

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



# Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science et technologie du  
médicament

## Thème

**Optimisation et caractérisation des complexes  
d'inclusion vitamine E/cyclodextrine  
et cholestérol/cyclodextrine.**

**Soutenu devant le jury composé de :**

**Président : M<sup>r</sup> R. Ketrane**

**Examinatrice : M<sup>me</sup> H. Belkacemi**

**Promoteur : M<sup>r</sup> S. Fatmi**

**Invitée : M<sup>me</sup> Y. Amrani**

**Réaliser par :**

**M<sup>lle</sup> Meriem MEZNAD**

**M<sup>lle</sup> Imane M'HAMDI**

**Promotion 2016**



*Nous tenons avant tout à remercier le miséricordieux tout puissant, car sans son aide et sa bienveillance, rien de cela n'aura pu être réalisé.*

*Nous tenons aussi, à exprimer nos gratitude, à notre encadreur M<sup>r</sup>. S. FATMI, pour avoir accepté de nous guider tout au long de ce travail, pour tous les moyens mis à notre disposition, pour ses précieux conseils, et surtout pour son soutien qui nous a permis l'accomplissement de ce travail. Ainsi son dynamisme communicatif, sa bonne humeur qui nous a toujours apaisé et surtout pour sa patience.*

*Nous remercions infiniment, Mr. IGUEROUDA pour nous avoir accordé l'opportunité de travailler dans le laboratoire R.B.A*

*Nous remercions aussi Mr. alladin KHALLOUFI de nous avoir aidé à réaliser la partie biologique.*

*Merci pour l'ensemble des membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'examiner et évaluer notre travail et de faire partie de notre jury.*

*Un grand remerciement à Mme AMRANI pour son aide, orientation, soutiens, merci d'être comme une deuxième maman pour nous.*

*Nous tenons aussi à remercier Mme RABHI et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*A mes très chers parents, que dieu vous protège, qui y ont toujours été à mon côté et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Pour tous les nobles sacrifices que vous avez imposé pour assurer mon bien être et mon éducation. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affectation et l'amour que j'éprouve envers vous. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toutes mes reconnaissances et tout mon amour.*

*Sans oublier, mes frères et mes sœurs, ainsi qu'à tous les membres de ma grande famille grands et petits.*

*A youyou qui ma encouragé et soutenu durant toute la période de nos études.*

*A ma binôme Meriem pour tous les efforts qu'elle a fournie durant la réalisation Nchalah on restera copines jusqu'à la fin de nos jours.*

*Enfin je dédie ce travail à mes meilleurs amis et tout le monde qui m'ont connus, aimés, appréciés, encouragés de près ou loin pendant tous mon cursus*

*Imane. M*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier ».*

*A mes chers frères El Hadi, Abdeslam et Abderrahmane pour leurs soutiens moraux et qu'ils trouvent ici le témoignage de gratitude.*

*A ma binôme et meilleur copine Assoula pour tous les efforts qu'elle a fournis pour le réaliser, que dieu lui offre tout le bien de ce monde.*

*A tout mes cousins et cousines grands et petits, spécialement Lila, Biba, Mounia et Fatma, merci de me considérer comme votre petite sœur, merci d'être toujours à mes côtés que ce soit dans le bien ou le pire.*

*A ma très chère cousine Felia et mon meilleur ami Zimou*

*A tout mes amis et à tout ceux qui me connaissent sans les avoir cités puisque la liste est grande.*

*Meriem.M*

# Liste des figures

<b>Figure I.1.</b> Structures de $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD et $\gamma$ -CD.....	4
<b>Figure I.2.</b> Représentations de la structure chimique générale des cyclodextrines.....	5
<b>Figure I.3.</b> Structure tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles.....	8
<b>Figure I.4.</b> Schéma d'inclusion d'une molécule dans la cavité d'une cyclodextrine.....	9
<b>Figure I.5.</b> Processus de complexation des cyclodextrines.....	10
<b>Figure I.6.</b> Représentation schématique des complexes d'inclusion respectivement de gauche à droite 1 :1, 1 :2, 2 :1, 2 :2.....	11
<b>Figure I.7.</b> Diagramme de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors.....	12
<b>Figure II.1.</b> Structure chimique de cholestérol.....	19
<b>Figure III.1.</b> Structure du Tocophérol.....	25
<b>Figure III.2.</b> Structure du Tocotriénol.....	25
<b>Figure IV.1.</b> Représentation schématique d'un spermatozoïde.....	31
<b>Figure II.1.</b> La collecte des spermatozoïdes du bovin.....	51
<b>Figure III.1.</b> Chromatogramme de la Vitamine E.....	53
<b>Figure III.2.</b> Chromatogramme de l'eau distillée.....	53
<b>Figure III.3.</b> Chromatogramme de la $\beta$ -CD.....	54
<b>Figure III.4.</b> Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	54

<b>Figure III.5.</b> Concentrations de la vitamine E après solubilisation.....	55
<b>Figure III.6.</b> Spectre Infrarouge de la Vitamine E, PM $\beta$ -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.....	57
<b>Figure III.7.</b> Courbe d'étalonnage de cholestérol.....	59
<b>Figure III.8.</b> Facteurs statistique obtenus.....	62
<b>Figure III.9.</b> Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la solubilité du cholestérol.....	63
<b>Figure III.10.</b> Courbe iso-réponse.....	65
<b>Figure III.11.</b> Spectre Infrarouge du cholestérol, HP $\beta$ -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.....	66
<b>Figure III.12.</b> Diagramme en bâton des vitesses linéaire (VSL) des spermatozoïdes.....	67

# Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Caractéristiques physico-chimique des cyclodextrines natives les plus courantes.....	7
<b>Tableau II.1.</b> Propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	21
<b>Tableau III.1.</b> Propriétés physico-chimique de la vitamine E.....	26
<b>Tableau II.1.</b> Les quantités des CDs utilisées.....	40
<b>Tableau II.2.</b> Préparation des solutions de la courbe d'étalonnage.....	41
<b>Tableau II.3.</b> Plan d'expérience D-Optimal.....	44
<b>Tableau II.4.</b> Matrice d'expérience avec des valeurs centrées réduites.....	45
<b>Tableau II.5.</b> Préparation des solutions de la courbe d'étalonnage.....	47
<b>Tableau III.1.</b> Concentrations de la vitamine E après solubilisation.....	55
<b>Tableau III.2.</b> Matrice d'étude complétée.....	60
<b>Tableau III.3.</b> Valeurs numériques des caractéristiques numériques.....	62
<b>Tableau III.4.</b> Détermination de l'optimum.....	64

# Liste des abréviations

**CD(s)**: Cyclodéxtrine(s).

**Chol**: Cholestérol.

**$\beta$ -CD** : Beta-cyclodextrine.

**HP $\beta$ CD**: Hydroxyl-propyl bêta-cyclodextrine.

**PM $\beta$ CD** : Perméthyl bêta-cyclodextrine.

**$\alpha$ -CD** : Alpha-cyclodextrine.

**$\gamma$ -CD** : Gamma-cyclodextrine.

**SPZ** : Spermatozoïde.

**Vit E** : Vitamine E.

**TB**: Tris buffer.

**CASA**: Computer assisted sperm analyser.

**Std**: Standard.

**CGT-ase** :Cyclodextringlucosyltransferase enzyme.

**PE** : Pharmacopée européenne.

**PB** : Pharmacopée britannique.

**USP** : United States Pharmacopée.

**$K_s$**  : Constante de stabilité.

**$K_d$**  : Constante de dissociation.

**C/P**: ratio cholestérol/phospholipide.

**RSD** : Ecart relatif standard.



**VSL** : Vitesse de la trajectoire en ligne droite.

**HPLC** : Haute performance liquid chromatography.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**LDL** : Low densité lipoprotéines.

**HDL** : Haute densité lipoprotéines.

# Table des matières

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction générale**..... 1

## **Chapitre I : Revus bibliographiques**

### **PARTIE I : Généralités sur les cyclodextrines**

I.1. Introduction .....	3
I.2. Historique .....	3
I.3. Définition .....	3
I.4. Structure et propriétés des CDs .....	4
I.4.1. Structure .....	4
I.4.1.1. Les cyclodextrines naturelles .....	4
I.4.1.2. Les cyclodextrines modifiés .....	5
I.4.1.2.1. But de la modification .....	5
I.4.1.2.2. Les dérivés des cyclodextrines .....	6
I.4.2. Propriétés physico-chimique des CDs .....	7
I.5. Toxicité des cyclodextrines .....	8
I.5.1. CDs naturelles .....	8
I.5.2. CDs modifiées .....	9
I.6. Situation juridique .....	9
I.7. Complexe d'inclusion .....	9
I.7.1. Définition.....	9

I.7.2. Mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion .....	10
I.7.3. Caractéristiques d'un complexe d'inclusion .....	11
I.7.4. Diagramme de solubilité (Diagramme d'Higuchi).....	11
I.7.5. Facteurs influençant la complexation des molécules organiques par les CDs .....	12
I.7.6. Préparation d'un complexe d'inclusion.....	13
I.7.6.1. La méthode de précipitation .....	13
I.7.6.2. La méthode de pétrissage (Kneading) .....	13
I.7.6.3. Mélange physique ou mélange à sec .....	13
I.7.6.4. Lyophilisation.....	13
I.7.6.5. La complexation par CO <sub>2</sub> à l'état supercritique .....	14
I.7.6.6. Co évaporation .....	14
I.7.7. Techniques de caractérisation des complexes d'inclusions.....	14
I.7.7.1. Méthode spectrophotométrie UV-visible .....	14
I.7.7.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	14
I.7.7.3. Spectroscopie infrarouge (IR) .....	15
I.7.7.4. Diffraction des rayons X (DRX) .....	15
I.7.7.5. La microscopie électronique à balayage (MEB) .....	15
I.7.7.6. Analyse thermogravimétrique (ATG) .....	15
I.7.7.7. Analyse calorimétrique différentielle (DSC) .....	16
I.7.7.8 Test de dissolution.....	16
I.7.8. Utilisation des cyclodextrines.....	16
I.7.8.1 Domaine pharmaceutique.....	16
I.7.8.2. Industrie alimentaire.....	16
I.7.8.3. Cosmétique .....	17
I.7.8.4. Agriculture.....	17
I.7.8.5. Textile.....	17
I.7.8.6. En chimie catalytique et analytique.....	17

I.7.8.7. Domaine biologique .....	17
I.8. Conclusion.....	17

## **PARTIE II : Cholestérol**

II.1. Définition .....	18
II.2. Historique.....	18
II.3. Structure de cholestérol .....	18
II.4. Source du cholestérol.....	19
II.5. Extraction du cholestérol .....	19
II.6. Rôle du cholestérol .....	20
II.6.1. Élément structural .....	20
II.6.2. Précurseurs de composés biologiques.....	20
II.7. Propriétés physico-chimique du cholestérol .....	20
II.8. La solubilité du cholestérol.....	21
II.9. Le cholestérol et la membrane spermatique .....	21
II.10. Conclusion .....	22

