

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université a. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés
Laboratoire de Génie pharmaceutique.

Mémoire EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie pharmaceutique

Présenté par

- Anki Melissa
- Lamari Ilissa

Thème

*Les Alginates de sodium comme système
d'encapsulation de l'huile essentielle du Romarin.*

Soutenue le 03/07/2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr. AZZOUG Moufok	MCA	Université de Bejaia	Président
Mme CHIBANI Nacera	MCA	Université de Bejaia	Examinateur
Mme TAOUZINZT Lamia	Doctorante	Université de Bejaia	Encadrant
Mr FATMI Sofiane.	MCA	Université de Bejaia	Co- Encadrant

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, YEMA qui est mon exemple tu m'as encouragé tout au long de ma vie, ton amour et ta tendresse font de moi une personne épanouie, à VAVA qui a toujours su croire en moi et m'encouragé à sa manière, vous êtes tous les deux les êtres les plus chères pour moi.

A mes chers deux grands frères IDIR et SALIM pour leurs soutiens, et à toutes les personnes de ma grande famille.

Je dédie ce travail à la mémoire de mon oncle KHALI BENKACEM qu'il repose en paix tu as été un exemple pour nous tous.

A mes adorables copines : RACHIDA, SONIA, TITA, SYLIA, SISSA, SOUAD, KARIMA et BOUCHRA je vous adore toutes, et également mes amis, qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A mon très cher binôme MELISSA tu as été une amie, binôme, camarade avec qui j'ai contribué à faire ce travail.

A tous ceux que j'aime.

ILISSA

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, c'est grâce à vous que j'ai pu atteindre cette réussite, votre amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, à mon chère PERE pour ses encouragements son soutien et son sacrifice, afin que rien n'entrave le déroulement de mes études. À ma chère MERE, qui ne cesse jamais de penser et de prier pour moi et me donne toujours espoir dans cette vie, et qui m'arrose de tendresse, merci papa merci maman, et je souhaite qu'un jour je pourrai vous rendre une partie de ce que vous m'avez donné.

Mes chères frères YANIS et SALAS, à ce que je souhaite de réussite et du succès dans leurs vies. Je vous aime trop.

Mes chères tante ZAHIA et DJAWIDA qui ont une grande place dans mon cœur et sans oublier mes autres tantes, merci pour votre amour et encouragement et pour aussi mon oncle MADJID et à ma chère grande mère paix à ton âme car tu a toujours été à mes côtés de puis ma naissance.

Ma fidèle copine KAMYLA sans oublier mes chères cousines qui ont été toujours à mes côtés et qui ne cesse de me soutenir toute ma vie.

Mes chères amies avec qui j'ai partagé que de bons moments.

Moi-même et à ma jolie ILISSA, mon amie avant que sois ma binôme avec qui j'ai partagé ce travail.

MELISSA

Remerciements

On souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire

En premier on tient à remercier notre promotrice Madame L.TAOUZINET pour sa généreuse disponibilité et pour sa grande professionnalité, pour nous avoir guidés et mettre en disposition ses connaissances pour nous permettre d'achever ce travail, on a énormément appris.

Nos remerciements vont également à notre co-promoteur Mr S.FATMI, pour ses conseils et son aide lors de la réalisation de notre mémoire.

Nous tenons à remercier tous les membres de jury pour avoir accepté de juger notre travail et de l'améliorer.

Un grand merci à nos familles, tous nos amis et nos collègues qui nous ont été d'un soutien moral tous au long de ce travail.

Enfin, une pensée à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de notre travail.

ILISSA et MELISSA

Sommaire

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1 solubilité et système d'encapsulation	
I.1. Introduction du chapitre	3
I.2. La solubilité	
Définition La solubilité.....	3
Définition La solubilisation.....	3
I.2.2. Importance de la solubilité.....	4
I.3. La biodisponibilité	
I.3.1. Définition.....	4
I.4. Les problèmes des principes actifs et médicaments hydrophobes.....	5
I.5. Les systèmes d'encapsulation	
I.5.1 Définition de système d'encapsulation.....	5
I.5.2 Les différents systèmes d'encapsulation.....	6
I.5.2.1. Cyclodextrine.....	6
I.5.2.2. Polyéthylène glycol.....	7
I.5.2.3. Les liposomes.....	8
I.5.2.4. Les Alginate	
1) Introduction.....	10
2) Description de l'alginate E(401).....	10
3) la Biosynthèse des alginates.....	10
4) Préparation des alginates.....	11
5) Propriétés.....	12

Sommaire

Solubilité.....	12
Viscosité.....	13
6) Développement des alginates.....	13
7) Alginate comme système d'encapsulation des principes actifs.....	13
Les microsphères.....	13
Les billes	13
Les gels	13
Les membranes.....	14
8) Applications.....	15
9) Désavantage des alginates.....	15
Chapitre II cryoconservation spermatique	
II.1. Introduction.....	16
II.2. Le sperme.....	16
II.3. Les spermatozoïdes.....	16
II.3.1. Définition.....	16
II.3.2. Les caractéristiques fonctionnelles des spermatozoïdes.....	17
II.3.3. Mobilité des spermatozoïdes.....	17
II.4. Cryoconservation spermatique	18
II.4.1. Généralité.....	18
II.4.2. Définition de la cryoconservation.....	18
La cryoconservation chez l'humain.....	19
Chez l'animal.....	19
II.4.3. L'intérêt de la cryoconservation.....	19

Sommaire

II.4.4. Stress oxydatif.....	20
II.4.5. Choc thermique.....	20
II.4.6. Les stratégies adoptés pour réduire les effets secondaires du procédé de Cryoconservation	20
Agents Cryo protecteurs.....	20
II.4.7. L'utilisation des huiles essentielles dans la cryoconservation.....	21
Chapitre III	
III.1. Introduction.....	22
III.2. Définition des huiles essentielle.....	22
III.3. Composition chimique des HE.....	22
III.4. les Propriétés physico-chimiques des HEs.....	22
III.5. Conservation des huiles essentielles.....	23
III.6.1. Introduction sur le romarin.....	23
III.6.2. Etymologie.....	24
III.6.3. Description du Romarin.....	24
III.6.4. Composition et utilisation du romarin.....	25
Médecine.....	26
Alimentation.....	26
Industrie agro-alimentaire.....	27
Parfumerie et cosmétique.....	27
Cryoconservation spermatique.....	27
III.6.5. Toxicité.....	28

Sommaire

Chapitre IV Matériel et méthode

IV.1. Introduction	29
IV .2.Matières premières et matériel utilisé.....	29
IV .3.Les matières premières.....	29
IV .3.1.Le romarin (BS)	30
IV .3.2.Alginate de sodium (sigma Aldrich).....	30
IV.3.3. Le chitosane (sigma Aldrich).....	30
IV .3.4.Le chlorure de calcium (biochim).....	31
IV .3.5.Acide acétique (biochim).....	32
IV .4.Equipement et appareillage utilisés.....	32
IV .4.1.Caractérisation d’huile romarin.....	32
IV .4.1.1. Détermination de densité d’HE (romarin).....	32
IV .4.1.2. Détermination de ph d’HE (romarin).....	33
IV.5.Optimisation d’un système d’encapsulation Alg/Chi / Rom –Méthodologie de plan d’Expérience - Plan de Box-Behnken.....	33
IV .5.1.Préparation des billes alginates/chitosanes/Romain.....	34
IV .5.2.Teste de motilité	35
IV .5.2.1.Collecte de sperme épидидymite.....	35
IV .5.2.2. Analyse de la motilité.....	36
IV .5.3.Caractérisation de billes Alg/Chi/Rom.....	36
IV .5.3.1.Identification de la bille par HPLC.....	36

Sommaire

IV .5.3.2. Analyse par spectroscopie l'infra rouge à transformer de fourrier.....	37
a). Pour les solides.....	37
b). Pour les liquides.....	37
IV .5.3.3 Etude de l'indice de gonflement.....	37
Chapitre V Résultat et discussion	
V.1.Caractéristiques de l'huile HE (romarin).....	39
V.2.Optimisation de l'encapsulation Na-Alg/Chi/Rom.....	39
V.3.Détermination de l'optimum.....	42
V .4. Caractérisation de la solution optimale.....	42
V.4.1.Caractérisation par HPLC.....	42
V.4.2. Caractérisation par Infrarouge.....	45
V.4.3.Caractérisation par indice de gonflement.....	47
V.5.Teste de motilité spermatique.....	48
CONCLUSION.....	51

Annexe

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'optimisation de PA.....	1
Figure 2 : Simulation d'une concentration de médicament par rapport à la courbe du temps pour deux médicaments.....	5
Figure 3 : Structure générale des cyclodextrines.....	7
Figure 4 : Structure chimique des polyéthylènes glycol (PEG).....	8
Figure 5 : Schéma représentant un liposome.....	9
Figure 6 : La structure chimique de l'alginate de sodium.....	10
Figure 7 : Premières étapes de l'extraction de l'alginate chez les algues brunes.....	11
Figure 8 : Algue Laminaria.....	12
Figure 9 : Schéma du spermatozoïde.....	17
Figure 10 : Le romarin.....	25
Figure 11 : Huile essentielle Romarin.....	26
Figure 12 : Un plan de box benhken avec trois facteurs.....	33
Figure 13 : Schéma représentation les étapes de préparation des billes.....	35
Figure 14 : L'épididyme.....	36
Figure 15 : Les conditions optimales pour la motilité.....	40
Figure 16 : Les facteurs influencent la motilité spermatique.....	41
Figure 17 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon camphre.....	43
Figure 18 : Chromatogramme de HPLC de l'optimum.....	43
Figure 19 : Chromatogramme HPLC du placebo.....	44
Figure 20 : Les spectres d'Alg/Chi/Rom/Plc de spectroscopie l'infra rouge a transforme fourrier.....	45
Figure 21 : Graphe indiquant l'indice de gonflement.....	47
Figure 22 : Valeurs moyennes (+/- SEM) pour curviligne vitesse (VCL).....	48
Figure 23 : Valeurs moyennes (+/-SEM) vitesse moyenne du trajet (VAP).....	49
Figure 24 : Valeurs moyennes (+/-) vitesse linéaire droite (VSL).....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : différents médicament sur le marcher utilisant les alginates.....	15
Tableau 2 : H/E Rom récolté dans déférents pays dans le monde avec leurs compositions...25	25
Tableau 3 : Principales utilisations du romarin en Algérie.....	28
Tableau 4 : Les propriétés physico-chimiques de l'alginate.....	30
Tableau 5 : Les différentes caractéristiques physico-chimique du chitosane.....	31
Tableau 6 : Les différentes caractéristiques physico-chimique du cacl ₂	31
Tableau 7 : Les propriétés physico-chimiques de l'acide acétique.....	32
Tableau 8 : La matrice d'essaie.....	34
Tableau 9 : La composition en masse de billes de deux essaies d'un ph de 2.5.....	37
Tableau 10 : La composition en masse de billes de deux essaies d'un ph de 7.5.....	38
Tableau 11 : caractéristiques Densité, pH de l'HE Rom à température ambiante (20-25°C).	39
Tableau 12 : Matrice d'expérience donnée par le plan Box-benhekn.....	40
Tableau 13 : Composition d'optimum.....	42
Tableau14 : les valeurs de motilités pour optimum.....	42
Tableau 15 : les groupements fonctionnels de FTIR.....	46
Tableau 16 : Résultats de l'indice de gonflement des billes.....	47

Liste des abréviations

Pa : Principe actif.

He : Huile essentielle.

CD : Cyclodextrine.

PEG : Polyéthylène glycol.

ASC : l'aire sous la courbe.

C max : Concentration maximale.

NA-Alg : Alginate de sodium.

Chi : Chitosane.

I A : Insémination artificielle.

ROS : Réactif oxygène species.

Rom : Romarin.

Ros : Rosmarinus.

Alg/Chi/Rom : Alginate chitosane romarin.

HPLC: High-performance liquid chromatography.

I : Indice de gonflement.

MI : Masse initial.

MF : Masse final.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier.

B.R : Billes avec rinçage.

VCL : Vitesse curviligne.

VAP : Vitesse moyen du trajet.

VSL : Vitesse linéaire droite.

Introduction générale

Un des défis majeurs de la formulation de médicaments topiques est la solubilisation des principes actifs. En effet, leur degré de solubilité influence souvent le choix des excipients et des paramètres de formulation à mettre en œuvre pour un développement réussi [1].

La solubilité des principes actifs est un facteur critique dans le développement d'un médicament. La majorité des principes actifs se caractérise par une faible solubilité dans l'eau, ce qui nécessite une optimisation du choix des excipients et des conditions de formulation comme le montre le schéma (1).

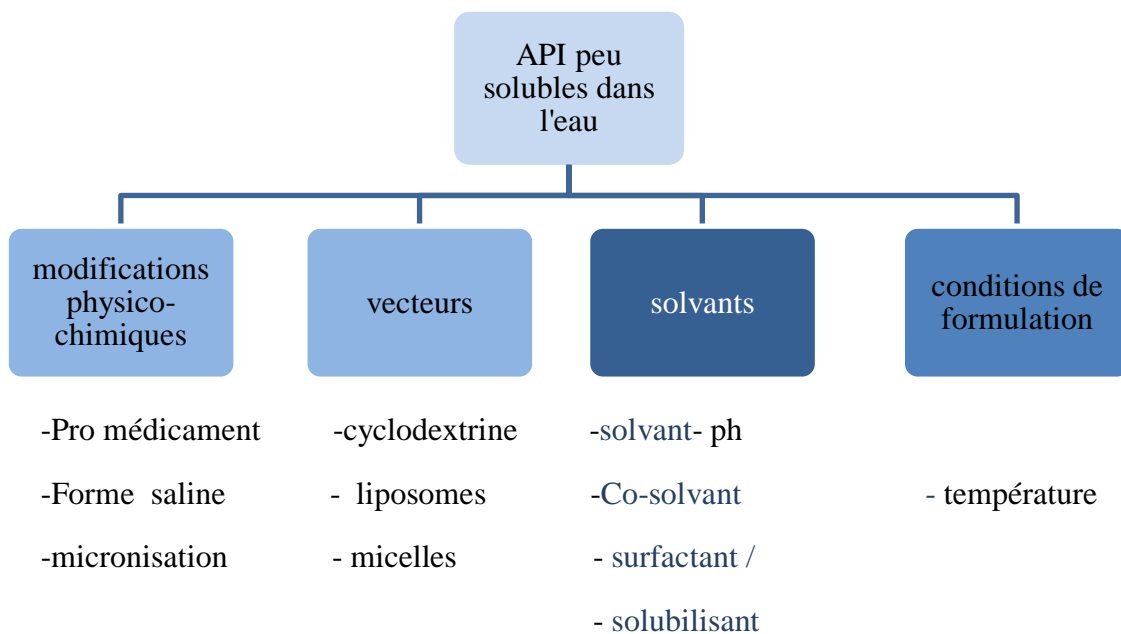


Figure 1 : Schéma d'optimisation de PA.

Pour améliorer la solubilité des principes actifs sans avoir recours à des modifications physico-chimiques ou des procédés de formulation complexes, la clé est la sélection d'un système solvant / Co-solvant / solubilisant adapté à votre principe actif

L'encapsulation peut être fortement utile pour protéger les antioxydants de la dégradation par contact direct avec des facteurs externes tels que la lumière, l'oxygène, les produits chimiques, la chaleur et la pression..., ainsi que pour augmenter la biodisponibilité dans les membranes

Introduction général

et fluides biologiques. Parmi les systèmes d'encapsulation les plus cités dans la littérature on retrouve : les cyclo-dextrines, les liposomes, le polyéthylène glycol et polymères[2].

Les alginates sont l'un des polymères naturels qui sont souvent utilisés dans les systèmes de délivrance de médicaments et de protéines. L'utilisation de l'alginate peut offrir plusieurs avantages, notamment la facilité de préparation, la biocompatibilité, la biodégradabilité et la non-toxicité. Il peut être appliqué à diverses voies d'administration de médicaments, y compris les systèmes de délivrance de médicaments ciblés ou localisés[3].

L'objectif du présent travail est de mettre en œuvre un système innovant d'encapsulation de l'huile essentielle du Romarin (He) en utilisant l'alginate de sodium et évaluer son efficacité dans le milieu de la conservation spermatique. En effet, l'huile essentielle du Romarin est largement utilisée particulièrement seule (non encapsulées), bien caractérisées et approuvées dans la cryoconservation spermatique [4].

La première partie de notre travail, est une étude d'optimisation des paramètres de formulation des billes alginate / HE Romarin/Chitosane. Par suite, afin de démontrer l'impact des formulations obtenues sur la cellule spermatique. La formulation optimale a été caractérisée.

Dans ce manuscrit, la première partie est une étude bibliographique concernant les trois notions de notre travail, à savoir la solubilité et les systèmes d'encapsulation (liposomes, CD, PEG, Alginate de sodium...), ensuite la cryoconservation spermatique et l'huile essentielle du Romarin. Dans la deuxième partie nous exposant les méthodes et les résultats trouvés. Enfin, une conclusion et une identification des perspectives qui pourraient enrichir et compléter le travail ont été avancées.

Etude bibliographique

I.1. Introduction du chapitre

Dans les années 1960, l'encapsulation de cristaux liquides par la gélatine et la gomme d'acacia pour écrans thermosensibles a été décrite par Ferguson [5]. Cette méthode d'encapsulation a permis le développement des écrans à cristaux liquides utilisés pour les structures aérospatiales [6].

L'encapsulation qui se résume à piéger un composé ou d'un système au sein d'un matériau dispersé en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structure et sa fonctionnalisation, en développant cette technique l'homme n'a fait que reproduire la nature [7].

L'encapsulation est parmi les préparations pharmaceutiques en cours d'élaboration par les grandes firmes médicamenteuses [8].

Dans ce chapitre, il sera présenté la solubilité, biodisponibilité ainsi les différents polymères utilisés dans l'encapsulation, on se focalisera sur l'alginate de sodium qui sera le polymère utilisé dans l'encapsulation.

Les alginates, sont peu connus du grand public, sont pourtant des produits aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines chacun de nous les consommes ou les utilise régulièrement sans même le savoir, les industries y trouvent une propriété commune : la capacité de gélification de ce produit naturel, origine qui est très bien perçue actuellement dans notre société [9].

