

République
Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

***L'évaluation de l'effet préservateur de l'huile essentielle de
Rosmarinus officinalis sur la semence caprine après
cryoconservation***

Soutenu le 01 /10/2020

Présenté par : FERIH HOUCINE

Devant le Jury :

Mr KHELAF.D	Professeur	ENSV	Présidente
Mr ADEL.D	MCB	ISVB	Examineur
Mr KAIDLR	Professeur	ISVB	Promoteur
Mr KALEM.A	MCB	ISVB	Co-promoteur

Au nom d'ALLAH
Le tout puissant et le très miséricordieux par
La grâce du quel nous avons pu réaliser ce travail que je dédie :
A ma chère maman
Qui n'a jamais arrêté de m'encourager
Merci pour toute l'énergie dépensée à la réalisation de mes rêves,
Merci d'avoir toujours cru en moi,
Merci pour ton amour que j'ai souvent mis à l'épreuve,
Je t'aime de tout mon coeur.
A mon oncle Mouhamed
Au meilleur oncle que l'on puisse rêver avoir,
Pour avoir toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments et pour m'avoir
toujours encouragé.
Merci d'être toujours là pour moi, je t'aime énormément mon chère « SIDI »
A mes soeurs et mon frère
Dalel, Hasnaa , Amel et Hsen
Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble
A mes cousins spécialement Sidali
A toutes mes cousines spécialement Samia, Lila, Fatiha
A ma belle soeur Dalila
A mes beaux frères
A mes nièces Hadil , Malek , Joumanah, Yasmine , Mariya , Ania spécialement Salma
A mes amis
Hommage a ma grande
mere Rabi Yerhamha

Introduction	2
Partie bibliographique	3
Chapitre I : Physiologie de la reproduction du bouc	3
I. Physiologie de la reproduction.....	3
1. Performances de la reproduction.....	3
1.1. Maturité et comportement sexuel.....	3
1.2. Production du sperme.....	3
1.2.1. Définition du sperme.....	3
1.2.2. Spermatogénèse.....	4
a. Spermatogénèse.....	4
b. Méiose.....	5
c. Spermiogénèse.....	5
1.2.3. Régulation hormonale de la fonction sexuelle.....	5
1.2.4. Aspects spécifiques de la reproduction chez le bouc.....	6
1.3. Facteurs de variations du comportement sexuel.....	7
1.3.1. Facteurs environnementaux.....	8
a. La saison.....	8
a.1. La circonférence scrotale.....	8
a.2. Le comportement sexuel.....	9
a.3. Les glandes annexes.....	9
a.4. Variations saisonnières de l'activité sécrétoire.....	9
b. La photopériode.....	10
c. Effet thermique.....	11
d. l'alimentation.....	12
1.3.2. Facteurs internes.....	12
II. Collection et évaluation de la qualité spermatique.....	12
1. Collection du sperme.....	12
1.1. Sperme épидидymaire.....	12
1.2. Sperme éjaculé.....	13
1.2.1. Collection au vagin artificiel.....	13
2. Evaluation de la qualité spermatique.....	13
2.1. Examen macroscopique.....	13
2.1.1. Volume.....	13
2.1.2. La couleur du sperme.....	14
2.1.3. La consistance et l'aspect du sperme.....	14
2.2. Examen microscopique.....	14
2.2.1. La concentration.....	14
a. Comptage direct par hématimètre.....	14
b. La spectrophotométrie.....	15
2.2.2. La motilité massale.....	15
2.2.3. La motilité individuelle.....	15
2.2.4. Etude de la morphologie spermatique.....	16
a. Coloration totale.....	16

b. Coloration vitale.....	16
2.3. Examen biochimique.....	16
2.3.1. La mesure du pH.....	16
2.3.2. Le test de fructolyse.....	17
2.3.3. La réduction du bleue de méthylène.....	17
2.3.4. La thèrmorésistance.....	17

Chapitre II : Conservation de la semence et stress oxydatif

I. Conservation de la semence du bouc	18
1. Le lavage de la semence.....	18
2. Les techniques de conservation de la semence du bouc.....	18
2.1. La dilution de la semence.....	18
2.2. Conditionnement de la semence.....	19
3. La conservation proprement dite.....	22
3.1. Conservation a l'état liquide.....	22
3.2. Conservation a l'état congelé.....	22
II. Stress oxydatif	25

Chapitre III : Potentiel des huiles essentielles sur la préservation des spermatozoïdes caprine

I. Généralités	27
1. Méthodes d'extraction	27
1.1. Hydrodistillation.....	27
1.2. Distillation par entrainement a la vapeur d'eau.....	27
2. Méthodes d'analyses.....	27
3. Composition chimique.....	28
4. Toxicité.....	28
5. Solubilisation des huiles essentielles.....	29
II. Etude bibliographie et botanique de Rosmarinus officinalis.....	29
1. L'importance de la famille des Laminacae.....	29
2. Définition.....	30
3. Description botanique.....	30
4. Pouvoir potentiel de Rosmarinus officinalis sur les différentes activités.....	31
4.1. Activités antimicrobiennes.....	32
4.2. Activités antifongiques.....	32
4.3. Activités antivirales.....	32
4.4. Activités ovicides.....	32
4.5. Activités antioxydantes.....	33
4.6. Effets anti-hépatotoxiques.....	33
III. Interactions huile essentielle de Rosmarinus officinalis-spermatozoides.....	33
1. Effet protecteur.....	33
2. Effet spermicide.....	33

Méta-analyse des données

I. Objectifs.....	34
II. Matériels et méthodes.....	35
1. Partie théorique.....	35
1.1. Protocole expérimental.....	35
1.2. Nature des données	35
1.3. Critères d'inclusion.....	36
1.4. Critères d'exclusion.....	36
1.5. Classification des données.....	37
III. Résultats et discussion.....	38
1. La molécule.....	38
2. L'espèce.....	38
3. Les voies d'administration.....	39
4. Aperçu sur les protocoles expérimentaux adoptés pour chaque étude.....	39
4.1. La voie alimentaire.....	40
4.1.1. Huile essentielle (R.O).....	40
4.1.2. Extrait de plante du romarin.....	40
4.1.3. Acide rosmarinique.....	40
4.2. In vitro.....	40
4.2.1. Huile essentielle (R.O).....	40
4.2.2. Extrait de plante du romarin.....	41
4.2.3. Acide rosmarinique.....	42
5. Présentation des résultats et discussion	42

Conclusion et recommandations.....	45
---	-----------

ABP : Androgen binding protein

CPG : chromatographie en phase gazeuse

FIV: fécondation in vitro

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GOT : glutamic oxaloacetic transaminase

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone

Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

KCl : chlorure de potassium

LDL : low density lipoprotein

LH : Hormone lutéinisante

NaCl: chlorure de sodium

PEG: polyethylene glycol

PGF2 alpha: prostaglandine

Tris: 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

v/v : volume/volume

Figure 01 : Structure d'un spermatozoïde.....	04
Figure 02 : Conditionnement de la semence.....	21
Figure 03 : Schéma d'une paillette d'insémination artificielle.....	21
Figure 04 : Le romarin.....	30
Figure 05 : Recherche et classification des données.....	37
Figure 06 : Représentation des pourcentages de l'utilisation de l'huile essentielle (R.O), extrais de plante de romarin et acide rosmarinique libre et en combinaison.....	38
Figure 07 : Représentation des espèces incluses.....	39
Figure 08 : Résumé des différentes voies utilisées pour chaque molécule et chaque espèce.....	39




Tableau 01 : Notion de la mobilité massale dans l'espèce caprine.....15

Tableau 02 : Présentation de la nature des données.....36

En Algérie, la médecine traditionnelle a toujours eu sa place parmi nos ancêtres. En se basant sur la phytothérapie, nos grands-parents ont su choisir la bonne plante pour chaque trouble. Après avoir mené des études scientifiques approfondies sur les vertus de ces plantes, les scientifiques attestent des effets bénéfiques des plantes médicinales.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet conservateur des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* contre les dommages causés par le gel et la décongélation.

Dans cette revue bibliographique, nous avons analysé les travaux d'auteurs consacrés à l'effet de la supplémentation en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, l'extrait végétal de romarin et d'acide rosmarinique dans la préservation des caractères morpho-cyto-physiologiques. et l'amélioration des performances de reproduction en plus de son effet protecteur contre le stress oxydatif chez différentes espèces.

Les résultats de l'effet de l'action normale du romarin sous toutes ses formes, ont montré une amélioration des paramètres du sperme, donc une protection contre les agents de stress.

Ces résultats suggèrent que le romarin et ses dérivés peuvent avoir des actions repro-protectrices potentielles contre le stress oxydatif et des effets stimulants sur la fertilité masculine.

Mots clés: Romarin, huile essentielle, extrait de plante, acide rosmarinique, cryoconservation, royal, reproduction, fertilité, sperme, bouc de chèvre.

In Algeria, traditional medicine always had its place among our ancestors. Based on herbal medicine, our grandparents knew how to choose the right plant for each disorder. After carrying out in-depth scientific studies on the virtues of these plants, scientists attest to the beneficial effects of medicinal plants.

The objective of this study is to determine the preservative effect of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* against damage caused by freezing and thawing.

In this bibliographic review, we have analyzed the work of authors devoted to the effect of supplementation with the essential oil of *Rosmarinus officinalis*, the plant extract of rosemary and rosmarinic acid in the preservation of morpho-cyto-physiological characters. and improving reproductive performance in addition to its protective effect against oxidative stress in different species.

The results of the effect of the normal action of rosemary in all its forms, showed an improvement in sperm parameters, thus protection against stress agents.

These results suggest that rosemary and its derivatives may have potential repro-protective actions against oxidative stress and stimulatory effects on male fertility.

Keywords: Rosemary, essential oil, plant extract, rosmarinic acid, cryopreservation, royal, Reproduction, Fertility, Sperm, billy goat.

Cyodamage

هن

بفا

Rosmarinus officinalis

بفا
officinalis .

پر Rosmarinus

بفا

بفا

هظاً

بفا

بفا

:

پر

Les ovins et caprins représentent 56% de la population domestique mondiale de ruminants avec 1178 millions de moutons et 1000 millions de chèvres sur un total de 3,872 millions de têtes (FAOSTAT, 2013). Dans certaines régions dans le monde, la chèvre reste l'animal qui joue un rôle primordial dans l'alimentation des populations, et la valeur de la chèvre s'est avérée capitale, lors des grandes famines qui ont sévi dans le monde et en particulier dans le continent africain (Gourine, 1989).

En Algérie l'élevage caprin compte parmi les activités agricoles les plus traditionnelles associées à l'élevage ovin, cette population reste marginale et ne représente que 13% du cheptel national (Fantazi, 2004).

Avec une production de 1750000 tonne de viande et 2377000,000 millions litres de lait (F.A.O, 2014), l'Algérie ne couvre pas les besoins croissants de sa population. Cette situation qui a poussé l'état à importer des chèvres performantes (la Saanen, l'Alpine.....etc.), sans pour autant tenir compte, des problèmes d'alimentation, et d'adaptabilité de ces animaux à l'égard des conditions de l'environnement, a fait que ces essais aboutissent à l'échec.

La situation de la production caprine algérienne rend indispensable d'entamer un travail de renforcement de la filière et de son efficacité technico-économique, en se basant en premier lieu sur l'augmentation de la productivité numérique d'animaux de « bonne qualité génétique» par l'amélioration des performances de reproduction. À cet objectif la biotechnologie de la reproduction apparait comme solution pouvant aider à une meilleure maîtrise de la production.

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.

La conservation de la semence fraîche ou congelé réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leur réserves énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement. En revanche, des altérations membranaires sont observées, 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 et lutter contre ces cryodommages, de nombreuses études portées sur la recherche de nouvelles alternatives qui pourront être utilisées dans les milieux de conservation du sperme. Dans ce sens, les huiles essentielles (HE) et leurs constituants peuvent être très efficaces contre une grande variété d'oxydants et de micro-organismes. (Elmi et al., 2017).

Rosmarinus officinalis est connu comme un riche de polyphénols et d'huiles volatiles, y compris des molécules telles que les acides carnosique, rosmarinique et camphre. Ces composés présentent divers activités biologiques notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, et propriétés anti cancérogènes (Touazi.L et al., 2018)

Le but de la présente étude, est d'évaluer l'effet de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur la préservation des caractères morpho-cytophysiologiques des spermatozoïdes du bouc après cryoconservation et ceci en analysant la qualité de la mobilité des spermatozoïdes et leurs intégrité membranaire.

la première partie de ce mémoire est dédiée à la littérature sur le sujet, avec un premier chapitre consacré pour des notions sur la physiologie de la reproduction du bouc et un second

qui se charge de la conservation du sperme, enfin un troisième chapitre qui traite les huiles essentielles et leurs interaction avec le sperme. La deuxième partie sous forme d'une méta-analyse de 40 article dont 20 article qui font l'objet de notre étude.

Chapitre I :

La physiologie de reproduction du bouc

I. Physiologie de la reproduction :

1. Performances de la reproduction :

1.1. Maturité et comportements sexuels :

L'initiation du comportement sexuel chez le jeune bouc, qui se manifeste notamment par le flairage et les tentatives de saut, apparaît à des âges variables allant de quelques semaines (races européennes) à un an pour d'autres races. De ce fait, la maturité sexuelle peut apparaître à des âges très différents entre individus, qui vont de 4-8mois à 1-4 ans selon qu'ils appartiennent à des races plus ou moins précoces (Lall 1947, Elwisy et Elsawaf 1971).

Chez le mâle adulte, la motivation et l'efficacité sexuelle dépendent à la fois des sécrétions hormonales et des relations sociales entre les animaux. Le début de la saison sexuelle est précédé par une augmentation des hormones androgènes d'origine testiculaire (Hoffman *et al* 1972), révélée par une spectaculaire augmentation de la concentration plasmatique de testostérone (Saumande et Rouger 1972). La motivation et l'efficacité sexuelle d'un bouc à l'intérieur d'un groupe d'animaux peuvent être modulées par une compétition basée sur des relations hiérarchiques de dominance. L'environnement social (présence de partenaires de même sexe ou de sexe opposé) joue aussi un rôle important pour faciliter la pleine expression du comportement sexuel chez le mâle (Rouger 1974), en interaction avec des facteurs tels que la nutrition ou la saison (Walkden-Brown *et al* 1994a).

1.2. Production de sperme

1.2.1. Définition du sperme :

Le sperme est un liquide biologique animal complexe expulsé du corps (mâle) lors de l'éjaculation. Il varie d'une espèce à une autre et dans la même espèce sa mobilité est différente d'un individu à un autre, avec un volume qui varie selon les espèces, et même dans l'espèce. Dans ce dernier cas, il sera en rapport avec l'état physiologique du mâle, l'individu, la race, le développement corporel, le nombre de saillies ou de récolte et la méthode de récolte ainsi la saison, dont il est au sommet dans la saison de reproduction chez le bouc (Leboeuf *et al.*, 2003).