## **PARTIE III : Vitamine E**

III.1. Introduction .....	23
III.2. Définition.....	23
III.3. Historique .....	23
III.4. Source .....	24
III.4.1. Origine naturelle .....	24
III.4.2. Origine synthétique.....	24
III.5. Structure .....	24
III.6. Les propriétés physico-chimiques de la vitamine E .....	25

III.7. La solubilité de la vitamine E .....	26
III.8. Toxicité.....	26
III.9. Liste des rôles et actions de la vitamine E [14, 15, 16] .....	27
III.10. L'effet de la vitamine E sur le sperme.....	27
III.11. Dosage de la vitamine E .....	28
III.11.1. Dosage de la vitamine E par HPLC en phase inverse.....	28
III.12. Conclusion .....	28

## **PARTIE IV : Conservation du le sperme**

IV.1. Introduction .....	29
IV.2. Historique .....	29
IV.3. Caractéristique des spermatozoïdes .....	30
IV.3.1. Le sperme .....	30
IV.3.2. La composition chimique de sperme .....	30
IV.3.3. Les spermatozoïdes.....	30
IV.3.4. La réalisation du spermogramme .....	30
IV.3.5. La morphologie du spermatozoïde .....	30
IV.3.6. Mobilité des spermatozoïdes .....	31
IV.3.7. Viabilité .....	31
IV.4. Conservation de sperme .....	31
IV.4.1. Diluant .....	32
IV.4.2. Cryoprotecteur .....	32
IV.5. Congélation du sperme.....	32
IV.6. Réfrigération du sperme .....	33
IV.7. Conclusion.....	33

## **PARTIE V : Travaux anterieurs**

V.1. Introduction .....	34
-------------------------	----

V.2. Travaux antérieurs .....	34
-------------------------------	----

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1. La vitamine E.....	39
II.1.1. Préparation des complexes d'inclusion.....	39
II.1.2. Vérification de la méthode de dosage de la vitamine E par HPLC.....	40
II.1.3. Sélection de la CD adéquate pour la solubilisation de la vitamine E.....	42
II.1.4. Caractérisation des complexes d'inclusion .....	42
II.1.4.1. Analyse par spectroscopie IR.....	42
II.1.4.2. Balayage Calorimétrique Différentiel (DSC) .....	43
II.2. Le cholestérol.....	43
II.2.1. Réalisation du plan d'expérience .....	43
II.2.2. Préparation des complexes d'inclusion selon le plan d'expérience .....	45
II.2.3. Vérification de la méthode de dosage du cholestérol par HPLC .....	46
II.2.4. Détermination de la réponse de notre matrice d'expérience .....	47
II.2.5. Réalisation de l'essai optimum et son mélange physique équivalent .....	48
II. 2.6. Caractérisation des complexes d'inclusion .....	48
II. 2.6.1. Analyse par spectroscopie IR.....	48
II.2.6.2. Balayage calorimétrique Différentiel (DSC) .....	49
II.3. Amélioration de la conservation du sperme bovin par l'addition des complexes vit E/ CD et CHL/CD .....	49
II.3.1. Réfrigération du sperme de bovin .....	49

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

III.1. La Vitamine E.....	53
III.1.1. Vérification de la méthode de dosage par HPLC .....	53

III.1.1.1. Spécificité .....	54
III.1.1.2. Linéarité et courbe d'étalonnage .....	54
III.1.2. Sélection de la cyclodextrine adéquate pour la solubilisation de la vitamine E .....	55
III.1.3. Caractérisation des complexes d'inclusion .....	56
III.1.3.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	56
III.1.3.2. Balayage Calorimétrique Différentiel (DSC) .....	58
III.2. Le Cholestérol .....	58
III.2.1. Vérification de la méthode de dosage par HPLC .....	58
III.2.1.1. Spécificité .....	58
III.2.1.2. Linéarité et courbe d'étalonnage .....	58
III.2.2. Optimisation du complexe d'inclusion (CHL/CD) .....	59
III.2.2.1. Analyse de la matrice d'expérience complétée .....	59
III.2.2.2. Modèle mathématique proposé .....	61
III.2.2.3. Analyse des effets propres des facteurs sur les réponses .....	61
III.2.2.4. Etude des effets propre des facteurs sur les réponses .....	63
III.2.2.5. Détermination de la région optimale et de l'optimum .....	64
III.2.3. Caractérisation du complexe d'inclusion CHL/CD .....	66
III.2.3.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	66
III.2.3.2. Balayage calorimétrique Différentiel (DSC) .....	67
III.2.4. Amélioration de la conservation du sperme bovin par l'addition des complexes vit E/ CD et CHL/CD .....	67
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>69</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>71</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>81</b>

# **Introduction générale**



## Introduction générale

---

Avec le développement des biotechnologies de la reproduction, les techniques d'insémination artificielle sont pratiquées couramment chez de nombreuses espèces animales telles que le bovin. Cependant, les spermatozoïdes sont des cellules complexes hautement sensibles qui peuvent perdre rapidement leur pouvoir fécondant [1].

La mise au point d'un milieu de dilution plus performant permettant d'améliorer la conservation de la semence et de préserver une bonne capacité fécondante des spermatozoïdes lors de leur réfrigération et congélation reste de nos jours un défi à relever [1].

Dans ce sens, quelques travaux, rapportent l'utilisation séparée de la vitamine E et du cholestérol avec des mécanismes divers afin d'améliorer la conservation du sperme [2].

En effet, la vitamine E joue le rôle d'antioxydant et elle intervient notamment dans le processus de reproduction [3]. Le cholestérol quant à lui agit d'une manière secondaire mais aussi importante, car il est responsable de la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques, ce qui conduit à la diminution des transferts d'eau particulièrement lors des processus de conservations [4,5].

Après avoir réalisé une étude bibliographique de ces deux molécules, il nous a été apparu une nouvelle problématique plus profonde qui limiterait leurs utilisations comme milieu de dilution : **leur faible solubilité en milieu aqueux** et par conséquent en milieu physiologique [6].

Pour pallier à ce problème, différents travaux [7,8] ont démontré que l'utilisation des cyclodextrines pouvait fortement améliorer la solubilité des molécules hydrophobes, car ces dernières sont des oligosaccharides cycliques qui possèdent au sein de leur structure une

## Introduction générale

---

cavité hydrophobe. Celle-ci permet de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : **solubilité dans l'eau**, réactivité, stabilité, etc. [9].

Dans ce manuscrit, nous avons tout d'abord étudiés les différentes propriétés physico-chimiques des cyclodextrines natives et modifiées, les méthodes de préparation et de caractérisation des complexes formés avec elles, ainsi que leurs divers domaines d'applications.

Ensuite nous présenterons une revue bibliographique sur le cholestérol, la vitamine E ainsi que les méthodes de conservation du sperme bovin.

Puis, nous avons choisi de faire une synthèse chronologique des travaux antérieurs effectués sur les cyclodextrines et vitamine E et/ou cholestérol.

Par la suite, nous résumerons la partie pratique effectuée tout le long de ce mémoire, nous exposerons les résultats trouvés et interpréterons ces derniers.

Nous terminerons par un bref résumé des acquis obtenus à travers ce projet et les moyens de les optimiser et de les développer dans le futur.

# **Chapitre I**

## **Revu bibliographique**

# **PARTIE I**

## **Les cyclodextrines et leurs complexes**

## Les cyclodextrines et leurs complexes

### I.1. Introduction

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques, qui possèdent au sein de leur structure une cavité hydrophobe. Celle-ci leur permet de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : solubilité dans l'eau, réactivité, stabilité, etc.

### I.2. Historique

Les cyclodextrines ont été isolées pour la première fois par Villiers en 1891, grâce à l'expérience de la dégradation de l'amidon par une souche de micro-organismes (l'amylase de *Bacillus macerans*: cyclodextrinase). Villiers met alors en évidence deux produits (l' $\alpha$ - et la  $\beta$  cyclodextrine) ayant des propriétés physico-chimiques proches de celles de la cellulose. Les cyclodextrines ont été caractérisées en 1903 par Schardinger en tant que oligosaccharides cycliques ; c'est pour cette raison qu'elles sont nommées dextrines de Schardinger dans les premières publications traitant des cyclodextrines. En 1938 Freudenberg et al ont démontrés que les cyclodextrines sont construites à partir d'unités de D-glucoses liées entre elles par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glucosidiques. Freudenberg et al ont découvert que les cyclodextrines étaient capables de former des complexes d'inclusion, et déterminent entièrement la structure de la  $\gamma$ -cyclodextrine [5]. Dans les années 1950, French, Cramer et al ont intensément travaillé sur la synthèse et la purification de complexes de cyclodextrines. Le premier brevet concernant l'application des cyclodextrines pour la mise en forme d'un composé à activité biologique sera déposé par Freudenberg en 1953.

A partir de ce moment, l'étude des cyclodextrines prend un essor considérable : fabrications industrielles, synthèse de cyclodextrines modifiées, fabrication de complexes d'inclusion, etc. Depuis 1970, on dénombre un peu plus de 130000 documents traitant des cyclodextrines (publications, brevets, abstracts) [10].

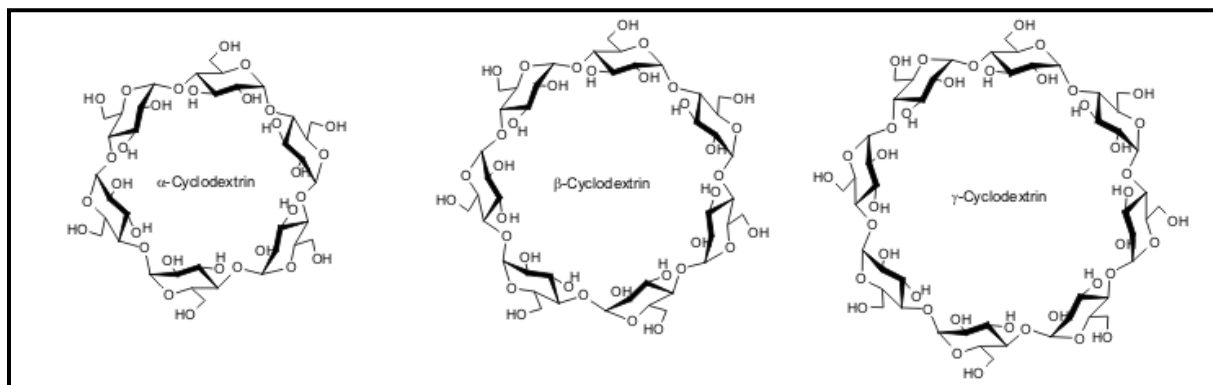
### I.3. Définition

Les cyclodextrines sont des macromolécules cycliques issues de la dégradation enzymatique de l'amidon par la CGT-ase (cyclodextrin glucosyl transferase enzyme).

# PARTIE I

## Les cyclodextrines et leurs complexes

Elles sont constituées par l'assemblage de 6 à 12 unités de glucoses reliés par des liaisons  $\alpha$ -1,4 glucosidiques. Les plus importantes à l'heure actuelle dans l'industrie et les plus stables sont les  $\alpha$ -CD avec 6 unités glucose,  $\beta$ -CD avec 7 unités et  $\gamma$ -CD avec 8 unités.



