flacons d'HE à portée des enfants
 - Respecter strictement les voies d'administration, les doses prescrites et les contre-indications propres à certaines HE.

III-10-L'encapsulation des HE (solubilisation) :

L'encapsulation est une technique permettant d'emprisonner des liquides ou des solides dans une enveloppe qui les isole dans le but de les protéger de l'environnement extérieur, ou de maîtriser leur libération dans un environnement choisi. L'encapsulation de composés bioactifs (huiles essentielles, arômes, antioxydants, lipopeptides bactériens) est réalisée par le système d'encapsulation moléculaire (cyclodextrines, maltodextrines), dans laquelle la substance est encapsulée dans une cavité hydrophobe

III-11- Les cyclodextrines :

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

Chapitre IV

L'huile essentielle du Romarin

Chapitre IV :L'huile essentielle du Romarin (*Rosmarinus officinalis*)**IV-1-Description :**

Le Romarin, plante commune à l'état sauvage, est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (Zermane.A 2010) .

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (Zeghad.N2009) de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé (Makhloufi .A) .Les feuilles sont coriaces, persistantes, sessiles, linéaires, entières, enroulées sur les bords, vertes et ponctuées dessus, blanches tomenteuses à la face inférieure(Rameau. J.C et Dumé.G 2008) . Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace(Makhloufi .A) .La floraison commence dès les mois de janvier/ février et se poursuit jusqu'en avril – mai(Zeghad.N2009) .Les fleurs sont réunies au sommet des rameaux, bleues pâles à blanchâtre, pratiquement sessiles, disposées en petites grappes axillaires et terminales, bractées tomenteuses lancéolées(Rameau. J.C et Dumé.G 2008) .

IV-2- Répartition géographique :

Le romarin est originaire du bassin méditerranéen mais cultivé dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps (Iserin et al., 2001), et est cultivé dans des jardins comme plante ornementale. Il apprécie les climats chauds, modérément secs, résiste à la sécheresse et très exigeant en lumière. En Algérie, le romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national.

IV-3-Variétés et espèces :

Il existe trois espèces de romarin de la famille des Lamiacées qui poussent naturellement dans la région méditerranéenne: *Rosmarinus officinalis* L., *R. tourneforti* (*ericalyx* Jordan & Four) et le *R.tomentosus* Hub-Mor & Maire(Neffar. F et Benabderahmane.Z 2013).

Systématique de la plante

Nomenclatures : Romarin officinal à cinéole, rose des marins, rose de mer, rose marine, encensier, herbes aux couronnes.

Organe producteur : sommités fleuries

Principaux constituants : 1,8 cinéole (oxyde terpénique), camphre (monoterpénone), bornéol (monoterpénol), acétate de bornyle (ester terpénique), alpha pinène, beta pinène, camphène (monoterpènes), beta cariophyllène (sesquiterpène).

Famille botanique : Lamiacées.

Origine : Maroc, Tunisie

Valeur thérapeutique : +++

Voie orale : bonne voie

Par la peau : voie de préférence

Diffusion : bonne voie

Régne : plantae – plantes

Sous-règne : tracheobionta-plante vasculaire

Embranchement : spermaphyte

Sous embranchement : spermaphyte

Superdivision: spermatophyte – plantes à graines

Division : Magnoliophyta – les plantes à fleurs

Classe : dicotylédone

Sous classe : gamopétale

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae – famille de la menthe

Genre : Rosmarinus L.- romarin

Espèce botanique : Rosmarinus officinalis

Figure N°7 : systématique de Rosmarinus officinalis

IV-4-L'huile essentielle du Romarin :**IV-4-1-Composition chimique :**

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

IV-4-2- Composition phénolique :

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

IV-4-3- Utilisation :

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

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

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

IV-4-4-Les différentes activités biologiques de *Rosmarinus officinalis* :**✚ Activité antibactérienne :**

Le Romarin a été testé sous différentes formes contre différentes bactéries à Gram positif ou négatif responsables de différents types de pathologies.

(Etude de 2007 de Bozin *et al.*)

Les HE de *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis* ont été analysées et testées pour leur activité antimicrobienne sur 13 souches de bactéries (et 6 de champignons). Les composés majoritaires de l'HE de Romarin testée sont : limonène (21,7%), camphre (21,6%), alpha-pinène (13,5%), linalol (10,8%). L'HE de Romarin (ainsi que celle de Sauge) a montré une activité antibactérienne importante sur *Escherichia coli* (y compris celle multi-résistante), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* et *Shigella sonnei*. Les bactéries à Gram positif semblent plus sensibles.

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

✚ Activité antifongique :

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

✚ Activité antivirale :

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

✚ Activité insecticide contre d'autres insectes parasites de végétaux

L'activité insecticide de l'HE de Romarin contre divers insectes parasites de végétaux a été étudiée par plusieurs auteurs (**Tak J-H., Jovel E., Isman M.B 2016 et Sanchez Chopa C., Descamps L.R 2012 et Zhang Z., Bian L., Sun X. *et al* 2015 et Moretti M.D., Sanna-Passino G., Demontis S. *et al.* 2002**)

Les résultats paraissent encourageants et l'HE de Romarin pourrait être une alternative intéressante dans le contrôle des insectes nuisibles.

Autres activité :

Le romarin est aussi utilisé comme anti-oxydante dans l'industrie de la fabrication des produits à base de viande.

Le romarin est employé en phytothérapie, pour ses propriétés stimulante au niveau hépatique, son action spasmodique sur les intestins et sur l'estomac, ainsi que son action sur les muscles lisses du système respiratoire (il calme la toux et contribue au confort de l'asthmatique).

En ce qui concerne les propriétés anticancéreuses du Romarin, malgré un nombre croissant de travaux expérimentaux, l'information sur les effets chimio-protecteurs ou antiprolifératifs des cellules cancéreuses est très pauvre, en particulier sur le mécanisme d'action (**Cattaneo L., Cicconi R., Mignogna G. et al. 2015**).

IV-5-Interaction substances actives-spermatozoïdes

IV-5-1- Effets des huiles essentielles :

IV-5-1-1- Effets protecteurs :

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

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

IV-5-1-2-Effets spermicides :

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

IV-5-2- Effets des extraits phénoliques :**IV-5-2-1- Effets protecteurs :**

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

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

IV-5-2-2- Effets spermicides :

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

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

Une étude récente montre que le nimbolide, qui est un isoprénoïde qui se trouve dans les feuilles de neem et l'extrait de graines a des effets délétères à haute dose sur les paramètres biochimiques des fonctions reproductrices chez les rats après administration orale. On a observé qu'il inhibait efficacement la motilité du spermatozoïde et la viabilité de manière

dépendante de la dose. L'activité spermicide des doses graduées de nimbolide a été étudiée séparément in vitro, et la dose minimale effective qui conduit à l'immobilisation de la totalité des spermatozoïdes après 20 secondes était de 3,50 µg/million de spermatozoïdes (**Kumbar et al., 2012**).

Partie Pratique

I-Matériel et méthodes

Pour bien mener notre étude, qui s'inscrit dans le cadre de la conservation des caractéristiques de la semence de lapin lors de la réfrigération à 4°C, nous avons testé de nouveaux milieux à base d'HE de *Rosmarinus officinalis*.

Selon l'objectif visé, la pratique est réalisée en deux parties, la première partie s'est déroulée au niveau du clapier de la station expérimentale de l'université Blida 1 et la deuxième partie s'est effectuée au niveau du laboratoire de biotechnologie de la reproduction animal (LBRA) de l'institut de science vétérinaire de Blida 1.