Chez le bouc, le sperme apparaît comme un liquide épais, crémeux et inodore avec une viscosité plus élevée que celle du taureau (Vaissaire, 1977). Le bouc a un sperme très concentré mais peu abondant dont le volume est de 1ml et la concentration est de $3,5 \times 10^9$ spz/éjaculat (Dérivaux, 1971 ; Hafez, 1974). Chez le jeune de 7 à 10 mois, le volume peut osciller entre 0,2 et 0,5ml et de 0,6 à 2ml chez le bouc adulte (Setchell, 1977 ; Corteel, 1988). Le sperme est composé de 90% de liquide séminal et de 10% de cellules reproductrices: les spermatozoïdes (SPZ) (Jumeau., 2015). Ces gamètes sont des cellules différenciées responsables du transport de l'information génétique dans le tractus génital femelle et de sa délivrance à l'intérieur de l'ovocyte. Morphologiquement, le SPZ des mammifères est divisé en deux parties : la tête qui comprend l'acrosome et le noyau cellulaire, le flagelle qui comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Ponthier et al., 2014) (**Figure 01**).

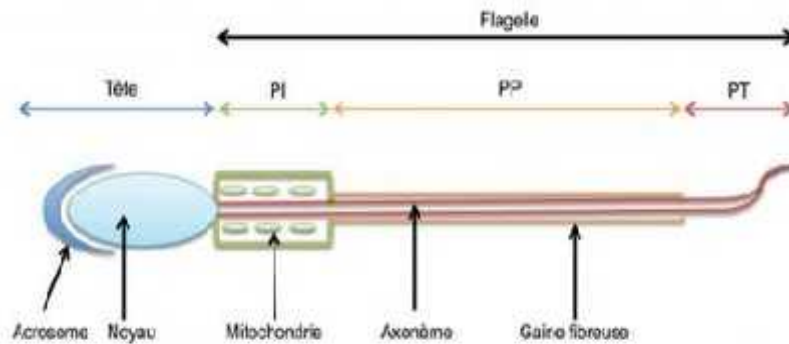


Figure 01 : Structure d'un spermatozoïde (Jumeau., 2015).

1.2.2. Spermatogénèse :

Les spermatozoïdes sont produits dans les tubes séminifères dans le parenchyme testiculaire. La production spermatique comprend plusieurs étapes des cellules souches aux spermatozoïdes

a. Spermatogénèse

La spermatogénèse proprement dite est l'étape de prolifération des cellules souches (Spermatogonies) par mitose pour conserver un stock constant de cellules, jusqu'à leur différenciation en spermatides. Les spermatogonies sont disposées en périphérie de l'épithélium séminal et entre les cellules de Sertoli avec lesquelles elles ont un contact étroit. Régulièrement, des spermatogonies rentrent en phase de différenciation pour donner des spermatocytes de premier ordre (spermatocytes I).

b. Méiose

Les spermatocytes I répliquent leur ADN avant de rentrer en méiose. C'est au cours de cette étape que le phénomène de crossing-over se produit, permettant l'échange de portions de chromosomes entre les chromosomes homologues paternels et maternels. Cela concourt au brassage des gènes caractéristique de la reproduction sexuée. La première division de méiose réduit le nombre de chromosomes et donne des spermatocytes de deuxième ordre (spermatocytes II). Ils subissent rapidement la deuxième division de méiose qui sépare les deux chromatides de chaque chromosome pour donner des cellules haploïdes : les spermatides.

c. Spermiogénèse

La spermiogénèse est l'étape de différenciation cytoplasmique : les spermatides se transforment en spermatozoïdes avec de nombreuses modifications structurales et chimiques.

On distingue quatre phases : la phase de golgi, du capuchon, de l'acrosome et de maturation.

Les vésicules golgiennes fusionnent et se concentrent sur la partie antérieure du noyau pour donner l'acrosome. Les centrioles s'orientent à l'opposé de l'acrosome pour donner naissance au flagelle. Les mitochondries se disposent en anneau autour des filaments du flagelle tandis que le cytoplasme résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli sous forme d'une gouttelette cytoplasmique (Derivaux et Ectors 1985). Chez le bouc, la durée du cycle spermatogénétique est estimée à 50.7 jours : 36.9 jours pour la spermatogénèse et 13.8 jours pour la spermiogénèse (Derashri et al. 1992).

1.2.3. Régulation hormonale de la fonction sexuelle

Les principales hormones impliquées dans la régulation de la fonction sexuelle chez le bouc ont plusieurs origines : testiculaire, hypothalamo-hypophysaire et épiphysaire.

La testostérone est synthétisée par les cellules de Leydig. Elle contrôle les caractères sexuels spécifiques du mâle. La spermatogénèse, les sécrétions des glandes annexes et le comportement sexuel sont directement sous son influence. Elle régule également les caractères sexuels secondaires (développement musculaire, odeurs...).

Les cellules de Sertoli produisent l'inhibine et l'ABP (Androgen Binding Protein) qui se lie à la testostérone et la transporte vers l'épididyme. Le rôle de l'ABP n'est pas encore totalement élucidé.

La GnRH est produite par l'hypothalamus sous l'action des facteurs environnementaux, en particulier la photopériode. L'épiphyse synthétise et sécrète la mélatonine pendant les périodes d'obscurité. La sécrétion de mélatonine influe sur la libération de LH (stimulée en jours courts et inhibée en jours longs) (Chemineau et Delgadillo 1994). La GnRH stimule la synthèse et la libération de FSH et de LH par l'hypophyse. Ces dernières agissent au niveau du testicule : FSH active la spermatogenèse et la production par les cellules de Sertoli, d'inhibine et d'ABP. LH stimule la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig (Derivaux et Ectors 1985). L'antéhypophyse, sous le contrôle de l'hypothalamus, produit la prolactine(PRL) qui exerce son action sur les cellules de Leydig en augmentant la synthèse de testostérone, en augmentant le nombre de récepteur à LH et en favorisant la fixation de LH sur ses récepteurs (Dadoune et Demoulin 2001). De nombreuses autres hormones comme les hormones thyroïdiennes, surrénaliennes, pancréatiques interviennent aussi dans la régulation des fonctions testiculaires directement ou indirectement (Dadoune et Demoulin 2001).

1.2.4. Aspects spécifiques de la reproduction chez le bouc.

✓ Puberté

La maturité sexuelle est définie comme la production des premiers éjaculats de bonne qualité. Elle est marquée par l'acquisition du comportement sexuel, l'augmentation des synthèses de testostérone et de LH, le début des sécrétions des glandes annexes, le démarrage de la spermatogenèse et finalement l'émission des premiers éjaculats. Parallèlement à ces modifications, les glandes annexes et les organes liés à la fonction sexuelle augmentent de taille.

Le suivi régulier des concentrations hormonales sur des chevreaux de race Alpine, montre une augmentation lente de la testostéronémie au cours des deux premiers mois de vie, puis une élévation importante corrélée à une augmentation rapide de la taille des testicules et du poids de l'animal, pendant les deux mois suivants. A quatre mois, la testostéronémie est équivalente à celle mesurée chez des boucs adultes en saison sexuelle (Corteel 1994). Parallèlement à ce processus, on assiste à une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et de FSH. Les premiers comportements sexuels du chevreau (flairage de la vulve, coup de patte, chevauchement...) (Corteel 1994).

L'éjaculation des premiers spermatozoïdes marque le passage de l'état pubertaire à la maturité sexuelle (production des premiers éjaculats de bonne qualité) permettant l'utilisation des animaux pour la reproduction. L'âge de la puberté varie en fonction de la saison de mises-bas.

Les chevreaux nés au printemps ont une puberté plus précoce que ceux nés en automne, en relation avec la saison sexuelle (Corteel 1981).

✓ Saisonnalité

Sous nos latitudes, les caprins présentent une activité sexuelle saisonnée. La période de reproduction débute en été (juin), se poursuit en automne et jusqu'au début de l'hiver.

Chez les boucs de races européennes, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la production de semence (volume et concentration) varient au cours de l'année sous l'influence de la photopériode (Corteel 1981). La qualité des éjaculats est aussi affectée par la saison : le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la motilité des spermatozoïdes sont plus élevés durant la saison sexuelle (Delgadillo Sanchez 1990). Les variations saisonnières de l'activité sexuelle sont contrôlées par la durée de sécrétion de la mélatonine superposable à la durée de la nuit. Elle agit sur la sécrétion de GnRH et donc sur la fonction de reproduction. Un traitement photopériodique, avec une alternance de 2 mois de jours courts (8h de lumière) et 2 mois de jours longs (16h de lumière) permet de supprimer les variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le mâle, bélier ou bouc (Delgadillo Sanchez 1990).

1.3. Facteurs de variation du comportement sexuel :

La plupart des animaux domestiques des zones tempérées présentent des variations saisonnières de leurs activités sexuelles de reproduction, celles-là sont plus ou moins marquées selon les espèces ; les bovins et les porcins ne manifestent relativement qu'une faible saisonnalité, alors que les équins et surtout les petits ruminants ont des périodes d'arrêt complet de leur reproduction (Ortavant et al., 1985).

Pour maîtriser au mieux l'expression de cette activité, il est nécessaire de connaître les facteurs susceptibles de l'influencer et qui peuvent être classés de la manière suivante:

- ✓ Facteurs environnementaux physiques et sociaux tels le : la photopériode, la saison, la température, la structure du groupe et l'état nutritionnel notamment.

- ✓ Facteurs internes : le taux des hormones stéroïdes, les races, les différences intra raciales et individuelles.

1.3.1 Facteurs environnementaux :

Dans les conditions naturelles, l'animal est soumis, en permanence, aux aléas du milieu par ses diverses composantes climatique, alimentaire, sociale. Celui-ci joue un rôle déterminant sur les performances de reproduction (Colas et al., 1986).

a. La saison :

L'importance de l'effet de la saison dépend de la latitude : plus on est proche de l'équateur moins les variations sont importantes. La durée de la saison sexuelle varie inversement avec latitude. Dans les pays tempérés, les caprins manifestent d'importantes variations saisonnières de l'activité sexuelle. Dans les deux sexes, l'activité sexuelle maximale s'étend généralement d'août à janvier tandis que la période d'activité minimale s'étend de février à juillet (Hanzen Ch., 2005).

Les variations se manifestent par une diminution de l'intensité du comportement sexuel, de la production spermatique en quantité et en qualité, entraînant des baisses plus ou moins importantes de fertilité et de prolificité dans les troupeaux (Thimonnier J., 1996; Chemineau et al. 1998).

a.1. La circonférence scrotale :

Chez le bouc, la circonférence scrotale est étroitement corrélée au poids du corps, ainsi qu'au nombre total de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. La mesure de cette circonférence constitue la méthode indirecte la plus simple et la plus efficace pour l'estimation du volume testiculaire et de la production des spermatozoïdes. En effet, les mâles dont la circonférence scrotale est la plus grande ont des testicules plus développés (Hochereau-DeRevier, 1979 Berndston et al., 1987).

La circonférence scrotale est influencée par plusieurs facteurs dont les principaux sont : la saison, le poids corporel, la race, l'alimentation et l'environnement climatologique (Autef et al., 1997). La circonférence scrotale est un élément prédictif du moment de l'apparition de la puberté dont la valeur est supérieure à celle de l'âge ou du poids et cela quel que soit la race de l'animal (Dumont, 1997; Hanzen, 2005).

a.2. Le comportement sexuel :

l'intensité du comportement sexuel diminue pendant le printemps chez le bouc en l'absence d'un entraînement régulier, les montes et les saillies s'arrêtent chez presque tous les animaux pendant quelques semaines ou mois au cours du printemps/été tandis qu'un entraînement régulier atténue ces variations (Baril et al., 1993).

a.3. Les glandes annexes :

Peu d'informations sont rapportées sur l'activité des glandes annexes en fonction de la saison. Pelletier et Ortavant (1970), ont observé une évolution saisonnière dans le poids des glandes séminales caractérisée par une augmentation graduelle à partir du mois de mars et l'atteinte d'un maximum au mois de juillet. Les valeurs restent élevées jusqu'au mois de septembre puis commencent à décroître pour atteindre des valeurs minimales en février

a.4. Variation saisonnière de l'activité sécrétoire

Les changements de sécrétion des hormones gonadotropes sont à l'origine d'une alternance entre périodes d'activité et d'inactivité sexuelle (Karsch et al., 1984). Chez le bouc alpin, le niveau de base de LH, la fréquence des pulses, leurs amplitudes et la concentration de LH sont faibles de janvier à mai. L'amplitude des pulses augmente régulièrement en juin, juillet et août, puis leur fréquence augmente brusquement en septembre tandis que leur amplitude diminue à cause de la réaction inverse entre fréquence et amplitude, mais aussi probablement sous l'influence de la testostérone sécrétée en grande quantité. Cette augmentation plasmatique de la LH et de la testostérone en août et en septembre est suivie d'une diminution progressive de la concentration de la LH jusqu'en janvier, puis le cycle annuel recommence (Chemineau et Delgadillo, 1994).

L'augmentation de la LH (amplitude en juin / juillet, fréquence en septembre) entraîne le début de la croissance testiculaire (juillet / août) puis la libération de la testostérone (septembre) qui stimule le comportement sexuel (augmentation du nombre de saillies par test de comportement et diminution de la latence à l'éjaculation) et la qualité de la semence (octobre). Par ailleurs, la testostérone est à l'origine de la modification de l'odeur des boucs pendant la saison sexuelle (Zarrouk et al., 2001). Donc, le pic de l'activité sexuelle coïncide avec l'augmentation de la testostérone plasmatique se produisant au cours de l'automne (Jainudeen et al., 2000).

b. La photopériode :

Les variations annuelles de la durée du jour ou photopériode sont responsables de l'alternance entre une saison sexuelle et une saison de repos sexuelle chez la plupart des espèces animales. Le contrôle photopériodique de la reproduction, selon la durée photopériodique peut exercer une action stimulatrice ou inhibitrice sur l'activité de reproduction. Toutefois l'animal, en l'absence d'information photopériodique, exprime un rythme endogène de reproduction. Et, dans les conditions naturelles, le rôle principal de la photopériode semble être de synchroniser ce rythme interne : c'est le rythme circannuel de reproduction (Malpauet al., 1996; Thimonnier J., 1996).

Chez les caprins, les jours dits courts sont stimulateurs de l'activité sexuelle et les jours longs sont inhibiteurs (Chemineau et al., 1996).

✓ Jours courts : en général, moins de 12 heures d'éclairement quotidien sont considérés comme des jours courts, mais en réalité, la perception d'un jour court est relative : un jour court est un jour plus court que le précédent.