I.2. La solubilité

I.2.1. Les définitions

- **La solubilité** : est définie en termes quantitatifs comme la concentration de soluté dans la solution concentrée à une certaine température, et dans ce sens elle peut être définie comme une interaction spontanée de deux substances ou plus pour former une dispersion moléculaire homogène [10].
- **La solubilisation** : peut être définie comme une préparation d'une solution isotrope thermodynamiquement stable d'une substance normalement insoluble ou légèrement soluble dans un solvant donné par l'introduction d'un composant ou des composants supplémentaires [11].

I.2.2. Importance de la solubilité

- L'efficacité thérapeutique d'un médicament dépend de la biodisponibilité et en fin de compte de la solubilité de molécules de médicament.
- La solubilité est un des paramètres important pour atteindre la concentration désirée de médicament dans la circulation systémique pour que la réponse pharmacologique soit localisée.
- Faible solubilité est le problème majeur rencontré avec le développement de la formulation de nouvelles entités chimiques.
- Tout médicament à être absorbé doit être présent sous la forme d'une solution aqueuse au niveau du site d'absorption. [12]

I.3. La biodisponibilité

I.3.1. Définition

- **La biodisponibilité** est une mesure de la vitesse et du taux auxquels un produit chimique ayant une action thérapeutique est absorbé dans la grande circulation à partir d'une préparation pharmaceutique et atteint le lieu d'action.

L'ingrédient actif de la plupart des médicaments pris par voie orale est libéré dans les voies gastro-intestinales et atteint son lieu d'action par la grande circulation. La concentration sanguine de l'ingrédient actif et/ou de ses métabolites actifs est donc un marqueur de la concentration au lieu d'action et une mesure valide de la biodisponibilité. La courbe de la concentration sanguine en fonction du temps (obtenue par une série de mesures effectuées à divers moments) témoigne non seulement de la libération de l'ingrédient actif par la préparation pharmaceutique et de son absorption à partir des voies gastro-intestinales, mais aussi d'autres facteurs comme le métabolisme pré systémique, la diffusion et l'élimination. La biodisponibilité est évaluée au moyen de deux grands paramètres pharmacocinétiques [13] (voir figure) :

- L'aire sous la courbe (ASC) de la concentration sanguine en fonction du temps
- La concentration sanguine maximale (C_{max}).

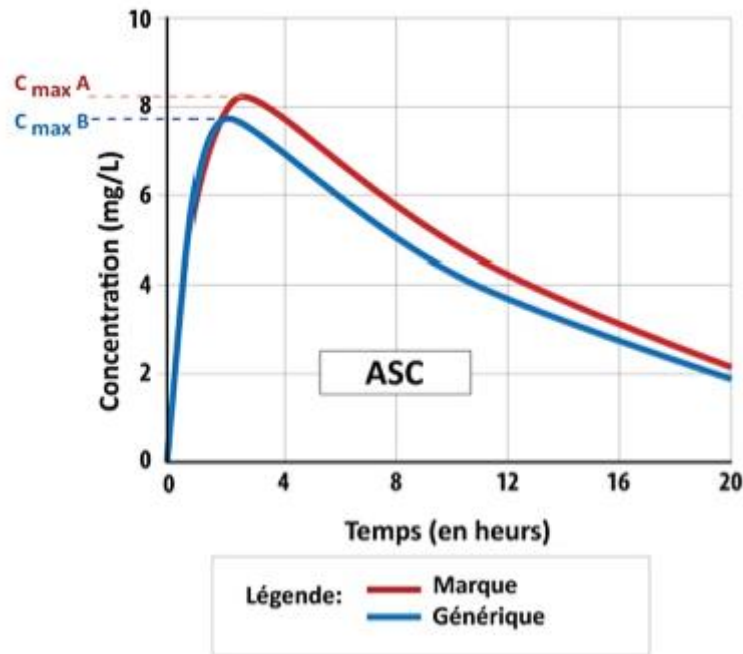


Figure 2 : Simulation d'une concentration de médicament par rapport à la courbe du temps pour deux médicaments.

I.4. Les Problèmes des principes actifs et des médicaments hydrophobes

- La biodisponibilité des principes actifs hydrophobes est problématique un problème essentiel du à leur faible solubilité dans le milieu gastro- intestinal.
- Le liquide gastro-intestinal étant un milieu aqueux, ces principes actifs ont une faible vitesse de dissolution, ce qui ralentit leur diffusion vers la membrane intestinale et diminue l'absorption.
- La solubilité des principes actifs hydrophobes car, il prient un plus de temps pour se solubiliser.

I.5. Les systèmes d'encapsulation

I.5.1 Définition de système d'encapsulation

C'est une technique qui consiste à piéger ou enrober une substance ou un mélange de substances spécifique à l'aide de matériaux adaptés [14]. Les substances à encapsuler peuvent être liquides, solides ou gazeuses [15]. Ce sont souvent des principes actifs ou instables à certains facteurs environnementaux ayant une action ciblée, ou bien des substances dont on souhaite modifier l'état (transformation d'un liquide en solide par exemple) [16].

I.5.2 Les différents systèmes d'encapsulation

Les polymères naturels ont été largement étudiés en tant que véhicules qui ont suscité beaucoup d'intérêt dans l'encapsulation et l'administration de médicaments et de molécules bioactives. [17]

I.5.2.1. Cyclodextrine

Les cyclodextrines (CD) représentent une famille d'oligosaccharides cycliques non toxiques, obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon. Ils ont six, sept ou huit unités de glucose reliées par des liaisons α -1-4, nommées respectivement α -, β - et γ -CD[21].

Ils ont la forme d'un cône ; avec une surface extérieure hydrophile, ce qui rend les CD solubles dans l'eau. Une cavité interne non polaire est formée permettant la formation de complexes d'inclusion de molécules hôtes lipophiles [18].

En raison de leur capacité à modifier les propriétés physicochimiques des médicaments et autres composés, les CD sont généralement indiqués comme excipients pharmaceutiques habilitants. Une ou plusieurs molécules de médicament peuvent former un complexe avec une molécule de CD et une ou plusieurs molécules de CD peuvent former un complexe avec une molécule de médicament.

Habituellement, une molécule de médicament crée un complexe avec une molécule de CD. Il a été établi que le traitement de spermatozoïdes de diverses espèces avec des cyclodextrines pré chargées avec une molécule médicamenteuse (antioxydants, huile essentielle) avant la cryoconservation, peut améliorer la qualité du sperme après le processus de congélation-décongélation [19].

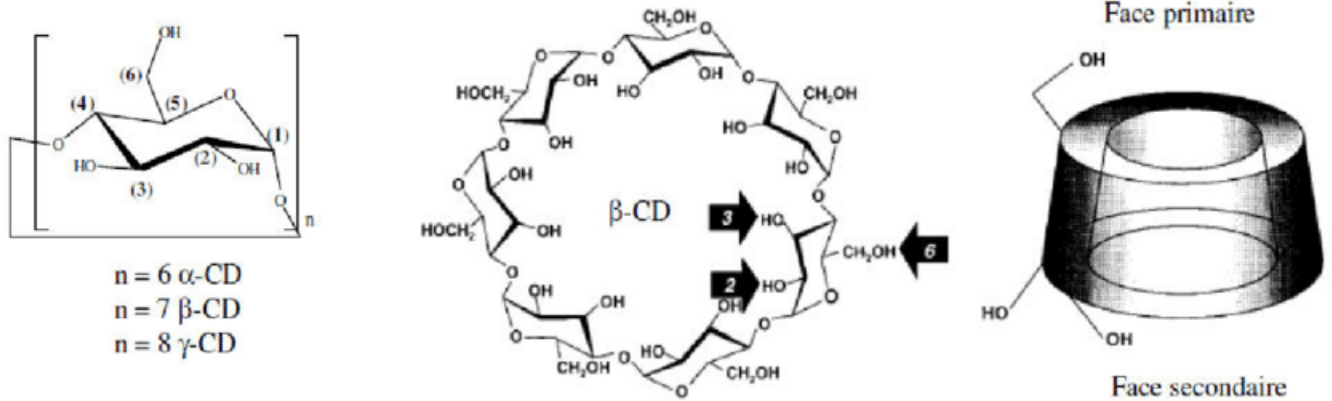


Figure 3 : structure générale des cyclodextrines.

I.5.2.2. Polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol est un polymère neutre non toxique de structure chimique comme la suivante= $\text{HOH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$. Le polyéthylène glycol (PEG) est actuellement l'un des matériaux polymères les plus utilisés dans l'administration de médicaments [20].

Peut modifier la pharmacocinétique et généralement la toxicité des molécules bioactives. Peut améliorer la durée de vie de l'ensemble «médicament transporteur», permettant ainsi l'administration de concentrations plus faibles du composite «médicament-transporteur» et par conséquent réduire la toxicité [21].

Le PEG couvre une large gamme de propriétés bénéfiques, notamment une solubilité élevée dans les milieux aqueux ainsi que dans les solvants organiques, ce qui simplifie la modification des groupes terminaux [22].

Il est également largement utilisé pour la modification de supports utilisés en thérapeutique. L'utilisation des PEG dans la cryoconservation du sperme a un effet positif [23].

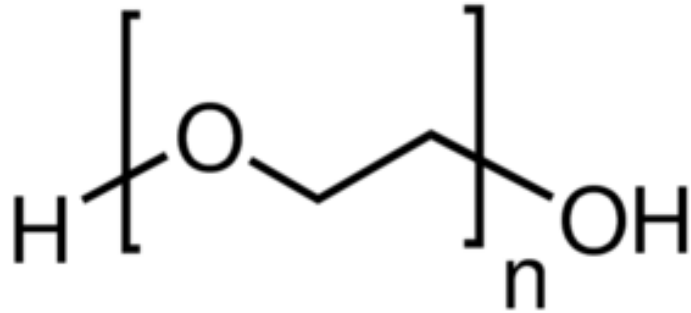


Figure 4 : structure chimique des polyéthylènes glycol (PEG).

I.5.2.3. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intravasculaire d'un milieu extérieur. Au sein de ces bicouches, tout comme dans les membranes biologiques, les mouvements des phospholipides sont observés. Sont faciles à préparer. L'hydratation de film phospholipidique permet d'obtenir des liposomes multi lamellaires. Pour obtenir des liposomes uni lamellaires, des étapes supplémentaires sont nécessaires. Les liposomes sont employés dans l'industrie comme vecteurs de substances cosmétologiques. Ils sont aussi parfois utilisés comme vecteurs de thérapie génique, pour délivrer des médicaments ou encore comme supports de vaccins. Les liposomes constituent surtout un bon modèle membranaire et sont largement employés pour mieux comprendre les mécanismes intervenant au niveau de la membrane, comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes. [28]

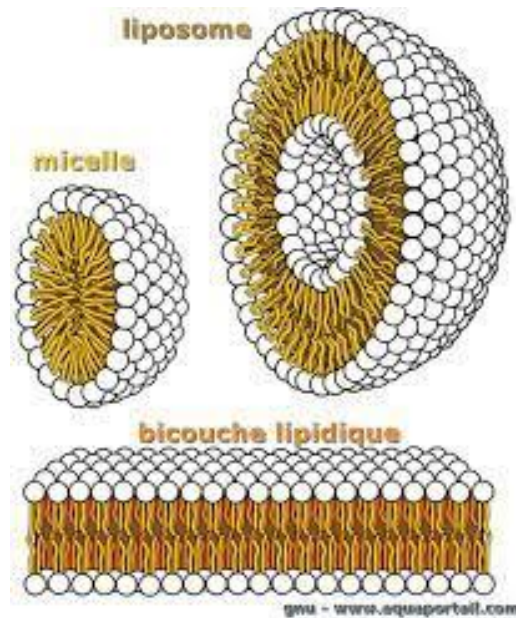


Figure 5 : schéma représentant un liposome

I.5.2.4. Les Alginates

1) Introduction

Les alginates sont des polymères naturels largement utilisés dans l'industrie alimentaire en raison de leur caractère biocompatible et biodégradable, de leur non toxicité et de leur disponibilité facile. Le caractère bio adhésif des alginates les rend également utiles dans l'industrie pharmaceutique. Les domaines d'application des systèmes d'administration de médicaments à base d'alginate de sodium sont nombreux et ces systèmes peuvent être formulés sous forme de gels, de matrices, de membranes, de nano sphères, de microsphères, etc.

2) Description de l'alginate E (401)

L'alginate de sodium ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) est un polysaccharide linéaire, un dérivé de l'acide alginique composé d'acides 1,4- β -D-mannuronique (M) et β -L-guluronique (G). L'alginate de sodium est un composant de la paroi cellulaire des algues brunes marines et contient environ 30 à 60 % d'acide alginique. La conversion de l'acide alginique en alginate de sodium permet sa solubilité dans l'eau, ce qui facilite son extraction. L'alginate de sodium est un polysaccharide typique, ce qui lui permet d'être très largement utilisé dans tous les domaines qui nécessitent d'avoir une liaison d'acide β -D-mannuronique lié 1-4 (M), et à

son épimère C-5, il y a un groupe présent nommé L-acide guluronique (G). L'alginate de sodium a été extrait de différentes sources d'algues et dans différentes compositions. [24]

La production industrielle des alginates est basée sur la culture des algues brunes; néanmoins dans la nature, cette famille de polymères est également produite par des bactéries du genre *Azobacter* et *Pseudomonas* (polysaccharide de la capsule). [25]

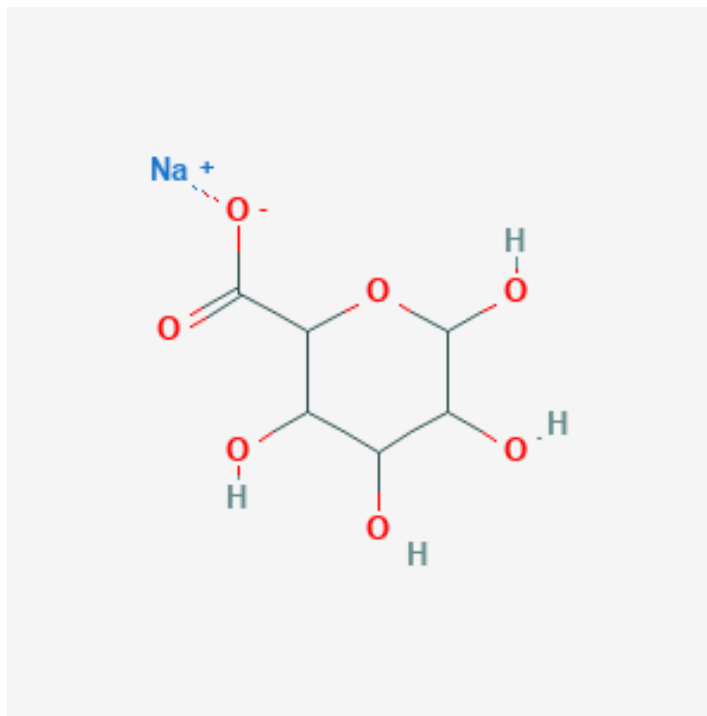


Figure 6 : La structure chimique de l'alginate de sodium.

3) la Biosynthèse des alginates

L'opération de biosynthèse peut être décomposée en quatre étapes :

- 1) synthèse du précurseur de GDP-acide mannuronique ;
- 2) transfert de membrane cytoplasmique et polymérisation en acide polymannuronique;
- 3) transfert péri plasmique et modification ;

4) exportation à travers la membrane externe. [26]

4) Préparation des alginates

Généralement, pour préparer des alginates à usage commercial :

1) Les algues sont récoltées mécaniquement et séchées avant d'être traitées ultérieurement, à l'exception de *M. Pyrifera* qui est traitée par voie humide.

2) Les alginates sont ensuite extraits de la matière algale séchée et broyée après traitement avec un acide minéral dilué pour éliminer ou dégrader les homo poly saccharides neutres associés tels que la laminaire et la fucoïdien. [27]

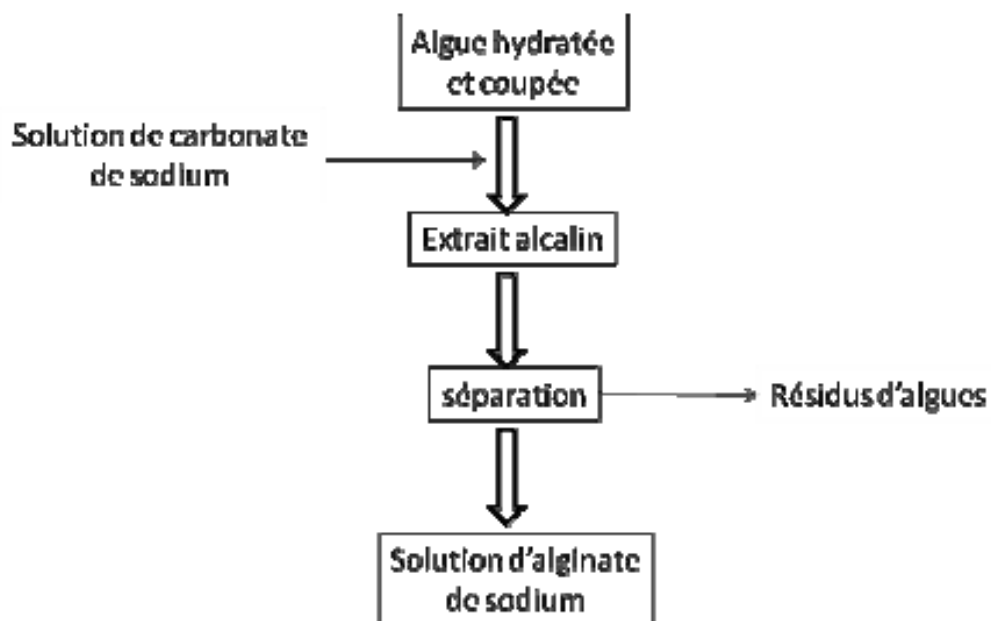


Figure 7 : Premières étapes de l'extraction de l'alginate chez les algues brunes.



Figure 8 : Algue Laminaria.