I-1- Matériel

I-1-1-Matériel biologique

La réalisation de cette étude nécessite l'utilisation du matériel biologique (des lapins) et matériel végétal (Huile essentielle *Rosmarinus officinalis*).

a) Modèle animal

La présente étude est portée sur (4) lapins mâles provenant de la station expérimentale de l'université Blida 1.

b)- Les huiles essentielles :

L'huile essentielle testé dans notre travail est extrait d'une plante fait partie de la famille des *Lamiaceae* HE du Romarin (*Rosmarinus officinalis*), constituée principalement de Camphre (15-25%) ; α -pinène (19.6%) ; Bornéol et estérifié (10%) ; 1,8 Cinéol (15-50%) ; Limonène (3,6%) (Albert. Y. et al., 1996 ; deans et al., 1998).

Le *Rosmarinus officinalis* (Figure8), est acheté dans une pharmacie. Elles sont obtenues par distillation en utilisant l'entraînement à la vapeur d'eau en juin 2019 à partir des feuilles et des rameaux, sa composition est environ 50% 1,8 cinéolé. La plante est d'origine géographique de Tébessa-Algérie.

L'huiles essentielle a été conservée dans des flacons stériles et stockées a 4°C et a l'abri de l'air et de la lumière pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.(figure8)



FigureN° 8: HE utilisée

I-1-2- Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est :

- Vagin artificiel
- Eau chaude.
- Des micropipettes.
- Des lames.
- Des lamelles
- Des tubes eppendrofs.
- Solution de fixation (Eau physiologique (Na Cl à 9 %)
- Tris buffer (D-glucose +acide citrique+ tris).
- spermes
- les milieux de conservations.
- les étiquettes.
- réfrigérateur.

II-Méthodes

pour réaliser ce travail et l'ensemble des analyses nous avons passer par plusieurs étapes .

I-1-Préparation du complexe CD-HE :

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

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

II-2-Préparation des milieux de conservation :

II-2-1-Protocole de préparation du dilueur :

La survie des spermatozoïdes à basse température est réduite, il est nécessaire d'utiliser un milieu spécifique, ou dilueur, afin d'accroître leur longévité et de préserver au mieux leur capacité de fécondation. En effet, **Rota et al., (1995)** et **Tsutsui et al., (2003)** ont montré que la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un dilueur qu'en l'absence de dilueur.

Plusieurs dilueurs ont été mis au point par des chercheurs, dans ce travail le sperme est dilué dans le milieu le tris buffer + le jaune d'oeuf (JO).

D'après **Boiti et al., (2005)** le tris buffer (TB) utilisé pour le lapin doit contenir les composants et les propriétés suivantes (**tableau 3**)

Tableau III: les composants et les propriétés adéquates du tris buffer utilisé pour le lapin (**Boiti et al, 2005**).

Tris	3,029 g
L'acide citrique H₂O	1,676 g
D- Glucose déshydraté	1.250 g
Streptomycine	75.000 UI
G-pénicilline	166.200 UI
L'eau distillée à	100 ml
pH	7,14
Osmolarité	299 mOsm / kg

Les composantes de tris buffer utilise est dans le tableau suivant (tableau4).

Tableau IV: les composantes de tris buffer (milieu de **Strazinger, 1971**) :

Tris buffer(TB)

Tris (hydroxyméthylaminométhane) : 3,028g
 -D-glucose : 1,250g
 -Acide citrique monohydrate : 1,675g

Dans 100 ml d'eau distillé sous un adjutateur on ajoute :

- 3,028 g du Tris (hydroxyméthylaminométhane) pour avoir des solutions tampons.
- 1.675 g d'acide citrique pour régulariser le PH et l'osmolarité.
- 1.250g de D-glucose comme élément nutritif pour éviter l'épuisement des spz.
- 15% de JO afin de protéger les SPZ contre le choc thermique.

II-2-2-Protocole de préparation des traitements de conservation

a) Le contrôle contient uniquement le Tris buffer.

b) Préparation des milieux de conservation avec HE :

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des HEs qui ont été obtenues à partir de l'espèce *Rosmarinus officinalis* en choisissant quatre concentrations : 1, 2, 4, 10 µl/ml.

II-3- Processus de la collecte du sperme :

a) préparation des vagins artificiels et les tubes de collecte

avant la collecte, le vagin artificiel est lavé avec l'eau chaude javellisée puis rincés à l'eau courante et séchés , puis on met le VA dans le bain marie pour le chauffer .

b) récolte de la semence

Après avoir préparé le VA est maintenu à une température de 39°C, nous introduisons une lapine de dans la cage du mâle. Au moment où le mâle essaye d'accoupler la femelle, nous insérons rapidement le VA entre les animaux de façon que le pénis entre dans la grande extrémité du VA. Une fois que le pénis est entré dans la grande extrémité, l'éjaculation se produit . Par la suite le mâle se laisse glisser à coté de la lapine avec un soupir (cris) et y reste quelques secondes allongé.

II-4- Protocole expérimental

Immédiatement après la récolte :

Nous avons analysé la couleur du sperme, le volume et la motilité massale au microscope optique ensuite nous avons ;

-dilué la semence avec le tris buffer + JO

.-préparé une série de (X) tubes pour une conservation à 4°C.

- Des concentrations différentes d'HE (0.5, 1, 2, 4 µl/ml) ont été ajoutées respectivement dans chaque tube de Tris, le milieu sans addition d'HE a été considéré comme un contrôle.

- Réalisé une analyse pour tout les échantillons à T0 avec l'analyseur informatique (CASA) Computer Assisted Semen Analyser.

- Mis la série de (X) tubes dans un réfrigérateur à 4°C.

- Analysé la série de tube, avec le CASA, chaque 2 jusqu'à T3.

II-5-L'analyse du sperme collecté :

II-5-1- Analyse macroscopique :

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

II-5-2- Analyse microscopique :

✚ La motilité massale :

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

✚ La motilité individuelle :

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

✚ La concentration

La concentration du sperme est obtenue directement à partir d'un analyseur informatique du sperme (CASA), en tenant compte du taux de dilution.

II-6- Analyse de la mobilité :

II-6-1- Analyse assistée par ordinateur (C.A.S.A) :

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

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

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

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

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

II-7-Méthode d'analyse :

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

Une première analyse à T0 et à température ambiante est réalisée à l'aide du logiciel informatique CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) pour l'ensemble des 06 milieux. Les échantillons (traitement + sperme) sont conservés à 4°C, pour être analysés chaque deux heures jusqu'à T3.

Remarque :

Le protocole ci-dessus était le protocole qu'on comptait suivre, mais vue la situation que le monde traverse, il a été réalisé jusqu'à l'étape de l'effet de l'huile essentielle sur la mobilité. Par conséquent on ne pouvait pas continuer notre expérimental jusqu'à l'obtention de la concentration nécessaire pour améliorer la qualité de la semence réfrigérée à 4°C.

La partie réalisée est résumée ci-dessous :

I-1-8-Matériel de laboratoire :

+ Consommable :

Lames et lamelle, Eppendorfs stériles

+ Produit chimique :

Solution galope

+ Autres :

Des micropipettes de 10 µl, 100 µl, et 1000 µl, vortex (agitateur) , bain marie (figure 09,10,11)



Figure N° 09 : Micropipette



figure N°10 : vortex (agitateur)



FigureN°11 :Bain marie

L'analyse a été effectuée par le système CASA.