**Figure I.1.** Structures de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD [12].

### I.4. Structure et propriétés des CDs

#### I.4.1. Structure

##### I.4.1.1. Cyclodextrines naturelles

Les cyclodextrines ont une structure tronc-conique, délimitant une cavité en leur centre dont les dimensions varient selon le nombre d'unités de glucose. Une étude RMN a montré que chaque unité glucose adopte une conformation de type chaise [11].

Tous les groupements polaires (hydroxyles OH) sont localisés à l'extérieur. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire) (Figure I.2).

Cette organisation moléculaire délimite une cavité rendue relativement hydrophobe par la présence de ponts osidiques (-O-). C'est grâce à ce caractère amphiphile (hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur) que les CDs sont capables d'inclure dans leur cavité hydrophobe des molécules lipophiles pour former des complexes d'inclusion solubles dans l'eau [12,13].

Les cyclodextrines et leurs complexes

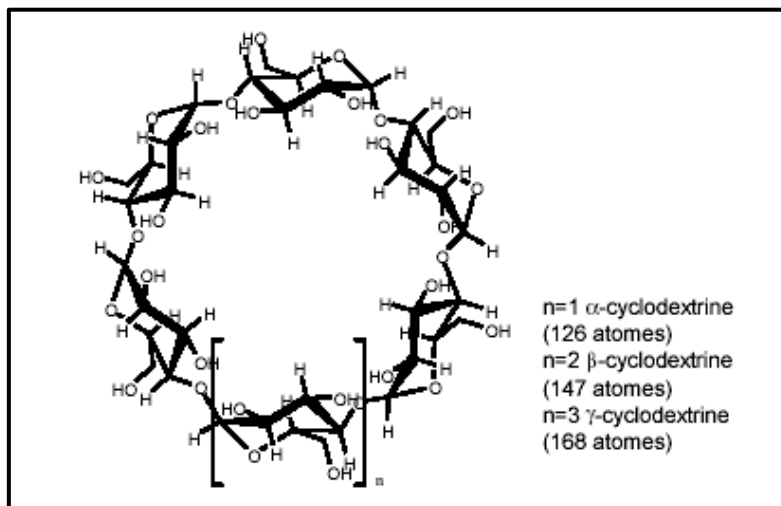


Figure I.2.Représentations de la structure chimique générale des cyclodextrines [14]

I.4.1.2. Cyclodextrines modifiés

Les cyclodextrines naturelles ne sont pas sans présenter différents inconvénients. En effet, des trois cyclodextrines naturelles  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, seules la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -cyclodextrine présentent une cavité de diamètre suffisant pour inclure aisément des molécules thérapeutiques, l' $\alpha$ -cyclodextrine ne permettant que d'inclure des produits de faible poids moléculaire notamment des gaz. Par ailleurs, la  $\beta$ -cyclodextrine est près de dix fois moins soluble que l' $\alpha$ -cyclodextrine ou  $\gamma$ -cyclodextrine, ce qui peut limiter l'intérêt de son emploi.

Enfin, pendant de nombreuses années, la  $\gamma$ -cyclodextrine n'a été qu'un sous-produit de l'obtention de l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -cyclodextrine [10].

Ces divers inconvénients ont poussés les chimistes à préparer des dérivés des cyclodextrines naturelles, en l'occurrence de la  $\beta$ -cyclodextrine, présentant de bonnes caractéristiques de solubilité.

Les CDs peuvent être modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène ou du groupe hydroxyle tout entier par une grande variété des groupements, neutres ou ioniques tels que les groupes alkyles, hydroxyalkyles, sulfobutyles, glucosyles, acétyles, etc. [10].

I.4.1.2.1. But de la modification

Parmi les objectifs visés lors de ces modifications, on peut citer :

- L'amélioration de la solubilité de la CD (en particulier celle de la  $\beta$ -CD).
- L'amélioration de la capacité de complexation.
- La fixation d'un groupe spécifique (pour la modélisation enzymatique).
- La formation des polymères de CDs, etc.

### Les cyclodextrines et leurs complexes

#### I.4.1.2.2. Dérivés des cyclodextrines

##### ➤ Méthyl cyclodextrines

Ces produits sont parmi les premiers dérivés de cyclodextrines à avoir fait l'objet d'études notables en vue de leur utilisation pharmaceutique [15,16].

Deux types de dérivés sont commercialisés : les diméthyl et les triméthylcyclodextrines. Les diméthylcyclodextrines sont majoritairement substituées sur les C<sub>2</sub> et C<sub>6</sub>, alors que les triéthylcyclodextrines sont substituées également sur les C<sub>3</sub>.

Contrairement à ce qui pouvait être attendu d'une méthylation, les produits obtenus sont très nettement plus soluble que les cyclodextrines d'origine puisque dans le cas des dérivés de la  $\beta$ -cyclodextrine, la solubilité à la température ambiante passe de 18,5 g/l à 570 g/l et 310 g/l respectivement pour les diméthyl et les triméthyl  $\beta$ -cyclodextrines.

Un inconvénient majeur de ces dérivés est que leur dissolution est un phénomène exothermique, ce qui se traduit par le fait que leur solubilité diminue avec une élévation de température [16].

##### ➤ Hydroxypropyl-cyclodextrines

L'hydroxypropylation des cyclodextrines se produit de façon totalement aléatoire, ceci aboutit à l'obtention d'un produit toujours très mal défini quant au niveau des substitutions.

La conséquence principale est que les hydroxy-propylcyclodextrines étant toujours des mélanges, ces produits sont incapables de cristalliser avec un réseau bien défini et se présentent donc toujours sous l'état amorphe. La très grande solubilité aqueuse de ces produits est donc non seulement le résultat de leur nature chimique, mais aussi de leur état physique. Les solubilités aqueuses des 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrines, quel que soit leur degré de substitution, sont toujours supérieures à 500 g/l. A noter que ces dérivés se comportent de façon tout à fait classique en fonction de la température : une augmentation de celle-ci se traduisant par une augmentation de la solubilité de ces dérivés.

##### ➤ Autre dérivés

Il existe d'autres dérivés des cyclodextrines hydrosolubles qui sont cités dans la littérature, on peut citer :

- Hydroxyéthylcyclodextrines : très semblables aux hydroxypropylcyclodextrines (HP $\beta$ CD) [17].



## PARTIE I

### Les cyclodextrines et leurs complexes

- Cyclodextrines ramifiées comme glucosyl et maltosyl [18,19].
- Les polymères des cyclodextrines : les polymères les plus utilisés sont ceux qui ont un poids moléculaire élevé car ils peuvent subir un gonflement [20].

#### I.4.2. Propriétés physico-chimique des CDs

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau I.1.

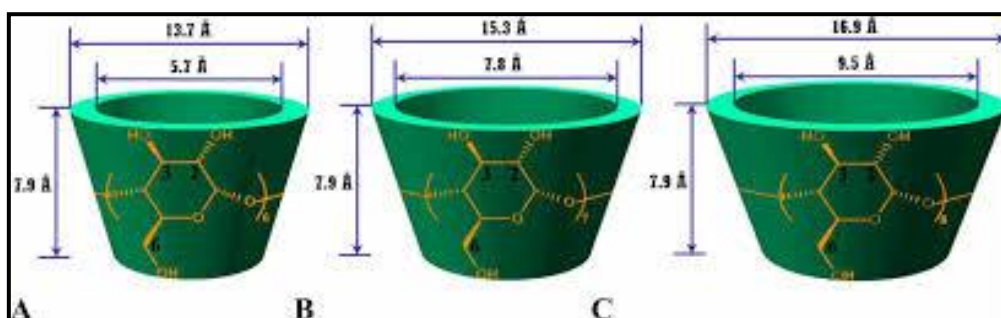
**Tableau I.1.** Caractéristiques physico-chimique des CDs natives les plus courantes [6]

Propriétés	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombre d'unité glucose	6	7	8
Formule brute (anhydre)	$C_{30}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{72}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse atomique (anhydre)	972.85	1134.99	1294.14
Longueur de la cavité, Å	$7.9 \pm 0,1$	$7.9 \pm 0,1$	$7.9 \pm 0,1$
Diamètre de la cavité, Å	4.7 -5.3	6.0-6.6	7.5-8.4
Diamètre extérieur, Å	$14.6 \pm 0.4$	$15.4 \pm 0.4$	$17.5 \pm 0.4$
Volume de la cavité, Å <sup>3</sup>	174	262	427
pKa à 25°C	12.33	12.20	12.08
Solubilité dans l'eau à 25°C (g.L <sup>-1</sup> )	14.5	1.85	23.2
Solubilité (eau, 25°C), mol.l <sup>-1</sup>	0.1211	0.0163	0.168
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité. (nH <sub>2</sub> O)	6-7	11-12	7-13

## PARTIE I

### Les cyclodextrines et leurs complexes

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' $\alpha$ -CD à la  $\gamma$ -CD. De par la taille de sa cavité, la  $\beta$ -CD est celle qui complexe le plus grand nombre des composés et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CDs [10].



**Figure I.3.** Structure tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD de gauche à droite) [10].

La solubilité dans l'eau varie de façon plus inattendue. En effet, la  $\beta$ -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' $\alpha$ -CD et la  $\gamma$ -CD, possède la solubilité la plus faible. Ceci peut s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle situés sur les carbones C2 et C3 de deux unités adjacentes [13] qui rend la molécule de  $\beta$ -cyclodextrine plus rigide que les molécules de  $\alpha$ - ou  $\gamma$ -cyclodextrines.

En effet, la formation de cette ceinture continue n'est pas possible pour les  $\alpha$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines : l' $\alpha$ -cyclodextrine possède une unité de glucose en conformation tendue ce qui ne rend possible que l'établissement de 4 liaisons hydrogène sur les six possibles ; la  $\gamma$ -cyclodextrine est quant à elle non planaire et possède une structure moins rigide ce qui lui confère la plus grande solubilité des trois cyclodextrines les plus communes.

### I.5. Toxicité des cyclodextrines

#### I.5.1. CDs naturelles

Les cyclodextrines présentent une très faible cyto-toxicité [21] qui peut être pratiquement éliminée par modifications chimiques. Cette cyto-toxicité, pour de hautes concentrations, entraîne une hémolyse par absorption des molécules de cholestérol et de

## PARTIE I

### Les cyclodextrines et leurs complexes

phospholipides présentes dans la membrane cellulaire et conduit à la destruction de la cellule [22]. C'est la  $\beta$ -cyclodextrine qui présente la toxicité la plus élevée pour l'organisme humain.

L'administration orale de cyclodextrine à des rats ou à des chiens n'est pas toxique si la dose journalière ne dépasse pas 3% du ratio alimentaire. Chez l'homme la prise journalière ne doit pas excéder 1 à 2 grammes [23].

#### I.5.2. CDs modifiées

Parmi les cyclodextrines modifiées hydrophiles, seules les 2HP- $\beta$ CD et sulfobutyl $\beta$ -CD sont désignées comme étant sans danger et n'ayant aucun effet secondaire lors de l'administration par voie parentérale [21,22].