✓ Jours longs : en général, plus de 12 heures d'éclairement quotidien sont considérés comme des jours longs. En réalité, la perception d'un jour long, est relative : un jour long est un jour plus long que le jour précédent (INRA., 1998).

Puisque la photopériode est l'entraîneur de la fonction de reproduction, les animaux sont donc capables de mesurer le temps photopériodique (la durée du jour) par le système neuroendocrinien grâce à un messager biochimique appelé mélatonine.

✓ La mélatonine : Découverte en 1958 par Aaron B. Lerner, elle est naturellement présente dans l'organisme de tous les mammifères et est très répandue dans le monde vivant. Elle est synthétisée principalement dans la glande pinéale, à partir du tryptophane et de la sérotonine sous l'effet d'enzymes dont l'activité est commandée par la perception jour / nuit (Collin et al.1988). C'est un informateur quasi universel pour les êtres vivants du rythme nuit / jour(Malpau, 2001).

Chez les mammifères, la mélatonine est métabolisée en 6-hydroxy-mélatonine par le foie et les reins (Yu et al., 1993). C'est grâce à la durée de cette sécrétion que les mammifères sont capables de mesurer la durée de la nuit et donc celle du jour (Bittmanet al., 1983a).

Chez les caprins, les taux plasmatiques diurnes sont faibles, le plus souvent non détectables avec les dosages radio-immunologiques disponibles (< 5 pg/ml), alors que les taux nocturnes sont élevés et varient de 50 à 150 pg/ml (Malpaux et al., 1987; Delgadello et Chemineau, 1992).

L'information photopériodique est perçue par la rétine et transmise par voie nerveuse à la glande pinéale en plusieurs étapes : de la rétine aux noyaux supra-chiasmatiques. L'information photopériodique est transmise par l'intermédiaire de la voie monosynaptique rétino-hypothalamique (Legan et Winans, 1981; Herbert et al., 1978) (Figure: 4.8). A partir de cette structure hypothalamique, le signal est transporté aux noyaux hypothalamiques paraventriculaires, puis dans une colonne de cellules inter-médio latérales situées dans la moelle thoracique et ensuite aux ganglions cervicaux supérieurs (Lincoln, 1971; Swanson et Kuypers, 1980; Klein et al., 1993). Enfin, le signal parvient à la glande pinéale par les neurones synaptiques post-ganglionnaires. A ce niveau, le cycle lumière est traduit en rythme circadien de sécrétion de mélatonine. L'effet majeur de la mélatonine est de modifier la fréquence de libération de LH -RH (luteinising hormone releasing hormone) et par conséquent celle de la LH et l'activité gonadique (alternance entre activité et repos sexuel).

c. Effet du stress thermique :

De nombreuses études montrent que les températures ambiantes élevées altèrent les fonctions reproductives des mammifères domestiques. La réduction de la fertilité, en milieu chaud, est étroitement associée à une élévation de la température corporelle et testiculaire. Chez le mâle, le maintien de la température testiculaire basse dépend de la chaleur évacuée à travers les parois scrotales et à travers les tissus adjacents des testicules (Ortavant et Loir, 1978).

Quand le flux sanguin diminue, la thermorégulation des testicules est dégradée. Chez les ovins, après un court traitement de chauffage du scrotum à 37°C ou 40°C ou après le premier jour du stress thermique de l'animal entier à 32°C, une augmentation initiale du flux sanguin est suivie d'une réduction importante quelques jours après la fin du traitement. Après une semaine du traitement à 32°C, les parois des artères spermatiques, dans la région médiane du plexus pampiniforme, s'épaississent et la lumière artérielle diminue (Ortavant et Loir, 1978). D'autre part, le contenu testiculaire en PGF_{2a} de ces ovins augmente. Les niveaux élevés de cette hormone sont responsables d'effets négatifs sur la fonction spermatogénétique et ce par une contraction de l'artère spermatique dans la région du plexus pampiniforme réduisant ainsi le flux sanguin vers les testicules.

d. L'alimentation :

Le développement de la fonction de reproduction est donc étroitement lié au poids corporel (Courrot et Richetin, 1968 ; Alberio, 1976 ; Colas et al., 1986). D'une façon générale, une sous-alimentation entraîne un dysfonctionnement gonadique qui se traduit par une diminution de la sécrétion des stéroïdes et par l'interruption de la production des gamètes (Gauthie ; Casteilla et al., 1987).

1.3.2 Facteurs internes :

Les effets des facteurs environnementaux sont modulés par la race et les individus. Par conséquent, le facteur génétique a une influence sur l'activité sexuelle et gametogénétique des boucs. L'existence des différences raciales a été mise en évidence pour la plupart des caractéristiques spermatiques (volume et concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, anomalies spermatiques, pourcentage des cellules vivantes) et pour la production spermatique quotidienne.

Ainsi, il existe des variations, entre mâles, dans le pourcentage des spermatozoïdes anormaux. Dans les races saisonnières, quelques mâles produisent, au printemps, un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux près de 100% tandis que d'autres ne le produisent qu'à 15%. L'héritabilité de ce caractère est plus ou moins élevée 0,42, celle du volume est près de 0,43 et celle de la concentration est de 0,07 (Land et Robinson, 1985).

II. Collection et évaluation de la qualité spermatique

1. Collection du sperme :

1.1. Sperme épидидymaire :

Les spermatozoïdes testiculaires acquièrent leur fertilité et leur mobilité pendant le transit épидидymaire qui dure environ une quinzaine de jours. Ceux qui sont fertiles et motiles restent près d'une semaine stockés dans la région caudale de cet organe qui sert de réservoir, c'est donc ce passage à travers l'épididyme qui les transforme en spermatozoïdes matures (Baril et al., 1993).

L'utilisation du sperme épидидymaire est une technique qui peut être exploitée dans le cadre de l'insémination artificielle (IA) ou de la fécondation in vitro (FIV). La collecte du sperme épидидymaire se réalise directement à partir de l'épididyme en utilisant la méthode de rétrograde-flushing et permet le recueil des spermatozoïdes en nombre suffisant pour plusieurs dizaines d'IA ou de FIV. Le sperme épидидymaire se conserve plusieurs jours à 4°C (Guérin et al., 2003). Il est possible de prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant

sous anesthésie générale avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste en une microponction du canal déférent. Souvent, il est collecté directement sur des testicules après abattage des animaux.

1.2. Sperme éjaculé :

1.2.1. Collecte au vagin artificiel :

Le vagin artificiel contient de l'eau chaude (40-43°C) qui est protégé par une housse. Les animaux sont entraînés à la collecte, une femelle bête en train est immobilisée dans l'appareil de contention, le bélier effectue une ou deux fausses montes. Après l'éjaculation, l'opérateur secoue énergiquement le vagin artificiel pour faire descendre le sperme dans le tube de collecte (Christian., 2009).

1.2.2. Collecte à l'électro-éjaculateur :

L'électro-éjaculateur lubrifié est introduit dans le rectum et une décharge électrique faible stimule les centres nerveux du bulbe rachidien. Cette technique permet d'obtenir un sperme sans intervention des mécanismes sensoriels et psychiques de l'éjaculation. Le sperme collecté est de moins bonne qualité que celui collecté au vagin artificiel et d'une plus faible concentration (Christian., 2009).

2. Evaluation de la qualité spermatique :

Après avoir collecté de la semence du bouc, la prochaine étape consistera à l'évaluation quantitative et qualitative du sperme obtenu. La mise en évidence de ces caractéristiques fait appel aux différents paramètres macroscopiques, microscopiques et biochimiques dont leur concordance permet de tirer des résultats fiables.

2.1. Examen macroscopique :

2.1.1. Volume :

La mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par la lecture directe à l'aide de graduations du tube de collecte sans tenir compte de sa partie mousseuse (Baril et al, 1993).

Le volume de l'éjaculat dépendra de divers facteurs, à savoir, l'âge, la saison et la fréquence de récolte (Maxwell et Evan, 1987 ; Hafez, 1987). Cependant, quand le volume de l'éjaculat

augmente ou diminue, ces changements sont, en grande partie, dues aux changements de la quantité des sécrétions épидидymaire et des glandes annexes (Corteel, 1977). Selon Setchell, (1977) et Taure, (1988), le volume de l'éjaculat varie entre 0,2 et 0,5ml chez les jeunes boucs

2.1.2. La couleur du sperme :

Chez la plupart des espèces animales, la couleur du sperme peut varier du blanc clair au jaune brillant (Ezekwe, 1988a). Chez le bouc, le sperme est de couleur blanc jaunâtre. Cette coloration est due à la présence d'un pigment lipochrome élaboré par la vésicule séminale (Hafez, 1987 ; Maxwell et Evans, 1987).

2.1.3. La consistance et l'aspect du sperme :

Chez les caprins, le sperme est un liquide épais, crémeux, inodore et assez visqueux (Marquis, 1990). La consistance de la semence est en fonction du rapport entre les spermatozoïdes et le plasma séminal. Ainsi, le sperme de forte consistance contient beaucoup plus de spermatozoïdes que celui de faible consistance (Salamon, 1976 ; Hafez, 1987).

2.2. Examen microscopique :

2.2.1 : La concentration :

L'appréciation de la couleur peut être une méthode empirique pour l'évaluation de la concentration. Ainsi, une couleur jaune très claire signifie une concentration inférieure à 1 milliard de spz/ml. En revanche, un sperme blanc ivoire peut exprimer une concentration supérieure ou égale à 3-4milliards de spz/ml (Marquis, 1990). Cette évaluation subjective peut être complétée par d'autres méthodes, à savoir :

a. Le comptage direct par hématimètre :

Il consiste en une dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes, tels que le NaCl à 3% ou solution de formaldéhyde à 1%. Pour le sperme de bouc, un taux de dilution de 5% est conseillé (Hanzen, 2006). Généralement, les hématimètres se différencient par les cellules de comptage, il existe, alors, les cellules de Malassez, de Thoma, de Naubouer ou de Türk.

b. La spectrophotométrie (néphélogétrie) :

C'est la méthode universelle utilisée dans les centres d'insémination artificielle. Elle consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes, en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou colorimètre (Dumont, 1996).

Chez les races saisonnées, la concentration spermatique suit une évolution inverse de celle du volume, elle est élevée en dehors de la saison de reproduction et faible en saison sexuelle. Ces variations sont le reflet de la synthèse et de la sécrétion des glandes annexes (Baril et al, 1993)

2.2.2. La motilité massale :

La motilité massale est le résultat des mouvements ondulatoires des gamètes. Elle se mesure en déposant une goutte de sperme pur sur une lame préchauffée et placée sur la platine chauffante du microscope (37 à 38°C), sous un faible grossissement (x 80). L'observation doit être rapide car à cette température, la motilité massale diminue au bout de 15 à 20 secondes.

L'utilisation d'une échelle allant de 0 à 5 permet de noter la qualité de la semence, selon le tableau ci-dessous (Maxwell et Evans, 1987 ; Baril et al, 1993) (**Tableau 01**).

Tableau 01 : Notation de la mobilité massale dans l'espèce caprine (konfe, 2014).

Note	Pourcentage approximatif	Nature du mouvement
0	0%	Aucun mouvement en surface
1	20%	Léger mouvement à la surface
2	40%	Mouvement net mais ne formant pas de vagues
3	60%	Début de vague
4	80%	Vagues très nettes
5	100%	Tourbillons nettement visible

2.2.3. La motilité individuelle des spermatozoïdes :

Cette évaluation est réalisable en même temps que l'estimation du pourcentage des spermatozoïdes mobiles, d'ailleurs, elles sont effectuées dans les mêmes conditions de grossissement et de température (Hafez, 1987 ; Barillet al, 1993).

Chez les races à activité sexuelle saisonnière, le taux des spermatozoïdes mobiles est élevé pendant la saison sexuelle et faible en dehors de celle-ci (Delgadillo, 1990). Pendant la saison

de reproduction, la motilité spermatique est élevée ; ainsi, un éjaculat moyen contient 85 à 95% de spermatozoïdes normaux dont leur motilité individuelle est la plus élevée de l'année.

En général, les variations saisonnières de la motilité évaluées en conditions définies, sont associées aux variations saisonnières correspondantes de la fertilité (Corteel, 1976a).

2.2.4. Etude de la morphologie spermatique :

Elle apprécie la qualité du sperme à travers le nombre de spermatozoïdes atypiques, qui est un indicateur de la baisse de viabilité. Ce test est réalisé en recourant aux différentes préparations colorées.

a. Coloration totale :

Elle a pour objectif de faire mieux apparaître la morphologie générale du spermatozoïde. Elle peut être simple (bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane et la fuschine) ou double (williams, giemsa et karras). Les colorations doubles se concentrent beaucoup plus sur la structure de la tête et de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes (Derivaux et Ectors, 1986 ; Hafez, 1987).

b. Coloration vitale :

Cette technique permet la détermination du pourcentage des spermatozoïdes morts par rapport aux vivants. La coloration la plus utilisée est celle de l'éosine nigrosine. Les frottis sont réalisés en mélangeant une goutte de colorant avec une goutte de sperme.

Cependant, l'acrosome ne peut pas être évalué sur ce type de préparation, et seule une lecture, en milieu humide de préparation des gamètes fixés au formol en contraste de phase, le permet (Chavette, 1992). Pour déterminer le taux de cellules mortes de celles qui présentent des anomalies structurales, la lame est placée sur la platine chauffante du microscope à 37- 38°C et examinée à la lumière directe, pour au moins 150 spermatozoïdes dans différents champs de la même préparation (Baril et al, 1993). Tous les spermatozoïdes colorés en totalité ou en

2.3. Examens biochimiques :

2.3.1. La mesure du PH :

Le sperme du bouc est légèrement acide, son pH varie de 6 à 6,8 avec une moyenne de 6,4 (Vaissere, 1977). Cette valeur évolue inversement à celle de la concentration, quand celle-ci

augmente, le PH diminue. Le PH est mesuré, juste après la récolte, à l'aide d'un PH mètre. Après la collecte, le rythme de diminution du PH permet l'évaluation de la qualité du sperme (Derivaux et Ectors, 1986).

2.3.2. Le test de fructolyse :

Les spermatozoïdes, stockés *in vitro* en anaérobiose, métabolisent le fructose présent dans le plasma séminal. L'index de fructolyse s'exprime par la quantité en milligramme de fructose assimilée par 10 spermatozoïdes en une heure à 37,6°C. Il est significativement corrélé avec la concentration et la motilité spermatique. Ainsi, un sperme de qualité a un index de fructolyse variant entre 1,4 et 2 (Derivaux et Ectors, 1986).