✚ Système CASA :

Ce système comporte un microscope lié à une caméra digitale, le tout est associé à un ordinateur doté d'un logiciel d'analyse informatique des paramètres spermatiques (Sperme class Analyzer ; SCA Version 5.4, microptic S.L. Viladomat 321, 6 – 4 08029 – Barcelona, Spain)

Cet outil sert à réaliser une analyse automatique des vidéos de spermatozoïdes en mouvement et générer des valeurs objectives des paramètres de mobilité suivants : la vitesse curviligne ou (VCL) (Curvilinéaire Velocity), la vitesse moyenne de trajectoire ou VAP (Average Path Velocity), la vitesse linéaire ou VSL (Straight-Line Velocity), l'ALH (Amplitude of Lateral Head displacement), la fréquence de battement de tête ou BCF (beat cross frequency). Les données sont récupérées sous forme d'un fichier Excel.

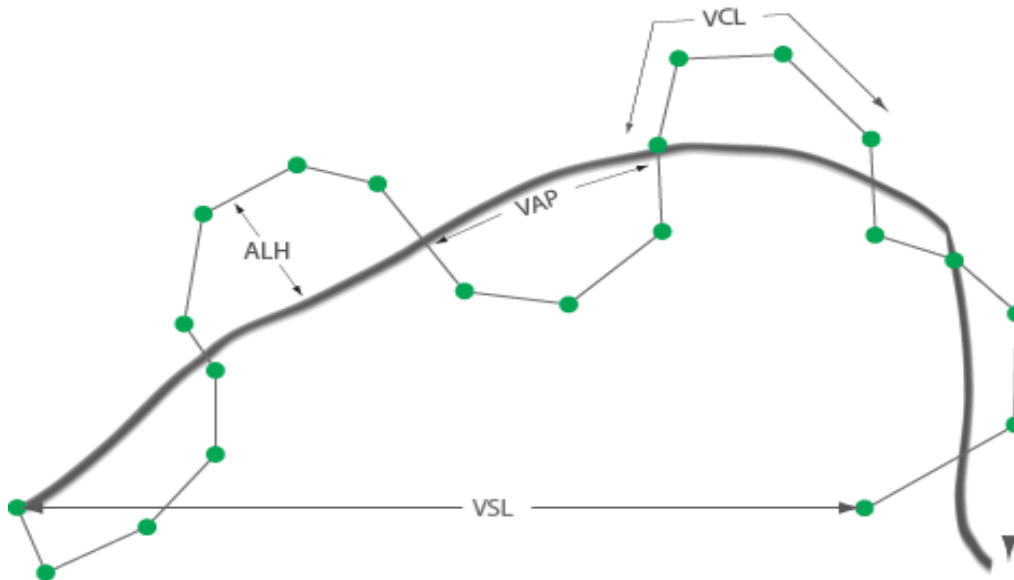


Figure N°12 : Schématisation des différents paramètres de mobilité du spermatozoïde

I-2-9-Méthodes

I-2-10-La récolte de la semence : avant la collecte on a préparé le vagin artificiel et les tubes de collecte (Figure 13)



FigureN°13 : préparation des vagins artificiels et les tubes de collecte

- Puis nous avons introduit une lapine de dans la cage du mâle. Au moment où le mâle essaye d'accoupler la femelle, nous insérons rapidement le VA entre les animaux de façon que le pénis entre dans la grande extrémité du VA. Une fois que le pénis est entré dans la grande extrémité, l'éjaculation se produit .(figure 14)



Figure N°14: récolte de la semence

-Après la collecte de sperme le tube de collecte est maintenu dans le creux de la main fermée afin d'éviter la diminution de la température, puis transporté immédiatement au laboratoire dans un thermos à température entre 36,5 et 37,5C°et placé dans un bain marie à 37C°.

- Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biotechnologie lié à la reproduction bovine de l'institut des sciences vétérinaires de Blida.
- Les manipulations effectuées durant l'expérimentation se sont déroulées dans des conditions d'asepsie afin d'éviter toute contamination microbienne risquant d'altérer les résultats obtenus.

I-2-11-Préparation des solutions :

✚ Protocole de préparation de témoins :

On a pu avoir un seul prélèvement de sperme, puis on a réalisé une dilution utilisant la solution de GALOPE, Dans un eppendorf on a ajouté 1160 µl de Galope + 40 µl de la semence puis on a étiqueter l'Eppendorf (T : témoins T0 GALOPE + sperme)

à partir de cette dilution nous avons effectué la première analyse considérée comme témoin.

✚ Protocole de préparation de solution huile essentielle + sperme :

On a pris 1 ml de la dilution préparée sur laquelle nous avons ajouté 10 µl de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. puis on a effectué la deuxième analyse pour tester l'effet de cette concentration sur les spermatozoïdes.(Sperme dilué + HE à T0)

I-2-12-Analyse microscopique :

L'analyse microscopique est obtenue directement d'un analyseur informatique du sperme CASA qui présente des valeurs objectives des paramètres de mobilité :

- la vitesse curviligne ou (VCL)
- la vitesse moyenne de trajectoire ou VAP
- la vitesse linéaire ou VSL

I-2-13-Motilité massale :

 **Analyse des témoins :**

Dans un premier temps T0, on effectue l'analyse de témoins. Le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes est estimé directement après l'analyse par observation d'une goutte de sperme sous microscope optique au grossissement x10, chambre Ph1 avec filtre vert, et une plaque chauffante à 37°C pour éviter les chocs thermiques des spermatozoïdes voire fausser les résultats.

 **Analyses de la solution l'huile essentielle +sperme :**

Pour cette analyse, on utilise les mêmes étapes que la précédente.

II-Résultats et discussion

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de notre essai de l'effet des HE utilisée sur la semence collectée.

II-1-Résultats

Nous avons préparé 06 lapins pour la récolte dont 05 ont chevauché la lapine à plusieurs reprises mais sans éjaculation malgré qu'on a appliqué la méthode de pauser la femelle au dessus de la cage du male pour augmenter sa stimulation, tandis que le 6^{ème} a pu éjaculer dès le premier chevauchement; sachant que ce dernier n'est pas habitué d'éjaculé dans le vagin artificiel.

L'éjaculation était rapide, ce qui montre que ce lapin a une libido courte.

II-1-1 Examen macroscopique

Les caractéristiques macroscopiques du sperme collecté :

Couleur

Après observation de la semence dans le tube de collecte transparent, nous avons déterminé sa couleur qui était blanchâtre avec aucune trace anormale.

Volume

Il est mesuré par lecture directe sur le tube gradué. Notre lapin a éjaculé 1 ml de sperme.

II-1-2- Examen microscopique

✚ La motilité témoin et le Sperme dilué + HE

Tableau VI: résultat de la motilité individuelle

LOT	TEMOIN	HE (T0)
MOTILITE INDIVIDUELLE	84%	4%

-Dans ce travail, le mouvement des SPZ est estimé directement après la collecte. La semence récoltée a une bonne motilité massale et le sperme est de bonne qualité. Il présente 84% de SPZ mobiles.