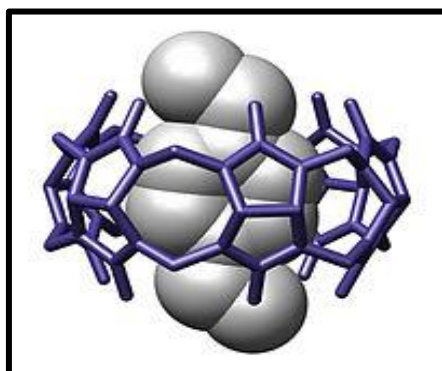
#### I.6. Situation juridique

L' $\alpha$ -CD et  $\beta$ -CD ont leurs propres monographies dans la pharmacopée européenne (PE), pharmacopée britannique (PB) et l'United States Pharmacopée (USP). Elles sont classifiées comme étant des excipients. Parmi les CDs modifiées, seul l'HP $\beta$ CD a une position juridique et sa propre monographie dans la PE et la PB, tandis que diméthyle- $\beta$ -CD, et le triméthyle- $\beta$ -CD, sont considérés comme des substances liées [24].

#### I.7. Complexes d'inclusion

##### I.7.1. Définition

Un complexe d'inclusion est une espèce chimique constituée par l'association de deux ou plusieurs molécules. La molécule hôte est capable d'inclure la molécule invitée dans sa cavité, ce qui donne une encapsulation stable sans formation de liaison covalente. Dans le but d'améliorer la solubilité, la stabilité ou la biodisponibilité des molécules invitées [25].



**Figure I.4.** Schéma d'inclusion d'une molécule dans la cavité d'une cyclodextrine [26].

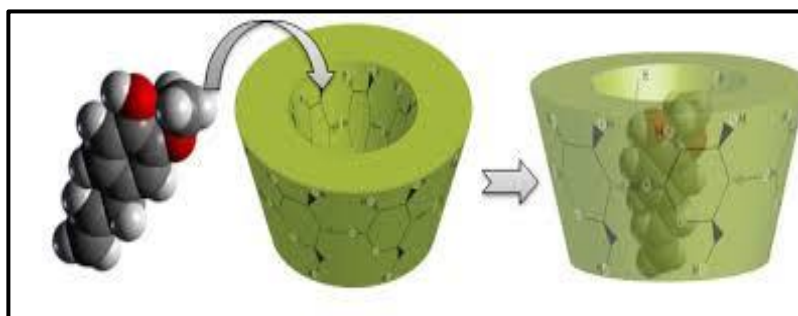
## PARTIE I

### Les cyclodextrines et leurs complexes

#### I.7.2. Mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion

Le caractère amphiphile des cyclodextrines leur permet de solubiliser dans l'eau des molécules hydrophobes par formation de complexes d'inclusion.

Ces molécules pénètrent dans la cavité par la plus grande ouverture et le côté le plus accessible. La molécule invitée est incluse d'une manière à éloigner sa portion polaire pour avoir un maximum de contact avec la cavité hydrophobe, et sa partie polaire interagit avec la surface hydrophile de la CD (Figure I.5) [13].



**Figure I.5.**Processus de complexation des cyclodextrines [13].

La formation d'un complexe d'inclusion est engendrée par plusieurs interactions parmi lesquelles on distingue :

- Des interactions hydrophobes entre l'hôte et l'invité.
- Des interactions de Van Der Waals (interactions dipôle /dipôle).
- Des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des cyclodextrines et certains groupements de la molécule invitée [27].

Le phénomène de complexation partiel ou total peut faire intervenir une ou plusieurs molécules de cyclodextrine pour une ou plusieurs molécules invitées, on trouve des complexes de type 1 :1 si une molécule de CD interagit avec une molécule invitée, de type 2 :1 si la molécule invitée est de grande taille et que plusieurs molécules de CDs peuvent interagir avec, ou de type 1 :2, 1 :3 ou la cavité de la CD est assez spacieuse pour accueillir deux molécules invitées (Figure I.6) [28,29].

Les cyclodextrines et leurs complexes

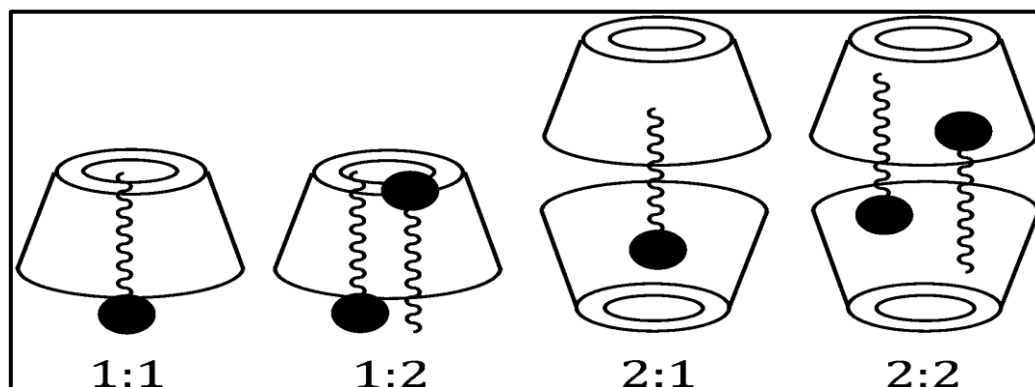
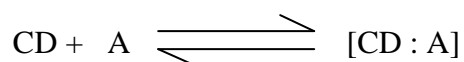


Figure I.6.Représentation schématique des complexes d'inclusion respectivement de gauche à droite 1 :1, 1 :2, 2 :1, 2 :2 [27].

I.7.3. Caractéristiques d'un complexe d'inclusion

La formation du complexe entre la molécule invitée A et la CD, ainsi que sa dissociation sont gouvernées par les lois thermodynamiques :



Ce processus réversible peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité  $K_s$  ou par une constante de dissociation  $K_d$  [28,30].

$$K_s = 1 / k_d = ([CD-A]) / ([CD] [A])$$

Où [CD-A], [CD] et [A] sont les concentrations du complexe d'inclusion, la molécule hôte (cyclodextrine) et le principe actif respectivement.

De nombreuses techniques d'analyses physico-chimiques, telle que la spectroscopie UV-visible, la spectrométrie de fluorescence, l'analyse cristallographique, la spectroscopie RMN, la spectrométrie de masse ou bien encore des méthodes d'analyses électrochimiques, permettent de mettre en évidence, de caractériser les constantes d'association de ces complexes.

I.7.4. Diagramme de solubilité (Diagramme d'Higuchi)

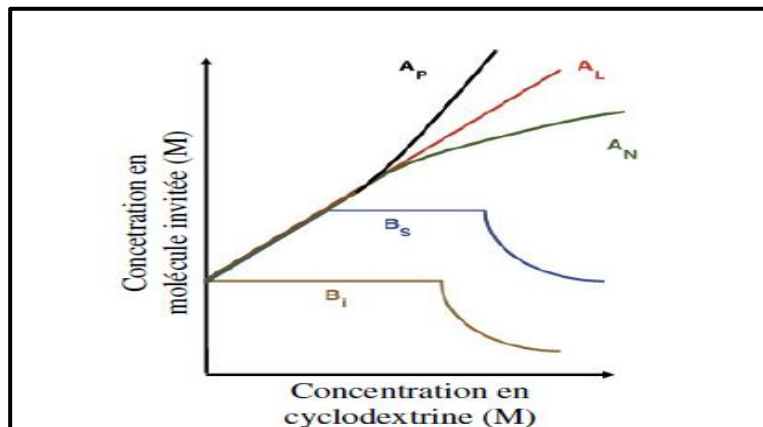
Suite à la formation du complexe d'inclusion, les propriétés physico-chimiques de la molécule invitée changent considérablement. La plus importante est l'augmentation de la solubilité des molécules peu hydrosolubles [14]. L'une des approches la plus utilisée pour déterminer  $K_s$  est la méthode décrite par Higuchi and Connors [31] ; qui consiste en l'étude de la solubilité.

## PARTIE I

### Les cyclodextrines et leurs complexes

L'évaluation de l'effet de la CD sur la solubilité apparente des molécules invitées permet de construire le diagramme de phase ou isotherme de solubilité et ceci en rapportant sur un graphique : Les concentrations molaires de l'agent complexant (CDs) sur l'axe des abscisses et les concentrations molaires du soluté sur l'axe des ordonnées [28].

Les diagrammes de solubilité de phase sont classés selon deux types A et B (Figure I.7) [32].



**Figure I.7.** Diagramme de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors [28].

Les courbes de types A indiquent la formation des complexes d'inclusions solubles, tandis que celles de types B indiquent la formation des complexes peu solubles.

#### ❖ Le profil B

Les courbes de types B sont subdivisées en B<sub>s</sub> et B<sub>I</sub> :

B<sub>s</sub> : correspond aux complexes dont la solubilité est limitée.

B<sub>I</sub> : indique les complexes insolubles.

#### ❖ Le profil A

Les courbes de types A sont subdivisées en A<sub>L</sub>, A<sub>P</sub> et A<sub>N</sub> :

A<sub>L</sub> : augmentation linéaire de la solubilité du PA en fonction de la concentration des CDs.

A<sub>P</sub> : déviation positive de l'isotherme.

A<sub>N</sub> : déviation négative de l'isotherme.

#### **I.7.5. Facteurs influençant la complexation des molécules organiques par les CDs**

La formation d'un complexe d'inclusion dépend de plusieurs paramètres :

- La taille de la molécule hôte
- Les propriétés de la molécule hôte (composition des fonctions chimique, solubilité... etc).
- Les structures des CDs (ionique, ramifié...etc).

### Les cyclodextrines et leurs complexes

- Les propriétés des solvants (polarité, pH) [33, 34].

#### **I.7.6. Préparation d'un complexe d'inclusion**

Il existe différents procédés pour réaliser des complexes d'inclusion [35]. Pour toutes ces techniques et pour chaque molécule invitée, les quantités d'eaux, la vitesse et le temps d'agitation, la température et le temps de chauffage doivent être optimisés [24].

##### **I.7.6.1. Méthode de précipitation**

Le complexe d'inclusion est préparé par mélange du principe actif et des cyclodextrines. Le mélange des deux constituants est ensuite dispersé dans l'eau. La solution est agitée et chauffée pour obtenir un liquide concentré, visqueux et translucide.

Le complexe est obtenu par précipitation du mélange réalisé, qui est séparé et séché pour obtenir l'inclusion [36].

##### **I.7.6.2. Méthode de pétrissage (Kneading)**

La cyclodextrine est triturée dans un mortier avec une petite quantité d'eau pour obtenir une pâte homogène. La molécule invitée est alors ajoutée. Préalablement, une petite quantité de solvant (méthanol, éthanol) peut être ajoutée pour faciliter la dissolution de la molécule invitée [37].

##### **I.7.6.3. Mélange physique ou mélange à sec**

La méthode est basée sur un mélange homogène des cyclodextrines et du substrat dans un mortier, le mélange s'effectue sans ajout de solvant [38]. Les molécules invitées peuvent être complexées par simple mélange des deux poudres ensemble. Le temps de mélange nécessaire dépend de l'invité. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes des poudres et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante [39].

##### **I.7.6.4. Lyophilisation**

La lyophilisation, appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans le produit par sublimation [40].