2.3.3. La réduction du bleu de méthylène :

Après coloration au bleu de méthylène, un sperme de bonne qualité se décolore en moins de 10 minutes, au contraire, un sperme de qualité médiocre ne l'a fait qu'en dépassant les 15 minutes (Milovanov, 1986).

2.3.4. La thermorésistance :

C'est la détermination de l'aptitude des spermatozoïdes à survivre en conditions thermiques comparables à celles de l'appareil génital femelle. La semence est diluée pour avoir entre 80 et 300 millions de spz/ml et est placée dans un bain-marie à 37 - 38°C. Le taux des cellules vivantes est déterminé au début du test et 3 heures après (Hafez, 1986).

Dans le but de mieux apprécier la qualité de la semence, d'autres tests peuvent être utilisés, il s'agit, entre autres, de l'intégrité de l'acrosome, le test GOT (Glutamic Oxaloacetic Transaminase) et l'aptitude des spermatozoïdes à se déplacer dans différents milieux y compris le mucus cervical (Baril et al, 1993).

Chapitre II : Conservation de la semence et stress oxydatif

I. Conservation de la semence du bouc :

La conservation de la semence, particulièrement à l'état congelé, provoque des dommages aux spermatozoïdes qui concernent à la fois leurs structures (membranes, flagelles) et leur état fonctionnel. Ces altérations influencent leur motilité et leur viabilité. Malgré de nombreux travaux consacrés à ces problèmes, la fertilité de la semence congelée demeure généralement plus faible que celle de la semence conservée pendant quelques heures à température positive. (Meskeni Z, 2017)

L'effet délétère du plasma séminal sur la viabilité des spermatozoïdes conservés dans un milieu à base de lait écrémé ou contenant du jaune d'œuf, constitue un problème spécifique pour la conservation de la semence de bouc. Suite à la présence des enzymes bulbo-urétrales qui affectent négativement la survie des spermatozoïdes *in vitro* en présence de constituants lactés du dilueur. (Meskeni Z, 2017)

Pour se faire, l'élimination du plasma séminal est une étape clé pour arriver à préserver les caractéristiques de la semence après conservation, ainsi une procédure préliminaire pour pouvoir procéder aux autres processus de conservation qui vont être présentés en détails dans ce chapitre.

1. Le lavage de la semence du bouc :

Le lavage de la semence dès la collecte est réalisé en suspendant le sperme dans une solution Krebs Ringer-Phosphate (solution «de lavage») contenant du glucose, puis en centrifugeant le mélange pour éliminer le plasma séminal. Deux lavages successifs sont préférables à un seul lavage. Au moment de la collecte, l'éjaculat est dilué avec la solution de lavage de façon à obtenir une concentration de 400×10 millions de spermatozoïdes/ml de la suspension à centrifuger. Le tube de collecte est alors placé dans une centrifugeuse pendant 15 minutes à 20°C, à une accélération de 500-600 g. Après quoi, le surnageant est éliminé avec une pipette

et un nouveau volume, identique, de solution de lavage est ajouté; le tube est centrifugé une seconde fois de la même manière précédemment citée. (Meskeni Z, 2017)

2. Les techniques de conservation de la semence du bouc :

La réussite de l'Insémination artificielle dépend, principalement, de la qualité de la semence. Si elle est réalisée avec de la semence fraîche, il y aurait un taux de succès très satisfaisant suivant les espèces et les techniques d'insémination (Cseh et al., 2012). La semence cryoconservée présente des taux de succès plus variables, principalement, dues aux dommages subis par les spermatozoïdes durant le processus de congélation (Hammersted et al., 1990; Bailey et al., 2000).

2.1. La dilution de la semence :

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

Depuis les 50 dernières années, les dilueurs à base de jaune d'œuf et de lait de la vache sont les plus répandus pour la conservation des semences d'animaux d'élevage en frais ou en congeler (Iritani & Nishikawa, 1961; O'Shea & Wales, 1966). Cependant, le mécanisme par lequel le jaune d'œuf et le lait protègent les spermatozoïdes pendant la conservation en frais ou contre le cryodommage reste très peu connu.

➤ L'effet bénéfique du jaune d'œuf

Le dilueur à base de jaune d'œuf est le plus commercialement utilisé, puisqu'il a été le premier à être testé avec succès pour la congélation de semence bovine, qui représente un intérêt économique sans précédent (Holt, 2000a).

Le jaune d'œuf est généralement très concentré dans le dilueur (20% v/v) ce qui a poussé plusieurs études à identifier son composant le plus actif qui serait responsable de l'effet

protecteur (Foulkes, 1977; Watson, 1981). Il en est ressorti que la lipoprotéine de basse densité (low-density lipoprotein « LDL ») était le composant du jaune d'œuf composant le meilleur effet protecteur de semence (Pace & Graham, 1974; Watson, 1981).

De plus, certaines études ont également montré que le LDL seul était largement responsable de la résistance des spermatozoïdes bovins au choc du froid ainsi que, l'amélioration de la motilité spermatique post dégel (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004).

En revanche, son mécanisme de protection n'est pas encore élucidé. Quinn (1980) a montré que la portion phospholipidique du LDL serait responsable de son effet bénéfique en constituant

un film protecteur à la surface de la membrane spermatique ou en remplaçant les phospholipides membranaires perdus ou endommagés pendant la cryoconservation.

Plus récemment, Amirat –Briand (2010) ont effectués de tests de fertilité sur des vaches laitières et ont montré que le dilueur à base LDL seul permettait de maintenir une qualité spermatique post-dégel comparable à celle du dilueur à base de jaune d'œuf sans toutefois réussir à augmenter le taux de fertilité par insémination artificielle (59% pour le dilueur à base de LDL contre 65% pour le dilueur à base de jaune d'œuf).

➤ L'effet bénéfique du lait :

Le lait entier ou le lait écrémé sont couramment utilisés comme base de dilueur pour la conservation de semence à 4°C ou pour la congélation de semence lorsqu'ils sont supplémentés en glycérol (Kakar & Ganguli, 1978).

Le lait entier est constitué d'eau (87,5 %), de protéines (3.2 %), de sucres (4,6 %), de lipides (3,7 %) et de minéraux (0.8 %). Le lait écrémé à la même composition à la différence qu'il n'a que < 0.1 % de lipides (Lusignan et al., 2011).

La majorité des protéines du lait sont des caséines organisées en micelles (80 %) qui seraient responsables de l'effet protecteur de la semence. Selon certains auteurs, les micelles de caséines extraites du lait permettent de conserver à 4°C la semence d'étalon (Batellier et al., 1997), de bouc (Leboeuf et al., 2003), de bélier (O'Shea & Wales, 1966) ainsi que la semence de taureau en frais (O'Shea & Wales, 1966) et en congelée en présence de glycérol (Choong & Wales, 1963)

2.2. Conditionnement de la semence :

Le sperme est, généralement, stocké en paillettes de chlorure de polyvinyl, de 0,5 ou 0,25ml.

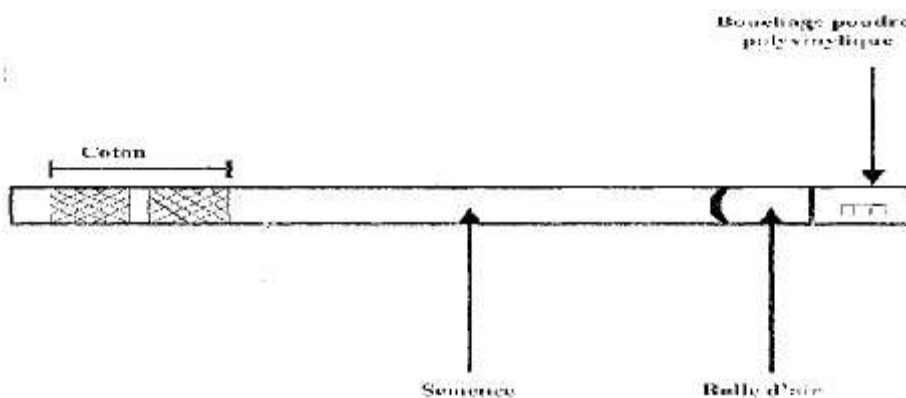
L'une des extrémités des paillettes est obstruée par deux bouchons, entre lesquels s'interpose de la poudre d'alcool polyvinylique. Après homogénéisation de la semence diluée, il est possible de remplir les paillettes soit par utilisation d'une machine (**figure 02**), soit par aspiration buccale à travers le bouchon de l'extrémité de la paillette. Après contact avec la semence, ce bouchon de polyvinyle forme une barrière étanche qui évite les pertes (**figure03**). Après quoi, en utilisant une seringue ou avec un bref mouvement de poignet, il est nécessaire de laisser 1 cm d'air à l'autre extrémité de la paillette afin de pouvoir obturer celle-ci avec de la poudre polyvinylique de couleur.

Les paillettes, soigneusement séchées avec du papier, peuvent alors être employées (Marquis, 1990).

Figure 02 : conditionnement de la semence



Figure03: Schéma d'une paillette d'insémination artificielle (Derivaux et Ectors, 1986).



3. La conservation proprement dite :

3.1. Conservation à l'état liquide :

Le sperme du bouc peut être conservé à des températures allant de 2 à 15°C, le plus souvent à 4°C. Actuellement, pour la préservation de la semence à l'état liquide à 4°C, les milieux à base de lait écrémé sont les plus utilisées (Leboeuf et al, 2003). Une manière de conserver la semence de taureau, bouc, bélier ou cheval en frais est de descendre progressivement sa température à 5°C après sa dilution (Katila, 1997; Leboeuf et al., 1998; Verberckmoes et al., 2005; O'Hara et al., 2010). Cette descente en température a pour but de réduire les dépenses métaboliques et de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes (Gadea, 2003).

Le dilueur Glucose-citrate-jaune d'œuf est l'un des premiers à avoir été testé avec succès sur de la semence de bélier depuis 1960 (Salamon & Maxwell, 2000). Plus récemment, les dilueurs de conservation de semence en frais sont à base de Tris : Tris-glucose-jaune d'œuf et le Tris-citrate-fructose-jaune d'œuf (Salamon et Maxwell, 2000).

Le dilueur à base de lait est également utilisé pour la conservation de la semence fraîche chez le bélier et le taureau (Vishwanath & Shannon, 2000; O'Hara et al., 2010). En revanche, le lait doit être préalablement chauffé afin d'éliminer la lacténine, une protéine du lait capable de diminuer la qualité spermatique (Vishwanath & Shannon, 2000).

En générale, la semence fraîche du bouc doit être inséminée dans les 8h suivant sa collecte afin d'obtenir le taux de gestation optimal (Maxwell & Watson, 1996; Salamon & Maxwell, 2000).

3.2. Conservation de la semence à l'état congelé (Cryoconservation) :

La cryoconservation 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). Cette dernière partie de la définition est la plus difficile à maîtriser puisque les cellules et tissus ne sont pas naturellement programmés pour résister à la congélation et la majorité des cellules non protégées subissent d'importants dommages à basse température. De plus, les cellules spermatiques ne possédant aucun système de réparation subissent des dommages irréversibles rendant la semence non fonctionnelle.

Il devient, donc, indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation

afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères.

La congélation peut se faire à l'aide d'une machine dans laquelle la température est programmée ou en manipulant les paillettes de la manière suivante (**figure 04**) :

- Paillette moyennes de 0,5ml : maintenues 5min. à 4cm au dessus du niveau d'azote liquide, puis plongées directement dans celui-ci.
- Paillettes fines de 0,25ml : maintenues 2min à 16cm, puis 3min à 4cm au dessus du niveau d'azote liquide et finalement, les plongées directement dans celui-ci (Baril et al, 1993).

Remarque : un maintien de la semence à plus 5°C, en présence de glycérol, est nécessaire avant d'amorcer la descente vers les températures de congélation (Adamou-N'daye et al, 2003).

Figure 04 : Congélation et stockage des paillettes (CIA AWE Ciney Belgique)



Pendant la congélation, l'eau va subir une transition de phase passant d'un état liquide à un état cristalline (Mazur, 1968). De ceci résulte la formation de cristaux de glace et l'augmentation de la concentration en solutés présents dans le milieu. Les cristaux de glace, au cours de leur formation, transpercent les membranes des cellules tandis que l'augmentation de la concentration en solutés crée un changement de l'osmolarité du milieu, entraînant des pressions mécaniques importantes sur les membranes cellulaires (Mazur, 1968).

Les agents cryoprotecteurs augmentent la concentration de tous les solutés du système permettant la réduction des cristaux de glace. Pour être biologiquement acceptable par les cellules, les agents cryoprotecteurs doivent avoir un faible taux de toxicité, qu'il soit pénétrant ou non (Fahy et al., 1984).

Selon plusieurs études, les techniques de congélation de semence induisent des dommages aux spermatozoïdes affectant l'intégrité des membranes et des fonctions spermatiques (Mazur, 1968; Critser et al., 1987; Hammerstedt et al., 1990; Bailey et al., 2000; Bailey et al., 2003).

Quel que soit le type de dilueur ou la technique de congélation, une grande majorité des spermatozoïdes présente une baisse de motilité et d'intégrité membranaire réduisant leurs chances de fécondation (Salamon & Maxwell, 1995; Gillan et al., 2004; Menchaca & Rubianes, 2004; Barbas & Mascarenhas, 2009).

✓ Les agents cryoprotecteurs

En 1949, il a été démontré pour la première fois que l'ajout de glycérol à la semence de coq permettait d'augmenter le taux de survie des spermatozoïdes après décongélation (Polge et al., 1949). Le glycérol, réduirait la formation des cristaux de glace délétères pour les membranes cellulaires en augmentant la concentration totale en soluté.

Quelques années plus tard, des études ont démontré que le changement d'osmolarité au moment de la congélation était la principale cause de dommage cellulaire, plus que la formation de cristaux de glace (Lovelock, 1953a; Lovelock, 1953b). Le glycérol réduirait les cryodommages en équilibrant la variation de concentration en soluté de part et d'autres des membranes cellulaires.

En basant aux études effectuées et aux résultats obtenus, les propriétés des agents cryoprotecteur sont comme suit:

- le cryoprotecteur doit être soluble dans l'eau et maintenu à basse température afin d'abaisser la température de congélation.
- avoir un faible taux de toxicité afin d'avoir à sa concentration une efficacité optimale.
- avoir une tolérance dans le tractus génital femelle.

Le glycérol reste de loin le cryoprotecteur le plus couramment utilisé pour la congélation de semences de mammifères (Di Santo et al., 2012). Toutefois, il a été démontré chez l'humain que l'utilisation de glycérol pour la congélation de semence induit des ondulations de la

membrane plasmique, une altération de la membrane acrosomale interne ainsi qu'une désorganisation des crêtes mitochondriales (Sherman, 1990).