5) Propriétés

L'alginate de sodium est un produit linéaire [28], sensible au pH [29], soluble dans l'eau [30], non toxique, biodégradable [31], hydrophile [32], biocompatible [33], sûr, périssable, non immunogène [34], copolymère poly anionique économiquement bio adhérent [35] polysaccharide. Na-Alg a une capacité de chélation, une transparence à faible coût [36], une facilité de gélification [37], une muco adhésion [38], une capacité d'épaississement et une capacité de fabrication de film. Il a les propriétés d'un caractère stabilisant, d'une viscosité élevée dans l'eau et d'un négociateur gélifiant. En présence d'un environnement gastrique, les hydrogels qui contiennent de l'alginate de sodium ont une propriété de délivrance très lente de décharge médicamenteuse. Na-Alg est thermiquement stable [39].

Et parmi ces propriétés :

- **Solubilité :** Les alginates de sodium ne sont lentement solubles dans l'eau froide, aussi pour les solutions hydro alcooliques dont la teneur en alcool est supérieure à 30 % en poids. Il est également insoluble dans d'autres solvants organiques, à savoir le chloroforme et l'éther, et dans les acides où le PH de la solution obtenue limite cette tombe en dessous de 3,0. Une solution à 1% dans de l'eau distillée a un PH d'alginate environ 7.2.

L'alginat de calcium, est cependant pratiquement insoluble dans l'eau et les solvants organiques mais soluble dans le citrate de sodium. [40]

- **Viscosité** : Différentes qualités d'alginates de sodium sont disponibles, donnant solutions aqueuses de viscosité variable dans une plage de 20 à 400 centipoises (0,02-0,4 Pas) se comporte comme un fluide pseudo plastique. Dans une solution à 1 % à 200 °C. En raison de la diffusion de longueurs de chaîne, les solutions d'alginat ne sont pas clairement newtoniennes. Se comporte comme un fluide pseudo plastique. [41]

6) Développement des alginates

Alginat de sodium être facilement manipulé et inoffensif, ayant également d'autres comme agent d'encapsulation L'alginat a été utilisé comme matériau d'encapsulation en raison de sa capacité à absorber l'eau, à être facilement manipulé et inoffensif. [42]

7) Alginat comme système d'encapsulation des principes actifs

Elle existe sous forme de gels, de matrices, de membranes, de nano sphères, de microsphères, etc... des systèmes tels que :

- **Les microsphères** : possèdent une bonne sphéricité, une bonne taille et une efficacité de piégeage adéquate. L'étude in vitro montre une libération de médicament prolongée, de sorte que l'utilisation de microsphères offre potentiellement un profil de libération prolongée ainsi qu'une meilleure administration de TP. [43]
- **Les billes** : elles servent de réservoir, et constituent un support très bien étudié aujourd'hui puisqu'on sait contrôler leur production et leur reproductibilité au niveau des dimensions [43].

L'alginat, en se gélifiant, peut former des billes. Qui peuvent contenir un principe actif qui va être libéré une cinétique connue et dans des consistions connues [44].

- **Les gels** : les alginates ont la capacité de former des hydrogels en présence des hydrogels de cation divalents ou trivalents. Cette méthode de gélification, dite

ionotropique, met en jeu des interactions entre les charges des cations et les fonctions carboxylate portées par les monomères mannuronate (M) ou guluronate (G) des chaînes d'alginate. [45]

- **Les membranes:** la membrane étant perméable, le contenu est libéré progressivement par diffusion dissolution ou évaporation. La membrane peut également être semi-perméable pour le substrat qui va diffuser à travers la membrane. [45]

8) Applications

Ce nouveau polysaccharide a des applications potentielles dans tous les aspects de l'alimentation, de la livraison de médicaments [46], et du pansement et pour le traitement des eaux usées [46]. Na-Alg a de nouvelles applications dans le domaine de l'administration de médicaments, Il est utilisé pour la libération lente de médicaments. Le Na-Alg est utilisé pour les médicaments intestinaux [47], la leucémie, Ce polysaccharide a également de grandes applications dans le domaine de la délivrance de gènes concernant l'identification du cancer de la protéase, la détection de la théophylline, la chimiothérapie topique [48], la croissance bactérienne probiotique, la délivrance de médicaments antiviraux - VIH / SIDA, Les applications de pansement et de cicatrisation des plaies peuvent être plus réalisables en utilisant ce polymère [49]. Le Na-Alg peut être utilisé dans les applications de pansement et de cicatrisation des plaies [50].

Les caractéristiques divulguées par l'alginate de sodium, telles que la biocompatibilité, la biodégradabilité et le profil non toxique, fournissent la faisabilité de ce polymère pour l'utilisation dans la micro encapsulation de probiotiques. La recherche sur l'encapsulation de ces micro-organismes dans du gel d'alginate de sodium a été prometteuse et cette technologie s'est avérée être une alternative viable, maintenant sensiblement la stabilité de ces bactéries à la fois dans le stockage et le passage dans le tractus gastro-intestinal. L'inclusion d'autres matériaux adjuvants améliore la viabilité de ces organismes et rend la technique plus efficace, démontrant ainsi l'utilisation potentielle du polymère pour l'enrobage de probiotiques en application dans les aliments. [51]

Tableau 1 : Différents médicaments sur le marché utilisant les alginates.

Nom du médicament	Nom commercial	Effet thérapeutique
GAVISCON	Gaviscon dosette	Brûlure d'estomac, remontées acides
COOPER	Marga médicament	Brûlure- maux d'estomac
LEHNING	Lehning Gastropax poudre	Brûlure d'estomac et de l'œsophage
HERBESAN	Herbesan Adoucid Estomac	Contribue au fonctionnement des enzymes digestives qui agissent dans l'estomac
Alginate de sodium /Bicarbonate de sodium	/	Traitement du reflux gastro-œsophagien

9) Désavantage des alginates

En raison de divers types d'inconvénients, ce polymère a une utilisation limitée dans les industries. L'alginate de sodium est utilisé dans divers médicaments, mais après utilisation, il a tendance à provoquer des troubles gastro-intestinaux. Effets indésirables, tels que ballonnements, diarrhée et nausées [52].

II.1. Introduction

La semence cryoconservée est un aspect essentiel de la banque de ressources génomiques pour conserver la biodiversité des espèces animales menacées et contrôler la reproduction de ces animaux [53]. De plus, la cryoconservation assure le stockage du sperme pendant de longues périodes dans des conditions inférieures à zéro (-196°C) et facilite l'échange de matériel génétique entre populations éloignées [54].

II.2. Le sperme

Le sperme est un liquide opaque, blanchâtre produit par l'éjaculation, composé de spermatozoïdes en suspension dans le liquide séminal qui est un mélange des sécrétions des différentes glandes génitales males (prostate, vésicule séminal...) [55]

II.3. Les spermatozoïdes**II.3.1. Définition**

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée. Il se compose des parties :

Une tête et un flagelle. Le lien entre la tête et le flagelle est assuré par une pièce connective) /collet.

- 1- La tête, d'une taille de $5\ \mu\text{m}$ par $3\ \mu\text{m}$,
- 2- Le flagelle est une structure de $60\ \mu\text{m}$ environ. [56]

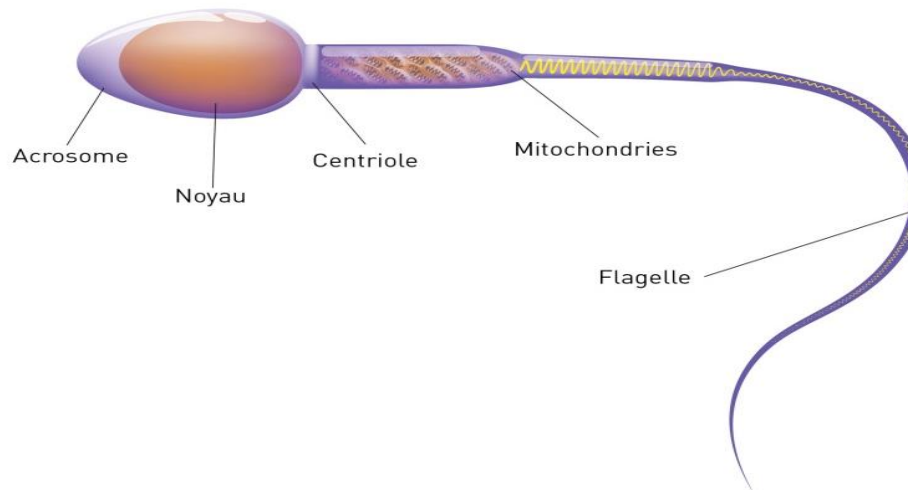


Figure 9 : Schéma du spermatozoïde.

II.3.2. Les caractéristiques fonctionnelles des spermatozoïdes

La survie et le fonctionnement d'un spermatozoïde repose sur l'intégrité physique et/ou fonctionnelle d'un certain nombre d'éléments :

- Des mitochondries fonctionnelles et un flagelle intact permettant sa mobilité
- Un acrosome intact permettant la capacitation et la réaction acrosomique de se produire au bon moment
- Des récepteurs, essentiels pour la fixation du sperme à la zone pellucide de l'ovocyte
- Une membrane plasmique intacte pour la fusion avec celle de l'ovocyte
- Un noyau indemne pour permettre un développement embryonnaire normal [57].

II.3.3. Mobilité des spermatozoïdes

Dans tous les laboratoires qui évaluent la semence, la mobilité est le premier paramètre estimé au-delà du volume et de la couleur de l'éjaculat. La mobilité peut être évaluée subjectivement sous microscope, ou grâce au système CASA qui permet d'automatiser le calcul des trajectoires des spermatozoïdes et de leur vitesse [58].

II.4. Cryoconservation spermatique**II.4.1. Généralité**

La cryoconservation du sperme a un impact essentiel sur la préservation à long terme des mâles génétiquement supérieurs de l'espèce. Chez l'homme [59], la cryoconservation du sperme devient un enjeu important dans la préservation de la fertilité masculine notamment avant un traitement médical comme la radiothérapie ou la chimiothérapie, qui peut entraîner à un dysfonctionnement éjaculateur ou à une insuffisance testiculaire [60]. De plus, la cryoconservation est également très pertinente pour la gestion de la reproduction des animaux domestiques, car elle permet l'élevage d'animaux d'une immense valeur commerciale en collectant des spermatozoïdes après castration ou autopsie, et leur utilisation ultérieure dans des programmes d'élevage [61]. De plus, la cryoconservation facilite la distribution de la semence sur distance. Ce qui a considérablement contribué au développement des technologies de reproduction telles que l'insémination artificielle et la fécondation in vitro dans le monde [62].

II.4.2. Définition de la cryoconservation

Il est largement rapporté que le processus de cryoconservation impliquant le refroidissement, la congélation et la décongélation induit des modifications graves et préjudiciables des fonctions des spermatozoïdes. Il est bien connu que le processus de congélation et de décongélation du sperme entraîne non seulement des modifications néfastes de la composition des lipides membranaires, de l'état des acrosomes et de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes, mais aussi une augmentation des dommages causés à l'ADN des spermatozoïdes [63]. Pendant le processus de cryoconservation, les spermatozoïdes subissent de nombreux stress liés à la baisse de température, à l'ajout de cryo protecteurs, à la formation de glace et à l'exposition à une os molarité accrue du milieu pendant la congélation [64].

Le milieu de cryoconservation contient un mélange de plusieurs composants [hydroxyméthylamino méthane (TRIS), glucose, pénicilline, acide acétique, glycérol, fructose, zinc, DMSO] ; cette composition et les dosages dépendent des espèces étudiées [65].

La cryoconservation spermatique peut se faire à partir de la semence humaine ou animale :

- **La cryoconservation chez l'humain**

Le recueil nécessite un délai d'abstinence sexuelle ('absence d'éjaculation) de 2 à 8 jours. Cette période d'abstinence assure une stabilité des paramètres biologiques (le volume, la mobilité et la numération des spermatozoïdes) :

Il s'agit pour l'homme de produire un échantillon de sperme, obtenu par masturbation, car les autres façons pourraient altérer le prélèvement et la qualité des spermatozoïdes [66].

- **Chez l'animal**

La voie male désigne la collecte de sperme (à l'aide d'un vagin artificiel ou par électro-éjaculation), du sperme épидидymaire ou encore des tissus testiculaires. Le sperme épидидymaire peut être prélevé post mortem ou à partir des testicules d'un mâle castré : on obtient alors des spermatozoïdes jeunes ou immatures en absence de liquide séminal. Les tissus testiculaires permettent également de reformer des spermatozoïdes à partir d'un individu mort [67].

II.4.3. L'intérêt de la cryoconservation

La cryoconservation du sperme favorise le stockage et le transport du matériel génétique pour son utilisation dans l'insémination artificielle (IA) et d'autres technologies de reproduction avancées.

Cependant, la cryoconservation du sperme provoque plusieurs contraintes, notamment un choc thermique, des dommages osmotiques et la formation de cristaux de glace, réduisant ainsi la qualité du sperme. La supplémentation des milieux cryoprotecteurs avec des antioxydants s'est avérée positive chez différentes espèces [68].

II.4.4. Stress oxydatif

Représente la balance entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène également appelé des radicaux oxygénés libre (reactive oxygen species –ROS) et celle des antioxydants. Un certain taux de ROS est nécessaire pour l'activation de différents processus tels que

capacitation, acrosomique ou la fusion oocyte-spermatozoïde. Néanmoins, quand ce taux augmente par rapport à la quantité d'antioxydant, des effets néfastes peuvent atteindre la cellule et donc augmenter le taux d'infertilité. Les ROS peuvent induire le phénomène de peroxydation des lipides [69].

II.4.5. Choc thermique

La cryoconservation vise à maintenir la viabilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes par un processus séquentiel de réduction de la température, de déshydratation de la cellule, de congélation, de stockage puis de décongélation. Tout au long du processus de congélation-décongélation, les spermatozoïdes sont soumis à plusieurs effets négatifs, notamment une baisse de température, la formation de cristaux de glace et divers types de stress (physiques, chimiques, osmotiques et oxydatifs). Ces effets peuvent gravement compromettre la qualité et la fertilité du sperme. De ce fait, la qualité post-décongélation des spermatozoïdes est significativement réduite, avec une perte de motilité qui peut être de l'ordre de 40% à 60%. Le choc froid est associé à la composition lipidique de la bicouche membranaire. La diminution de la température pendant le refroidissement produit une transition phospholipidique qui affecte la rigidité et la fragilité de la membrane, conduisant à une séparation des phases lipidiques [70].

II.4.6. Les stratégies adoptés pour réduire les effets secondaires du procédé de cryoconservation

Pour réduire les effets secondaires du procédé de cryoconservation, on a recours à plusieurs agents comme le cholestérol, vitamine E, huile essentielle...etc.

- **Agents Cryo protecteurs**

Les cryo protecteurs sont des produits chimiques de faible poids moléculaire et très perméables utilisés pour protéger les spermatozoïdes des dommages causés par le gel lors de la cristallisation de la glace. Les cryo protecteurs agissent en diminuant le point de congélation d'une substance, en réduisant la quantité de sels et de solutés présents dans la phase liquide de l'échantillon et en diminuant la formation de glace dans les spermatozoïdes [71].

Les molécules de cholestérol apportent de la rigidité et de la stabilité à la membrane des Spermatozoïdes, dans le sperme, ces protéines ont des effets bénéfiques sur la qualité du sperme après la décongélation, en protégeant les spermatozoïdes des dommages causés par la cryogénie [72].

L'utilisation d'antioxydant comme la vitamine E réduit le stress oxydatif et peut empêcher la réalisation de la capacitation [73], ceci explique pourquoi certains auteurs recommandent l'ajout de la vitamine E dans les milieux de conservation de semence afin de réduire les stress oxydatifs pouvant mener à une capacitation précoce de spermatozoïdes [74].

II.4.7. L'utilisation des huiles essentielles dans la cryoconservation

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Rom) a récemment été signalée comme étant intéressante pour une utilisation dans la cryoconservation du sperme.

Cependant, liée à ses caractéristiques lipophiles, l'encapsulation dans l'alginate pourrait renforcer les effets positifs de Rom en augmentant sa solubilité dans les extenseurs de sperme. La capacité de Rom protège le sperme contre les dommages de la cryoconservation et l'améliorée après son encapsulation.

III.1. Introduction

Les huiles essentielles (HE) existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Les HE se retrouvent dans des grandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : l'écorce (cannelle), et pour certaines plantes, c'est dans les racines (ail) [75].

III.2. Définition des huiles essentielle

Les HE sont des liquides volatiles, réfringents, optiquement actifs, voisins des huiles, d'odeur tout à fait caractéristique. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire [76].

Une huile essentielle selon la pharmacopée est un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux [77].

Selon l'AFNOR, elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche [78].

Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques [79].

Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes) [80].

III.3. Composition chimique des HE

Les HE ont une composition assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : Les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phényle propane [81].

III.4. les Propriétés physico-chimiques des HE

- Les H/E sont généralement Incolores ou jaune pales à l'état liquide à température ordinaire [81]. Toutes les H/E sont Volatiles, odorantes et inflammables [81].
- Peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques [81].

- Altérables et très sensibles à l'oxydation [81].
- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé [81].
- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C [81].

III.5. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusque cinq ans. Seules les essences de Citrus se gardent un peu moins longtemps (trois ans). Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusque vingt degrés [82].

III.6. Romarin '*Rosmarinus officinalis*'

III.6.1. Introduction sur le romarin

Ces dernières années, la demande en huiles essentielles (HE) de plantes médicinales a augmenté, notamment pour l'huile de la plante de romarin, largement utilisée comme conservateur alimentaire naturel.

L'huile de romarin a des propriétés antimicrobiennes, antimycotiques et antioxydants et, surtout, un faible coût et une disponibilité immédiate [83].

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 [84].

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. Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mésopotamie, Chine et en Inde antiques [85].

III.6.2. Etymologie

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis*), le nom latin *Rosmarinus* est habituellement interprété comme "ros" dérivé de la rosée et "marinus" de la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer [86]. La définition d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom d'original est dérivé du grec "rhops" arbuste et "myron" baume [87].

III.6.3. Description du Romarin

Le Romarin, plante commune à l'état sauvage, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la retrouve dans tous les jardins et parcs en bordure odorante [88]. Cette plante appartient à la famille des Lamiacées [89].

Le Romarin peut atteindre jusqu'à 1,50 m de hauteur [90], il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole (petit pied), coriaces, beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous [91].