-après avoir ajouté l'huile essentielle au sperme dilué la motilité a diminué jusqu'à 4%(figure15)

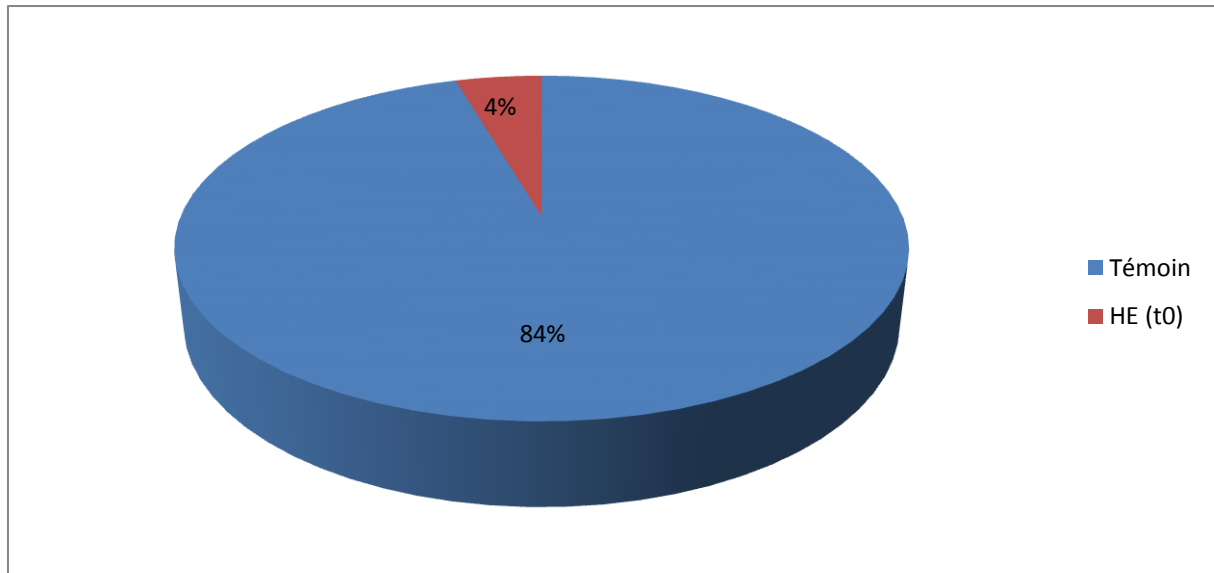


Figure 15: Evolution de la motilité à T0 pour le témoin et l'huile essentielle

II-1-3-Résultats de l'effet de l'huile essentielle sur le sperme collecté

Résultats des paramètres de la mobilité des SPZ du témoin et l'huile essentielle qui ont été obtenus directement suite à l'analyse par le CASA sont représentés dans le tableau et la figure ci-dessous

- ✓ La vitesse curviligne ou (VCL)
- ✓ La vitesse moyenne de trajectoire ou VAP
- ✓ La vitesse linéaire ou VSL

Tableau VII : résultat des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyser, CASA).

PARAMETRS	TEMOIN	HE (T0)
VCL	53,81	29,61
VAP	39,93	15,21
VSL	30,29	11,54

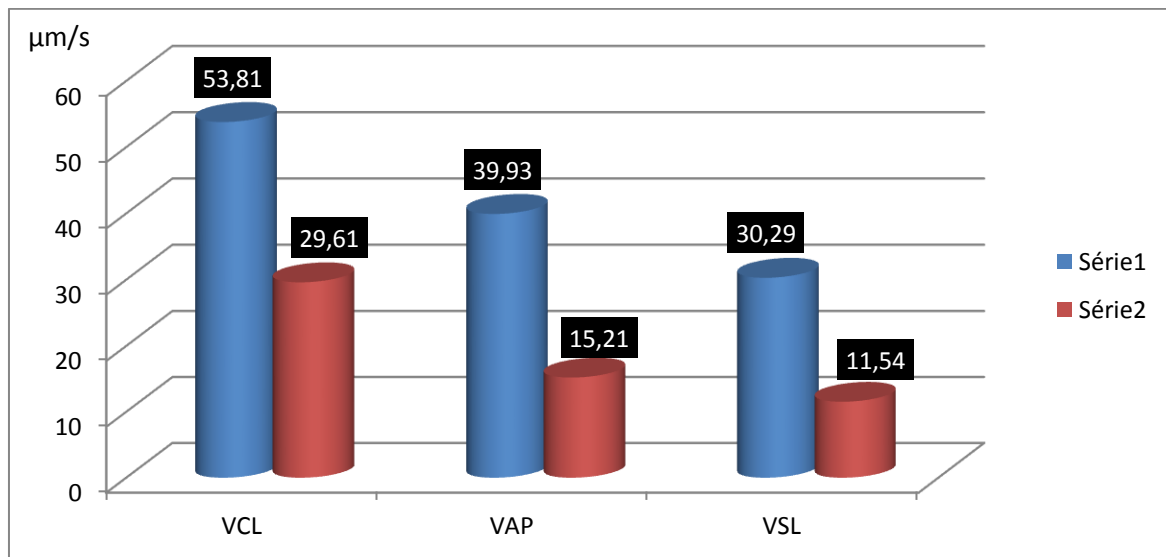


Figure 16 : Evolution de la VCL ,VAP et VSL des spermatozoïdes du témoin et de L’hules essentielle

D’après ces résultats nous remarquons que la VCL,VAP et VSL du témoin est largement supérieur de celle de HE

Discussion :

- Les volumes de sperme peuvent varier en fonction de l’état corporel des mâles, leur âge, l’environnement et aussi l’alimentation (**Hanzen., 2009**).

L’effet spermicide peut être du à :

- ✚ La forte concentration de l’huile essentielle

In vitro, les effets des huiles essentielles dépendent de la concentration utilisée, en effet il est montré que l’HE de *Rosmarinus officinalis* reste bien tolérée par les SPZ porcins jusqu’à une concentration de 0.6mg/ml alors que l’HE de *Thymbra capitata* a un effet spermicide à une concentration de 0.4mg/ml (**Elmi et al., 2017**).

- ✚ La fragilité des spermatozoïdes de lapin (trop fragile pour cette espèce)

l’exposition des mâles à des températures élevées (34 C° pendant 8 h) déprime l’activité sexuelle et perturbe la spermatogénèse, en augmentant sensiblement le pourcentage des spermatozoïdes morts (**Boussit, 1989 ; Kasa et Thwaites, 1992**).

✚ Un composant dans l'huile essentielle et qui avait un effet nocif sur les spermatozoïdes **kammerer et al., 2012** ont mis en évidence que les huiles essentielles (selon la plante utilisée) peuvent avoir un effet toxique ou bénéfique chez les lapins.

✚ Un contact direct entre l'huile essentielle et les spermatozoïdes qui a provoqué un choc au lieu d'être consommé comme complément alimentaire qui sera traité dans l'organisme et traversera tout un parcours avant d'être en contact avec les spermatozoïdes

Les huiles essentielles, lorsqu'elles sont utilisées en particulier *in vivo* comme compléments alimentaires, ont montré une remarquable puissance dans la protection et l'amélioration des paramètres du sperme de plusieurs espèces animales (**Liu, Q et al., 2017 et Köse, E et al., 2011**). Cependant, quand elles sont utilisées *in vitro*, chez l'homme ainsi que chez d'autres espèces animales, un effet spermicide a été mis en évidence avec impact sur la motilité des gamètes et l'intégrité de la membrane plasmique (**Chikhoun, A et al., 2015 et Buch, J.G et al., 1988**).

Le résultat négatif que nous avons obtenu est un résultat mais dans le cadre des conditions expérimentales de notre travail, il ne pourra jamais être généralisé.

Pour retirer une conclusion fiable proche de la réalité il sera préférable de réaliser plusieurs essais et de maîtriser aussi tous les paramètres et les conditions de travail.

Pour cela nous avons opté pour l'analyse de quelques publications touchant de très près ce problème concernant l'amélioration de la longévité des spermatozoïdes conservés à une température de 4°C.

nous avons utilisé dans cette synthèse trois travaux réalisés par :

-**Touazi L. (2018)** qui a étudié l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur la motilité des spermatozoïdes de coq pendant un stockage de courte durée à 4 °C

-**Azamoum Farah & Rabia Fatma Zohra** qui ont étudié l'intérêt des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* dans la conservation de la mobilité du sperme du bélier à 4°C en 2018

-Mr KIROUANI Mokrane qui a travaillé sur Amélioration de la Conservation du Sperme Aviaire à la température de 4 C° réalisé en 2020

Les huiles essentielles sont devenues de plus en plus l'objet de différentes études car elles ont montré des résultats très intéressants dans le domaine médical.