De ces observations, plusieurs autres agents cryoprotecteurs ont été proposés pour la congélation de semences, comme le méthanol chez le poisson (Lahnsteiner et al., 2000; Yang et al., 2010), du diméthylacétamide chez le coq (Blanco et al., 2010; Wishart, 2007) et du DMSO chez l'amphibien (Mansour et al., 2010).

II. Le stress oxydatif :

Durant les différentes étapes de conservation du sperme, un des problèmes majeur rencontré est la dégradation des spermatozoïdes au moment de la congélation et de la décongélation. Ceci est dû aux divers stress occasionnés dont le stress oxydant (Grignard., 2005).

En 2002, Bossoki a défini le stress oxydatif (SO) comme étant un déséquilibre dans la balance métabolique cellulaire durant lequel il y a production des molécules appelées radicaux libres. Ces molécules sont composées d'oxygène, initialement inerte et indispensable aux processus énergétiques des spermatozoïdes, et sont des molécules toxiques conduisant à la formation des radicaux libre appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ROS). Une augmentation de la quantité des radicaux libres et/ou une diminution des composés antioxydants sont responsables du stress oxydatif.

Les spermatozoïdes se défendent contre ce stress (Ben Ali et al., 2012) et se protègent de l'effet néfaste des ROS grâce aux enzymes anti oxydantes présentes dans leur cytoplasme (Lusignan., 2011).

Il existe des antioxydants synthétiques tels que le médicament, la Vitamine E et C (Gülçin., 2012). Il existe également des antioxydants naturels tels que les huiles essentielles et les polyphénols (Mighri et al., 2010).

Chapitre 03

Potentiel des huiles essentielles sur la préservation des spermatozoïdes caprine

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont été utilisées en phytothérapie comme remède contre plusieurs maladies vue leur richesse en centaines, voire en milliers de composants ayant des vertus thérapeutiques. De nos jours, l'utilisation de ces composés reste un moyen de soin largement utilisé, voire l'unique moyen pour certains autochtones et communautés vivants dans des pays en voie de développement (Hadj-Seyd et al., 2016).

Parmi les 800 000 espèces de plantes prospérant sur la planète, un nombre relativement important est capable de synthétiser des composants aromatiques que l'on appelle les huiles essentielles (HE).

Au cours des dernières décennies, la communauté scientifique a manifesté un intérêt croissant pour l'application des HE, qui sont des mélanges complexes de composés volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Elles sont caractérisées par une tache translucide sur du papier qui ne persiste pas très longtemps comparativement aux huiles fixes (Gainard., 2016). Elles sont dotées de plusieurs activités biologiques et écologiques (Elmi et al., 2017).

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

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

I. Généralités

1. Méthodes d'extraction :

Il existe plusieurs modes d'extraction comme l'hydro distillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvants organiques, l'extraction par ultra-sons.

Deux procédés sont principalement employés et font l'objet d'une monographie à la Pharmacopée : l'hydro distillation/distillation à la vapeur d'eau et l'expression à froid. (Pierron, 2014).

1.1. Hydro distillation (HD)

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

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

Cette technique utilise l'entraînement des substances aromatiques par la vapeur d'eau. Les plantes sont disposées entières ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs comme les racines ou les écorces) dans un appareil de type Clevenger ou dans un alambic (obtention à l'échelle industrielle). Pour l'obtention à l'échelle industrielle, un courant de vapeur d'eau traverse l'alambic et sous l'effet d'une source de chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui traverse alors la cuve contenant les plantes aromatiques. La vapeur d'eau ayant volatilisé et entraîne l'HE se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant et retourne donc à l'état liquide pour se séparer dans l'essencier ou vase florentin. L'HE étant hydrophobe et souvent moins dense que l'eau, surnage dans la majorité des cas à sa surface et est recueillie après décantation (Vele, 2015).

2. Méthodes d'analyse

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles, une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une

éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (Lakhdar, 2015).

Plusieurs méthodes sont utilisées, tel que :

- La chromatographie sur couche mince
- La chromatographie liquide haute performante
- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) : cette technique est la mieux adaptée à l'analyse des constituants volatils dans les extraits aromatiques.

La CPG peut être couplée à des méthodes spectrales, telles que l'infrarouge ou la spectrométrie de masse qui est de loin la plus utilisée (Figueredo, 2007).

3. Composition chimique

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

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

4. Toxicité

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles

riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines). D'autres huiles essentielles peuvent aussi être à l'origine d'une hépatotoxicité et neurotoxicité avec somnolence, coma et convulsions. Les cétones comme l' *l* -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Zenasni, 2014).

5. Solubilisation des huiles essentielles :

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 et polyéthylène glycol), dans laquelle la substance est encapsulée dans une cavité hydrophobe

➤ Le polyéthylène glycol (PEG) :

C'est un polymère biocompatible, non ionique et non toxique utilisé dans les domaines biomédicaux, biotechnologiques et pharmaceutiques (ANNUNZIATA *et al.*, 2002). Il est appelé également macrogol dans le domaine médical (TANI *et al.*, 2002).

Le PEG est un enchainement d'unités structurales répétitives de monomère d'éthylène Glycol, il peut être synthétisé par l'interaction d'oxyde d'éthylène avec l'eau ou d'oligomère d'éthylène glycol (KADAJJI et BETAGERI, 2011).

Le PEG a plusieurs propriétés :

- ✓ il n'est ni absorbé, ni fermenté.
- ✓ Il résiste à la reconnaissance du système immunitaire (BRITTON KEYS K., 1998).
- ✓ Il est très hygroscopique, miscible à l'eau et à de nombreux solvants organiques, notamment l'éthanol, l'acétone, l'oxyde de diéthyle.
- ✓ Il est insoluble dans les hydrocarbures.
- ✓ Il dissout bien la colophane et de nombreuses huiles essentielles.

II. Etude bibliographie et botanique de *Rosmarinus officinalis*.

1. L'importance de la famille des Lamiacée :

Les Lamiacée ou Labiacée sont une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6 000 espèces et près de 210 genres, à fleurs gamopétales irrégulières, possédant une corolle aux pétales soudées (gamopétalie) mais à deux lèvres bien marquées :

la lèvre supérieure arrondie en forme de casque, la lèvre inférieure plane et trilobée. Ce dispositif est lié à l'entomogamie (pollinisation par les insectes). Elles sont faciles à reconnaître avec leurs tiges quadrangulaires garnies de feuilles opposées tomenteuses et odorantes insérées sur des nœuds bien marqués.

Cette famille est une importante source d'huiles essentielles, d'infusion et antibiotiques naturels pour l'aromathérapie.

2. Définition :

Le Romarin est une plante des coteaux arides garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, Il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens (Belkhir,2015).

Le nom « romarin » viendrait du latin « ros marinus » (rosée de mer), ou bien du grec « rhops myrinos » (buisson aromatique), ou encore du latin « rhus marinus » (sumac de mer). On l'appelle également « herbe-aux-couronnes », et en provençal, « encensier » (Belkhir,2015).



Figure 04: Le Romarin (*Rosmarinus Officinalis*) (MEYER., 2004)

3. Description botanique :

Le romarin faisant partie de la famille des Lamiacées ou Labiées, il possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques que sont des caractéristiques communes à l'ensemble de cette famille. Le genre *Rosmarinus* est représenté par trois espèces différentes, mais *Rosmarinus officinalis* est la principale. Ses caractères sont les suivants :

- arbuste toujours verts, de 60cm à 2m de haut et pouvant vivre jusqu'à 30 ans,
- tige, à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2mm.

- feuilles opposées, coriaces, sessiles, linéaires, entières, de 1,5 à 4,5 cm de long, aux bords enroulés vers le bas ; face supérieure vert sombre et glabre, face inférieure blanche, tomenteuse, parcourue par une nervure saillante, et portant poils articulés ramifiés et poils glandulaires fortement serrés.
- inflorescence spiciforme, à fleurs subsessiles, qui s'épanouissent toute l'année, calice gamosépale, poudré-blanchâtre, tube en forme de cloche, à 3 lobes, le plus large est la lèvre supérieure et les deux autres forment la lèvre inférieure.
- corolle gamopétale, tubuleuse, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes en forme de casque, l'inférieure à 3 lobes, avec le médian plus large, concave), 2 étamines, et des anthères allongées uniloculaires.
- le fruit est un tétrakène, de couleur brune.
- Fleurs bleu pâle, lilas ou blanchâtres, maculées de petites taches violettes à l'intérieur.

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais, à cette différenciation morphologique très aléatoire, nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant : romarin à cinéole, romarin à verbénone, romarin à camphre, bornéol, et, parfois, romarin à myrcène (Mostefai., 2012)

4. Pouvoir potentiel du *Rosmarinus officinalis* sur les différentes activités :

Le Romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol. L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (Henrich, et al 2006)

L'huile essentielle de romarin est employée en aromathérapie pour différentes propriétés. Elle est reconnue pour ses propriétés stimulantes sur l'activité locomotrice. Cette activité est due à la stimulation de l'organe de l'odorat mais aussi l'activation pharmacologique directe du système nerveux central.

Cette huile essentielle possède aussi des propriétés antifongiques et antiseptiques. Elle a également une action antispasmodique sur le sphincter d'Oddi, mais 7 à 8 fois moins importante que celle de l'huile essentielle de menthe (Layral G, Vierling E, 2007). Il existe

d'autres activités pharmacologiques et indications : stimulation des fonctions hépatiques, antispasmodique, antidiarrhéique, diurétique, antirhumatismal, analgésique, emménagogue, cicatrisant (Layeral G, Vierling E, 2007).

L'huile essentielle de romarin est également utilisée dans l'industrie cosmétique (savons, parfums) ainsi que par l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons) (Brech P, Gaillard J. I, Simonet M, 1989).

4.1. Activité antibactérienne :

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

4.2. Activité antifongique :

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

4.3. Activité antivirale :

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

4.4. Activité ovicide :

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

4.5. Activité anti-oxydante :

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

4.6. Effet anti- hépatotoxique :

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

III. Interaction huile essentielle-spermatozoïdes :

1. Effets protecteurs :

Les effets protecteurs des huiles essentielles (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).

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.

La cryoconservation peut induire des dommages structurels et fonctionnels à différents compartiments des spermatozoïdes. La sensibilité des gamètes de mammifères au choc froid réduit considérablement leur résilience. De plus, les membranes cellulaires sont affectées. Un des premiers événements indésirables sont la désorganisation de la structure de la membrane pendant le refroidissement à 5°C. Les rallonges sont utilisées pour réduire les dommages de choc froid. Par conséquent, la composition de l'extenseur de congélation est un facteur crucial pour protéger les spermatozoïdes. Le jaune d'œuf est un cryoprotecteur majeur pour la congélation du sperme de nombreuses espèces, d'autres substances l'ont remplacé. Le jaune d'œuf a une grande variabilité entre les lots, ainsi qu'un risque de contamination microbienne, ce qui peut conduire à la production d'endotoxines (Dávila et al., 2015). Cela réduit la fertilité des spermatozoïdes et augmente le risque de transmission de maladies, préoccupante dans les échanges du sperme. Ce qui a poussé les chercheurs vers l'étude de nouveaux composés actifs et d'améliorer les protocoles de conservation préétablis pour une préservation spermatique optimale.

Au cours des dernières années, la communauté scientifique a tourné son intérêt vers des composés naturels tels que les huiles essentielles pour remplacer des substances approuvées nocives et délétères en particulier dans le domaine des biotechnologies. Ceux-ci ont été testés sur spermatozoïdes de différentes espèces (Chikhouné et al., 2015; Dávila et al., 2015; Elmi et al., 2019, 2017; Giaretta et al., 2014; Touazi et al., 2018).

À la lumière des points susmentionnés, notre présent travail va mettre en évidence l'huile essentielle issue du romarin dans la préservation des caractères morpho-cyto-physiologiques après cryoconservation du sperme du bouc.

I. Objectifs :

- Étudier l'effet préservateur d'huile essentielle de romarin sur la semence caprine après cryoconservation.
- Mettre en évidence les caractères morpho-cyto-physiologiques des spermatozoïdes avant et après utilisation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.
- Voir, après avoir exposé notre semence à différentes concentrations de l'huile essentielle en question, la concentration la plus appropriée qui permet une préservation plus durable tout en étant pas toxique.

Après avoir effectué les examens de la motilité sur l'échantillon témoin (aliquote 1), on est passé à l'addition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à des concentrations progressives. Dès l'ajout de la première concentration qui est la plus petite, on a constaté après exploration par le CASA une mortalité totale des spermatozoïdes et cela du fait que l'huile essentielle en question n'était pas pure puisqu'on a mesuré le pH de ce dernier et s'est avéré acide. Donc on a supposé que cette acidité était le facteur de mortalité des spermatozoïdes.

Voyons les circonstances sanitaires du pays et la non disponibilité des produits, on n'a pas pu refaire l'expérimentation avec une autre huile essentielle. De ce fait on va témoigner les

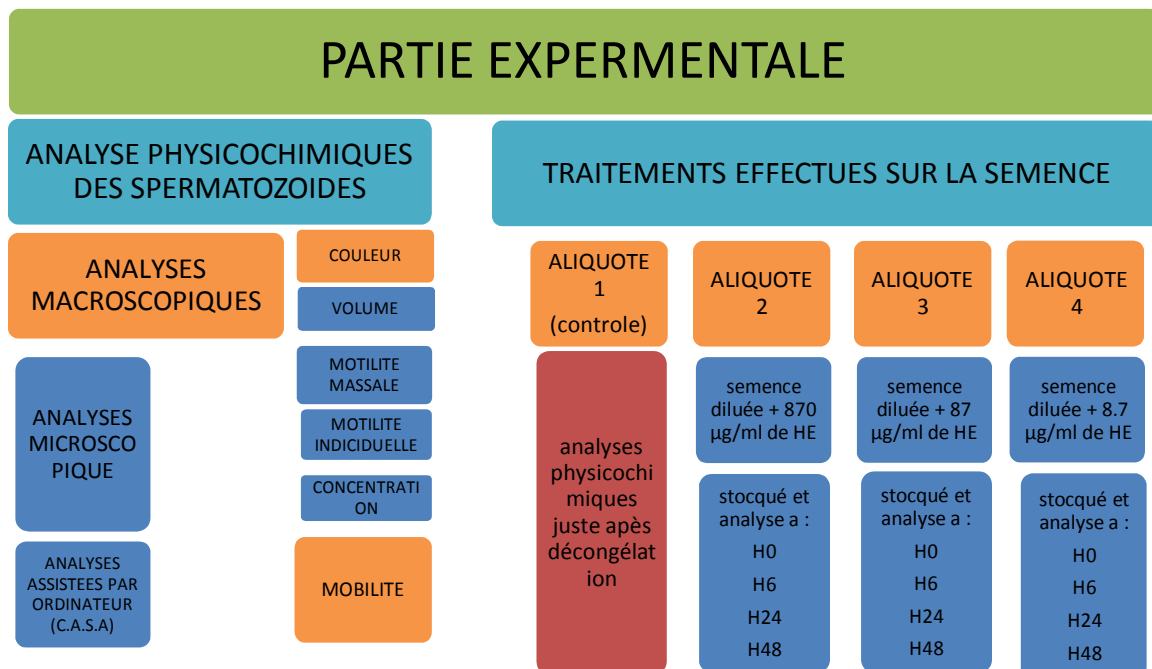
résultats attendus de notre étude, par d'autres résultats qui ont été obtenus par d'autres études similaire a la notre.