La molécule invitée est ajoutée à la solution aqueuse de CDs, après mélange sous agitation, la substance obtenue est congelée puis lyophilisée dans un lyophilisateur

### Les cyclodextrines et leurs complexes

#### I.7.6.5. Complexation par CO<sub>2</sub> à l'état supercritique

Grace à sa faible température critique, le CO<sub>2</sub> supercritique permet de développer des procédés à basse température pour des produits thermosensibles. A la fin de l'encapsulation, une phase de détente est réalisée. Elle consiste à abaisser la pression ce qui provoque le passage du gaz carbonique de l'état supercritique à l'état gazeux et permet de récupérer le complexe à l'état solide exempt de tout résidu de solvant.

Ce procédé présente de nombreux avantages dont celui de réaliser une réaction d'inclusion simple, reproductible en une seule étape. L'absence de solvant permet de supprimer l'étape d'élimination de ce dernier et par conséquent de réduire l'investissement, la pollution et le coût [41].

#### I.7.6.6. Co évaporation

Cette méthode est basée sur la préparation d'un mélange des cyclodextrines et des principes actifs avec l'ajout d'un solvant approprié, son principe se base sur l'évaporation et la condensation des solvants à l'aide d'un ballon d'évaporation par rotation sous vide afin de récupérer un complexe d'inclusion sous forme d'une poudre.

#### I.7.7. Techniques de caractérisation des complexes d'inclusions

Les structures des complexes d'inclusion peuvent être caractérisées en employant diverses techniques d'analyse physico-chimiques parmi lesquelles on distingue :

##### I.7.7.1. Méthode spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution [42].

Elle est particulièrement intéressante pour la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion. Mais il faut que la molécule étudiée absorbe à des longueurs d'onde différentes de celle des CDs [43,29].

##### I.7.7.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectrométrie RMN est une méthode importante qui permet d'expliquer la structure des composés organiques, particulièrement à l'état liquide. Le principe de l'étude des complexes d'inclusion repose sur le fait que si la molécule invitée pénètre dans la cavité des CDs, les atomes d'hydrogène situés à l'intérieur de la cavité (H-3 et H-5) seront



### Les cyclodextrines et leurs complexes

considérablement perturbés, tandis que ceux qui se trouvent sur la surface externe (H-2, H-4 et H-6) ne seront pas influencés [44,45].

#### **I.7.7.3. Spectroscopie infrarouge (IR)**

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse qui permet d'étudier l'arrangement des atomes et les distances interatomiques. Ces mesures sont généralement réalisées avec un échantillon à l'état solide [27].

Dans ce cas, elle est utilisée pour estimer l'interaction entre les cyclodextrines et les molécules invitées. L'application de la spectroscopie infrarouge est limitée aux invités ayant quelques bandes caractéristiques [46].

#### **I.7.7.4. Diffraction des rayons X (DRX)**

C'est une méthode qui permet de prouver l'inclusion mais aussi d'obtenir des informations sur la structure du complexe formé [14,33], nécessitant des faibles quantités de composés. Elle repose sur l'observation des différences entre le mélange physique simple des deux composés et le complexe d'inclusion potentiel. La formation d'un complexe CD-PA altère les modèles de diffraction et change la nature cristalline de la molécule invitée.

#### **I.7.7.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Cette technique est utilisée pour étudier les aspects microscopiques de la CD et de la molécule invitée. Elle consiste à balayer ligne par ligne, la surface des échantillons avec un faisceau électrons puis à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique [47].

#### **I.7.7.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)**

L'analyse thermogravimétrique consiste à suivre la perte en masse d'un composé en fonction de la température de chauffe [48]. Par conséquent le spectre obtenu nous donne des informations sur : d'ébullition, sublimation

Quand le complexe est formé, on observe un déplacement de ces points vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors une disparition dans l'intervalle de température où la CD est décomposé. Toutes modifications structurales de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CDs peuvent être évaluées par cette technique [27].

## PARTIE I

---

### Les cyclodextrines et leurs complexes

#### I.7.7.7. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)

Cette méthode permet de vérifier la formation des complexes d'inclusion, et d'étudier l'effet thermodynamique résultant de la présence de la molécule invitée.

On utilise cette méthode pour des composés ayant une température de fusion et d'ébullition en dessus de celle de dégradation de la CD. Il a été observé que la formation des complexes CD-invitée provoque la diminution du pic endothermique de fusion de la molécule invitée (cas d'un mélange physique), et sa disparition dans le cas d'une complexation complète [33].

#### I.7.7.8 Test de dissolution

La dissolution est l'un des plus importants tests biopharmaceutiques, il simule le comportement (dissolution) du médicament (complexe) *in vitro* (dissolutest), afin d'améliorer la solubilité du PA et l'augmentation de la vitesse de passage en solution. Les conditions de travail sont fixées par la pharmacopée ou la monographie [49].

#### I.7.8. Utilisation des cyclodextrines

Grace à leur toxicité nulle [22], le champ d'utilisation des CDs est très large. De nombreuses applications, qui utilisent la capacité de complexation des CDs avec un grand nombre de molécules invitées organiques, sont décrites dans la littérature, parmi celles-ci :

##### I.7.8.1 Domaine pharmaceutique

Beaucoup de travaux montrent les nombreuses applications possibles des cyclodextrines comme excipient. L'utilisation des cyclodextrines a pour but d'améliorer la solubilité des molécules faiblement hydrosolubles, permettant, ainsi, une délivrance rapide et massive du principe actif ; ce qui accroît sa biodisponibilité [50,51]. En plus de la solubilité et de la disponibilité biologique, les cyclodextrines procurent une meilleure stabilité à beaucoup de molécules [52].

Les principales CDs utilisées à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutiques sont les  $\beta$ -CD natives ou modifiées. La plupart des médicaments à base de CDs sont administrés par voie orale (comprimés, sirops...) [30,50].

##### I.7.8.2. Industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les cyclodextrines sont utilisés comme stabilisants pour les arômes et pour améliorer le goût et masquer les odeurs désagréables, mais aussi pour

## PARTIE I

---

### Les cyclodextrines et leurs complexes

enlever le cholestérol des produits d'origines animales comme les œufs et les produits laitiers [53].

#### I.7.8.3. Cosmétique

Les principaux avantages des CDs dans ce secteur sont la stabilisation, le relargage, la protection et la distribution des arômes [49,29].

#### I.7.8.4. Agriculture

L'inclusion des insecticides, fongicides, herbicides dans les CDs, peut protéger ces substances de la décomposition rapide par la lumière, l'oxygène, ce qui permet la prolongation des effets de ces produits et/ou leurs utilisations à plus faibles doses [54].

#### I.7.8.5. Textile

- Eliminer ou masquer l'odeur indésirable.
- Renforcer la prise des colorants par le tissu et par la suite réduire la quantité des colorants perdus lors du lavage [49].

#### I.7.8.6. En chimie catalytique et analytique

- Catalyseurs chimiques efficaces (augmentation du taux de conversion).
- Modèles d'enzymes artificielles.
- En raison de leurs effets stériques, les CDs jouent un rôle significatif dans des processus biocatalytiques en augmentant l'énantio-sélectivité.
- En chromatographie démontrant un potentiel élevé pour la séparation chirale (HPLC, électrophorèse capillaire) [49,30].

#### I.7.8.7. Domaine biologique

Les cyclodextrines sont ainsi utilisées comme agents cryoprotecteurs, ces derniers sont des composés organiques qui pénètrent dans la cellule spermatique pour assurer sa bonne conservation.

### I.8. CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons récolté des informations sur les cyclodextrines et ses dérivés. Ainsi, l'utilisation de ces molécules cages paraît très opportun dans l'optique d'améliorer la faible solubilité de deux molécules (vitamine E et cholestérol) qui feront à leurs tour l'objet de notre étude dans les prochains chapitres.

# **PARTIE II**

## **Cholestérol**

## PARTIE II

### Cholestérol

---

#### II.1. Introduction

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans des nombreux processus biochimiques. Le cholestérol est une molécule hydrophobe dérivé de triterpène comportant 27 carbones.

#### II.2. Historique

Le cholestérol fut découvert en 1770 par Poulletier dans les foies putréfiés. Longtemps confondu avec le blanc de baleine, il fut distingué des lipides ou graisses par Chevreul dès 1815, qui l'appela d'abord cholestéarine (graisse biliaire), puis cholestérine (du grec : cholé= bile, stéréos= solide). Les composés chimiquement apparentés au cholestérol furent appelés stérides, puis stérols, quand on eut reconnu la présence dans leurs molécules d'une fonction alcool. Gobley montra en 1846 que les œufs et la bile contiennent le même cholestérol.

Depuis cette date, et jusqu'à nos jours, se sont développées de très nombreuses recherches pour établir sa structure chimique, sa répartition dans les différents tissus, son rôle, sa formation et sa dégradation. Beaucoup de travaux scientifiques ont contribué principalement après la dernière guerre mondiale à élucider le mécanisme de sa biogenèse et de sa conversion en acides biliaires et en hormones stéroïdes.

Le cholestérol n'est plus un inconnu du grand public. Ces dernières années, une si large publicité la considérablement noirci ; il est considéré comme le grand responsable de l'athérosclérose et on a tendance à ne voir en lui qu'une entité chimique nuisible qui contribue à épaissir la paroi des artères, en s'y déposant en quantité anormalement importante [55].

#### II.3. Structure de cholestérol

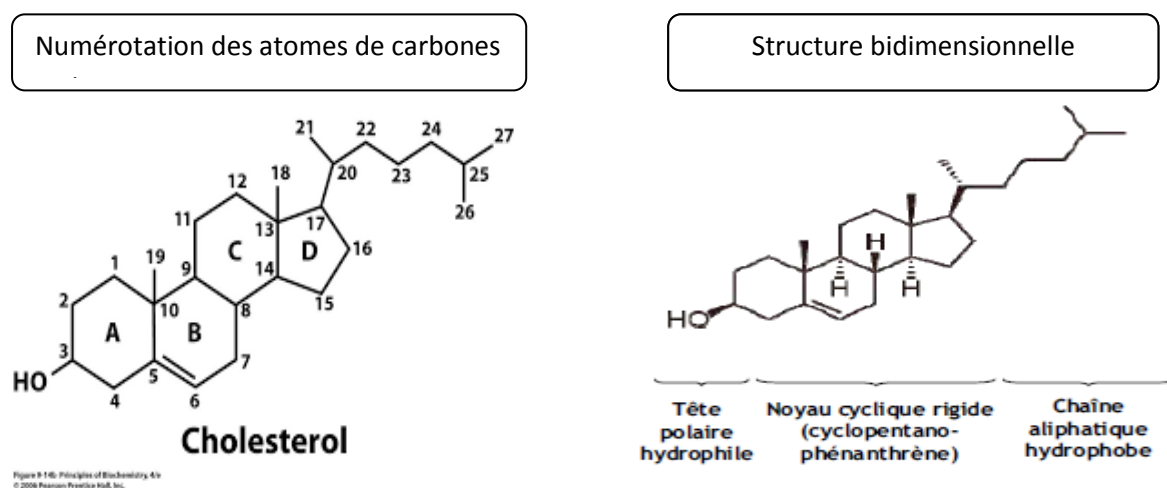
La molécule comprend quatre cycles carbonés, 3cycles pyraniques à 6 carbones (A,B et C) plus un cycle furanique à5 carbones(D)(Figure II.1). Les jonctions des cycles sont en trans ce qui lui confère une structure plane et rigide (figure II.1) caractérisant le cholestérol et la plupart de ses dérivés [56].