Les huiles essentielles, lorsqu'elles sont utilisées en particulier *in vivo* comme compléments alimentaires, ont montré une remarquable puissance dans la protection et l'amélioration des paramètres du sperme de plusieurs espèces animales (**Liu, Qet al.,2017 et Köse, E et al.,2011**) . Cependant, quand elles sont utilisées *in vitro*, chez l'homme ainsi que chez d'autres espèces animales, un effet spermicide a été mis en évidence avec impact sur la motilité des gamètes et l'intégrité de la membrane plasmique (**Chikhoun, A et al.,2015 et Buch, J.G et al., 1988**) ,et c'est le résultat trouvé suite à la réalisation de la première étape de notre protocole dans laquelle il y avait un contact direct entre la semence et l'huile essentielle qui a abouti à la destruction des spermatozoïdes

Rosmarinus officinalis est connu par sa richesse en polyphénols et en huiles volatiles, ainsi que des molécules telles que les acides carnosique, rosmarinique et camphre (**Cuvelier, M.E et al.,1996 et Rašković, A et al., 2014**) . Ces composés présentent diverses activités biologiques notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, et propriétés anticancérigènes.

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

À cet égard, de nombreuses études, utilisant le romarin extrait de feuilles, contenant de polyphénols, ont signalé des effets positifs sur le sperme congelé chez plusieurs espèces, dont le sanglier (**Malo, C., Gil, L et al.,2010**) ,le chien (**González, Net al.,2010**) et bélier (**Gil, L et al., 2010**). Cependant, aucun effet protecteur n'a été signalé lors de l'utilisation de l'huile essentielle de *R. officinalis*, et récemment, Elmi et ses collaborateurs (**Elmi, Aet al., 2017**) ont observé des motilités similaires lorsque le contrôle est comparé aux spermatozoïdes traités *in vitro* avec 0,2

mg / ml d'huile essentielle de *R. officinalis*. Dans l'ensemble, tous les données rapportées indépendamment sur la plante ont montré une activité spermicide évidente .

Azamoum Farah & Rabia Fatma Zohra qui ont étudiée l'intérêt des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation de la mobilité du sperme du bélier à 4°C en 2018 ont trouvé des résultats montrant que la qualité du sperme a été significativement préservée, en particulier avec les plus faibles concentrations de l'huile essentielle (0.5 µl/ml et 1 µl/ml) et le milieu contenant la cyclodextrine (ROM-CD). Les doses les plus élevées (2 et 4 µl/ml) ont montré un effet spermicide après 24h, ces deux concentration ont provoqués des altérations probablement similaires à celle décrites au niveau des bactéries (**Moreno, S. et al., 2006 ; Satyal, P. et al., 2017**). Ces résultats sont similaires à ceux trouvé sur le sperme aviaire par **Touazi L. et al., (2018)** qui a trouvé que la dose de (870 µg / ml) utilisé a montré des effets nocifs avec une activité spermicide totale après 24 h de stockage. et c'est ce que nous avons trouvé dans notre travail puisque une mortalité totale des spermatozoïdes a été constaté suite à l'utilisation de la dose de 10µl qui est une dose importante et qui a dépassé la limite qui favorise l'effet protecteur des SPZ.

la dose de (870 µg / ml) utilisé par Mr. Touazi a causé des altérations probablement similaires à celles décrites dans les bactéries (**Jordán, M.J et al., 2013 et Satyal, P et al., 2017**) . Le mécanisme décrit chez les bactéries était la capacité de l'huile essentielle à perturber et pénétrer dans la structure lipidique de la paroi cellulaire conduisant à la destruction des membranes (**Boutabia, Let al., 2016 et Burt, S. (2004) Essential oils et Vojnov, A.A. 2006**) .(**Chafar et coll. Chafar, Net al., 2015**) ont rapporté que l'huile essentielle de *R. officinalis* était active contre plusieurs souches de *Legionella pneumophila* avec une concentration <0,55 mg / mL. De plus, (**Outaleb et Al. Outaleb, T et al., 2015**) ont indiqué que l'huile essentielle de romarin a présenté les activités antibactériennes avec des concentrations allant uniquement de 4 à 20 µg / ml. Il ont rapporté aussi que l'activité spermicide chez de nombreuses espèces animales est associée à des dommages considérables sur différentes structures de spermatozoïdes, y compris les membranes cellulaires et l'intégrité de l'acrosome (**Türk, G et al., 2016 et Chikhoun, A et al., 2015 et Buch, J.G et al., 1988 et Elmi, A et al., 2017**). Selon les résultats de cette étude, l'utilisation de petites concentrations *in vitro* pourraient être bénéfiques pour les spermatozoïdes de coq dans des conditions de 4 ° C.

dans le travail de Mr KIROUANI MOKRANE sur Amélioration de la Conservation du Sperme Aviaire à la température de 4 C° réalisé en 2020, il a étudié l'intérêt de l'utilisation de faibles

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

Conclusion

Conclusion et perspectives

Chez l'homme, comme chez de nombreuses espèces de mammifères, la mobilité des spermatozoïdes est nécessaire à l'expression de leur fonction de fécondation de l'ovocyte. Au cours de leur voyage vers l'ovocyte, les spermatozoïdes rencontrent des micro-environnements très variés et subissent un certain nombre de modifications qui se manifestent notamment au niveau de leur mouvement. Des dysfonctionnements d'origine interne ou dépendants de facteurs externes peuvent perturber la mobilité des spermatozoïdes et donc être responsables d'infertilité (**Pierre et Serres., 1995**).

La biotechnologie de la reproduction a connu un progrès important et rapide ces dernières décennies. Elle inclut des techniques comme l'insémination artificielle, la cryoconservation et autres.

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

Les huiles essentielles sont des produits aromatiques riches en phyto-oestrogènes dont l'innocuité n'est pas totalement prouvée. Ces composés sont susceptibles de modifier le processus physiologique de la reproduction soit en l'améliorant ou en le perturbant (El Kalamouni, 2010).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés d'évaluer l'effet des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation des SPZ de lapin à 4 C°.

Dans ce travail, le mouvement des SPZ est estimé directement après la collecte. Les semences récoltées ont une bonne motilité massale et le sperme est de bonne qualité. Il présente plus de 84% de SPZ mobiles.

A T0 l'analyse effectuée par le CASA a montré une mortalité totale des spermatozoïdes ce qui prouve que l'huile essentielle avait un effet spermicide à une concentration de 10 µl.

Le résultat négatif que nous avons obtenu est un résultat mais dans le cadre des conditions expérimentales de notre travail, il ne pourra jamais généralisé.

Pour retirer une conclusion fiable proche de la réalité il sera préférable de réaliser plusieurs essais et de maîtriser aussi tous les paramètres et les conditions de travail.