Leur odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens, le romarin se cultive en des lieux secs et chauds, il se multiplie facilement au printemps, la floraison commence dès le mois de mars et se poursuit jusqu'en avril mai, la couleur des fleurs, qui se présentent en grappes assez semblables à des épis, varie du bleu pâle au violet (rarement la variété à fleurs blanches) [92].

Leur calice qui joue le rôle de protecteur de la fleur est velu, à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines (l'organe mâle) ayant une petite dent vers leur base, la lèvre inférieure de la corolle est profondément divisée, faisant penser au labelle de certaines orchidées, comme pour la plupart des lamiacées [93].



Figure 10 : Le romarin.

III.6.4. Composition et utilisation du romarin

Le romarin est une herbe médicinale bien connue et considérablement évaluée, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine traditionnelle [94].

Elle est très appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti oxydantes, antimicrobiennes et anti tumorales [95].

Tableau 2 : H/E rom récolté dans différents pays dans le monde avec leurs compositions.

Pays/pourcentage	α Pinène	Verbénone	Ac. de bornyle	Camphre	Cinéole
Algérie	26	22	0	8	0
Tunisie	16,5-19,0	1,5-13,0	0,7-1,2	16,9-17,5	18,2-20,3
Brésil	9,6	11,3	1,6	18,9	8
Egypte	9,3	7,6	2	14,9	9
Yémen	13,5	18,6	1,8	0	20,6

D'où son utilisation dans de divers domaines comme :

- **Médecine**

L'huile essentielle de romarin soulage les troubles rhumatismaux et de la circulation sanguine, soigne les blessures, soulage les maux de tête, améliore la mémoire et la concentration, combat les effets du stress et de la fatigue, traite l'inflammation des voies respiratoires et de la sphère ORL. Le romarin est utilisé en infusions, sous forme de poudres, extraits sec ou autres préparations galéniques pour usage interne, principalement contre les douleurs d'estomac [96].



Figure 11 : huile essentielle Romarin

- **Alimentation**

L'épice et l'huile de romarin sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisée dans les aliments cuits, viande, condiment, assaisonnement, les aliments industriels, casse-croûtes, sauces et autres, avec une teneur maximale d'environ 0.41% (4.098 ppm) dans les aliments cuits. L'huile est utilisée dans les desserts glacés, confiseries, aliments cuits, gélâtines et pouding, viande, condiments et assaisonnement, entre autres, avec une teneur maximale 0,003% (26.2 ppm), en alimentation diététique et tisanes [97].

- **Industrie agro-alimentaire**

Le romarin est une bonne source naturelle de composés antioxydants, il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments. [98]

- **Parfumerie et cosmétique**

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères aromatiques, ainsi que dans la formulation des pommades dermiques [99].

Grâce à la capacité de stimulation des terminaisons nerveuses cutanées, le romarin est employé comme tonique dans des bains moussants, et comme liniment pour muscles fatigués une dose de 1 à 2%. Il a des propriétés dermo-purifiantes qui lui permette l'utilisation dans la préparation de déodorants en lotion et shampooing, à une dose de 0.5 à 1%, l'extrait de romarin stimule le cuir chevelu [100].

- **Cryoconservation spermatique**

L'huile essentielle (Rom) a récemment été signalée comme étant intéressante pour une utilisation dans la cryoconservation du sperme. Cependant, liée à ses caractéristiques lipophiles, l'encapsulation dans les alginates pourrait renforcer les effets positifs de Rom en augmentant sa solubilité dans les extenseurs de sperme [101].

Tableau 3 : Principales utilisations du romarin en Algérie.

Wilaya	Partie utilisée	Utilisation en médecine traditionnelle	Mode d'emploi
Khenchela	Feuilles	Maladies du cœur – Estomac – jaunisse.	Infusion.
Bouira	Feuilles	Douleurs stomacales	Infusion
Nâama	Rameaux et fleurs.	Antispasmodique et antiseptique.	Infusion et bain
Biskra	Toute la partie aérienne	Rhumatisme-Douleurs stomacales – Défaillance de foie	Tisane.

III.6.5. Toxicité

Aucune étude ne mentionne des effets secondaires lorsque les extraits de romarin sont utilisés aux doses thérapeutiques de prescription, cependant à forte dose une certaine toxicité peut être observée. A titre d'exemple, l'ingestion de doses élevées d'huile essentielle de romarin provoque des hémorragies gastriques, de l'albuminurie, une dégénérescence graisseuse du foie et du rein, occasionnellement des allergies de contact et peut aussi être fortement épileptisante [102].

Etude Expérimentale

IV.1. Introduction

Le but de notre étude est d'utiliser la technique d'encapsulation à base d'alginate de sodium et du chitosane, qui se gélifie en bille, en vue de modifier la libération d'un principe actif, ce dernier qui est l'huile romarin, pour une libération prolongée. Pour cela nous avons optimisé à l'aide d'un plan d'expériences en utilisant un plan Box-Behnken à 3 facteurs.

Cette étude a comme objectif important la poursuite du développement des Na-Alg comme système d'encapsulation et c'est ainsi, que nous avons obtenu la matrice d'expérience à 15 essais (tableau 8).

I.2.Matières premières et matériel utilisé

Les matières premières utilisées sont :

- Alginate de sodium ;
- Huile essentiel (romarin) ;
- Chitosane ;
- Chlorure de calcium ;
- Solution d'acide acétique ;
- Eau distillée ;
- Méthanol ;
- Acétonitrille ;
- Phosphate di sodique ;
- Mono phosphate.

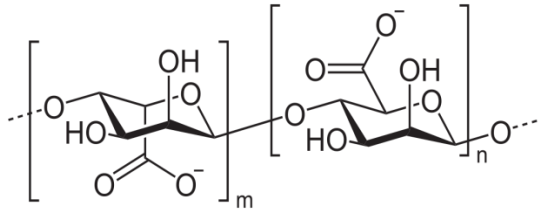
IV .3.Les matières premières

IV .3.1.Le romarin.

IV .3.2.Alginate de sodium (sigma Aldrich)

Les propriétés physico-chimiques de l'alginate de sodium sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Les propriétés physico-chimiques de l'alginate.

Formule brute	$C_6H_7NaO_6$
formule développée	
Poids moléculaire	198,1 g.mol ⁻¹
Point de fusion	>300°C
Solubilité	Pratiquement insoluble en éthanol (95%), éther, chloroforme et mélange méthanol (eau dans lesquels le contenu d'éthanol est plus considérablement que 30%
Conditions de stabilité et de stockage	L'alginate de sodium est un matériel hygroscopique, bien qu'il soit stable si stocké à de basses humidités relative et à une température fraîche les solutés de l'alginate de sodium sont les plus stables au PH 4 - 10

IV .3.3.Le chitosane (sigma Aldrich)

Le chitosane est un poly saccharide linéaire formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane est dérivé de la chitine, le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose et il est caractérisé par son degré de dés-acétylation. Sa viscosité et on poids moléculaire.

Le chitosane se présente sous la forme d'un solide amorphe. C'est l'un des rares poly électrolytes naturels cationiques existant dans la nature. En solution dans un acide dilué, le chitosane se comporte comme un poly cationique de forte densité de charge, en raison de la protonation des groupements $-NH_2$.

Le chitosane présente des propriétés très intéressantes, il est non-toxique, biodégradable, renouvelable, antibactérien et antifongique. Les différentes caractéristiques physico-chimique du chitosane sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Les différentes caractéristiques physico-chimique du chitosane.

Formule développée	
Température de solidification	203 °c
Densité	1.35 – 1.40 g.cm ³
Solubilité	Insoluble dans l'eau; dans les acides concentrés, les bases et les solvants organiques. il est soluble dans les acides dilués.
Acidité/alcalinité	Ph=4.0-6.0 (1 %m/v solution aqueuse)
Caractères organoleptiques	Poudre blanche inodore
Catégorie fonctionnelle	Agent enrobant, agent désintégrant, agent épaississant et liant des comprimés mucoadhésifs.
Condition de stabilité et de stockage	Conservation à température ambiante, dans un récipient étanche dans un endroit frais et sec.

IV .3.4.Le chlorure de calcium (biochim)

Le chlorure de calcium est un sel de calcium. Il est très soluble dans l'eau. C'est un produit anhydre recherché pour ses qualités exothermiques. Sa formule chimique est CaCl_2 .

Tableau 6 : Les différentes caractéristiques physico-chimique du CaCl_2 .

Formule brute	CaCl_2
Poids moléculaire	147.02 g.mol ⁻¹
Point de fusion	176°C (di hydrate)
Point d'ébullition	1935 °c
Densité	2.15 g/cm ³
Température de solidification	28.5-30 c (hexa hydrate)
Solubilité	Librement soluble dans l'eau et dans l'éthanol (95 %); insoluble dans éther di éthylique.
Condition de stabilité et de stockage	Il doit être stocké dans des récipients hermétiques dans un endroit frais et sec.

IV .3.5.Acide acétique (biochim)

Selon la monographie de la pharmacopée européenne, l'acide acétique est à 99 % (v/v). Le tableau suivant résume ses propriétés physico-chimiques.

Tableau 7 : Les propriétés physico-chimiques de l'acide acétique.

Formule brute	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$
Poids moléculaire	60.05 g.mol ⁻¹
Solubilité	Miscible à l'eau, à l'éthanol à 96 % et au chlorure de méthylène
Caractères organoleptiques	Liquide limpide, volatile, incolore ou masses cristallines
Conservation	En récipient étanche.

IV .4.Equipement et appareillage utilisés

Les différents équipements et appareillage utilisés dans notre étude pour l'ensemble des essais sont comme suit :

- Balance analytique ;
- Agitateur magnétique ;

- pH mètre; Thermomètre ; Pycnomètre ;
- Bains marie ;
- Sonicateur.

IV .4.1.Caractérisation d'huile romarin

IV .4.1.1.Détermination de densité d'HE (romarin)

- Préparer un bain marie à température de 20 °c ;
- Vérifier sa température à l'aide d'un thermomètre ;
- Plonger un pycnomètre vide d'un volume de 5 ml dans le bain marie ;
- Laisser le pycnomètre pendant 5 min, pour qu'il imprègne une température de 20 °c ;
- Mesurer sa masse à 20 °c, à l'aide d'une balance ;
- Remplir le pycnomètre de 5 ml de l'huile essentielle qui est romarin ;
- Plonger une deuxième fois dans le bain marie ;
- Après 5 min, on mesure la masse du pycnomètre remplie ;
- Vider le bain marie, et nettoyer la pialasse.

IV .4.1.2. Détermination de ph d'HE (romarin)

- Mettre un certain volume d'huile romarin dans un tube à essai ;
- Mesurer son ph à une température de 20 °c.

IV.5.Optimisation d'un système d'encapsulation Alg/Chi / Rom –Méthodologie de plan d'Expérience - Plan de Box-Behnken

Définition

Plan de Box-Behnken- : est une technique qui permet de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse dans des domaines expérimentaux bien déterminés dans le but de les optimiser. Les points expérimentaux du plan Box-Behnken sont représentés au milieu des arêtes de chacun des côtés d'un cube. C'est un plan qui peut comporter jusqu'à douze essais,

auxquels on peut ajouter des points au centre. Un plan avec trois facteurs (alginate de sodium, chitosane, huile romarin) est illustré dans la figure 13. [1]

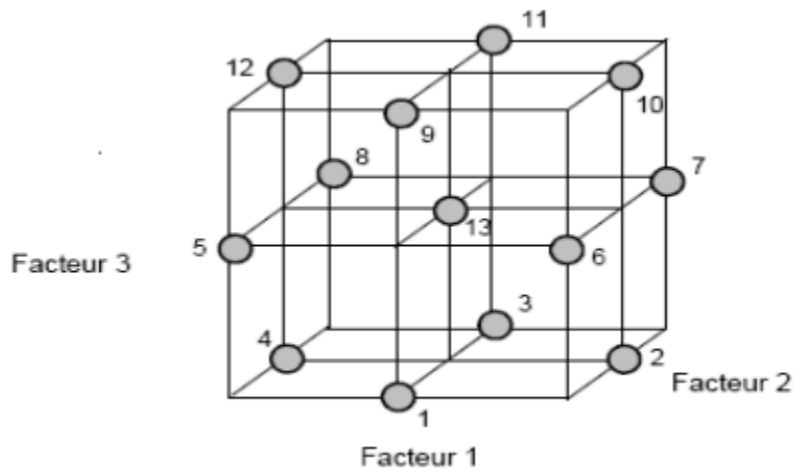


Figure 12 : Un plan de box behnken avec trois facteurs.

L'utilisation d'un plan expérimental permet de tester simultanément un grand nombre de facteurs et empêche l'utilisation d'un grand nombre d'essais indépendants lorsque l'approche traditionnelle étape par étape est utilisée.

La conception de Box-Behnken a été utilisée pour optimiser statistiquement les variables indépendantes étudiées étaient la quantité de alginate / chitosane / huile romarin.

La plage de concentration des variables indépendantes à l'étude est de :

- Alginate = [1 – 3](% poids/volume)
- Chitosane = [0.1 – 2](% p/v)
- Romarin = [0.1 – 2] (% p/v)

Tableau 8 : La matrice d'essais.

Teste	Chi (g)	Alg(g)	Rom(μ l)
1	0.1	1	80
2	0.1	3	80
3	2	1	80
4	2	3	80
5	1.05	1	10
6	1.05	3	10
7	1.05	1	150
8	1.05	3	150
9	0.1	2	10
10	2	2	10
11	0.1	2	150
12	2	2	150
13	1.05	2	80
14	1.05	2	80
15	1.05	2	80

IV .5.1.Préparation des billes alginates/chitosanes/Romain

- Dissoudre le chitosane dans une solution aqueuse (eau distilles) de 1% d acide acétique en ajoutant du chlorure de calcium de 4% ;
- Homogénéiser à 500 rpm pendant une heure ;
- La solution d'alginate de sodium a été préparé pour déférente concentrations (L'eau+alginate+romarin) ;
- Injecter la solution d'alginate de sodium dans la solution chitosane à travers une aiguille de seringue ;
- Sécher pendant 2h ;
- Laver puis sécher à température ambiante [104]. .

Les étapes de préparation des billes sont représentées sur le schéma ci-dessous.

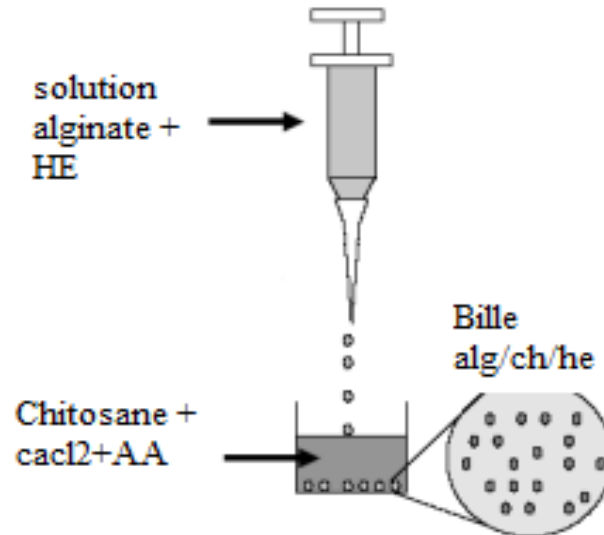


Figure 13 : Schéma représentation les étapes de préparation des billes

IV .5.2. Teste de motilité

IV .5.2.1. Collecte de sperme épидидymite

La collecte de sperme a été réalisée par la méthode de rinçage rétrograde

- L'épididyme (figure 15) a été séparé du testicule et nettoyé ;
- La cauda et le canal déférent ont été isolés ensemble de l'épididyme ;
- Les vaisseaux sanguins de l'épididyme cauda ont été coupés et la surface de la cauda a été rincée et essuyée ;
- Le sperme a été récupéré en appliquant une pression du canal déférent généré manuellement à partir d'une seringue contenant de l'air ;
- Le sperme a émergé d'une coupe faite dans la cauda distale près de la jonction avec le corpus [105].



Figure 14: l'épididyme.

IV .5.2.2. Analyse de la motilité

- Un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) (analyseur de classe de Spermatozoïdes, SCA Microptic, SL, version 3.2.0, Barcelone, Espagne) a été utilisé pour évaluer les paramètres de motilité des spermatozoïdes.
- Pour faciliter la capture d'image et éviter le chevauchement des spermatozoïdes, les spermatozoïdes ont été dilués pour atteindre une concentration.
- Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra vidéo (Caméra Digital Basler A312fc, Allemagne) à un grossissement x10(contraste de phase négatif).
- Les paramètres de motilité des spermatozoïdes mesurés par CASA étaient : la motilité totale (%), la motilité progressive (%), la vitesse curviligne (VCL $\mu\text{m/s}$), la vitesse linéaire droite (VSL $\mu\text{m/s}$) et la vitesse moyenne du trajet (VAP $\mu\text{m/s}$). [106]

IV .5.3.Caractérisation de billes Alg/Chi/Rom

IV .5.3.1. Identification de la bille par HPLC

- Peser environ 100 mg de billes pour chaque teste ;
- Ajouter 8 ml de méthanol ;
- Dissoudre les billes d'une tige de sonication ;
- Filtrer les billes, et dosage par HPLC.

Les conditions de HPLC

- Le débit = 1.5 ml/min ;
- La température = ne dépasse pas 25 °c ;
- Le temps de rétention = 6 min ;
- Phase mobile : Eau/Acétonitrile (ratio 3 :2)
- Longueure d'onde : 370 nm

IV .5.3.2. Analyse par spectroscopie l'infra rouge à transformer de fourrier

a). Pour les solides

- Peser une masse de 0.08 du KBR ;
- Ajouter la masse d'alginate ;
- Mélanger les deux masses (alg + KBR) sous pression de 80 k newton, à t=2min, à l'aide d'une presse ;

- Eliminer de l'air avec une pompe ;
- Les pastilles de KBR préparées sont analysées à l'aide d'un spectrophotomètre IR dans la page de 4000-400 cm⁻¹ (Perkin Elmer Spectrum one) ;
- Refaire les mêmes étapes pour le chitosane ;

b).Pour les liquides

- Etaler sur des verres de KBR le liquide à traiter, qu'on a désinfecté précédemment.
- Mettre échenillant dans l'appareil de l'infra rouge.
- Afficher les résultats sur écran de l'ordinateur qui est lié à l'appareil.