II. Matériels et méthodes :

1. Partie théorique :

1.1. Protocole expérimental :

Le protocole expérimental prévu est résumé dans l'organigramme suivant. En dépit des évènements pandémiques liés au corona virus, nous avons tenté quand même de concrétiser le protocole expérimentale, mais a cause de la non disponibilité de certains produits majeurs dans l'expérimentation, nous avons du réaliser de manière théorique notre étude sous forme d'une méta-analyse d'articles qui traite l'effet du romarin de façon générale sur la préservation des caractères morpho-cyto-physiologiques vis-à-vis les cryodommages induits par la conservation a l'état congelé.



1.2. Nature des données :

La recherche en ligne nécessite des moteurs de recherche scientifique et des mots clés. Le tableau suivant présent la nature de notre documentation scientifique :

Tableau 02 : Présentation de la nature des données :

Les moteurs de recherches	Les mots clés	La langue	L'année de publication	Nombre d'articles
PubMed	Huile essentielle	Anglais	2009-2019	Totales : 3 articles
Google scholar	Sperme	Français		Éliminés : 13 articles
Biomedcenter	cryoconservation	Turc		Inclus : 17 articles
	Bouc			
	Rosmarinus officinalis			

1.3. Critères d'inclusion et d'exclusion :

Avant l'analyse des articles concernant l'effet préservateur de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* nous nous sommes basés sur des critères d'inclusion, qui sont :

- ✚ Effet de d'huile essentielle de *rosmarinus officinalis* sur la reproduction (paramètres de sperme).
- ✚ Etudes faites sur les mâles.
- ✚ Etudes sur des mammifères (le bouc, les lapins, les souris, les rats, le porc et même l'homme).
- ✚ Utilisation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* seule ou en combinaison avec des molécules qui ont un effet synergique dans la préservation des caractères spermatiques
- ✚ La mise en évidence des concentrations utilisées des huiles essentielle ainsi des substances en combinaison
- ✚ Prendre en considération les études qui traite l'effet du romarin dans toutes ses formes (huile essentielle, extrais de plante, acide rosmarinique et autres constituants de la plante).
- ✚ La nature de l'étude : in vivo et in vitro (sur animal vivant ou sur la semence).
- ✚ Accepter l'effet antioxydant et antimicrobien.

1.4. Les critères d'exclusion :

- ✚ Effet du romarin sur d'autres effets qui n'ont pas un lien avec la reproduction.
- ✚ Etudes faites sur les femelles.
- ✚ Effet du romarin sur le processus de fécondation in vitro, dosage des hormones thyroïdiennes.

1.5. Classification des données :

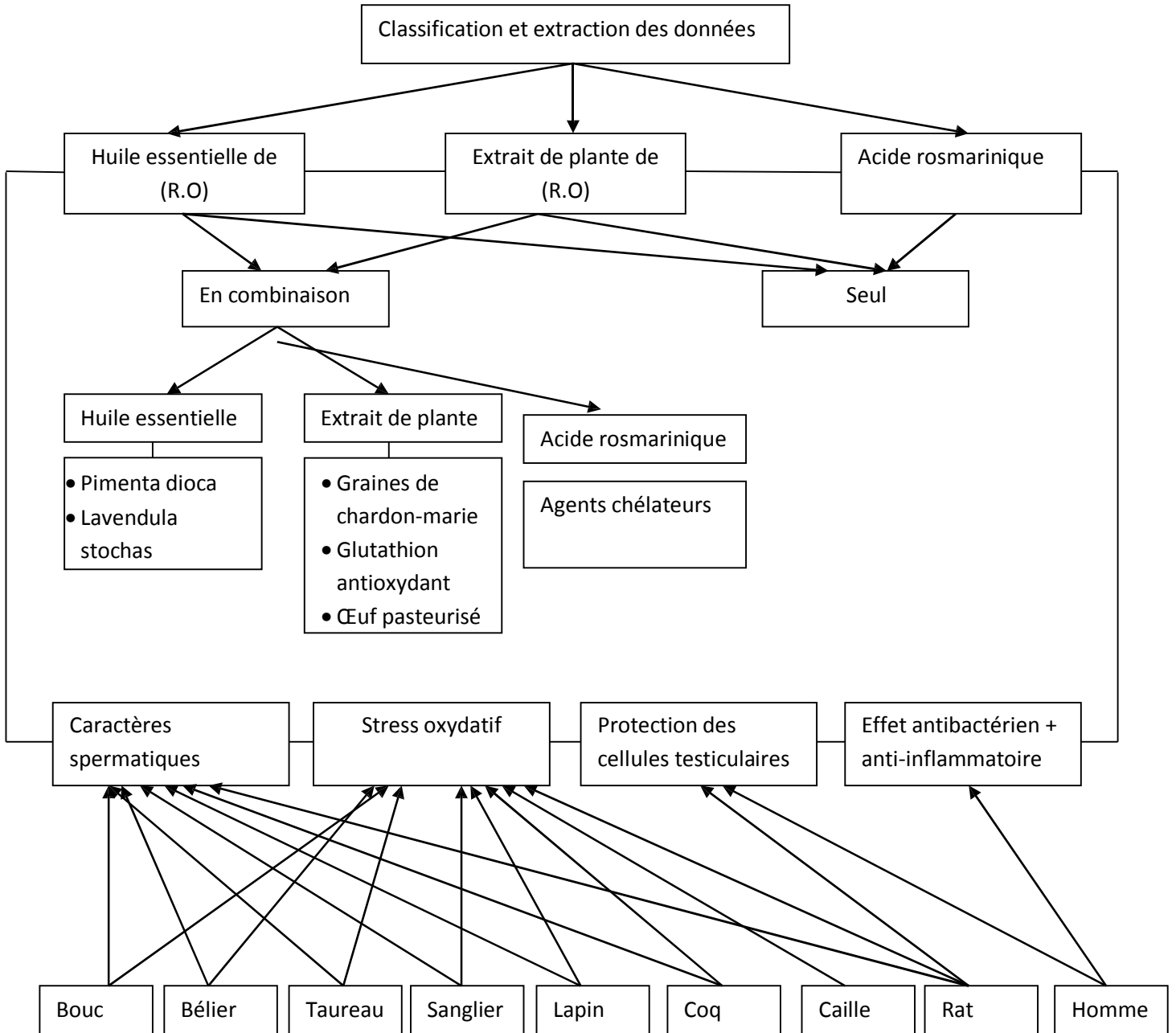


Figure 05 : Recherche et classification des données

III. Résultats et discussion :

1. La molécule :

Dans les articles étudiés, et parfois dans le même article, l'administration de l'huile essentielle de *rosmarinus officinalis* ou l'extrait de plante du romarin sont parfois seuls ou en combinaison avec une autre huile essentielle tel que (*Pimenta dioca* et *Lavendula stochas*) ou d'autres molécule comme (Graines de chardon-marie, glutathion antioxydant, lécithine de soja, agents chélateurs) qui font l'objet d'un effet synergique, ou parfois étude comparative.

La figure ci-dessous représente les pourcentages des études sur l'effet de l'administration d'huile essentielle de (R.O), l'extrait de plante de romarin et l'acide rosmarinique seuls ou en combinaison.

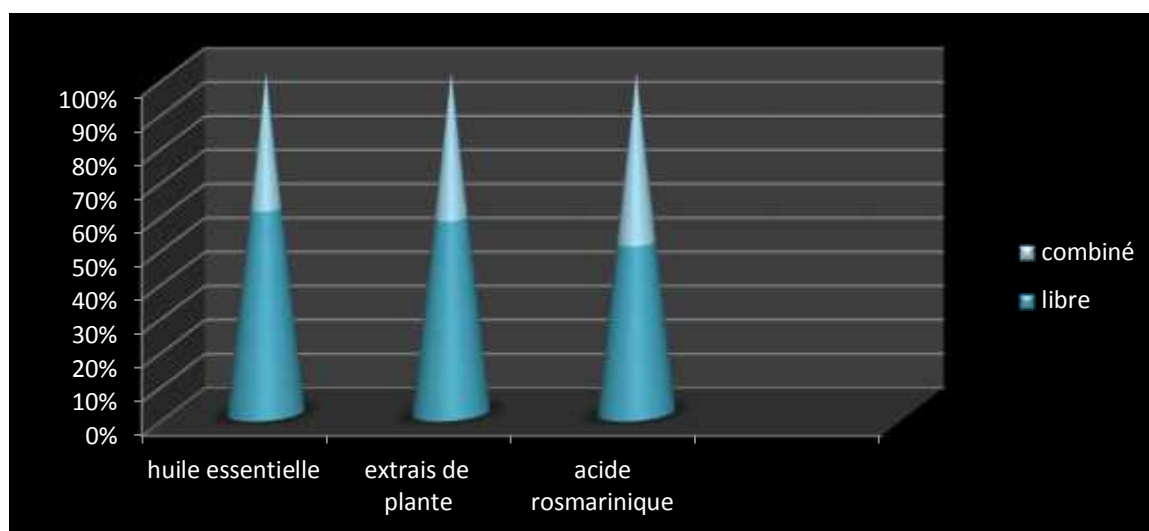


Figure 06: Représentation des pourcentages de l'utilisation de l'huile essentielle (R.O), extraits de plante de romarin et acide rosmarinique libre et en combinaison.

2. L'espèce :

Les espèces inclus dans cette étude sont : le bouc, le bélier, le sanglier, le taureau, le coq, la caille japonaise, les lapins, les rats et enfin l'Homme.

La figure en-dessous montre les pourcentages d'articles de chaque espèce.

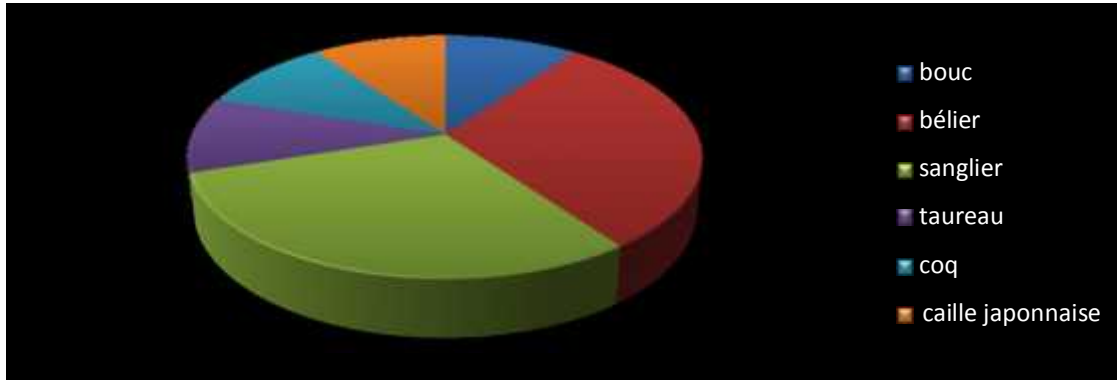


Figure 07: Représentation des espèces incluses.

3. La voie d'administration :

Les différentes voies utilisées pour chaque molécule et chaque espèce, sont résumés dans le schéma suivant :

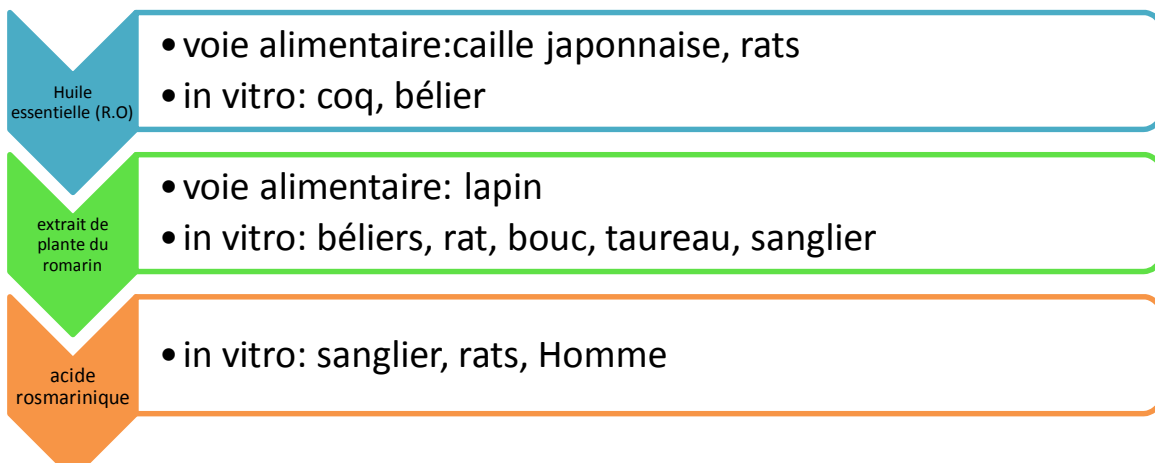


Figure 08: Résumé des différentes voies utilisées pour chaque molécule et chaque espèce.

Chez ces différentes espèces, la voie d'administration des substances étudiées la plus utilisée c'est Surtout in vitro, et c'est selon la nature des études ainsi l'objectif de chaque étude. L'administration de la gelée royale par gavage est moins utilisée.

4. Aperçu sur les protocoles expérimentaux adoptés pour chaque étude:

Voyons la diversité des espèces, molécules, les voies d'administration ainsi les doses administrées pour chaque étude, y'a compris l'utilisation des faibles, modérés et fortes doses. De même pour les unités utilisées. De ce fait on va citer de manière récapitulative les différentes données selon la voie d'administration, la molécule utilisée et l'espèce en question.

4.1. La voie alimentaire

4.1.1. Huile essentielle (R.O) :

- Caille japonaise :

90 poussins de caille japonaise obtenus a l'âge de 5 jours répartis en plusieurs groupes, les 2 groupes qui ont été traité par l'huile essentielle, étaient nourris par un régime alimentaire de base complété avec 125ppm et 250ppm respectivement jusqu'à l'âge de 43 jours. Donc la période expérimentale était de 28 jours

- Rat 1 : supplémenté de 50mg/kg jusqu'à 150mg/kg
- Rat 2 :

Population de 72 Rats répartie en quatre groupes recevant de l'eau supplémenté respectivement 1.25%, 2.5%, 5% de l'huile essentielle de (R.O) pendant 14 jours.