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

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

Reference

Bibliographique

Références bibliographique

1. **Abraham L., Kierszenbaum.,2002**, Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique, Paris : éd médicales internationales. p 619.
2. **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.
3. **Albert Y. Leung, Steven Foster,** (1996). *Encyclopedia of Common Naturel Ingradients Used In Foods, Drugs, And Cosmetics*, 2ème édition. Awrley -interscience publication, P445.
4. **Apel-Paz M., Vanderlick T.K., Chandra N. et Doncel F.G., 2003**, A hierarchy of lipid constructs for the sperm plasma membrane. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 309, p 724-732.
5. **Armspach, D., Gattuso, G., Königer, R., Stoddart, J.F.,** 1999. Cyclodextrins. In: *Bioorganic Chemistry : Carbohydrates*. Hecht, S.M. (Ed.), Oxford University Press, Oxford, 458-488.
6. **-Arpino P.**, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. II, *Techniques Ingénieur*, **2008**, pp.1491–2,4.
7. **Aruoma, O I.** (1996). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr*. 8: 53-63.B.
8. **Baba, L. & McGrath, IM.** (2008). Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care 8 Journal*, pp. 256-264.
9. **-Barboni T.**, Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie, Thèse de doctorat, Université de Corse, **2006**, pp.21.
10. **-Bardeau F.** (1976). *La médecine par les fleurs*. Ed. Robert Laffont.
11. **Baril (G.), (P.) Chemineau, (Y.) Congnie, (Y.) Guerin, (B.) Leboeu, (P.) Orgeur, (J.C.)**
12. **Barone R., 1976**, Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 4 : Splanchnologie : Laboratoire d'anatomie. Lyon, ENV.-879p.
13. **Barone R., 1978**, Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 3 : Splanchnologie 2 : Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale.-Paris : Vigot.-896p.

14. **Barone R., 1984**, Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 3 : Splanchnologie 1 : Appareils digestif et respiratoire.- Paris : Vigot.- 896p.
15. **-Bego Ph.** (2001). Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, p.2-3.
16. **-Belaïche P.** (1979). Aromatogramme. In Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Edition Maloine-S-S, tome I. p. 9-20.
17. **-Benayad N. (2008)**. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V-Agdal, Maroc, 61.
18. **Bencheikh N., 1995**, Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme. Ann. Zoot., 44, 263-279.
19. **-Benjilali B.** (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. P 17-59.
20. **Boiti C., Castellini C., Theau-Clément M., Besenfelder U., Liguori L., Renieri T. et Pizzi F., 2005**, Guidelines For The Handling Of Rabbit Bucks And Semen. 13: p 71 – 91.
21. **Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Leloc'h A., Montmeas L. et**
22. **Borghei-Rad, S.M., Zeinoaldini, S., Zhandi, M., Moravej, H., and Ansari, M.** (2017) Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. Theriogenology, 101: 35-43.
23. **Boussit D., 1989**, Reproduction et insémination artificiel en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC pp6-8.
24. **Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. and Chefrou, A. (2016)** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bull. Soc. R. Sci. Liège.*, 85: 174 189.
25. **Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. and Chefrou, A. (2016)**. Composition chimique et activité anti-bactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bull. Soc. R. Sci. Liège.*, 85: 174 189.

26. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I. et al.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007 ; 55 ; 7879-85
27. **Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E.**(2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rose-mary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 55: 7879-7885.
28. **Brambell F.W.R., 1944**, The reproduction of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Proc. Zool. Soc. London*. 114, 1-114.
29. **Bredderman P.J., Foot R.H., Yassen A.M., 1994**, An improved artificial vagina for collecting rabbit semen .Department of animal Husbandry, Cornell University, Ithaca New York,U.S.A.PP401-403.
30. **Brewster, M.E., Loftsson, T., (2007)**. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666
31. **Brewster, M.E., Loftsson, T., (2007)**. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666
32. **Bruneton J. (1999)**. Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, *Tec et Doc*, Paris, 1119.
33. **Buch, J.G., Dikshit, R.K. and Mansuri, S.M. (1988)** Effect of certain volatile oils on ejaculated human spermatozoa. *Indian. J. Med. Res.*, 87: 361-363
34. **Burt, S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.** *Int. J. Fo* Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free. Radic. Res.*, 40: 223-231. *od. Micobiol.*, 94: 223-253.
35. **-Caillet, Lacroix. (2009)**. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en science appliquées à l'alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier.
36. **Carange, J. (2010)**. Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? Thèse de doctorat. Université du Québec Trois-Rivières.
37. **Castellini C., 2008**, Comparaison des méthodes d'évaluations de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canines, et humaine. Thèse : 03-TOU 3-4108 à l'université Paul- Sabatier de Toulouse. p 37-44.

38. **Castellini C., Boiti C., Dal Bosco A., Lattaioli P. et Zampini D., 2003a**, Effet de la supplémentation en acides gras n-3 et vitamine E sur les caractéristiques de la semence de lapins d'âges différentes. In Proc. 10èmes Journées Recherche Cunicole, Novembre 2003, Paris, France, p 77-80.
39. **Castellini C., Cardinali R., Dal Bosco A., Minelli A. et Camici O., 2006**, Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 65, p 703–712.
40. **Castellini C., Cardinali R., Lattaioli P. et Dal Bosco A., 2005**, Comparison of different dietary sources of PUFA n-3 on semen characteristics of rabbit bucks. *Reprod. Dom. Animal.* (Abstr. 386), p180.
41. **Castellini C., Dal Bosco A., Cardinali R. et Mugnai C., 2004**, Effect of dietary α -linoleic acid on semen characteristics of rabbit bucks. In Proc. 8th World Rabbit Congress, September 2004, Puebla, Mexico, p 245-250.
42. **Castellini C., Lattaioli P., Dal Bosco A., Minelli A. et Mugnai C., 2003b**, Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Repro. Nutr. Dev.*, 43, p 91-103.
43. **Cattaneo L., Cicconi R., Mignogna G. et al.** Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLoS One*, 2015 ; 10(7)
44. **Chaftar, N., Girardot, M., Quellard, N., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frère, J. and Imbert, C. (2015)** Activity of six essential oils extracted from Tunisian plants against *Legionella pneumophila*. *Chem. Biodivers*, 12: 1565-1574.
45. **Chami. (2005)**. Oregano and clove essential oil induce surface
46. **Chikhoun, A., Stouvenel, L., Iguer-Ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Lorès, P., Wolf, J.P., Aissat, K., Auger, J., Vaiman, D. and Touré, A. (2015)** *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod. Biomed. Online*, 31: 411-420
47. **Chou J.P., Yi-Ch'uan L. et Chen-Ch'ao C., 1974**, Effect of heating on rabbit spermatogenesis. *Chin. Med. J.* 6, p 365-367.
48. **Cole H.H., Cupps P.T., 1977**, Reproduction in domestic animals, third edition, Academia Press, p 265, 290.
49. **Cook J.W., Taylor L.M., Orloff S.L., Landry G.J., Moneta G.L., Porter J.M. (2003)**. Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms. *Vascular Pharmacology*. 38: 293-300.

50. **Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. (1996)** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 73: 645-652.
51. **Davis B.K., 1974**, Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma. *J. Reprod. Fertile*, 41, p 241-244.
52. **Dayan F., Cantrell C.L., et Duke S.O. (2009)**. Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
53. **De Billerbeck K.V.G., Roques C., Vanière P., et Marquier P. (2002)**. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène*, 10(3), 248-251.-
54. **De Blas C., Wiseman J., 1998**, In: De Blas C., Wiseman J. (Eds). *The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, p 241-253.
55. **Deans et al., (1998)**. Chemical Composition, Antibacterial, and Antioxydatantive Activity of Laurel, sage, rosmariny, Oregano and Coriander Essentials Oils *J. Essent.Oil Res.* 10 P : 618.
56. **Deans et al., (1998)**. Chemical Composition, Antibacterial, and Antioxydatantive Activity of Laurel, sage, rosmariny, Oregano and Coriander Essentials Oils *J. Essent.Oil Res.* 10 P : 618.
57. **Decuadro-Hansen D, (2004)**. Chilled and frozen semen: the animal experience. Journée thématique de la SFEF, WEB : [www.em-consulte.com/en/article/27814].
58. **Decuadro-Hansen G., 2004**, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen: the animal experience, p 887-893.
59. **Degerman G., Kihlstrom J.E., 1961**, Brief cyclic variations in some sexual functions of the male rabbit. *Act Physiologica Scandinavia* 51, p 108-115.
60. Département fédéral de l'intérieur DFI **Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV** Santé animale 412/2014/
61. **Derivaux J., (1971)**. Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège. Edition Derouaux.-175p.
62. **Deutscher, G.H., Wells, M.E., et Battaglia, R.A. (2007)**. Evaluation of 33
63. **Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. and Skaltsa, H.D. (2007)**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.*, 43: 487-488