IV .5.3.3. Etude de l'indice de gonflement

- Préparer deux solutions tampon phosphate de deux ph différents de (2 ,5 - 7,5) ;
- Peser le poids d'une bille de chaque teste ;
- Immerger la bille dans chaque milieu ;
- Chronométrer 1 heure ;
- Récupérer la bille, la peser ;
- Répéter le test pour une autre fois ;
- L'indice de gonflement est alors calculé selon la formule suivante :

$$I = (M_f - M_i / M_i) * 100$$

D'où : I = indice de gonflement.

M_f = masse des billes après émergé et M_i = masse des billes initiale. [5]

Tableau 9 : La composition en masse de billes de deux essaye d'un ph de 2.5.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Masse (g)	0.001	0.015	0.008	0.017	0.008	0.017	0.001	0.008	0.004	0.002	0.001	0.003	0.005
Masse *(g)	0.001	0.025	0.010	0.018	0.003	0.014	0.003	0.01	0.008	0.001	0.001	0.002	0.001

Tableau 10 : La composition en masse de billes de deux essais d'un ph de 7.5.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Masse (g)	0.001	0.018	0.009	0.019	0.006	0.011	0.009	0.013	0.010	0.001	0.001	0.008	0.006
Masse *(g)	0.001	0.013	0.007	0.018	0.012	0.009	0.008	0.007	0.010	0.001	0.001	0.008	0.006

Les résultats obtenus

1. Caractéristiques de l'huile HE (romarin)

Tableau 11 : caractéristiques Densité, pH de l'HE Rom à température ambiante (20 - 25°C).

Densité	0.9144
pH	6.1

1.1 pH de l'huile Rom

Observation

La densité est de 0.914 est proche à celle de l'eau.

Le potentiel d'hydrogène est de 6,1.

Interprétation : L'huile du romarin a un caractère acide est cela est probablement du a la composition de l'huile (acide carnosique, acide oléanolique, acide phénolique, acide rosmarinique) [107].

2. Optimisation de l'encapsulation Na-Alg/Chi/Rom

Dans notre étude, la formulation des préparations des billes Na-alg/chi/Roma été optimisée en utilisant des concentrations un plan box-benhken, en considèrent l'alginate de sodium, chitosane et Romarin comme facteurs et la motilité comme réponse. Après avoir préparer les 15 solutions et effectuer le teste de motilité, on a abotter a la matrice présenté dans le tableau ci-dessus :

Tableau 12 : Matrice d'expérience donnée par le plan box-benhken.

Teste	Chi (g)	Alg(g)	Rom(μ l)	Motilité
1	0.1	1	80	23.86
2	0.1	3	80	18.76
3	2	1	80	25.09
4	2	3	80	21.19
5	1.05	1	10	28.51
6	1.05	3	10	18.48
7	1.05	1	150	20.87
8	1.05	3	150	18.27
9	0.1	2	10	21.04
10	2	2	10	20.83
11	0.1	2	150	85.40
12	2	2	150	18.36
13	1.05	2	80	24.32

Observation : Les résultats obtenus montrent qu'une augmentation en quantité d'alginate et de chitosan engendre une diminution de la motilité spermatique.

Par contre l'augmentation de l'HE Rom affecte positivement la motilité spermatique.

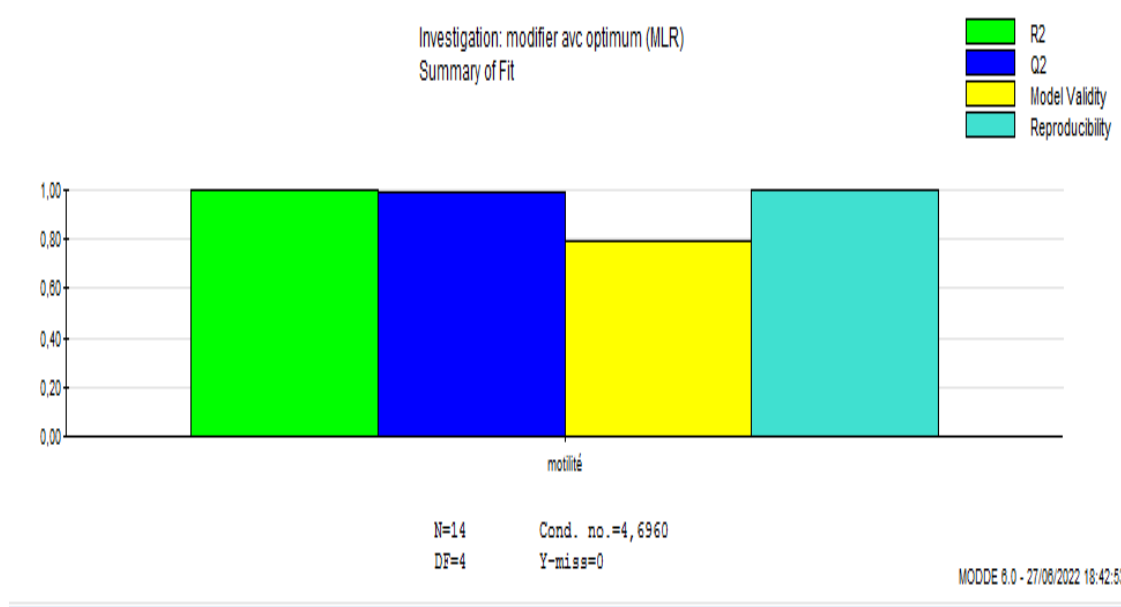


Figure 15 : Les conditions optimales pour la motilité.

Observation :

Différents lots ont montré une grande variation en ce qui concerne la motilité, la valeur R² (0.999) indique un bon ajustement et la reproductibilité (0,994) était acceptable, ainsi que Q² qui est de (0.987) cependant la valeur du model validité (0.795) est la plus minimale indiquant que ce modèle est peu signifiant pour prédire la motilité spermatique.

Les données ont été analysées statistiquement par ANOVA. L'équation polynomiale pour la motilité a été générée par régression linéaire multiple.

$$\text{Motilité} = 23.95 - 2.70 \text{ Alg} + 0.84 \text{ Chi} - 2.03 \text{ Rom} - 17.09 \text{ Alg}^2 + 15.36 \text{ Chi}^2 + 14.67 \text{ Rom}^2 + 0.29 \text{ Alg} \cdot \text{Chi} + 1.85 \text{ Alg} \cdot \text{Rom} - 34.28 \text{ Chi} \cdot \text{Rom} \quad (\text{Eq 1})$$

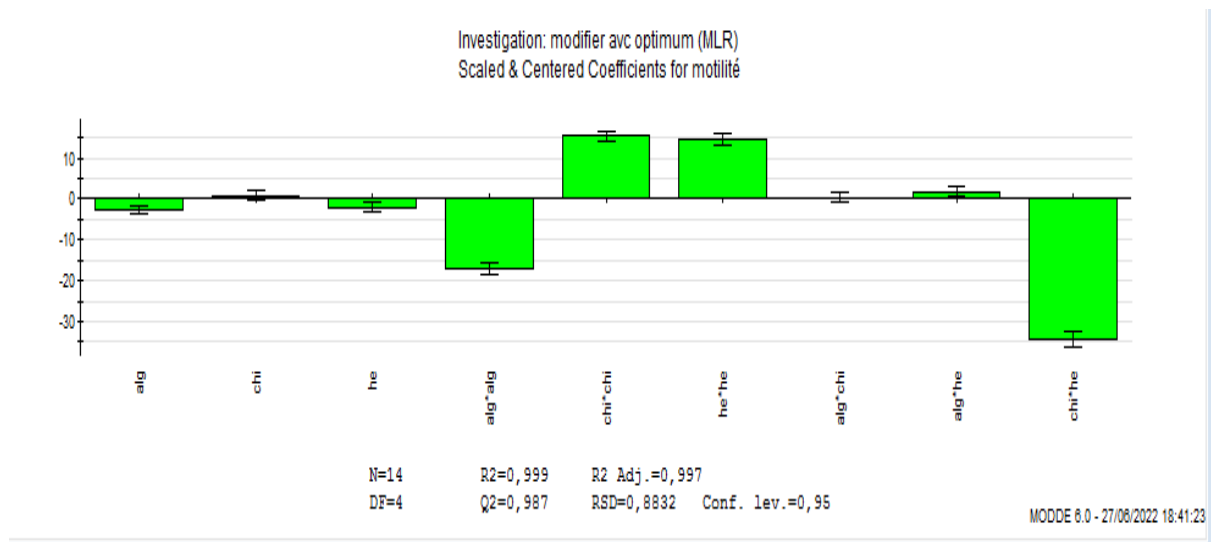


Figure 16 : Les facteurs influencent la motilité spermatique.

Observation : Les résultats indiquent clairement que la valeur de la motilité est fortement affectée par les variables sélectionnées pour l'étude, ceci est reflété par la large gamme de valeurs pour les coefficients des termes (Eq1). Les coefficients se sont avérés significatifs à p supérieure à 0,05, tandis que le niveau de signification de quelques autres coefficients ne contribue pas de manière significative à la prédiction de la motilité spermatique. L'analyse statistique et l'analyse des effets des facteurs ont démontré un effet positif du Chi, Chi-Chi, HE-HE, Alg-Chi, Alg-HE, sur la motilité, par contre les facteurs à effet négatifs sont : Alg, HE, Alg-Alg, Chi-HE qui affecte négativement sur la motilité spermatique (figure 17).

Interprétation : Il a été constaté que la motilité dépend de la composition des billes (la quantité de chitosane et alginate et Rom). La diminution de la motilité spermatique est probablement due à l'augmentation de la viscosité du milieu : l'alginate de sodium est un épaississant [108], ainsi que le chitosane qu'est un polymère hydrogel et on dit que c'est un matériau viscoélastique [109], ce qui freine le déplacement des spermatozoïdes dans le milieu. Cependant, huile romarin associée au système alginate /chitosan influence positivement la solubilité du romarin dans le milieu spermatique et de ce fait amélioré ses caractéristiques thérapeutiques à savoir l'effet antioxydantes [110]. Ce résultat est en accord avec les résultats de Ben Berkane et al et, ou il a démontré l'effet protecteur de l'huile du romarin dans la cryoconservation spermatique et cela dans la même plage de concentration étudiée [110].

3. Détermination de l'optimum

Après avoir validé le plan d'expérience les conditions optimal sont :

Tableau 13 : Composition d'optimum.

Alginate (g)	1
Chitosin (g)	1.05
Huile du romarin (μ l)	150
Motilité spermatique (μ l/s)	20.87

A fin de valider notre optimum nous avons préparé une solution dans les conditions optimal et la motilité spermatique a été évalué, les résultats sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau14 : les valeurs de motilités pour optimum.

Réponse	Optimum théorique	Optimum expérimental
Motilité spermatique	19.58	20.87

4. Caractérisation de la solution optimale (bille alginate/ chitosane/ romarin)

4.1. Caractérisation par HPLC

Le camphre est quantitativement le principal composant de l'huile du romarin (en Algérie). Les résultats de l'identification du camphre dans le système (Na-Alg, Chi) sont représentés dans les figures suivantes :

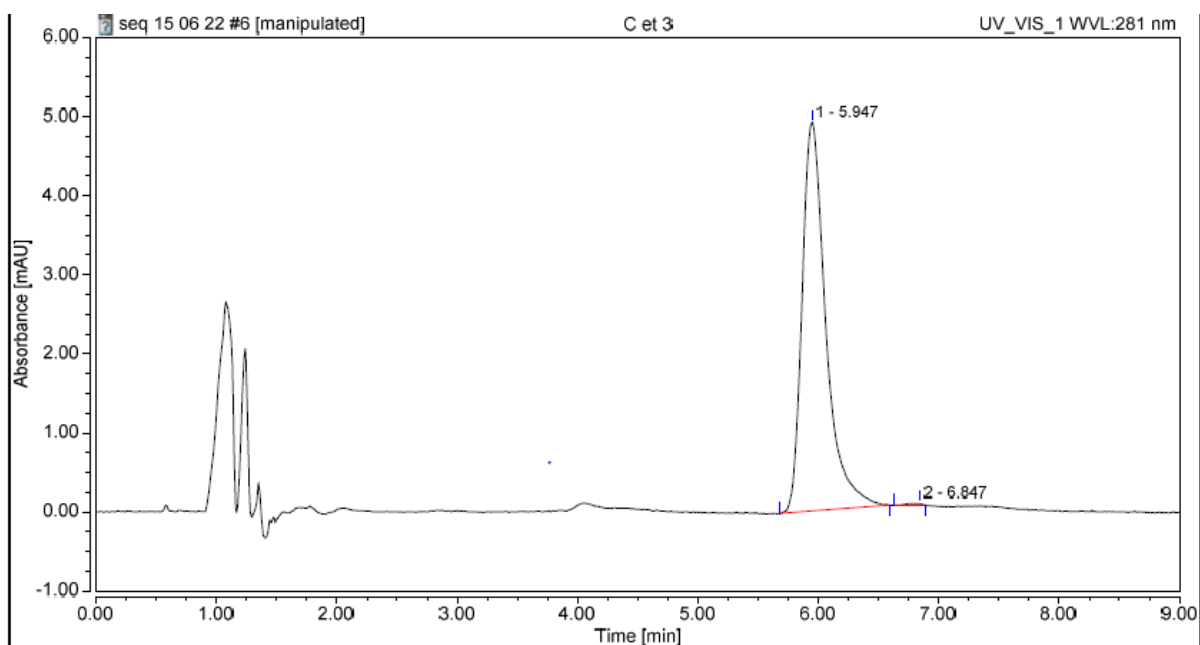


Figure 17 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon camphre.

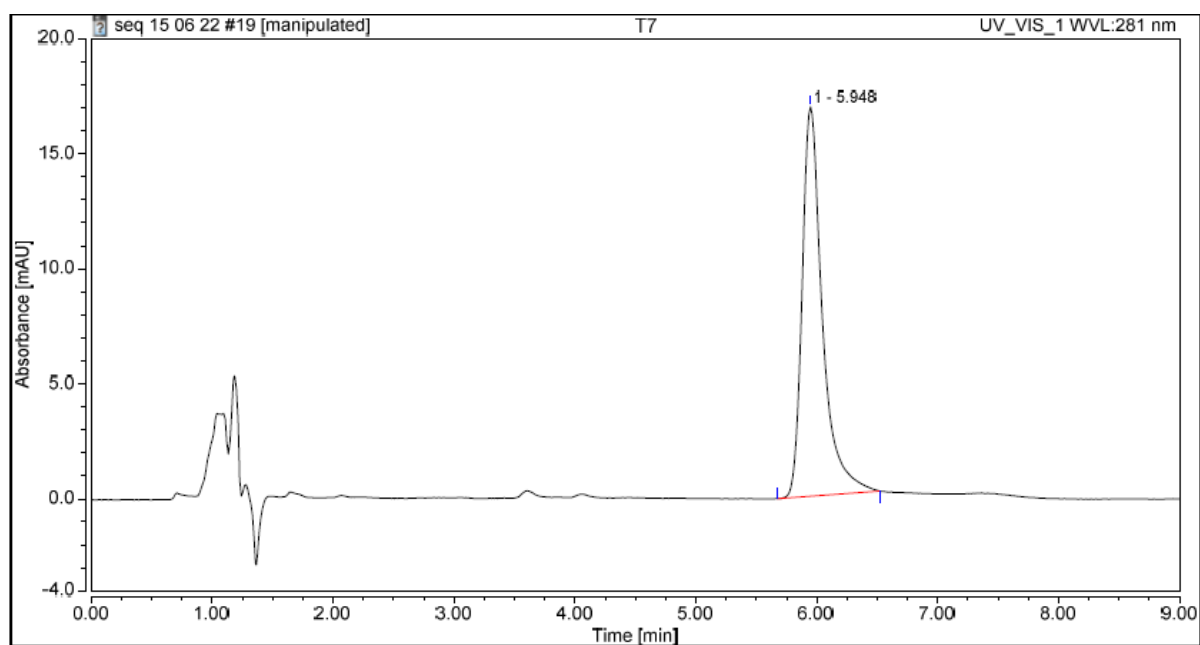


Figure 18 : Chromatogramme de HPLC de l'optimum.

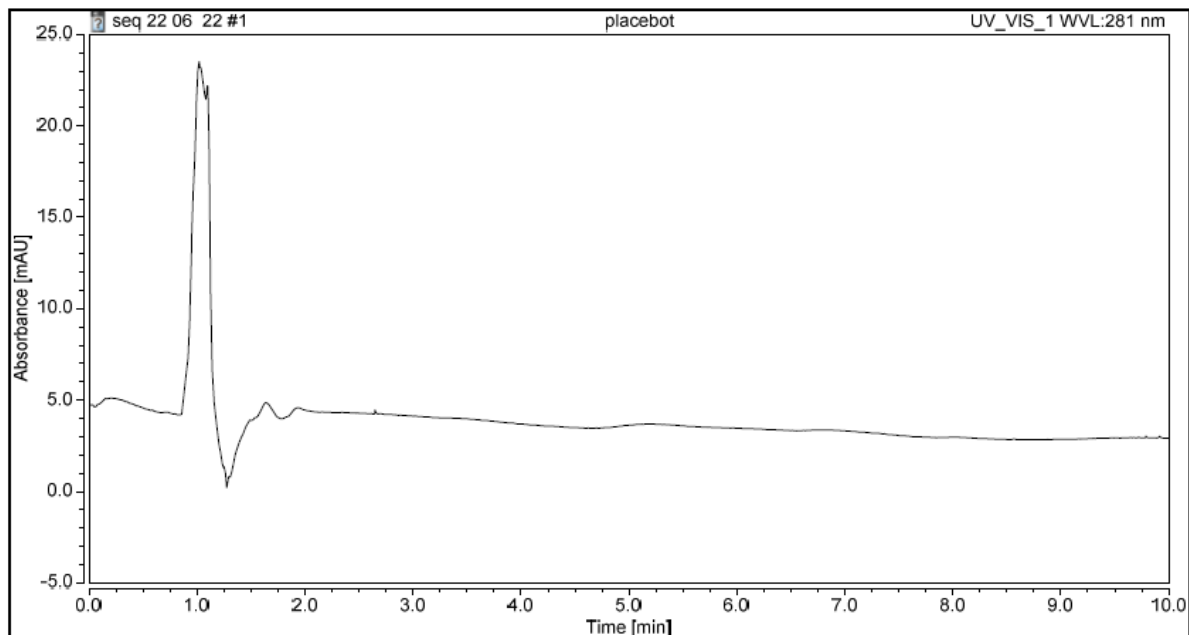


Figure 19 : Chromatogramme HPLC du placebo.