4.1.2. Extrait de plante du romarin :

- Lapin :

Les 2 groupes les 5 groupes de lapins ont été traité par de l'extrait de plante contenant dans chacun 7 lapins et recevant un régime alimentaire de base complété par 5g/kg et 10g/kg respectivement.

4.1.3. Acide rosmarinique :

- Rat 3 :

Afin d'atténuer les effets du mitronidazole, majoritairement ceux d'infertilité, des rat mal albinos ont été répartis en 8 groupes, les groupes soumis aux traitements a base d'acide rosmarinique, ont été exposés a des concentrations respectivement de 5mg/kg a 15 mg/kg. La période expérimentale est de 4 semaines.

4.2. In vitro :

4.2.1. Huile essentielle (R.O) :

- Coq :

Le sperme récolté des male reproductifs dilué dans un extenseur Tris et répartie en 4 aliquotes, un seul est considéré comme témoin et les 03 restant supplémenté avec des concentrations graduelles de l'huile essentielle 8.7µg/ml, 78µg/ml et 870µg/ml respectivement et analysés en 4 temps de 2h (h0, h6, h24, h48). L'expérimentation a été répétée 6 fois

- Culture bactérienne+ macrophage :

Sur des cultures bactériennes et fongiques de 48h des microorganismes majeurs qui affectent l'appareil urogénital et qui présentent une antibiorésistance vis-à-vis les antibiotiques connu potentiellement efficace, des concentrations progressives d'huile essentielle (R.O) ont été ajoutées aux cultures pour déterminer le potentiel antibactérien et antifongique 10, 50, 100, 200, 600, 1000, 2000µg/ml. Le potentiel anti-inflammatoire a été évalué sur des macrophages.

- Bélier 1:

Pour évaluer le caractère préservateur d'huile essentielle (R.O) sur des spermatozoïdes épидidymaire, des concentrations progressives de 0.5, 1, 2, 4 µl/ml ont été additionnées aux spermatozoïdes dilués préalablement dans un extenseur Tris. Chaque concentration était analysée a 4 temps séparé de 2h et une autre analyse a h24.

4.2.2. Extrait de plante du romarin :

- Bélier 2:

Semence obtenue de 4 bélier traitée, congelée, décongelée puis répartie en 4 aliquotes additionnée dans l'ordre avec les concentrations d'extrait d'huile essentielle (R.O) suivantes %, 4%, 6%, 8%. Et l'étude spermatique était réalisée dans l'immédiat.

- Bélier 3 :

L'Evaluation de l'effet in vitro de du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur du sperme de bélier congelé-décongelé a été faite sur des éjaculats obtenues à partir de trois béliers matures. Après récolte, la semence a été cryoconservés en utilisant une méthode de dilution en 2 étapes (Fraction 1: F1; Fraction 2: F2). Dans l'expérience qui fait qui est en lien avec notre travail sachant que dans cette étude, l'extrait du romarin a été utilisé en combinaison avec du jaune d'œuf. L'ajout du romarin a raison de 2% et 12% à F1, F2 ou les deux ont été évaluées a des temps différents.

- Bouc :

L'évaluation de l'effet d'extrait du romarin sur les dommages du gel dégel a été attesté sur 32 éjaculat obtenues de 4 males, traitées, congelée, décongelée puis diluées et répartie en 4 entités dont la première considérée comme témoin et le reste additionnées par les concentrations suivantes d'extrait de plante : 2%, 4%, 6%. l'analyse spermatique était réalisée juste après l'ajout de l'extrait de plante.

- Taureau :

Afin d'évaluer les vertus de l'addition de l'extrait de romarin sur la préservation des caractères morpho-cyto-physiologiques des spermatozoïdes cryoconservée, une semence récolté de 4 taureaux, traitée, congelée, décongelée puis diluée et répartie en 5 échantillons

dont 2 entre eux qui ont été additionnés respectivement par 5g.L-1 et 10 g.L-1 et analysés a 0h et 2h.

- Sanglier 3 : 1.5%.

4.2.3. Acide rosmarinique :

Homme : L'exploration de l'activité in vitro d'acide rosmarinique sur les fonctions du sperme humain a impliquée une récolte sur des donneurs (âgés de 25 à 38 ans) avaient des antécédents au cours des 2 années précédentes et qualité normale du sperme. Après purification du sperme par swimup direct dans un milieu fluide tubaire humain les spermatozoïdes ont été incubés avec 0, 1, 10, 100 ou 1000 μ M d'acide rosmarinique pour différents temps et solutions d'incubation.

- Sanglier 1 :

Pour évaluer l'effet antioxydant de l'acide rosmarinique sur la capacité de fertilisation des spermatozoïdes congelés décongelés, une récolte spermatique des sangliers jugés performant a été réalisée puis traitée et cryoconservée avec tampon lactose-jaune d'œuf, divisée en 4 aliquotes et supplémentée avec les concentrations suivantes de l'acide rosmarinique : 0 μ M, 26.25 μ M, 52.5 μ M, 105 μ M.les différents paramètres ont été étudié juste après décongélation.

- Sanglier 2 :

Pour explorer l'effet antioxydant sur la capacité de fertilisation des spermatozoïdes congelés décongelés, des éjaculats prélevés sur des sangliers matures qui ont été cryoconservée dans un tampon lactose-jaune d'œuf supplémenté avec différentes concentrations d'acide rosmarinique (0 μ M, 26.25, 52.5 μ M et 105 μ M). Les résultats ont été obtenus à 2 temps différents (0 min et 120min).

Chez ces différentes espèces la voie la plus utilisée pour l'exploration des effets des 3 molécules (huile essentielle (R.O), extrait de plante du romarin et l'acide rosmarinique), était surtout des études in vitro. En revanche, la molécule qui faisait l'objet de la plupart des études était celle de l'extrait du romarin après l'huile essentielle, et l'acide rosmarinique en faible pourcentage.

5. Présentation des résultats et discussion.

De nombreuses recherches scientifiques sur le romarin dans ses différentes formes sont effectuées sur les animaux d'élevage tel que l'ovin, bovin, caprin, volaille et porc. Du laboratoire tels que les rats, les souris et les lapins et même l'homme dans le but est de déterminer son efficacité sur les caractéristiques des spermatozoïdes ayants été exposés aux différents stress, en particulier le stress procuré le gel et dégel, ainsi les paramètres de fertilité. Ces études sont réalisées par l'utilisation de différentes méthodes d'analyses.

Pour l'évaluation de la concentration de spermatozoïdes, ils ont compté sur le microscope optique. La chambre de comptage hémostométrique a été utilisée dans la plupart des articles, dont la cellule de Thoma est la plus efficace. La motilité, la vitalité, la morphologie des

spermatozoïdes sont réalisées par microscopie optique, dont sa résolution est trop faible de 0,2µm, ainsi par le CASA.

Dans cette partie de discussion des résultats, on vas se contenter de deux études qui sont en lien direct avec nos objectifs.

- ✚ Une étude a été faite par L. Touazi et al, 2018 sur les avantages et les effets potentiellement nocifs de différente concentration de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur la semence de coq conservée à 4 ° C pendant 48 h.

Les résultats ont démontré que la qualité du sperme révélée par la motilité progressive et les vitesses des gamètes a été considérablement préservée, surtout avec les plus faibles concentrations de l'huile essentielle (87 µg / ml et 8,7 µg / ml). La dose la plus élevée était de 870 µg /ml a montré un effet spermicide complet attesté après 24 h de stockage. Cette concentration à causé des altérations probablement similaires à celles décrites dans les bactéries Moreno, S et al., 2006 ; Jordán, M et al., 2013. 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 Burt, S. (2004); Boutabia, L.et al., 2016. Chaftar et 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. [54] ont indiqué que l'huile essentielle de romarin présentait apprécier les activités antibactériennes avec des concentrations allant uniquement de 4 à 20 µg / ml. De même, il on rapporté que l'activité spermicide chez de nombreux espèces animales est associée à des dommages considérables sur différentes structures de spermatozoïdes, y compris les membranes cellulaires et l'intégrité de l'acrosome Buch, J.G et al., 1988 ; Chikhouné, A et al., 2015 ; Türk, G et al., 2016 ; 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. En réalité, les paramètres de motilité et cinématique totaux et progressifs étaient significativement conservés dans 87 et 8,7 µg / ml traitements. Après 24 h de stockage, le pourcentage de la mobilité progressif de s gamète était de 43,25 et 63,08 à 87 et 8,7 µg / ml de traitements, respectivement, contre 26,86 ± 2,36% du groupe témoin. Elmi et coll. Elmi, A et al 2017 ont rapporté que le la motilité totale et progressive était significativement altérée à partir de la concentration de 0,8 mg / ml de *R. officinalis* huile essentielle dans les spermatozoïdes de porc. Cette concentration était presque identique à la concentration spermicide utilisé dans notre expérience (870 µg / ml). À 0,2 mg / ml, le les auteurs ont observé des valeurs de motilité similaires à celles du groupe témoin. Plusieurs molécules actives telles que le 1,8 cinéole, camphre, -thujène, chrysanthénone, -cubébène, et le camphène, connu pour son activité antioxydante, ont été identifiés dans l'analyse phytochimique . Ces composés sont probablement impliqués dans les effets protecteurs observés. Ces découvertes sont conformes aux rapports précédents utilisant du romarin comme extrait aqueux (fraction riche en polyphénols) en sanglier et bouc. Les effets bénéfiques de L'huile essentielle de *R. officinalis*

peut être liée à l'antioxydant qui procure une activité limitant la peroxydation lipidique et les dommages membranaire pendant le stockage réfrigérant.

- ✚ Une autre étude a été faite par Azamoum.F et Rabia.F, 2018 sur l'intérêt des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation de la mobilité du sperme du bélier à 4°C. afin de lutter contre le stress oxydatif, différentes concentrations d'HE de *R.officinalis* ont été ajoutées au milieu de conservation du sperme du bélier stocké à 4°C pendant 24h. Les résultats ont montré que la qualité du sperme a été significativement préservée, en particulier avec les plus faibles concentrations de l'huile essentielle (0.5 µ /ml et 1 µ /ml) et le milieu contenant la cyclodextrine (ROM-CD). Les doses les plus élevées (2 et 4 µ /ml) ont montré un effet spermicide après 24h, ces deux concentrations ont provoqué des altérations probablement similaires à celle décrites au niveau des bactéries (Moreno, S. et al., 2006 ; Satyal, P. et al., 2017). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés sur le sperme aviaire par Touazi L. et al., (2018). Plusieurs molécules actives telles que le 1,8 cinéole, le camphre, le -thujène, la chrysanthénone, le -cubébène, et le camphène, connu pour son activité antioxydante, ont été identifiés dans l'analyse phytochimique, Touazi L. et al., (2018) a suggéré que ces composés sont probablement impliqués dans les effets protecteurs observés. Elmi A. et al., (2017) a indiqué un effet spermicide complet de *Thymbra capitata* à une concentration de 0.4 mg/ml mais des concentrations tolérées de *R.officinalis* allant jusqu'à 0.6 mg/ml. Une étude réalisée par Motlagh MK et al., (2014) a déterminé un effet bénéfique de l'extrait phénolique de romarin sur les paramètres spermatiques. D'après nos résultats, nous constatons que la concentration optimale est de 0.5 µ /ml, largement supérieure à celle utilisée par Touazi L. et al., (2018) (8.7 µg/ml), cela pourrait s'expliquer par le type de l'animal étudié. Selon les résultats de cette étude, l'utilisation de petites concentrations in vitro pourrait être bénéfique aux spermatozoïdes du bélier dans des conditions de 4°C, en effet les paramètres de mobilité analysés (VCL, VSL, VAP, % mobiles et progressifs) ont été significativement conservés notamment dans les concentrations 0.5 µ /ml et 1 µ /ml.

Conclusion et recommandations

Dans notre présent travail nous avons tenté de contribuer à l'étude de l'effet de l'utilisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* sur la préservation des caractères morpho-cytophysiologique des spermatozoïdes caprins. Malheureusement, on n'a pas pu témoigner nos objectifs par des résultats expérimentaux. De ce fait, on est opté à une méta-analyse des articles qui vont dans le même sens de nos objectifs et qui traitent en supplémentation des dérivés de la plante du romarin tel que l'extrait de la plante et l'acide rosmarinique en élargissant la panel des espèces étudiées et les objectifs qui tour autour toujours sur le système reproducteur. Les résultats obtenus d'après les articles ne permettent pas de dégager un effet positif certain chez le modèle animal mais il y en a toujours un effet repro-protectif tel que la préservation contre les cryodommages de la semence et contre le stress oxydatif ainsi qu'une stimulation de la fertilité masculine.

L'huile essentielle (R.O) est un produit naturel avec une grande possibilité d'utilisation dans la médecine et récemment chez les animaux. Elle est devenue d'un intérêt considérable en raison de l'augmentation des données sur leurs effets utiles sur les animaux et la reproduction humaine.

Les niveaux et les modalités de l'administration de cette huile essentielle aux régimes alimentaires sont très importants car ils ont plusieurs effets sur la qualité du sperme, la capacité à maintenir la

viabilité, la motilité, le nombre de spermatozoïdes et la fertilité.

En outre, l'huile essentielle (R.O) est associée à une activité antioxydante très puissante in vitro d'où il y'a une diminution des dommages d'ADN et de la chromatine avec élévation du poids corporel et testiculaire.

A cause des contradictions, notre étude reste incomplète pour cela nous somme toutefois convaincues que notre initiative mérite d'être approfondie et nos données fournissent une nouvelle perspective pour comprendre l'effet de l'huile essentielle (R.O) sur la préservation des spermatozoïdes vis-à-vis les cryodommages. Ces informations pourraient ouvrir la voie à d'autres études portées sur :

- L'exploration des mécanismes physiologiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur différents espèces.
- 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 leurs propriétés in vivo, par l'évaluation de leur impact sur différents types cellulaires.