64. **-Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto., Rehder V.L.G and Delarmelina C.(2005).**Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
65. **Dubey R, Dubey K, Sridhar C. et Jayaveera K. N.,** (2011). Spem immobilization activity of aqueous, methanolic and saponins extract of bark of *Ziziphus Mauritiana*. Pelagia Research Library. Ed. *Der Pharmacia Sinica*, 2, 11-16
66. **-Duraffound C., Hervicourt L.et Lapraz J.C. (1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
67. **Ece, A. Gurkan, F. Celik, F, Boşnak, M. Yel, S. Balik, H. Erel, O. (2007).** Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clinical Biochemistry Journal*, Vol 40(9-10), pp. 634-639.
68. **Elmi, A., ventrella, D., Barone, F., Filippini, G., Benvenuti, S., Pisi, A., Scozzoli, M. and Bacci, M.L. (2017)***Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oils: *In vitro* effects and toxicity on swine spermatozoa. *Molecules*, 22: 2162.
69. **Fabiani R., Johansson L., Lundkvist O. et Ronquist G., 1995,** Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *European J. of Obstetrics gynecology and Reproductive Biology*, 58, p 191-198.
70. **Falières J., Esparbié J.et Saleil G., 2003,** Comparison de la production spermatique de trois souches de lapins: moyennes et variabilités. In Proc. 10èmes Journées Recherche Cunicole, Paris, France, p 81-84.
71. **Favier, A. (2006).** Stress Oxydant et pathologies humaines, *Annals of Pharmacotherapy SAGE Journal*, Vol 64, pp. 390-396.
72. **Fernandez X., Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. 2007,** pp. 3233-5, 10
73. **Fernandez X., Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. 2007,** pp. 3233-5, 10
74. **France-Ida J. (1996).** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*, 3 :5-6.
75. **France-Ida J. (1996).** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*, 3 :5-6.
76. **Francisco D.A.A., Luis F.A.R., 2003,** analyses of seminal quality tool in fertility experimental toxicology study. p 44-46.

77. **Frolich A., 1948**, Some factors affecting semen production in rabbits. Primo. Congo intern. Physiopat. Reprod animal Fecund. artif, Milano.
78. **Frömming, K.-H., Szejtli, J., (1994)**. Cyclodextrins in Pharmacy. Davies, J.E.D. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p.
79. **Gil, L., Mascaró, F., Mur, P., Gale, I., Silva, A., González, N., Malo, C. and Cano, R. (2010)** Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 91.
80. **Gogol P., Bochenek M. et Smora Z., 2002**, Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, p 92-95.
81. **González, N., Gil, L., Martinez, F., Malo, C., Cano, R., Mur, P. and Espinosa, E. (2010)** Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 88.
82. **Grasse P.P., 1971**, Traité de Zoologie : Tome 17, Fasc 6 : Mamelles, Appareil génital, Gamétogenèse, Fécondation, Gestation.- Paris : Masson et Cie.1156 p.
83. **Guinoiseau E. (2010)**. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse de Doctorat, Université de Corse, 114.
84. **Guinoiseau E. (2010)**. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse de Doctorat, Université de Corse, 114.
85. **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.
86. **Hafez E.S.E., 1960**, Sex drive in rabbits. Southwestern Veterinarian14, p 46-49.
87. **Hansen C., 2011-2012**, La propédeutique de l'appareil de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire service de Thériogénologie des animaux de production. p12-25.
88. **Hanzen Ch. (2008)**. Propédeutique de l'appareil génital mâle des ruminants. WEB:[http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R06_Propedeutique_male_2009_PWP.pf]
89. **Hemalatha S., Patel Dk, Kumar R, Prasad Sk (2011)**.Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. Asian Pac J Trop Biomed ; 1(1) : S131-S138

90. **Hiroe K., Tomizuka T., 1965**, Effets d'un environnement à température élevée sur la production de sperme chez les animaux domestiques. (Jap.) – Bulletin of the National Institute of Animal Industry, Japan N° 9, 27-3S.
91. **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., (2001)**. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
92. **-Isman M.B. (2000)**. Plant essential oils for pest ans dieseae management. *Crop protection*, 19(8), 603-608.
93. **-Isman M.B. (2000)**. Plant essential oils for pest ans dieseae management. *Crop protection*, 19(8), 603-608.
94. **Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. (2013)** Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Ind. Crops Prod.*, 48: 144-152.
95. **Knapp H.R., 1990**, Prostaglandins in human semen during fish oil ingestion, evidence for in vivo cyclooxygenase inhibition and appearance of novel therienoic compounds. *Prostaglandins*, 39, p 407-423.
96. **Kohen, R. & Nyska, A. (2002)**. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology: SAGE Journals*, Vol 30, pp. 620-650.
97. **Köse, E., Sarsilmaz, M., Meydan, S., Sönmez, M., Kuş, I. and Kavakli, A. (2011)** The effect of lavender oil on serum testosterone levels and epididymal sperm characteristics of formaldehyde-treated male rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 15: 538-542.
98. **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.
99. **-Kurita, Koike. (1982)**. Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils componements. *Agric. Biol. Chem.*, p 46-159-165.
100. **-Kurita, Koike. (1982)**. Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils componements. *Agric. Biol. Chem.*, p 46-159-165.
101. **-Lahlou M. (2004)**. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *phytotherapy research*, 18(6), 435-448.

102. **Laverdière F.**, Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., Dossier *Couplage*, 1999, pp.21.
103. **Lebas F.**, 1996, Document Cuniculture : Biologie des lapins. Recherche INRA. [En ligne].Accès internet : www.cuniculture.info/Docs/.../biologie-01.htm (page consulté le 23/03/2014).
104. **Leeson C.R., Leeson T.S.**, 1970, The postnatal development of the ductus epididymitis in the rabbit. *Canadian Journal of Zoology*48, p 1147-1153.
105. **Legrand.** (1978). Manuel préparatoire en pharmacie. 8^{ème} éd. Masson.
106. **Lemaoui A.**, (2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.l algérienne. Mémoire Magister, Université de Sétif, 100p.
107. **Lemberg.** (1982). « Armoise » *Artémisia herba alba*. *Perfumer flavorist*, 7, p58-63.
108. **Liu, Q., Duan, R.J., Zhou, Y.F., Wei, H.K., Peng, J. and Li, J.L.** (2017) Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen antioxidant status and semen quality parameters. *Andrologia*, 22: 1-8.
109. **-Lucchesi, 2005Ilboudo, 2009).**
110. **Luzi F., Maertens L., Mijen P. et Pizzi F.**, 1996, Effect of feeding level and dietary protein on libido and semen characteristics of bucks. In Proc. 6th World Rabbit Congress, July 1996, Toulouse, France, vol. 2, p 87-92.
111. **M.Culvier et al.**, (1996). Sage and Rosmary Phenolic Antioxydants, *JAOCS*.Vol(73), n°5.
112. **Makhloufi .A** ; « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant a l'état spontané dans la région de Bechar (*matricariapubescens* (desf.) Et *Rosmarinus officinalis* l) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; université d'Aboubaker belkaid.
113. **Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martinez, F., Cano, R., De Blas, I. and Espinosa, E.** (2010) Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61: 142-147.
114. **Mann T., Lutwak-Mann C.**, 1981, Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: Mann T., Lutwak-Mann C.