Observation :

- L'étalon du camphre présente un pic dans les environs de 6 min ;
- L'échantillon bille optimum on constate une apparition d'un pic au même temps de rétention que l'étalon camphre. ;
- L'échantillon placebo ne présente aucun pic dans l'intervalle de temps.

Interprétation : Apparition du pic dans l'échantillon de l'optimum à 6 min (temps de rétention du camphre) indique la présence camphre dans l'huile du romarin et aussi est un signe de création de complexes entre l'huile/alg/chi dans la bille, cela est confirmé par la non présence des pic dans l'échantillon placebo (absence de l'huile dans la formulation du placebo). De ce fait on peut dire qu'il y a eu encapsulation (formation de complexe) de l'HE Rom dans les billes d'alginate de sodium.

4.2. Caractérisation par infrarouge FTIR

A fin de déterminer les groupements fonctionnels des composés brutes ainsi que les billes optimales et le placebo une analyse infrarouge a été effectuée, les résultats sont rapportés dans la figure suivante :

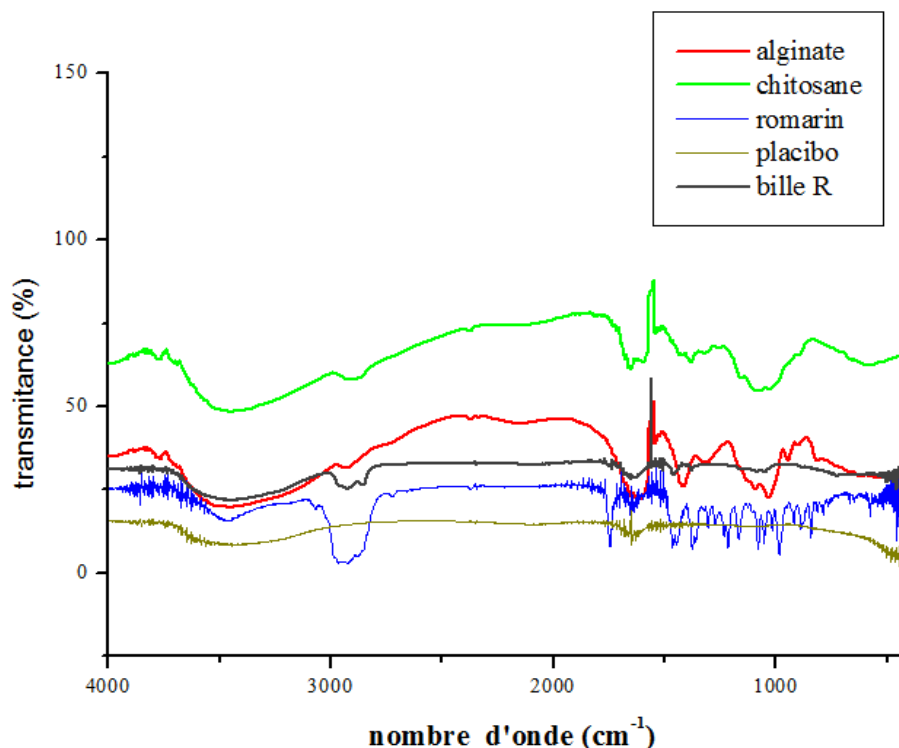


Figure 20 : Les spectres d'Alg/Chi/Rom/Plc/B.R de spectroscopie infrarouge transformée de Fourier.

Observations : Les spectres du chitosane, Na-alginate, romarin, les billes, et le placebo ont montré des pics caractéristiques autour 3400 cm pour l'étirement -OH et l'étirement -C=C présent dans chaque constituant sauf en romarin. CH qui s'étend à 2913 cm¹ a été observé de manière très significative dans le romarin et les B.R mais n'est pas significatif dans le reste constituant. On remarque la présence de C=O s'étirant à 1742 dans le romarin et son absence dans les autres spectres. L'alginate a montré un pic caractéristique autour 1423 pour le groupement OH. Elongation CO=O=CO qui s'étend à 1040 examiner dans le chitosane et Na-alginate. Dans le romarin certains pics distincts au tour de 1178 cm pour étirement -CO et au tour de 964 pour étirement C=C. Il y a également eu des pics significatifs de 1450 cm pour la liaison CH dans le romarin, au final le spectre du chitosane montre un pic caractéristique qui n'est pas existant aux autres, ce dernier est de tour de 1382 pour l'étirement S=O. Dans Na-

sodium et chi ont montré une fort bandes de transmission de 1620 cm, 1600 cm¹ respectivement dues aux anions carboxyles vibrations d'étirement asymétriques et symétriques disparaissant où devenir faible dans les formulations de billes qui ont mis en évidence des multi-interactions (liaison hydrogène et interaction électrostatique) entre le chitosane et l'alginate [111].

Il y a également eu des pics significatifs de 1600 en raison de la présence du groupe amine présent dans le chitosane.

Les détails sur le spectre ont été trouvées dans le graphique FTIR ont été tabulées dans le tableau suivant :

Tableau 15 : les groupements fonctionnels de FTIR.

Groupes fonctionnels	Nombres d'ondes pour alginate	Nombres d'ondes pour chitosane	Nombres d'ondes pour romarin	Nombres d'ondes pour Placebo	Nombres d'ondes pour B.R
OH étirement	3470	3454	3454	3478	3478
C=C étirement	1620	1600	/	1636	1628
CH étirement	/	/	2913	/	2913
C=O étirement	/	/	1742	/	/
Flexion OH	1423	/	/	/	/
CO=O=CO Elongation	1040	1040	/	/	/
CO étirement	/	/	1178	/	/
C=C flexion	/	/	964	/	/
	/	/	409	433	/
Flexion CH	/	/	1450	/	/
S=O étirement	/	1382	/	/	/

Interprétation :

L'apparition du pic du romarin dans la bille (alg/chi/huile)et son absence dans le placébo, signifie que l'huile du romarin a été encapsulée (interne/externe) dans la bille grâce à la

réticulation, l'absence du pic de l'huile dans le placebo est expliqué par la non présence de l'huile.

4.3. Caractérisation pas l'indice de gonflement

Tableau 16 : Résultats de l'indice de gonflement des billes.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Indice gonflement % ph 2.5	Ecla- tement	Ecla- tement	Ecla- tement	22.85	Ecla- tement	29.03	Ecla- tement	72.22	Ecla- tement	Ecla- tement	Ecla- tement	Ecla- tement	Ecla- tement
Indice gonflement % ph=7.5	Ecla- tement	87.09	Ecla- tement	70.27	55.55	100	Ecla- tement	45	55	450	400	6.25	8

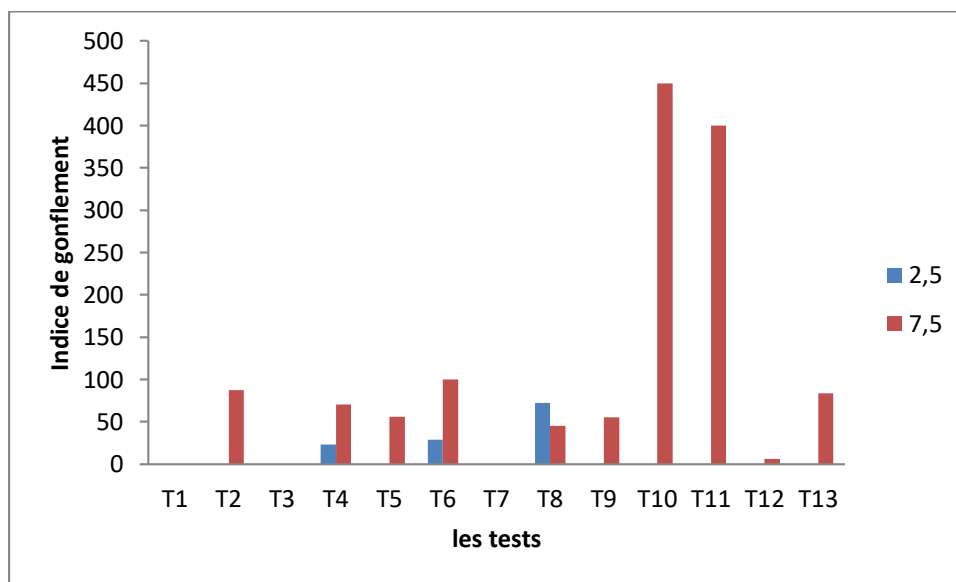


Figure 21 : Graphe indiquant l'indice de gonflement.

Le comportement de gonflement des billes représenté sur la figure a été étudiée en mesurant l'absorption de solution tampon pendant 30 minutes ; définis à pH 2.5 et pH 7.5.

Observation : Le rapport d'absorption de la solution tampon par les billes dans deux milieux de pH basique et acide, était défèrent. On voie que dans un milieu avec un pH de 2.5 que les testes 4 ; 6 ; 8 ont marqué une valeur de 22.85 % 29.03% 72.22% respectivement.et un

éclatement total pour le reste des billes. Par contre dans le milieu d'un pH de 7.5 on constate que la majorité des billes n'ont pas éclaté sauf celles du teste 1 ; 3 et 7. Cependant, l'augmentation progressive du gonflement des billes au niveau des deux tampons, était maximale pour la solution ph 2.5 (acide) et minimale pour la solution ph 7.5 (faiblement basique). Et on remarque que dans d'autres articles l'article que le rapport d'absorption d'eau par les microsphères des trois formulations était faible et indépendant du temps. Cependant, l'augmentation progressive de la concentration de chitosane dans F1, F2 et F3 a contrôlé le gonflement de la microsphère au niveau des trois tampons. L'absorption d'eau maximale pour les trois formulations a été observée pendant 7 h. Plus ou moins jusqu'à ce stade, les microsphères se comportent comme une matrice pour la libération contrôlée du médicament incorporé, après quoi l'érosion et la dégradation des microsphères se produisent

Interprétation : Cela revient au fait que l'alginate de sodium qui est le polymère d'encapsulation se dégrade plus dans un milieu acide (ph=2,5 qui est le ph de l'estomac), la bille se fait perforer par l'acidité (os molarité /perméabilité), et la solution y entre ce qui entraîne un gonflement progressive et au final explosion de la bille, on déduit donc que l'alginate joue le rôle d'un pansement gastrique et la protège des effets du principe actif.

Ainsi au niveau du ph=7.5 (ph de l'intestin) les billes se comportent comme une matrice pour la libération contrôlée du médicament incorporé, après quoi l'érosion et la dégradation des sphères se produisent.

5. Teste de motilité spermatique

Les Valeurs moyennes (\pm SEM) pour curviligne vitesse (VCL), vitesse moyenne du trajet (VAP) et vitesse linéaire droite (VSL), après 0, 18, 24 h de conservation à 4°C de l'épididyme de bovin spermatozoïdes dans le groupe témoin (Contrôle), l'optimum, et HE Rom.

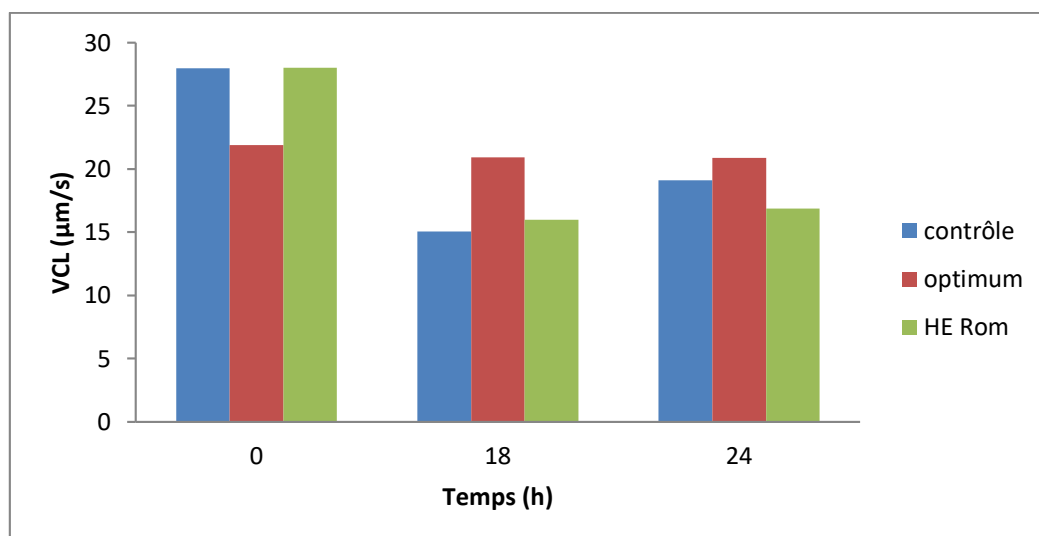


Figure 22 : Valeurs moyennes (\pm SEM) pour curviligne vitesse (VCL)

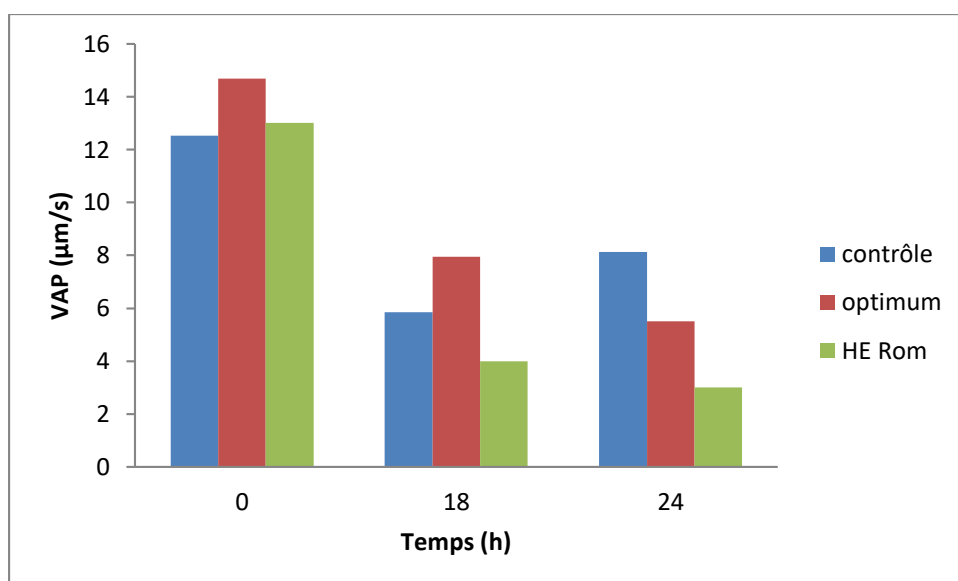


Figure 23 : Valeurs moyennes (\pm SEM) vitesse moyenne du trajet (VAP)

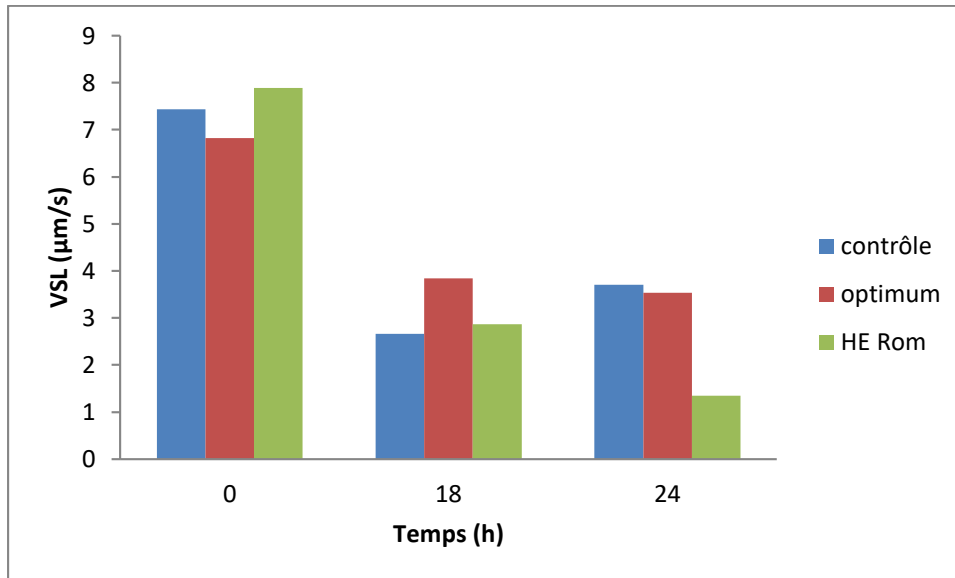


Figure 24 : Valeurs moyennes (\pm SEM) vitesse linéaire droite (VSL).

Observation

A T=0 on constate que l'huile Rom seule non encapsuler et le contrôle tris ont un meilleur effet comparant à celui des alginates. Après 18 et 24 h de réfrigération, on constate que l'optimum bille Alg/Chi/Rom a un meilleur effet sur la VSL, de même pour la VAP et VCL.

Interprétation

A t=0 l'alginate ne peut pas être explosé elle n'a pas encore libéré carrément l'huile Rom après un intervalle de temps de 18 et 24 h l'huile a été libérée et il a fait son effet de cryoprotecteur et avoir un effet anti oxydant veut dire protection contre le choc thermique et le stress oxydatif. Et le retard d'obtention de l'effet revient que l'alginate est contre la libération de l'huile L'augmentation de l'optimum par rapport à HE Rom à partir de 18h s'explique que l'huile doit être encapsulée dans l'alginate et chitosane pour être efficace, Et le retard d'obtention de l'effet revient que l'alginate est contre la libération de l'huile, le chitosane qui se conserve à -2°C donc protège la membrane spermatique qui sa congélation s'effectue à 4°C , L'alginate de sodium qui offre une protection lors de la cryoconservation grâce à ses propriétés physico-chimiques (gélifiant, épaississant...etc.). Les mêmes résultats ont été également obtenus par Ben Berkane et al (2020) qui a également trouvé une efficacité d'augmenter la motilité spermatique à travers l'utilisation de la même concentration à travers l'utilisation HE Rom encapsulé en CD on utilisant le même intervalle de concentration.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

L'objectif de cette recherche consiste à mettre au point un système d'encapsulation et solubilisation d'un principe actif hydrophobe, l'huile essentielle Romarin, encapsuler avec les alginates et qui est destinée à la supplémentation de milieu de conservation spermatique. L'huile romarin étant un antioxydant qui peut être utilisé pour lutter contre les effets du stress oxydatif et choc thermique en particulier celui observé au niveau des cellules spermatiques lors de la cryoconservation.