1. A Hadj-Seyd, A Kemassi, YH Kouider, A Harma - Phytothérapie, 2016 – Springer. [A. IRITANI, Y. NISHIKAWA](#). Studies on the egg yolkcoagulating enzyme in goat semen. IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme, 1972.
2. Adamou-N'daye E.M, Gbangbouche A.B, Adjoui A, Jondet R, 2003. « Cryopréservation de la semence de taureau de race Borgou au Bénin » Revue Méd. Vét., 154, 1, 3-8.
3. 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.
4. Alberio R., 1976. «Rôle de la photopériode dans le développement de la fonction de la reproduction chez l'agneau "île de France" de la naissance à 21mois» (thèse doctorat 3^{ème} cycle, INRA de Tours - France.
5. Amirat. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with
6. Assanmacher J. CNRS. Paris, p483-493.
7. [Audrey Gainard](#). Lavandes et lavandin, utilisation en aromathérapie : enquête auprès des pharmaciens d'officine, 2016.
8. Autef P., Blisson G., Brard C., Poncelet J. L., 1997. «L'examen d'achat d'un bélier» . Le point vétérinaire vol 31 N°206 P15-21.
9. Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. 2006. The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73: 413-421.
10. Baril G, Chemineau P, Cognié Y, 1993. « Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins ».
11. Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guerin Y., Leboeuf B., Orgeur P., V. J. C. (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et caprins.
12. Ben Ali et al. Altered Antioxidant Status and Increased Lipid Per-Oxidation in Seminal Plasma of Tunisian Infertile Men, 2012.
13. Berndston .WE, Igboeli G, Pickett BW 1987. «Relationship of absolute numbers of sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls». *J. Anim. Sci.* 64: 241-246.
14. Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle, France, 289p.
15. Bittman E L., Dempsey R. J., Karsh F. J., 1983a. «Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe». *Endocrinology*, 113, 2276-83.
16. Chavette P, 1992. « Examen de la fonction génitale de l'étalon » *Rec. Med. Vét.*, 168 (6/7), 395-410.
17. Chemineau P, Delgadillo J.A, 1994. « Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins » *INRA. Prod. Anim.* 7 (5), 315-326.

18. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo J.A, Leboeuf B, 1998. « Photopériodisme et reproduction chez les caprins ». INRA, neuroendocrinologie sexuelle, physiologie de la reproduction, 37380 Nouzilly, France.
19. Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo J.A, Deletang F, Pobel T, Brice G, 1996. « Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins ». INRA Prod. Anim., 9 (1), 45-60.
20. Christian, M. (2009). La reproduction des ovins, des caprins et des chameaux cas de la zone tropicale, 1–42.
21. Colas G, Guerin Y, Lemaire Y, Montassier Y, Despierres J, 1986. « Variations saisonnières du diamètre testiculaire et de la morphologie des spermatozoïdes chez le bélier Vandéen et chez le bélier Texel » *Reprod. Nutr. Develop.* 26 (3), 863-875.
22. Colas G, Guerin Y, Lemaire Y, Montassier Y, Despierres J, 1986. « Variations saisonnières du diamètre testiculaire et de la morphologie des spermatozoïdes chez le bélier Vandéen et chez le bélier Texel » *Reprod. Nutr. Develop.* 26 (3), 863-875.
23. Collin J. P., Arendt J., Gem W., 1988. «Le troisième œil». La recherche, n°203, Volume 19, 1154-1165.
24. Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. Les Actes Du BRG, 4(OCTOBER), 173–183.
25. Corteel J. M., 1977. «Production, storage and artificial insemination of goat semen». In: Management of reproduction in sheep and goats Symposium, Madison, july 24-25, 41-57.
26. Corteel J.M, 1976a. *Ann. Zootech.* 25, 567-571.
27. Corteel J.M, 1988. «Collection processing and artificial insemination of goat semen». Extrait de Goat production, Gall C., 223-241.
28. Corteel JM. Quelques aspects de la reproduction des caprins. Rapport préparé pour le colloque sur l'utilisation l'amélioration du cheptel caprin polonais. Jastrzebiec. Movembre 1994: 4-23.
29. Courot M., Richetin C., 1968. «Développement du testicule chez l'agneau. Établissement de la spermatogenèse». *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 2 (1) 25-41.
30. Critser JK, Arenson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD (1987) Cryopreservation of human spermatozoa II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 47: 980– 984.
31. Dadoune JP, Dumoulin A. Chap. 13. Structure et fonctions du testicule. In: Thibault C, Levasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme Paris Ed. INRA 2001 : 256-289.
32. Delgadello. JA, Chemineau. P, 1992. « Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats by short photoperiodic cycles ». *J. Reprod. Fert.*, vol 94, 45-55.
33. Delgadillo J.A, 1990. « Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques » Thèse Montpellier, France, 119p.
34. Derashri et al. Reproduction in bucks, spermatogenesis, duration of seminiferous epithelial cycle and germ cell degeneration. In: Pre-Conference Proceedings Abstracts of Contributory Paper. 5th Inter. Conf. on Goats, New-Delhi, Mars 1992, Vol I : p263.
35. Dérivaux F, Ectors J, 1986. « Reproduction chez les animaux domestiques ». 3^{ème} Edition cabay louvain-la-neuve, Belgique.

36. Dérivaux J, 1971. « Reproduction chez les animaux domestiques ». Tome 1 et 2. Edition Déronaux, Liège.
37. Dérivaux J. Ectors F. Reproduction chez les animaux domestiques Louvain-la-Neuve Ed. Cabay 1985 : 1141p.
38. Di Santo et al. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART, 2012.
39. Dumont P., 1997. «Point Vétérinaire». Vol 28.n°185, Août –Septembre.
40. Elwishy A.B., Elsayaf S.A., 1971. Development of sexual activity in male Damascus goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 5, 350-355.
41. et rythmes de reproduction». Levasseur édition marketing., P 699- 724.
42. Ezekwe A, 1988a. « Ejaculate characteristic of two breeds of tropical bulls N°dama and Muturu » Joint seminar on animal of African countries, Addis-Ababa.
43. F. Lahnsteiner et al. Semen cryopreservation in Salmonidae and in Northern pike, 2000.
44. Fahy, G.M., et al. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426. doi:10.1016/0011-2240(84)90079-8.
45. Festy D., 2015. Mon abécédaire illustré des huiles essentielles. Leduc.S Editions, Paris. 240p.
46. Figueredo G., 2007. Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université de Clermont-Ferrand, France, 417p.
47. Foulkes, J.A. (1977) The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and
48. [Gianni Sacchetti](#) et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, 2005.
49. Guérin, Y., Locatelli, Y., Comizolli, P., Mauget, R., Mermillod, P., Legendre, X., ... Dacheux, J.-L. (2003).
50. Gülçin, I. (2012) Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
51. 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.
52. Hafez E.S.E, 1987. « Reproduction in farm animals » 1vol. Leo-Febiger, 5ème éd., 633p.
53. Hanzen C 2006. «Propédeutique de l'appareil reproducteur mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc». Cours de reproduction, université de Liège, Belgique.
54. Hanzen Ch., 2005. Cours doctorat, chapitre 12. «L'anoestrus saisonnier des petits ruminants».
55. Hanzen Ch., 2005. Cours doctorat, chapitre 12. «L'anoestrus saisonnier des petits ruminants».
56. Herbert J., Stacey P. M., Thorpe D. H. 1978. «Recurrent breeding seasons in pinealectomized or optic-nerved sectioned ferrets». *J. Endocr*; 78, 389-397.
57. Hochereau-De-Revier M. T., 1979. «Sertoli cells numbers and its relation to testicular size in rams and bulls». *J. Repro. Fert. Suppl* 34.101-114.
58. Hoffman B., Leidl W., Karg H., 1972. Seasonal rhythm of reproduction in the male goat. *Proc. 7th Intl Cong. Anim. Reprod. A. I., Munich*, Vol. 3, 2065-2068.

59. INRA., 1998. «Photopériodisme et reproduction caprine». www.tours.inra.fr
60. J. Gadea. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine, 2003.
61. Jainudeen M. R., Wahid H., Hafez E. S. E., 2000. «Sheep and goat». In: Reproduction in farm animals, E. S. E. Hafez & B. Hafez, 172-181.
62. [Jose M. Fernández-Ginés](#). Meat Products as Functional Foods: A Review, 2005.
63. Jumeau, F. (2015). Caractérisation du protéome du spermatozoïde humain To cite this version : HAL Id : tel-01144470, 250.
64. Karsch F. j., Bittman E. L., Foster D. L., Goodman R.L., Legan S. J., Robinson J. E., 1984. «Neuroendocrine basis of seasonal reproduction». Recent Prog. Horm. Res., 40, 185-232.
65. [Kelley Britton Keys](#). Poly(ethylene glycol) Star Polymer Hydrogels, 1998
66. Klein D.C., et al., 1993. «Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during a prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous productive rhythm». *biol. reprod.*, 41, 1034- 1046.
67. laboratoires». MALOINE S.A. EDITEUR. 457p, p81-276.
68. Lakhdar L., 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 183p.
69. Lall H.K., 1947. Some common breeds of goats in India. III. *Indian Fmg*, 8, 322-327.
70. Land R.B., Robinson D.W., 1985. «Genetics of reproduction in sheep». Butter-worth, Londres 427p.
71. Leboeuf B, Restall B, Salamoun S, 2003. «Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle ». *INRA Prod. Anim.*, 16 (2), 91-99.
72. Legan S.J., Winans S.S., 1981. «The photoneuroendocrine control of seasonal breeding in the ewe». *Gene. Comp. Endoc*, 45, 317-328.
73. Lessard Claude. Gauthier (C.) et al. (1997). - *Pour une théorie de la pédagogie. Recherches contemporaines sur le savoir des enseignants*. In: *Revue française de pédagogie*, volume 127, 1999. Approches cliniques d'inspiration psychanalytique. pp. 172-176.
74. Lincoln G.A., 1971. «Photoperiodic control of seasonal breeding in the ram: participation of the cranial sympathetic nervous system». *J. Endocr.*, 82, 135-147.
75. Malpau B., 2001. Dans «la reproduction chez les mammifères et l'homme» environnement
76. Malpau B., Viguié C., Thiéry J.C., Chemineau P., 1996. «Contrôle photopériodique de la reproduction». *INRA. Prod. Anim.*, 9 (1), 9-23.
77. Malpau. B, Robinson. JE, Brown. MB et Karsch. FJ, 1987. « Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin ». *Biol. Reprod.*, vol 36, 1333-1341.
78. MARIE ELISABETH LUCCHESI, FARID CHEMAT, and JACQUELINE SMADJA(2004) : *Flavour And Fragrance Journal* *Flavour Fragr. J.*; 19: 134-138.
79. Marquis P-H, 1990. « Synchronisation de l'oestrus et insémination artificielle dans l'espèce caprine ». Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Thèse pour le doctorat vétérinaire, diplôme d'état. 156p.
80. Maxwell W.M.C, Evans G, 1987. «Salamon's artificial insemination of sheep and goats». Butterworths, Sydney, Australia, 102p.

81. Mighri et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone, 2010.
82. Milovanov V. 1986. « Techniques de récolte du sperme » dans « la reproduction chez les animaux domestiques » de Derivaux J, Ectors F. vol2. Academia ed. p565-614.
83. Moussa et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, 2002
84. [O.I.Aruoma](#), [J.P.E.Spencer](#), [R.Rossi](#), [R.Aeschbach](#), [A.Khan](#), [N.Mahmood](#), [A.Munoz](#), [A.Murcia](#), [J.Butler](#), [B.Halliwell](#). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs, 1996
85. Onofrio Annunziata, Neer Asherie, Aleksey Lomakin, Jayanti Pande, Olutayo Ogun, and George B. Benede. Effect of polyethylene glycol on the liquid–liquid phase transition in aqueous protein solutions, 2002.
86. Optidyl®, a commercial egg yolk extender, 2004.
87. Ortavant R., Loir., 1978. «The environment as a factor in farm animals. 4ème world congress of animal production», 20-26 April 1978, Bnenos Aires. Vol. pp. 423-451.
88. Ortavant R., Pelletier J., Ravault J. P., Timmonier. J., Volland-Nail P., 1985. «Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals». In «Oxford reviews of reproductive biology».
89. Ouis N., 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de Doctorat, Université d’Oran, 239p.
90. Pace, M.M. & Graham, E.F. (1974) Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39, 1144-1149.
91. 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.
92. Pelletier J, Ortavant R., 1970. «Influence du photopériodisme sur les activités sexuelles, hypophysaires et hypothalamiques du belier île de France dans la photorégulation chez les oiseaux et les mammifères». Colloque CNRS, Montpellier, 17, 22 juillet 1967. eds. Benoit J et Zarrouk A, Souilem O, Drion P-V, Beckers J-F, 2001. « Caractéristiques de la reproduction de l’espèce caprine ». Ann. Méd. Vet, 145, 98-105.
93. Pierron C., 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 257p.
94. Ponthier, J., van den Berghe, F., Parrilla Hernandez, S., Hanzen, C., & Deleuze, S. (2014). Congélation de sperme dans l’espèce équine: état des lieux et perspectives. Annales de Médecine Vétérinaire, 159(1), 56–71.
95. [R G Wales](#), [T O’Shea](#). The oxidative utilization of fructose and acetate by washed ram spermatozoa in the presence or absence of potassium and magnesium, 1966.
96. Rouger Y., 1974. Etude des interactions de l’environnement et des hormones sexuelles dans la régulation du comportement sexuel des Bovidae. Thèse de Doctorat Sciences Naturelles, Université de Rennes, 197 p.
97. Salamon S, 1976. « Artificial insemination in sheep » Animal husbandary department university of Sydney, 139p.
98. Saumande J., Rouger Y., 1972. Variations saisonnières des taux d’androgènes dans le plasma de sang périphérique chez le bouc. C.R. Acad. Sc., Paris, 274, 89-92.

99. Scaramuzzi R.J., 1994a. The 'female effect' in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *J. Reprod. Fertil.*, 100, 521-531.
100. Sebrotynnek et al (2005). Comparison of natural rosemary extract and BHAIBHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science* .69:289-296.
101. Setchell B.P., 1977. «Male reproductive organs and semen». Extrait de Cole H.H. « reproduction in domestic animals » third edition, 230-255.
102. Sutour S., 2011. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France, 222p.
103. Swanson L. H., Kuypers H.G. J. M., 1980. «The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labelling methods». *J. Comp. Neurol.*, 194, 550-570.
104. Taure O, 1988. « Insémination: Capri I.A, récolte et sème ». *La chèvre*, 167, 36-39.
105. the integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 49, 277-284.
106. Thimonnier J., 1996. «Numéro spécial photopériode et reproduction». *INRA. Prod. Anim.* 9 (1), 3-8.
107. Vaissaire J-P., 1977. «Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de
108. Veena Prajapati. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, 2005.
109. Veeran Godwa Kadadji and Guru V. Betageri, *Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Application*, 2011.
110. Velé H., 2015. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments. Thèse de Doctorat, Université d'Angers, France, 255p.
111. William Holt. Basic aspect of frozen storage of semen, 2000.
112. Y.G. Gillij. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina; 2007
113. Yu. HS, Tsin. ATC et Reiter. RJ, 1993. « Melatonin: History, Biosynthesis, and Assay Methodology ». In: Yu H.S., Reiter R.J. (Eds), *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications*, 1-16. CRC Press, Boca Raton, Florida.
114. Zenasni L., 2014. Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* coss et d'*Origanum compactum* benth et du genre *nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse de Doctorat, Université de Rabat, Maroc, 169p