- (Eds.), Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p 269-326.
115. **Martinet L., 1973**, Quelques aspects de la physiologie de la reproduction du lapin. Conférence, Session ITAVI Toulouse, sept.
 116. **May D., Simpson B. et Kathleen., 1975**, Reproduction in the rabbit. Animal Breeding Abstracts vol. 43, n° 6, p 253-261.
 117. **Mazur P., (1984)**. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 247 C125-42.
 118. **Mercier P. et Rideaud P., 199**, Bactériologie du sperme frais de lapin. Prod. Anim., 3(3), p 215-221.
 119. **Mocé E., Lavara R., Lavara F. et Vicente J.S., 2000**, Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line selected with high growth rate. In Proc. 7th WorldRabbit Congress, Valencia, Spain, Vol. A, p 197-201.
 120. **Mocé E., Vicente J.S., Lavara R., Viudes De Castro M.P., Lopez M. et Bolet G., 2005**, Characteristics of fresh semen from eight rabbit breeds. Reprod. Domest. Anim., 40, p 388- 398.
 121. **Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006)**. Antioxidant and antimicrobial activities of rose-mary extracts linked to their polyphenol composition. Free. Radic. Res., 40: 223-231.
 122. **Moretti M.D., Sanna-Passino G., Demontis S. et al.** Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. AAPS PharmSciTech, 2002 ; 3(2):E13
 123. **Mukherjee B.P., Johari, 1951**, The Gelatinous Mass in Rabbit Semen. ISSN: 0028-0836. Volume 168. p 422-423.
 124. **Neffar. F et Benabderahmane.Z** ; « Quantification des Huiles Essentielles dans deux Espèces de Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de Djebel Metllili (Batna) »; Revue Agriculture ; université d'El hadj Lakhdar de Batna ; 2013.
 125. **-Newman A.A., Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Academic Press, London, New York, 1972**
 126. **O'Bryan M.K., Schlatt S., Phillips D.J., De Kretser D.M. et Hedger M.P., 2000**, Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. Endocrinol., 141, p 238-246.

127. **Ollier, C. 2011.** Le conseil en phytothérapie. 2ème édition. PRO-OFFICINA. 178p
128. **Orgebin – Crist J., 1968,** qeprod. Fertil. 15 : S.
129. **Outaleb, T., Hazzit, M., Ferhat, Z., Baaliouamer, A., Yekkour, A., Zitouni, A. and Sabaou, N. (2015)** Composition, antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *J. Essent. Oil. Bear. Pl*, 18: 654-665.
130. **Paris et al., (1993).** Effect of Carnosolic Acid Products. Vol 56, N°8, P1426.
131. **Partyka Agnieszka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski.(2012).** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77, pp1497–1504.
132. **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.
133. **-Pibiri Cécille M.,** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, **2006.**
134. **Pons-Rejraji. H, B. Sion, F. Saez, F. Brugnon,L. Janny etG. Grizard.** (2009). Rôles des dérive's actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, pp 529–535.
135. **Rameau. J.C et Dumé.G ;** « Flore forestière française: Région méditerranéenne » Edition Forêt privée française ; 2008; pp 897.
136. **Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S. and Mikov, M. (2014)** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.*, 14: 225
137. **Ratnam, VD. Ankola, DD. Baradwaj, V. Sahana, DK. Ravi Kumar, MNV.** (2006). Role of antioxidants in Sciences, Vol 81, pp. 895-905.
138. **Rhayour K.,** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de Doctorat, 2002, pp.9,10,17.
139. **Robin G., 1988,** Reproduction des mammifères d'élevage.-Paris : Ed. FOUCHER.-237p.- (collection INRAP).
140. **Roger T., 2002,** Anatomie comparée des Animaux de Laboratoire.- Lyon : ENV. p 20.

141. **-Roux D. et Catier O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Wolters Kluwer Fran-Vila R., Mundina M., Tomi F., Fursan R., Zacchino S., Casanova J., Canigüeral S., Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, Vol. 68, **2002**, pp. 164-167.
142. **Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Gui J et ai (2007).** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants.
143. **Sanchez Chopa C., Descamps L.R.** Composition and biological activity of essential oils against *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae) cereal crop pest. *Pest Management Science*, 2012 ; 68 ; 1492-1500
144. **Satyral, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters R.L., Awadh, A.N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A., and Setzer, W.N. (2017)** Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, 6: 20.
145. **Satyral, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters R.L., Awadh, A.N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G. and Setzer, W.N. (2017).** Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, 6: 20.
146. **Sauveroche, B. ; Wagner, R.G., (1993).** Physiologie de la reproduction des bovins trypanotolérants : synthèse des connaissances actuelles. Rome : FAO, 1993.- 149p.- (Etude FAO Production et Santé animales " 112.
147. **Sebbagh M., 1983,** Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*) à des températures élevées en corrélation avec la régulation thermique, le comportement alimentaire et le fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique.- Thèse : Méd vét : Dakar ; p 32 - 33.
148. **Stegmayr B., Ronquist G., 1982,** Stimulation of sperm progressive motility by organelles in human seminal plasma. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 16:p 85-90.
149. **Szejtli, J., (1988).** Cyclodextrin Technology. Davies, J.E.D (Ed.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 450 p. Szente,
150. **Tak J-H., Jovel E., Isman M.B.** Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 2016 ; 72 (3) ; 474-80

151. **Theau-Clément M., Brun J.M., Sabbioni E., Castellini C., Renieri T., Besenfelder U.,**
152. **Touazi L., B. Aberkane, Y. Bellik B. N. Moula and M. Iguer-Ouada.** (2018). Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage. Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/4.pdf].
153. **Türk, G., Çeribaşı, A.O., Şimşek, Ü.G., Çeribaşı, S., Güvenç, M., Özer Kaya, Ş., Çiftçi, M., Sönmez, M., Yüce, A., Bayrakdar, A., Yaman, M. and Tonbak, F.** (2016) Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Anim. Reprod. Sci.*, 164: 133-143.
154. **Valet.** (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO Production et Santé Animale, 83 : 231 epididymal sperm by the cannulation technique and effects of in vivo storage I Angus bulls. *Journal of animal science*, 39 (36), 1136-1143.
155. **-Valnet J.** (2000). Aromathérapie. Ed. Maloine S. A. alteration of *saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8. ce, 146.
156. **Van Praag E., 2002,** Appareil reproducteur mâle du lapin et Orchidectomie (castration chirurgicale)., http://www.medirabbit.com/FR/Skin./Fusobacterium_fr.pdf (page consulté le 26/03/2014).
157. **Walter M.R., Martinet L. et Moretb, Thibault C., 1968,** Régulation photopériodique de l'activité sexuelle chez le lapin mâle et femelle. *Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie normales et expérimentales*, Tome SI, Fasc.1/8, 77S-780.
158. **Weckesser et al.** (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (In press).
159. **Welsch U., 2002,** Précis D'histologie. Cytologie, Histologie, Anatomie Microscopique.- Tournai (Belgique) : éd Médicales internationales.- 260 p.
160. **Yamamoto Y., Shimamamoto K., Sofukitis N. et Miyagawa I., 1999,** Effect of hypercholesterolemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. *Human Reprod.*, 14, p 1516-1521.
161. **Zeghad.N ;** « Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur

activité antibactérienne » ; thèse de magistère, université de Mentouri ; Constantine ; 2009.

162. **Zermane.A** ; « Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes agroalimentaires »; thèse de doctorat, université de Mentouri ; Constantine ; 2010.

163. **Zhang Z., Bian L., Sun X. et al.** Electrophysiological and behavioural responses of the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) to volatiles from a non-host plant, rosemary, *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Pest Management Science*, 2015 ; 71 ; 96-104