La première partie de notre travail a porté sur les caractéristiques de notre huile par la suite la réalisation des billes d'alginates/huile/chitosane par la méthode d'encapsulation et l'optimisation à l'aide d'un plan d'expérience. Par ailleurs, on a caractérisé notre solution optimale par la méthode de HPLC, infrarouge FTIR et le teste de gonflement. Les résultats ont montré qu'il ya eu encapsulation de 'huile dans le complexe (alginate+chitosane)), et que la bille Alg/Chi/Rom se fait perforer par l'acidité (osmolarité /perméabilité).

Dans la deuxième partie de notre travail on étudier La capacité de Rom à protéger le sperme de bovin contre les dommages de la cryoconservation. D'après les résultats de la motilité spermatique (24h de cryoconservation), l'huile essentielle du Romarin montre un meilleur effet sur la cryoconservation du sperme réfrigéré à 4 °C dans un milieu contenant la solution optimale d'alginates (bille). Cela s'explique par la présence simultanée de l'huile du romarin et ses propriétés anti oxydantes ainsi que la présence de l'alginate et chitosane.

Les résultats ont montré que les alginates de sodium sont un système efficace pour l'encapsulation de l'huile essentielle du romarin ainsi que pour la protection des spermatozoïdes lors de la cryoconservation.

En guise de perspective, il serait intéressant dans des futurs travaux :

- De déterminer l'efficacité d'encapsulation dans les billes de l'alginate,
- De connaître la taille du système alginate chargé en l'huile,
- D'Effectuer des tests du stress oxydatifs /TBRS /ABTS / Catalase.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Onnesen. HH, Karlsen. J, Alginate dans les systèmes d'administration de médicaments, DurgDév. Ind. Pharm.,2002.
- [2] Taouzinet L et al, Alpha Tocophenol Loaded in Liposome : Preparation, Optimisation, Characterisationans sperm motility protection. Drug Delivery Letters, 2020.
- [3] GirexxGenecologiaReproduccia : Cryoconservation d'échantillons de sperme. Société Espagnole de fertilité.
- [4] Labbé C et al, Technologie de la conservation dusperme chez plusieurs vertébrés domestiques : protection des lipides membranaires, intégritédu noyau et élargissement des méthodes. Les Actes du BRG, 4 143-157 BRG, Articleoriginal.2003.
- [5] Souza HM et al, The in vitro investigation of lycopene effects on post-thawed ram sperm , 2019.
- [6] Affonso CRG, Fernandes RM, de OliveiraJMG, Martins M do C de C e, Lima SG de,de Sousa Júnior GR, Moreno FernandesMZLC &Zanini SF,Journal of theBrazilian Chemical Society 2012.
- [7] Fergason J.L, Liquide crystals, Université de Toulouse, 1964.
- [8] Alla N, Etude de fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation), Université de Toulouse, 2012.
- [9] Vincent E , Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau, l'alginate : un procédé d'encapsulation,02 juillet 2010.
- [10] J.richard et J .P.Benoit, 2000, mocoencapsulation. Technique de l'ingénieur, J2 210.
- [11] Vincent E, Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau, introduction, 02 juillet 2010.
- [12] Medene A et all, Flavour encapsulation and magister, Université Abderrahmane Mora Bejaia, 2006.

- [13] Dedalino L et al, Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohydrate Polymers, 2008.
- [14] Gouin S, Micro-encapsulation, industrial appraisal of existing technologies and trends,(2004).
- [15] Ouahab A, Différentes approches pour l'amélioration de la solubilité des P.A hydrophobes ,Definition, février 2016.
- [16] Ouahab A, Différentes approches pour l'amélioration de la solubilité des P.A hydrophobes, importance de la solubilité, février 2016.
- [17] Santé Canada [Internet]. Ottawa: Santé Canada; 28 nov. 2011. Biodisponibilité et bioéquivalence; (24 septembre 2009).
- [18] Deepa T, Starch-modified alginate nanoparticles for drug delivery, abstrait (13 janvier 2021).
- [19] Gharib R, Greige-Gerges H, Fourmentin S, Charcosset C & Auezova L (2015) Carbohydrate Polymers 129, 175–186.
- [20] Szejtli J (1998) Chem. Rev. 98(5), 1743–1754.
- [21] Pereva S, Nikolova V, Sarafska T, Angelova S, Spassov T & Dudev T (2020) Journal of Molecular Structure
- [22] Patel MR, Lamprou DA & Vavia PR (2020) AAPS PharmSciTech
- Benberkane A, Khellouf A, Benhenia K, Fatmi S & Iguer-ouada M (2019)
- [23] D'souza AA & Shegokar R (2016) Expert Opinion on Drug Delivery
- [24] Ishihara H (2013) Biological Pharmaceutical Bulletin 36, 883–888.
- [25] Zhang X, Wang H, Ma Z & Wu B (2014) Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 10, 1691–1702.
- [26] Özdemir C & Güner A (2007) European Polymer Journal 43, 3068–3093.

- [27] Zong C, Sun Y, Zhang N, Wang F, Li A, Li Q & Lyu Z (2019) Synthesis of Chitosan-g-Macromol. Res.
- [28] Amokrane A, Kaidi R & Iguer-Ouada M (2020) CryoLetters 41,
- [29] Almeida JD et al, Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes, (1975).
- [30] Perez R, Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisation, culture, Edition IFREMER, (1997).
- [31] Perez R, La culture des algues marines dans le monde p 60 à 60, chapitre 1 : Acide alginique et alginates, (1992).
- [32] K. Varaprasad, T. Jayaramudu, V. Kanikireddy, C. Toro, ER Sadiku, Matériaux composites à base d'alginate pour l'application de pansements : une mini revue, Carbohydr.Polym. (2020).
- [33] KY Lee, DJ Mooney, Alginate : propriétés et applications biomédicales, Prog. Polym.Sci. (2012).
- [34] CH Goh, PWS Heng, LW Chan, Alginates en tant que polymère naturel utile pour la microencapsulation et les applications thérapeutiques, Carbohydr. Polym. (2012).
- [35] C. García-Astrain, L. Avérous, Synthèse et évaluation d'hydrogels d'alginate fonctionnels basés sur la chimie du clic pour les applications d'administration de médicaments, Carbohydr.Polym. (2018).
- [36] Dharmendra J, Delivery systems alginate-based medicines: application in the pharmaceutical and biomedical research context, (11 août 2014).
- [37] Augst AD et al, Alginate hydrogels as biomaterials, Macromol, Biosci, (2006).
- [61] Ertesvåg H, Valla S, Biosynthesis and applications of alginates polymer degradation and stability, (1998).
- [38] Ertesvåg, H.; Valla, S. Biosynthèse et applications des alginates. Polym. Dégrad. Coup de couteau. 1998,

- [39]Hsieh, W.-C. ; Liao, J.-J. Culture cellulaire et caractérisation d'un échafaudage 3D en poly(alcool vinylique)-g-amidon réticulé pour tissus ingénierie. Glucides. Polym. 2013,
- [40]Cui, Z. ; Zhang, Y.; Zhang, J.; Kong, H.; Tang, X.; Pan, L.; Xia, K.; Aldalbahi, A.; Li, A.; Tai, R.; et coll. Fonctionnalisés à l'alginate de sodium les nanodiamants comme vecteurs de libération prolongée de médicaments chimiothérapeutiques. Carbone 2016,
- [41] Hussain, S.; Liu, T.; Javed, MS; Aslam, N.; Zeng, W. Nanosphères et nanoparticules de ZnS 0D hautement réactives pour les propriétés de détection de gazformaldéhyde. Sens. Actionneurs B Chem. 2017,
- [42] Hodsdon, AC; Mitchell, JR; Davies, MC; Melia, CD Structure et comportement des formes posologiques à libération prolongée à matrice hydrophile : 3. L'influence du pH sur les performances de libération prolongée et la structure interne du gel des matrices d'alginate de sodium. J. Contrôle. Communiqué 1995
- [43]KM; Zia, F.; Zuber, M.; Rehman, S.; Ahmad, MN Polyuréthanes à base d'alginate: un examen des avancées récentes et perspective. Int. J. Biol. Macromol. 2015,
- [44] Otterlei, M.; Østgaard, K.; Skjak-Bræk, G.; Smidsrød, O.; Soon-Shiong, P.; Espevik, T. Induction de la production de cytokines à partir de Monocytes humains stimulés par l'alginate. J. Immunother. 1991,
- [45] El-Rehim, HAA Caractérisation et application agricole possible du polyacrylamide/alginate de sodium réticulé hydrogels préparés par rayonnement ionisant. J. Appl. Polym. Sci. 2006,
- [46] Ibrahim, S.M.; El Fadl, F.A.; El-Naggar, AA Préparation et caractérisation de billes d'alginate-CMC réticulées pour contrôle libération de sel de nitrate. J. Radioanal. Nucl. Chim. 2014
- [47] Iqbal, M. ; Ali, A.; Rashid, H.; Raja, N.; Naveed, N.; Mashwani, Z.-U.-R.; Hussain, M.; Ejaz, M.; Chaudhry, Z. Évaluation de l'alginate de sodium et du chlorure de calcium sur le développement de graines synthétiques. Pack. J. Bot. 2019,
- [48] Goh, CH; Heng, SPW; Chan, LW Alginates en tant que polymère naturel utile pour la microencapsulation et les applications thérapeutiques. Glucides. Polym. 2012

[49]Miyazaki, S. ; Kubo, W.; Attwood, D. Administration orale soutenue de théophylline en utilisant la gélification in situ d'alginate de sodium. J. Contrôle.Version 2000

[50] Shilpa. A., Agrawal SS, Ray. AR, Livraison contrôlée de médicaments à partir d'une matrice d'alginate. Journal of Macromolecular science part C Polymer Reviews. 43 (2) (2003)

[51] Fuoss RM, Strauss UP, Interaction électrostatique des polyélectrolytes et des électrolytes simples. J. Polymer Sci.,(1948)

[52]Augst, AD; Kong, HJ; Mooney, DJ Hydrogels d'alginate comme biomatériaux. Macromol. Biosci.(2006).

[53] Yang, J. ; Pan, J. Synthèse hydrothermale de nanoparticules d'argent par l'alginate de sodium et leurs applications en surface améliorée Diffusion Raman et catalyse. Acta Mater. (2012).

Zia, KM; Zia, F.; Zuber, M.; Rehman, S.; Ahmad, MN Polyuréthanes à base d'alginate: un examen des avancées récentes et perspective. Int. J. Biol. Macromol. (2015).

[24] Yang, J. ; Pan, J. Synthèse hydrothermale de nanoparticules d'argent par l'alginate de sodium et leurs applications en surface améliorée Diffusion Raman et catalyse. Acta Mater. (2012).

[25] Hussain, S.; Javed, MS; Asim, S.; Shaheen, A.; Khan, AJ; Abbas, Y.; Ullah, N.; Iqbal, A.; Wang, M.; Qiao, G.; et coll. De nouvelles nanoparticules de NiMoO₄ ressemblant à du gravier sur un tissu de carbone pour des applications de supercondensateurs exceptionnelles. Céramique Int. (2020),

[26] Ertesvåg, H.; Valla, S. Biosynthèse et applications des alginates. Polym. Dégrad. Coup de couteau., (1998).

[27]Shilpa. A., Agrawal SS, Ray. AR, Livraison contrôlée de médicaments à partir d'une matrice d'alginate. Journal of Macromolecular science part C Polymer Reviews., (2003).

[28]Fuoss RM, Strauss UP, Interaction électrostatique des polyélectrolytes et des électrolytes simples. J. Polymer Sci., (1948).

- [29]Srivastava R, Mcshane MJ. Application de revêtements de films ultra-minces auto-assemblés pour stabiliser l'encapsulation de macromolécules dans des microsphères d'alginate. *JMicroencapsul*,(2005).
- [30]Rahman Z, Kohli K, Khar RK, et al. Caractérisation des microsphères de 5-fluorouracile pour l'administration colique,(2006).
- [31] Novicov L.E et all, A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury, (2002).
- [32]Vincent E, les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau, (14 mars 2018).
- [33]Draget K I et all, *Food Hydrocolloids*, (2001).
- [34]vandamme T et all, Polymères d'origine biologique pour la micro-encapsulation, *Des sciences aux technologies*, (2007).
- [35] Ahmad A et all, Une étude expérimentale et DFT sur de nouveaux colorants incorporés avec des colorants naturels sur le dioxyde de titane (TiO₂) vers l'application des cellules solaires. *Appl.Phys. A* (2020).
- [36] Zia, KM; Zia, F.; Zuber, M.; Rehman, S.; Ahmad, MN Polyuréthanes à base d'alginate: un examen des avancées récentes et perspective. *Int. J. Biol. Macromol.* (2015).
- [37]Swamy, PAR ; Chang, JH; Ahn, H.; Lee, W.-K.; Chung, I. Alginate de sodium greffé au N-vinyl caprolactame thermosensible billes d'hydrogel pour la libération contrôlée d'un médicament anticancéreux. *Cellulose*,(2013),
- [41]Comizzoli & Holt,2019; Rodrigues Silva, Rodrigues Silva, Machado da Silva, &Comizzoli,2018)
- [42]Bailey et al.,2008; Bailey, Morrier et Cormier, 2003
- [43]C. Escriva, *Les huiles essentielles Corses*, Ed. Amyris. Bruxelles, 2012.
- [44][2] B. M. Lawrence. *Perfum. Flavor* 2001, 26 (5), 50-58; 2(4): 34-35, *Perfum. Flavor* 2007; 32 (9), 50-54, *Perfum.Flavor* 2012,

- [45] Zhao C, Guo X-J, Shi Z-H, Wang F-Q, Huang X-Y, Huo R, et al. Role of translation by mitochondrial-type ribosomes during sperm capacitation: An analysis based on a proteomic approach. *Proteomics*. 2009
- [46] Auger J et al, Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 2000.
- [47] Lazzari C et al, Cellular and molecular deviation in bovine in vitro- production embryos related to the large offspring syndrome, *Biol*, 2002.
- [48] B Le Tallec et al, risks of transmissible diseases in relation to embryo transfert, (2001)
- [49] Ezzati M, Shanehbandi D, Hamdi K, Rahba, S & Pashaiasl M (2020)
- [50] Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S (2014)
- [51] Peltoniemi O, Björkman S, Oropeza-Moe M & Oliviero C (2019) *Anim Reprod* 16
- [52] Kumar P (2019) *Journal de recherche animale* 227-235.
- [53] de Paula et al. 2006 ; Hammadeh et al. 1999 ; Isachenko et al. 2004 ; Said et al. 2010 ; Thomas et al. 2009 ; Zribi et al. 2010
- [54] Watson. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 481–492 (2000).
- [55] Fabozzi, G. et al., Evaluation of the efficiency of two different freezing media and two different protocols to preserve human spermatozoa from cryoinjury. *International Journal of Reproductive Medicine*, 6: 1–6 (2016).
- [56] Laboratoire d'analyses médicales ZTP, BIOLOGIE DIAGNOSTIQUE (Analyses : spermogramme, spermocytogramme, spermoculture, test de migration survie)
- [57] B D Bavister, Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts, *Hum .reported*. Update, 1995.
- [58] Taouzinet L, Fatmi S, Skiba M, Iguer-ouada M, Encapsulation nanotechnology cryopreservation systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery: abstract, (janvier 2021).

- [59] Yudin AI, Vandervoort CA, Li MW, Overstreet JW. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. Mol. Reprod. Dev. 1999
- [60] Barel R et al, heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp 70 as a potential autoregulatory factor 1992
- [61] Harald Sieme, Harriette Oldenhof, Willem F. Wolkers. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. Animal Reproduction Science, 169:2-5(2016).]
- [62] [Mocé et al, 2010 ; Moore et al, 2005 ; Purdy and Graham, 2004)].
- [63] O'flaherty, C, Beconi, M & Beorlegui, N, Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa, 1997.] ,
- [64] [Satorre, MM, Breininger, E & Beconi, M T, Cryopreservation with alpha-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm, 2012].
- [65] Jacques G. Paltz s.a. « le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire « jacques paltz ». 1997.
- [66] Volak, J., ry Stdola, J., « plantes médicinales ». GRUND . Paris .1983.
- [67] Florence MAYER, UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.
- [68] Florence MAYER, UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.
- [69] paris M. et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris. 1981.
- [70] paris M. et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris. 1981.
- [71] KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en évidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique . Université d'Oran Es- Sénia 2000.

[72] . Jacques G.Paltz s.a. « le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire « jacque paltz ».1997

[73] Florence MAYER , UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.

[74] María Dolores Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[75] .(Boullard, 2001). MAYER , UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.

[76] (Stefanovits-Banyai et al., 2003). María Dolores Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[77](Katzer, 1998). paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris.1981.

[78] (Heinrich et al., 2006). María Dolor KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000es Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[79] (Botineau, 2010) MAYER , UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.

[80] (Roux, 2004). María Dolores Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[81] . (Garnier et al., 1961). KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000

[82] (Roux, 2004), María Dolores Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[83] (Roux, 2004), María Dolores Hernández¹ et al Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[84] Djermoune et Khanouche, 2014). KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000

[85] (Jones, 1998;Thoresen et Hildebrand, 2003),

[86] (Zoubeidi, 2004). María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[87] (Zoubeidi, 2004). María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[88] (Martini, 2011) María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[89] (Bousbia, 2011). paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris.1981.

[90] (Djabi et Khobizi, 2018) paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris.1981.

[91] Benberkane Amine et all ; Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* préchargée en γ -cyclodextrine: effet sur la motilité des spermatozoïdes de bélier, l'intégrité de la membrane et l'état oxydatif pendant le stockage à 4°C.

[92] . (Teuscher et al., 2005). María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[93] Cultivé; S, Spontané. María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[94] paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris.1981.