Le cholestérol possède un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3. Ce dernier constitue la tête polaire et constitue donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble

## PARTIE II

### Cholestérol

dans l'eau. D'autre part il possède une chaîne hydrocarbonée hydrophobe sur le carbone 17 (la queue aliphatique apolaire) [57].



**Figure II.1.** Structure chimique de cholestérol [57].

#### II.4. Source du cholestérol

Le cholestérol est retrouvé dans les produits d'origine animale. Les sources alimentaires majeures sont les fromages, le jaune d'œuf, la viande bovine et porcine. La plupart des molécules de cholestérol sont produites dans notre organisme. La synthèse du cholestérol peut avoir lieu dans de nombreuses cellules, mais c'est le foie qui en fabrique le plus. Une des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol est l'HMG Coenzyme A réductase qui transforme l'acide mévalonique en cholestérol. Cette enzyme est la cible d'une classe des médicaments anti-cholestérol : les statines.

#### II.5. Extraction du cholestérol

Le cholestérol se présente en feuillets incolores, à l'éclat nacré, ou en poudre cristalline, incolore, formée de minces tablettes. Il cristallise dans le chloroforme en longues aiguilles soyeuses fondant à 148,50 °C. Ses constantes physiques peuvent varier légèrement avec son origine, à cause de la présence des traces d'impuretés.

La graisse de laine constitue une matière première industrielle pour son extraction ; elle est saponifiée par les alcalins, le cholestérol libéré est extrait avec un solvant organique

dans lequel les savons sont insolubles. Les liqueurs d'épuisement laissent déposer, après distillation, un résidu de cholestérol qui est purifié par cristallisation [55].

#### II.6. Rôle du cholestérol

Le cholestérol est une molécule indispensable à la physiologie animale. Son rôle est double :

**II.6.1. Élément structural :** il est l'un des constituants des membranes lipidiques. En s'insérant dans la bicouche :

- Il régule la répartition des protéines membranaires
- Il intervient dans la fluidité des membranes : la fluidité des membranes diminue quand la quantité de cholestérol membranaire est élevée.

#### II.6.2. Précurseurs de composés biologiques

- Précurseur de la synthèse des acides biliaires : rôle dans l'émulsification des lipides alimentaires
- Précurseurs des hormones stéroïdiennes : hormones sexuelles et corticostéroïdes
- Précurseur de la vitamine D3 (= cholécalciférol) : rôle dans l'homéostasie calcique.

#### II.7. Propriétés physico-chimique du cholestérol

Le cholestérol est un solide blanc, cristallin, insoluble dans l'eau, soluble dans les liquides organiques. Le cholestérol est sensible à l'action de la lumière. Le tableau II.1 récapitule les paramètres physico-chimiques les plus importants du cholestérol.

## PARTIE II

### Cholestérol

**Tableau II.1.** Propriétés physico-chimiques du cholestérol [6].

<b>Propriétés chimiques</b>	
Formule brute	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
Nom systématique	Cholest-5-en-3-β-ol
Masse molaire	386.6535 ± 0.0251 g/mol
<b>Propriétés physique</b>	
T° fusion	147 à 150 °C
T° ébullition	360°C (décomposition)
Solubilité	Pratiquement insoluble (eau)
Masse volumique	1.07 g.cm <sup>-3</sup> 20°C
Point d'éclair	250°C

#### II.8. Solubilité du cholestérol

Le cholestérol est soluble dans l'alcool bouillant, peu soluble dans l'alcool froid, soluble dans l'éther, le chloroforme et le benzène. Il est connu que le cholestérol est une molécule hydrophobe et, comme les lipides en général, est insoluble en milieu physiologique.

#### II.9. Cholestérol et la membrane spermatique

La membrane spermatique est constituée des protéines et des lipides organisés en bicouches. Ces derniers ont une extrémité hydrophile orientée vers l'extérieur et une extrémité hydrophobe vers l'intérieur de la membrane [58].

Les lipides les plus représentés sont les phospholipides et le cholestérol qui peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique [59]. A basse température, les phospholipides membranaires subissent une transition de phase passant de la phase dite liquide à une phase cristalline [60]. En revanche, tous les lipides ne subissent pas la transition de phase au même moment ainsi que les protéines. De ceci résulte une diminution des mouvements lipidiques au sein de la membrane conduisant à une instabilité et perte des fonctions [59]. Selon certaines études, le ratio cholestérol/phospholipides (C/P) est élevé des



## PARTIE II

---

### Cholestérol

membranes spermatiques de certaines espèces, permettrait leur résistance au choc au froid [61, 62, 63].

Le cholestérol a également un rôle important dans la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques, ce qui conduit à la diminution des transferts d'eau, maintenant intact la structure membranaire des cellules pendant les variations osmotiques au moment de la cryoconservation [4,5].

#### II.9. Conclusion

Le cholestérol est une molécule hydrophobe et, comme les lipides en général, est insoluble en milieu aqueux. Il ne peut donc se dissoudre dans un diluer afin d'être directement incorporé à la semence.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques dont l'extérieur est hydrophile et l'intérieur hydrophobe [64]. De part cette configuration elles sont en mesure d'encapsuler des molécules hydrophobiques comme le cholestérol pour les rendre soluble. Lorsque le cholestérol est couplé à la cyclodextrine, le complexe permet l'incorporation de cholestérol dans les membranes cellulaires [65,66].

# **PARTIE III**

## **Vitamine E**

#### III.1. Introduction

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour définir les différents tocophérols et tocotriénols. Cette vitamine liposoluble est reconnue pour ses propriétés antioxydantes et assure la stabilité des structures cellulaires.

#### III.2. Définition

La vitamine E est une substance organique liposoluble décomposée en 8 formes organiques : 4 tocophérols et 4 tocotriénols.

La vitamine E (tocophérol) est un antioxydant puissant. Elle ralentit le vieillissement des cellules, mais joue aussi un rôle dans la prévention des maladies cardio-vasculaires et de certains cancers.

#### III.3. Historique

La découverte de la vitamine E et son développement peut être résumé comme suit [67].

**1922 :** Herbert Evans et Katharine Scott Bishop, chercheurs de l'Université de Californie, découvrent une substance alimentaire soluble dans les graisses dans le germe de blé et la laitue qui semble essentielle à la reproduction des rats. En effet, en administrant de la nourriture pauvre en huiles végétales à des rats. Ces derniers ont des troubles de la reproduction (dégénérescence des spermatozoïdes) et de la gestation (disparition du fœtus). Evans et Bishop nomment ce facteur alimentaire « facteurs X ».

**1924 :** Bennett Sure fait des observations semblables et donne à cette substance inconnue détectée par les précédents chercheurs le nom de vitamine E, les lettres A,B et D ayant déjà été utilisées, respectivement en 1913, 1910 et 1922.

**1936 :** Evans et ses collaborateurs isolent un principe actif de l'huile de germe de blé et la vitamine E est renommée : tocophérol, du grec « tokos ».

**1937 :** Le  $\beta$ - et le  $\gamma$ -tocophérol sont découverts puis isolés.

**1938 :** Erhard Femholz établit la formule chimique de la vitamine et Paul Karrer réussit à synthétiser  $\alpha$ -tocophérol.

## PARTIE III

---

### Vitamine E

**1963** : Après avoir compris les structures des  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérol dans les années 60. Ister réussit à synthétiser les tocotriénols.

**1968** : La commission sur les denrées alimentaires et la nutrition du conseil national de recherche des Etats-Unis reconnaît enfin la vitamine E en tant qu'élément nutritif essentiel pour l'être humain.

#### III.4. Source

##### III.4.1. Origine naturelle

On trouve la vitamine E dans les aliments d'origine animale et végétale :

- Origine animale : elle est présente dans les viandes, les œufs, le foie, le lait et ces dérivés.
- Origine végétale : elle est présente en abondance dans les huiles d'origine végétale ainsi que dans les fruits secs tels que les noisettes, arachides et amandes [68, 69, 70].

##### III.4.2. Origine synthétique

Les vitamines de synthèse sont des vitamines chimiques produites par des laboratoires, la vitamine E se présente généralement soit sous la forme de *RRR*- $\alpha$ -tocophérol, un stéréoisomère naturel, soit sous une forme synthétique, appelée all-racémique-  $\alpha$ -tocophérol ou all-rac- $\alpha$ - tocophérol, qui est un mélange en quantités à peu près égales des huit (08) stéréoisomères de l' $\alpha$ -tocophérol [69].

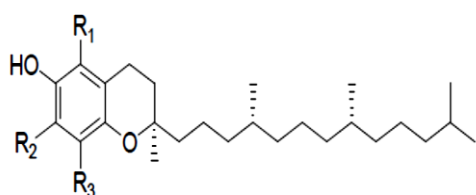
#### III.5. Structure

La famille de la vitamine E comprend les tocophérols et les tocotriénols.

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di- ou triméthyle auquel est rattachée une chaîne carbonée latérale saturée de 16 carbones.

## PARTIE III

### Vitamine E

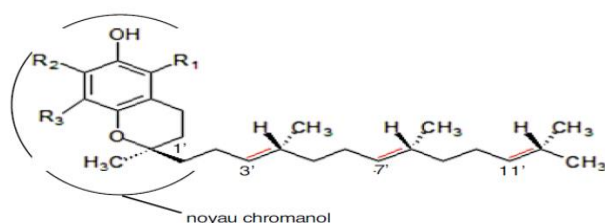


- $\alpha$ -tocophérol:  $R_1=R_2=R_3$ =groupement méthyle
- $\beta$ -tocophérol:  $R_1=R_3$ = groupement méthyl;  $R_2=H$ 
  - $\gamma$ -tocophérol:  $R_1=H$ ;  $R_2=R_3$ =groupement méthyl
- $\delta$ -tocophérol:  $R_1=R_2=H$ ;  $R_3$ =groupement méthyl

Figure III.1. Structure du Tocophérol [71].

Chaque tocophérol existe sous 8 stéréo-isomères différents, dans la nature, le seul stéréo-isomère de l' $\alpha$ -tocophérol retrouvé est le RRR- $\alpha$ -tocophérol.

Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale en position 3', 7' et 11'. Naturellement présents dans la nature, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -tocotriénols possèdent une activité vitaminique alors que les formes  $\gamma$  et  $\delta$  sont inactives [72].



- $\alpha$ -Tocotriénol :  $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$ .
- $\beta$ -Tocotriénol :  $R_1 = R_3 = CH_3$ ,  $R_2 = H$ .
- $\gamma$ -Tocotriénol :  $R_1 = H$ ,  $R_2 = R_3 = CH_3$ .
- $\delta$ -Tocotriénol :  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_3 = CH_3$ .

Figure III.2. Structure du Tocotriénol [71].