[95] (Martini, 2011) María Dolores Hernández¹ et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 2003

[96] Djermoune et Khanouche, 2014). KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .

- [97] paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris. 1981.
- [98] . Jacques G.Paltz s.a. « le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire « jacque paltz ». 1997
- [99] paris M.et al : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris. 1981.
- [100] Florence MAYER , UTILISATIONS THERAPEUTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : ETUDE DE CAS EN MAISON DE RETRAITE 30 Mars 2012.
- [101] Djermoune et Khanouche, 2014). KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique
- [102] Heinrich et al., 2006). María Dolor KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000es Hernández1 et all Chapitre 77 Huiles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)
- [103] . (Garnier et al., 1961). KAMBOUCHE. N « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000.
- [104] S. Wittaya-areekul et al. / Revue internationale de pharmacie 312 (2006) 113–118.
- [105] Taouzinet L et al (2020) *BMC* e5018 27. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, de Paz P & Anel L (2006).
- [106] Mortimer ST (2000) *Journal d'andrologie* 21, 515–524.
- [107] Hoefler C. Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L, et notamment des jeunes pousses, activités cholérétiques, anti-hépatotoxique, anti-inflammatoires et diurétiques, Université de metz centre des Sciences de l'environnement thèse de doctorat 1994.
- [108] Perez R, la culture des algues marines dans le monde Ifremer 1992 p 16 à 60 chapitre 1 : Acide alginique et alginates.

[109] R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Cationic cellulose hydrogels : kinetics of the cross-linking process and characterization as pH- / ion-sensitive drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 86, 253–265 (2003)

[110] Benberkane Amine et al ; Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* préchargée en γ -cyclodextrine: effet sur la motilité des spermatozoïdes de bélier, l'intégrité de la membrane et l'état oxydatif pendant le stockage à 4°C, (2019).

[111] Zhang, J. et al, 2008. Préparation et caractérisation de billes de gel composite gomme de tamarin/alginat de sodium. *L'Iran. Polym. J.* 17 (12), 899–906.

ANNEXES

Annexe



Figure : Lapeser de chlorure de calcium.



Figure : Laprélevassions de l'acide acétique.



Figure : Lapeser de l'alginate de sodium.

Annexe



Figure : Lapeser le chitosane.



Figure : Réalisation des billes Alg/Chi/Rom.

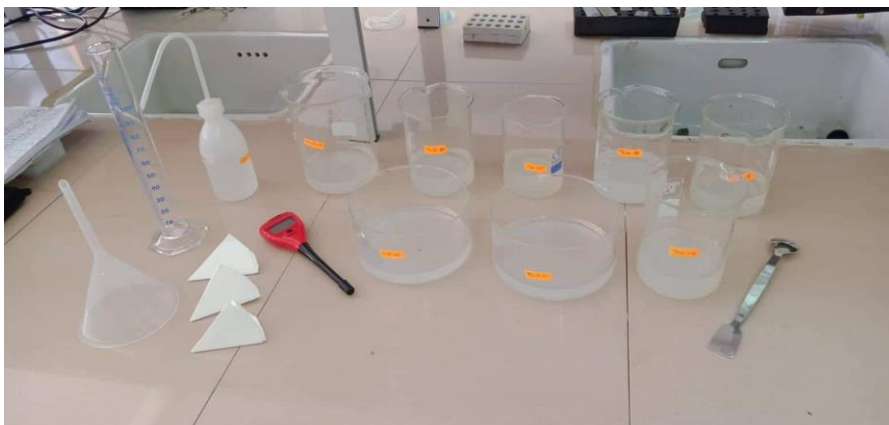


Figure : Rinçage des billes.

Annexe

1. Résultat de rinçage de billes

Tableau 11 : rinçage de billes.

Mesure de Ph	Teste1	Teste2	Teste3	Teste4	Teste5	Teste6	Teste7	Teste8	Teste9	Teste10	Teste1 1	Teste1 2	Teste 13
Ph eau	7.4	6	6.3	6.3	7.1	6.2	7.1	6.7	6.2	6.7	6.5	7.0	7.0
Ph (1)	2.5	2.6	3.5	3.6	3.4	3.4	3.3	3.4	2.5	3.9	2.5	3.8	3.7
Ph eau	6.6	6.5	6.7	7	6.2	6.4	6	6.8	6.2	6	6	6	6.6
Ph (2)	2.8	2.7	3.8	3.8	3.6	3.5	3.5	3.6	2.7	4	2.8	4.0	3.9
Ph eau	5.9	6.2	6.2	6	7.4	6.2	6	6	6.3	6.1	6.0	6	6.2
Ph (3)	3	3	4	4	3.8	3.7	3.8	3.7	3	4.3	3.1	4.1	4.1
Ph eau	6.3	6	6.4	6.4	6.4	7.3	7.5	6.4	6.0	7.3	65	6	6.2
Ph (4)	3.2	3.2	4.2	4.3	4	3.9	4.3	3.8	3.2	4.7	3.3	4.2	4.4
Ph eau	6.4	6	6.2	6.4	6.2	7	7	6.2	7.6	7.2	7.5	7.5	6.4
Ph (5)	3.7	3.4	4.5	4.5	4.5	4.4	4.9	4.4	3.5	5.0	3.5	4.5	4.9
Ph eau	6	6.1	6.1	7.3	7.3	6.7	7	7.3	6.3	7.0	7.2	66	6.3
Ph (6)	4	3.7	4.6	5.1	5.1	5	5.4	5.2	3.9	5.8	4.2	5.0	5.3
Ph eau	6.4	6	5.9	6.6	6.5	6.8	6.7	7.0	6.1	6.6	7.0	7.2	6.7
Ph (7)	4.5	4	4.6	5.5	5.6	5.4	6	5.6	4.1	6.0	4.5	5.5	5.4
Ph eau	6.4	6.1	6.7	6.6	6.7	6.6	6.6	7.1	6.9	6.7	6.6	7.0	7
Ph (8)	5.1	4.5	4.8	6.4	6.3	5.7	6.6	6.1	4.5	6.7	4.8	5.8	5.7
Ph eau	6.2	6	6.7	6.8	6.5	6.5		6.3	7.7		6.3	6.4	7.4
Ph (9)	5.9	4.7	5.2	6.8	6.5	6.0		6.2	5.2		5.4	6.4	6.1
Ph eau	6.1	6.3	7.6			6.3			7.5		63		6
Ph (10)	6.1	4.7	6.6			6.3			5.4		5.8		5.5
Ph eau		5.9	6.1						7.5		6.4		6.0
Ph (11)		5.6	6.1						5.9		6.3		6.0
Ph eau		6.6							7.5				
Ph (12)		5.9							6.1				
Ph eau		6.2							7.1				
Ph (13)		6.1							6.3				
Ph eau									6.4				
Ph (14)									6.3				
Ph eau									6.4				
Ph (15)									6.4				

Annexe

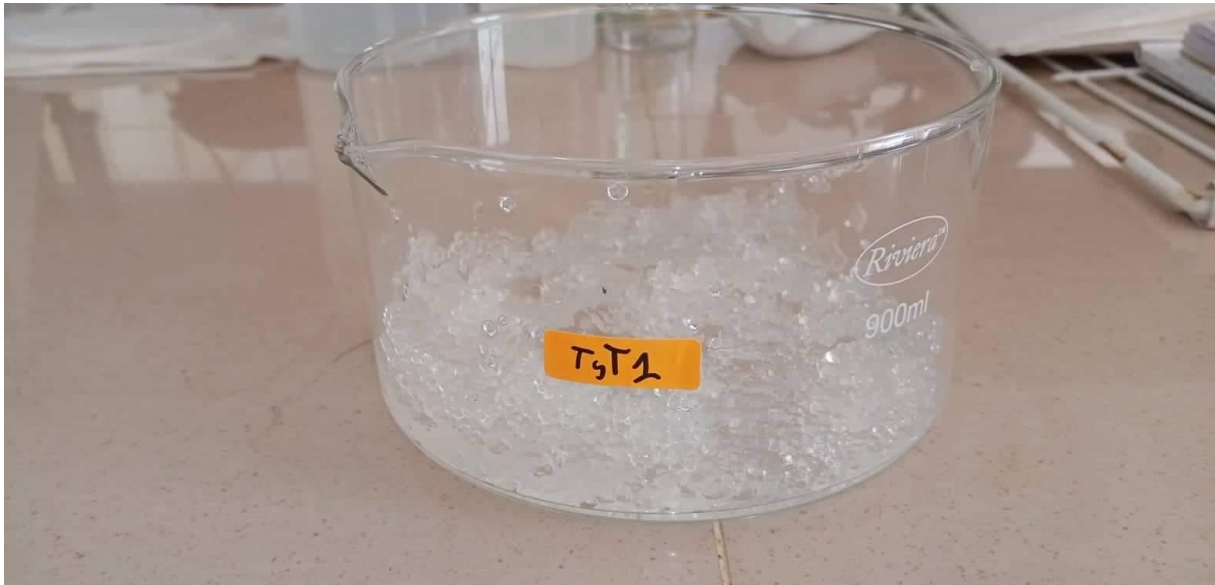


Figure : Billes Alg /Chi/Rom.



Figure : appareil sonicateur.

Annexe

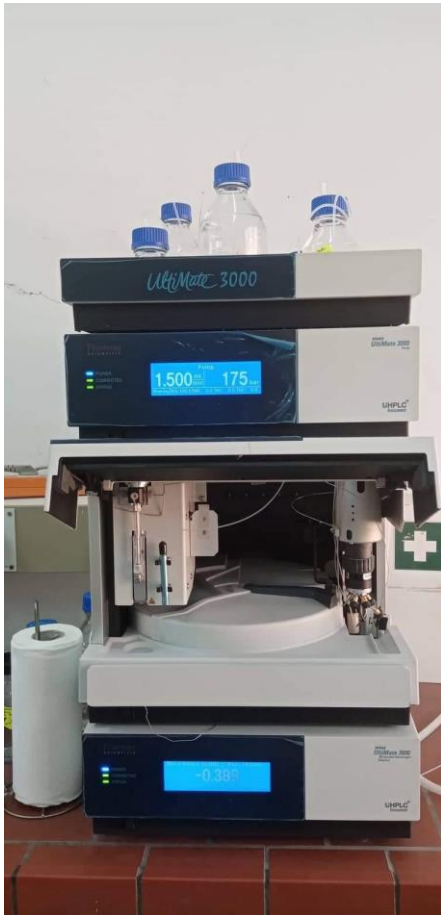


Figure : Appareil HPLC.



Figure : Appareil infrarouge.

Annexe



Figure : Collecte de sperme épидидymite.



Figure : collecte du sperme dans un epindorff .

Annexe



Figure : Appareil CASA.



Figure : photo prise par l'appareil CASA

Tableau 9 : La composition en masse de billes de deux essais d'un ph de 2.5.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Masse (g)	0.001	0.015	0.008	0.017	0.008	0.017	0.001	0.008	0.004	0.002	0.001	0.003	0.005
Masse *(g)	0.001	0.025	0.010	0.018	0.003	0.014	0.003	0.01	0.008	0.001	0.001	0.002	0.001

Annexe

Tableau 10 : La composition en masse de billes de deux essais d'un ph de 7.5.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Masse (g)	0.001	0.018	0.009	0.019	0.006	0.011	0.009	0.013	0.010	0.001	0.001	0.008	0.006
Masse *(g)	0.001	0.013	0.007	0.018	0.012	0.009	0.008	0.007	0.010	0.001	0.001	0.008	0.006

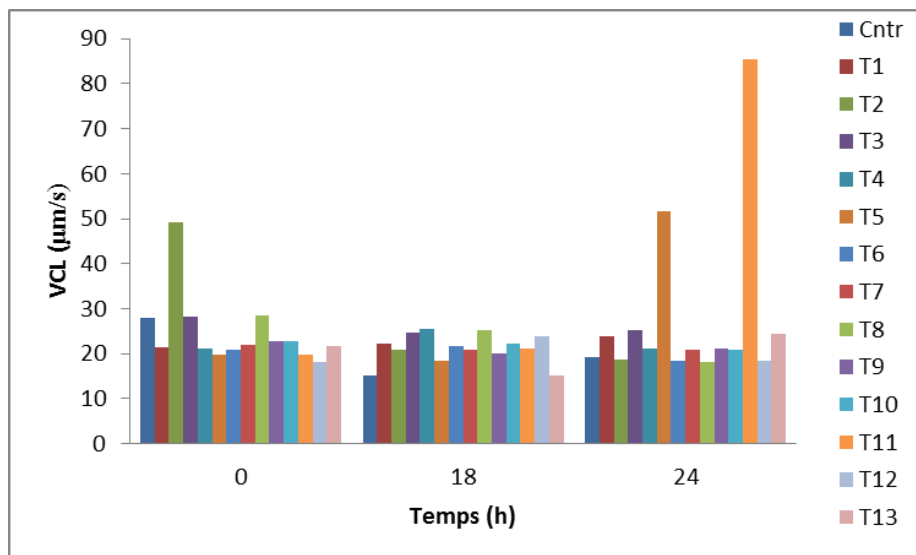


Figure : Valeurs moyennes (\pm SEM) pour curviligne vitesse (VCL).

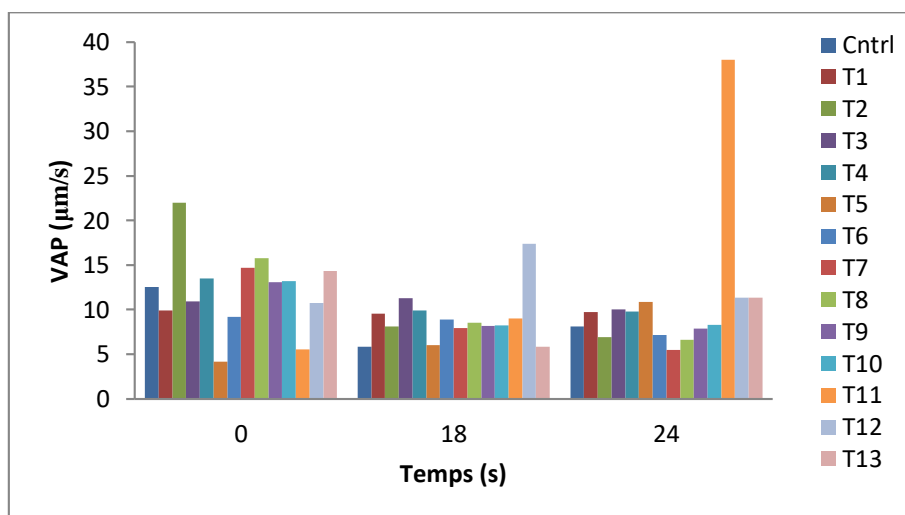


Figure : Valeurs moyennes (\pm SEM) pour vitesse linéaire droite (VSL).

Annexe

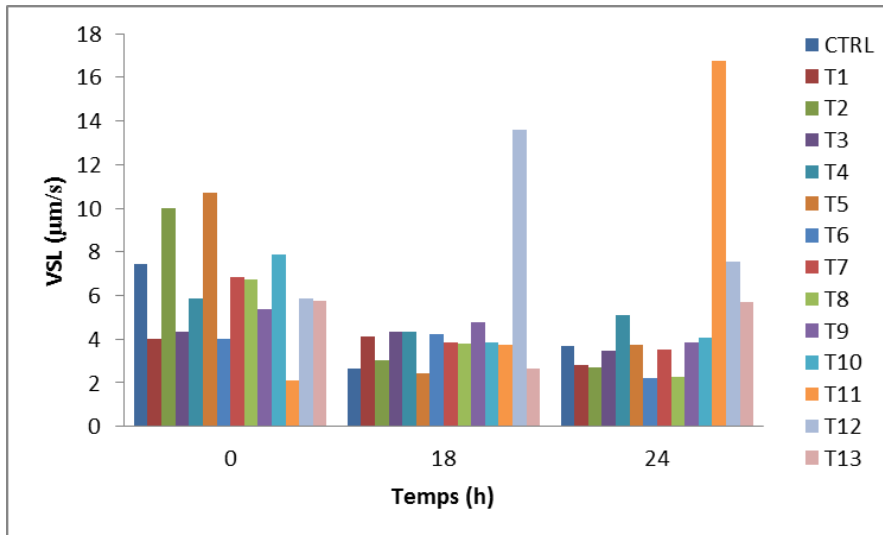


Figure : Valeurs moyennes (\pm SEM) pour vitesse moyenne du trajet (VAP).

Tableau : Taux d'humidité

Teste	Après 30 min	Après 30min	Après 30min	Après 30 min
1	0.001	0.001		
2	0.002	0.001	0.001	0.001
3	0.001	0.001		
4	0.001	0.001		
5	0.001	0.001		
6	0.009	0.002	0.001	0.001
7	0.001	0.001		
8	0.001	0.001		
9	0.001	0.001		
10	0.001	0.001		
11	0.001	0.001		
12	0.003	0.002	0.001	0.001
13	0.001	0.001		

Résumé

Dans ce travail nous avons collecté des informations sur l'alginate de sodium qui sera notre polymère utiliser dans le système d'encapsulation qui consistera à piéger, enrober l'huile essentielle romarin pour crée un complexe et améliorer sa solubilité, le romarin possède divers propriétés thérapeutique notamment antioxydant pour améliorer la cryoconservation des spermatozoïdes il est considéré comme cryoprotecteur, on tentera la modalisation de ce processus par la méthode des plans d'expériences.

Les résultats de cette étude montre que l'utilisation de ce système d'encapsulation, améliore la solubilité la stabilité et donc la biodisponibilité des principes actifs.

Mot clés : alginate de sodium, huile essentielle du romarin, cryoconservation, encapsulation, solubilité.

Abstract

In this work we have collected information on sodium alginate which will be our polymer to use in the encapsulation system which will consist of trapping, coating the rosemary essential oil to create a complex and improve its solubility, rosemary has various properties therapeutic in particular antioxidant to improve the cryopreservation of the spermatozoids it is considered as cryoprotectant, one will try the modeling of this process by the method of the plans of experiments.

The results of this study show that the use of this encapsulation system improves the solubility, stability and therefore the bioavailability of the active ingredients.

Key words: sodium alginate, rosemary essential oil, cryoconservation, encapsulation, solubility.