### III.6. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

- Les tocophérols sont des liquides visqueux, huileux et de couleur jaune pâle à la température ambiante [73].
- Ils sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les graisses, huiles et les solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, alcool éthylique et méthylique)[73].
- La vitamine E est oxydable surtout en milieu basique, à la lumière et à la température élevée.
- La vitamine E est stable en l'absence d'oxygène et en milieu acide [74].
- Elle est sensible aux rayons UV [74].
- Ils ont une stabilité élevée en milieu alcalin.

## PARTIE III

### Vitamine E

Le tableau suivant récapitule les paramètres physico-chimiques de la vitamine E.

**Tableau III.1.** Propriétés physico-chimique de la vitamine E [6].

<b>Formule brute</b>	$C_{29} H_{50} O_2$
<b>Masse molaire</b>	430,69 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Températures de fusion</b>	3°C
<b>Température d'ébullition</b>	253°C
<b>Solubilité</b>	Soluble dans l'acétone, éthanol, éther et les huiles végétales. Insoluble dans l'eau.
<b>Masse volumique</b>	0,947-0,951 g.cm <sup>-1</sup>
<b>Point d'éclair</b>	240°C

### III.7. Solubilité de la vitamine E

La solubilité de la vitamine E dans un solvant dépend de manière générale des interactions qu'elle peut avoir. Donc elle ne peut pas interagir physiquement avec l'eau ou une phase polaire, elle est alors généralement plutôt soluble dans les solvants organiques.

Le caractère lipophile de la vitamine E est caractérisé par la présence de groupement CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-, =CH-, noyaux aromatiques [75]. La grande majorité des molécules lipophiles sont incorporées (encapsulées) dans des formes pharmaceutiques spécifiques à l'application voulue, dont le but d'améliorer leur dissolution [72].

### III.8. Toxicité

La consommation régulière de vitamine E n'est pas dangereuse, même à des doses allant jusqu'à 1 000 mg par jour.

La consommation élevée d'alpha-tocophérol provoque un saignement chez certaines personnes. Certains médecins recommandent d'arrêter une supplémentation en vitamine E au mois avant une opération chirurgicale non urgente afin de réduire le risque de saignement.

Certaines études montrent qu'à des doses très élevées de 2 000 UI/jour, ce qui dépasse largement la quantité recommandée, la vitamine E peut être mortelle [76].

#### III.9. Liste des rôles et actions de la vitamine E [77, 78, 79]

- Le tocophérol est un puissant antioxydant qui neutralise les radicaux libres, protégeant ainsi les structures membranaires des cellules de notre organisme et ralentissant leur vieillissement prématuré. Ce qui a pour conséquence le ralentissement du vieillissement oculaire, celui de la peau et celui de la prostate, et le retard de l'usure des cartilages.
- En diminuant le taux du mauvais cholestérol (LDL), elle empêche les dommages dus à l'athérosclérose et protège ainsi des maladies cardio-vasculaires.
- La vitamine E protège de certains cancers.
- Elle a une action anti-infectieuse et renforce les défenses immunitaires.
- Elle contribue à ralentir l'oxydation des acides gras insaturés, empêchant ainsi les dommages causés par l'oxydation des membranes cellulaires, ce qui a pour conséquence un bon maintien de l'hydratation de la peau et un bon état des tissus.
- La vitamine E participe à la formation et à la protection des globules rouges.
- Elle est nécessaire au développement des cellules sexuelles. Elle est donc indispensable durant la grossesse, car sans elle, les tissus générateurs du sang ne se développent pas de manière convenable chez le fœtus.
- Le tocophérol stimule la fertilité et la fécondité.

#### III.10. Effet de la vitamine E sur le sperme

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est un antioxydant qui agit sur la membrane du spermatozoïde en neutralisant  $H_2O_2$  et en dégradant les radicaux libres. La carence en vitamine E entraîne une altération de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes, une diminution et une dégénérescence de la spermatogenèse [3].

De nombreuses études (chez l'animal et chez l'homme infertile) montrent un effet bénéfique de la supplémentation en vitamine E sur la qualité du sperme : diminution de la quantité des TBARS (marqueurs de la peroxydation des lipides) dans le plasma séminal avec amélioration de la mobilité et la rapidité des spermatozoïdes, augmentation de leur concentration et diminution des spermatozoïdes anormaux [3]. Il est aussi prouvé que la vit E a un effet positif sur la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte [78].

#### III.11. Dosage de la vitamine E

La vitamine E a été dosée par colorimétrie, fluorométrie et chromatographie. La méthode actuellement la plus utilisée est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Le choix de la méthode à utiliser dépend de :

- l'objectif de notre analyse.
- La nature de l'échantillon.

Certaines analyses ont pour but d'identifier l' $\alpha$ -tocophérol. D'autres visent la détermination de l'ensemble des tocophérols et tocotriénols, et leurs métabolites. Enfin, certaines méthodes s'intéressent en plus à la structure des molécules [71].

##### III.11.1. Dosage de la vitamine E par HPLC en phase inverse

La séparation des tocophérols par HPLC est conduite de différentes manières selon les auteurs (fruit étudié, extraction, type de colonne, solvant, gradient, etc...). Les extraits peuvent être analysés directement après filtration [80, 81, 82].

Mais cette pratique est utilisable uniquement pour les fruits dont le jus est obtenu facilement. C'est pourquoi, l'analyse des tocophérols par HPLC est souvent précédée d'une extraction liquide-liquide. Les travaux publiés par Justesen et ces collaborateurs [83], Escarpa et Gonzalez [84] et Careri., [85] décrivent l'utilisation du méthanol comme solvant. Ainsi, les extraits sont dissous dans du méthanol puis conservés après filtration, avant leur analyse.

#### III.12. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu, que la vitamine E est composée de plusieurs composés. Elle joue le rôle d'antioxydant et un intervient notamment dans le processus de reproduction.

La vitamine E est caractérisée par sa faible solubilité en milieu physiologique.

Ces conclusions confortent notre choix de la vitamine E comme : agent protecteur lors de la conservation du sperme et les cyclodextrines comme molécules solubilisantes.



# **PARTIE IV**

## **Conservation du sperme**

### Conservation du sperme

#### IV.1. Introduction

Dans les parties précédentes, nous avons vu que le phénomène d'inclusion par les cyclodextrines pourrait être une solution à la faible solubilité des deux molécules (la vitamine E et le cholestérol). Nous avons vu aussi que plusieurs méthodes pourraient nous permettre de juger de l'efficacité des complexes obtenus, le modèle spermatique est aussi une approche fiable.

#### IV.2. Historique

En 1776, Spallanzani réalise une fécondation artificielle sur des œufs de grenouille et démontre le caractère indispensable de la semence mâle.

L'application à l'homme ne tarde pas. En effet, en 1791 J. Hunter insémine la femme d'un drapier avec le sperme de ce dernier, et obtient une grossesse. C'est la première insémination artificielle humaine.

Reprenant les travaux de Spallanzani et de Montegazza (1866) qui découvre que le froid fixe les spermatozoïdes et que ceux-ci recouvrent une mobilité au réchauffement, Jean Rostand (1950) montre le rôle cryoprotecteur du glycérol rendant possible la congélation et la conservation dans l'azote des spermatozoïdes d'ovins et de bovins. Cette découverte va permettre la création des centres de congélation et de conservation du sperme, appelés alors « banques du sperme ». En 1963, Sherman procède avec succès à l'adaptation de cette technologie à la médecine humaine aux États-Unis, il ouvre la première banque de sperme humain et obtient les premières grossesses par insémination de sperme congelé.

Parallèlement à ces progrès, en France, les mentalités évoluent. Ainsi, en 1957, le 17<sup>e</sup> congrès de la Fédération des Sociétés de Gynécologie et d'Obstétrique de langue Française affirme que l'insémination avec le sperme du mari est une méthode de traitement acceptable d'une stérilité conjugale. En 1973, se créent les deux premières banques de sperme françaises [86].

### Conservation du sperme

#### IV.3. Caractéristique des spermatozoïdes

##### IV.3.1. 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 mâles (prostate, vésicule séminal...) [87].

##### IV.3.2. Composition chimique de sperme

Le sperme est une combinaison de plusieurs fluides dans lequel les spermatozoïdes sont maintenus en vie pour une courte durée, il contient deux vitamines C et B12, de nombreux sels minéraux comme le calcium, magnésium, phosphore, potassium et zinc.

Le sperme contient aussi deux sucres (fructose et sorbitol). Ce dernier est riche en protéine, sodium et cholestérol. Il contient aussi des traces des testostérone et d'autres hormones.

Ce liquide physiologique est composé de la sécrétion de différentes glandes :

- 5% glandes de Cowper.
- 20-40% prostate.
- 10-20% épидидyme.
- 40-60% vésicules séminales [87].

##### IV.3.3. Spermatozoïdes

Le spermatozoïde désigne un gamète (cellule reproductrice) mâle produit par les testicules. Il contient dans son noyau les informations génétiques du père qu'il transporte avec lui jusqu'à l'ovule, lequel possède les informations génétiques de la mère [88].

##### IV.3.4. Réalisation du spermogramme

Le spermogramme est un examen complet du sperme. Il est réalisé en cas de problème de fertilité constaté chez un couple. Il a pour but de mesurer avec précision la qualité du sperme notamment le nombre, la forme, la mobilité ainsi que d'autre paramètre : volume, pH, viscosité [87].

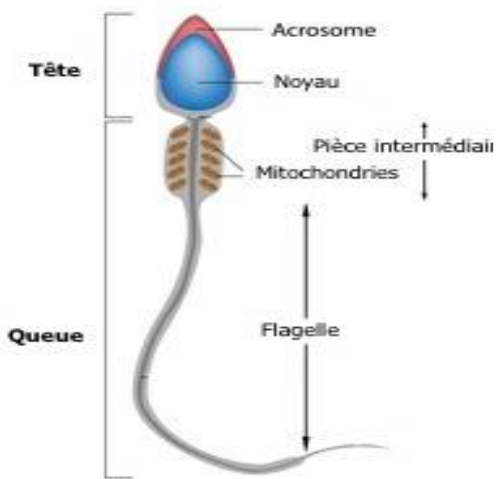
##### IV.3.5. Morphologie du spermatozoïde

L'examen morphologique permet de différencier les spermatozoïdes normaux des anormaux et les spermatozoïdes vivants des morts [71].

Le spermatozoïde normal se compose d'une tête, d'une pièce intermédiaire et d'un flagelle.

## PARTIE IV

### Conservation du sperme



- Le flagelle : c'est l'élément qui permet le mouvement.
- La pièce intermédiaire : c'est le moteur du spermatozoïde.
- Le noyau : contient le patrimoine génétique de l'homme.
- L'acrosome : c'est la membrane qui permet de passer au travers de la membrane de l'ovule, elle joue donc un rôle essentiel dans la fécondation.

**Figure IV.1.** Représentation schématique d'un spermatozoïde [71].

#### IV.3.6. Mobilité des spermatozoïdes

Les mouvements des spermatozoïdes peuvent être évalués au microscope entre lame et lamelle sur une platine de microscope chauffante. On distingue la mobilité totale et la mobilité progressive [89].

- La mobilité totale correspond au pourcentage de spermatozoïdes qui se déplacent quelle que soit leur trajectoire [89].
- La mobilité progressive reflète, quant à elle, la proportion de spermatozoïdes se déplaçant en ligne droite [90].

#### IV.3.7. Viabilité

Le taux de survie est le rapport entre le pourcentage des spermatozoïdes vivants normaux ( $V_n\%$ ) mesuré sur le pourcentage de spermatozoïdes après décongélation et le pourcentage  $V_f$  des spermatozoïdes dans le sperme frais [71].

### IV.4. Conservation de sperme

On utilise la technique de congélation du sperme pour ralentir les phénomènes biologiques, les mouvements moléculaires sont très diminués, les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées donc le temps cellulaire est arrêté [72]

Afin de protéger les spermatozoïdes durant la congélation, il est très important de prendre en considération les points suivants :

## PARTIE IV

---

### Conservation du sperme

#### IV.4.1. Diluant

On utilise un diluant pour protéger et nourrir les spermatozoïdes durant la congélation, il existe un grand nombre de diluer, à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes [1].

Il existe de nombreux diluants disponibles pour le sperme, comme, lait, lactose, saccharose, raffinose, d'autre contenant des agents protecteurs tel que le jaune d'œuf, et d'autres substances comprenant des antioxydants (les vitamines) [93].

#### IV.4.2. Cryoprotecteur

Les cryoprotecteurs sont des composés organiques ayant comme rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau [92].

Le choix du type du cryoprotecteur est très important pour avoir une bonne conservation du sperme, il existe plusieurs types de cryoprotecteurs tels que le glycérol, diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylacétamine (DMA) et les cyclodextrines[93].

#### IV.5. Congélation du sperme

La congélation de la semence permet la conservation du potentiel génétique d'un animal pendant une durée indéfinie. Elle offre ainsi la possibilité de transmettre ce potentiel à la descendance lorsque l'animal ne pourra plus reproduire, suite à des affections pathologiques ou à la vieillesse, ou après sa mort. Elle permet aussi de transporter la semence sur des longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle et le transport de la semence congelée permet également une dispersion incomparable des caractères génétiques intéressants [94].

En général cette technique nécessite quatre étapes ou phases [93] :

- Phase de refroidissement
- Phase de conditionnement
- Phase de congélation
- Phase de décongélation.

### Conservation du sperme

#### IV.6. Réfrigération du sperme

La réfrigération de la semence consiste à abaisser la température de la semence, diluée ou non, à 4 ou 5°C en vue de la conserver, à cette température, pendant 24 à 48 heures.

De plus, la réfrigération de la semence présente des avantages par rapport à la congélation : les protocoles utilisés sont simple et le transport est moins onéreux et moins dangereux.

Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet qu'une conservation de la semence à un court temps, contrairement à la congélation qui permet de conserver indéfiniment la semence [94].

#### IV.7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu que pour conserver le sperme, on peut utiliser la méthode réfrigération. D'où l'utilité de faire des essais de réfrigération avec une combinaison inédite : complexes : CD-Vit E et CD-Chol et pourquoi pas les trois CD-VitE/CD-Chol. Ce qui nous permettra au final de prouver l'amélioration ou non, de la solubilité de nos deux traceurs la vitamine E et le cholestérol.

# **PARTIE V**

## **Travaux antérieures**

## V.1. Introduction

Afin de mieux situer notre thématique de travail et afin de ressortir sa pertinence, nous avons choisi de faire un résumé des travaux antérieurs concernant les cyclodextrines, la vitamine E et le cholestérol.

## V.2. Travaux antérieurs

**En 1987**, K. UEKAMA et ces collaborateurs ont étudié le complexe d'inclusion du 2,6-di-O-méthyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) avec  $\alpha$ -tocopheryl acétate et  $\alpha$ -tocopherylnicotinate en solution aqueuse.

Les diagrammes de solubilité des complexes retrouvés correspondaient au type Ap et des constantes de stabilité (K) furent estimées.

Le complexe solide de l' $\alpha$ -tocopherylnicotinate avec la DM- $\beta$ -CD fut préparé par la méthode de Kneading en respectant un ratio molaire de 1 :2. La solubilité aqueuse des esters de tocophérols fut améliorée de  $10^5$  fois grâce à la complexation avec la DM- $\beta$ -CD [95].

**En 1993**, N. KARUPPIAH et al, ont étudié l'utilisation du complexe d'inclusion (cyclodextrine/cholestérol).

Les résultats qu'ils ont obtenus montrent que la préparation des complexes de cholestérol par HP $\beta$ CD n'interfère pas avec les enzymes et d'autres constituants présents dans les réactifs pour l'analyse de cholestérol (dosage par voie enzymatique) [96].

**En 1997**, W.TERNS et ces collègues, ont étudié la séparation et caractérisation des isomères *cis-trans* de l' $\alpha$ -tocotriénol par HPLC en utilisant une phase stationnaire perméthylée de  $\beta$ -cyclodextrine. Enfaite, Le comportement de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -tocotriénols durant l'analyse chromatographique (HPLC) fut étudié en utilisant comme phase stationnaire la  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée. Chacun des tocotriénols injectés séparément ont montré quatre (04) pics. Les quatre composants de  $\alpha$ -tocotriénol furent en parallèle identifiés par microscopie à balayage, RMN et FTIR [97].

**En 1999**, S. K. RODAL et ses collaborateurs ont étudié l'importance du cholestérol dans l'endocytose en utilisant méthyl- $\beta$  -cyclodextrine (M $\beta$ CD) pour extraire de manière sélective le cholestérol de la membrane plasmique. Le traitement par la M $\beta$ CD a fortement



inhibée l'endocytose. Les résultats ont montré que l'endocytose fonctionne toujours après l'élimination de cholestérol [98].

**En 2004**, A. IACONINOTO et al, ont étudié l'influence de la complexation de la (cyclodextrine/ $\alpha$ -tocophérol) sur la photo-dégradation et l'activité anti-oxydante d' $\alpha$ -tocophérol. L'interaction de la vitamine avec les cyclodextrines a été déterminée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. La photo-dégradation d' $\alpha$ -tocophérol a été examiné dans des émulsions préparées, il a été prouvé que : la photo-dégradation n'est pas significativement influencée par la complexation avec la  $\beta$ -CD, tandis que HP- $\beta$ -CD et HP- $\gamma$ -CD augmentent la décomposition de l' $\alpha$ -tocophérol induite par la lumière. Par conséquent, la complexation d' $\alpha$ -tocophérol avec ces cyclodextrines n'interfère pas avec la vitamine antioxydante [99].

**En 2005**, G. SOMOGY et al, ont étudié la capacité des cyclodextrines, à empêcher l'absorption d'aliments dérivés de cholestérol.

L' $\alpha,\beta,\gamma$ -cyclodextrines, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (2-HP $\beta$  CD), et heptakisO,O-diméthyl-bêta-cyclodextrine (DM $\beta$  CD) ont été préparés sous forme de solution à différentes concentrations. Ces solutions ont ensuite été saturées en cholestérol. L'évaluation de la concentration par HPLC du cholestérol dissous a montré que : la DM $\beta$  CD a donné les meilleurs résultats en matière de dissolution du cholestérol suivie d'HP $\beta$  CD et  $\alpha$ -cyclodextrine [7].

**En 2007**, E. M. HAN et ses collaborateurs ont réalisé une étude afin d'optimiser les différentes conditions pour la  $\beta$ -cyclodextrine réticulées en utilisant de l'acide adipique pour l'élimination du cholestérol dans une crème. Pour cette étude différents facteurs ont été considérés : la concentration en  $\beta$ -CD, la température de mélange, le temps et la vitesse de mélange.

L'élimination du cholestérol a été fortement influencée par la température de mélange, temps et la vitesse de mélange. Après élimination du cholestérol à partir de crème, la  $\beta$ -CD réticulée utilisée a été lavée pour la dissociation du cholestérol et réutilisation. Par conséquent, l'étude a montré que les conditions optimales pour l'élimination du cholestérol à l'aide  $\beta$ -CD réticulée étaient par l'ajout de 10% de  $\beta$ -CD, avec un temps de mélange de 30 min et une vitesse de 1400 tours par minute à 40°C avec plus de 90% d'élimination de cholestérol [100].

**En 2008**, F. P. JIAO et son équipe ont travaillé sur le complexe d'inclusion (vitamine E/ $\beta$ -CD), le complexe formé a été caractérisé par : Ultraviolet, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et à spectrométrie de fluorescence.

Les résultats obtenus ont confirmé l'existence d'un complexe d'inclusion (Vitamine E/  $\beta$ -CD) de type 1:1. La constante de formation du complexe d'inclusion a été également déterminée par spectrométrie de fluorescence [101].

**En 2009**, Y. WATANABE et ces collaborateurs ont étudié l'effet suppressif de  $\alpha$ -tocophérol complexé avec la  $\beta$ -Cyclodextrine sur l'oxydation du linoléate méthylique. Le  $\alpha$ -tocophérol complexé avec  $\beta$ -cyclodextrine a été préparé et son effet suppressif sur l'oxydation du linoléate méthylique a été cinétiquement examiné en utilisant le model de Weibull. L'effet suppressif de l' $\alpha$ -tocophérol complexé avec la  $\beta$ -cyclodextrine sur l'oxydation de linoléate méthylique est dû à la protection du  $\alpha$ -tocophérol par son inclusion par la  $\beta$ -cyclodextrine et au dégagement progressif du l' $\alpha$ -tocophérol du complexe d'inclusion [102].

**En 2009**, E. MOCE et ses collaborateurs ont mené une étude afin de déterminer si le traitement des spermatozoïdes de bélier avec six cyclodextrines différentes pré-chargé avec le cholestérol (CLC), augmente la viabilité du sperme avant sa cryoconservation.

Le sperme traité avec du 2HP $\beta$ CD préalablement à la congélation donna un plus grand pourcentage de spermatozoïdes mobiles (62%) par rapport au témoin (43%) après décongélation. En outre, les échantillons traités avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine présentaient des pourcentages de spermatozoïdes mobiles et viable similaires aux échantillons traités avec 2HP $\beta$ CD. La concentration de CLC optimisée dans ce travail, était de 2mg CLC/120\*10<sup>6</sup> sperme [1].

**En 2010**, N. MIYOSHI et ces collaborateurs, ont travaillé sur l'amélioration de la biodisponibilité orale du  $\gamma$ -tocotriénol, chez les souris, en utilisant le complexe d'inclusion ( $\gamma$ -tocotriénol/  $\gamma$ -cyclodextrine).

Des souris âgées de cinq semaines ont été alimentées avec de la vitamine E libre, suivie d'une administration orale d'une dose de 2,79 mg de fraction de  $\gamma$ -tocotriénol (FT) ou l'équivalent de complexe d'inclusion.

L'étude pharmacocinétique a révélé que l'inclusion par la  $\gamma$ -CD a amélioré la biodisponibilité du  $\gamma$ -tocotriénol chez les souris [103].

**En 2011**, Y. SUEISHI et ces collègues ont travaillé sur la caractérisation du complexe d'inclusion (vitamine E/DM- $\beta$ -CD). Ce dernier a été caractérisé par RMN. Les résultats obtenus suggèrent que la DM- $\beta$ -CD inclut la partie latérale de la chaîne de l' $\alpha$ -tocophérol [104].

**En 2011**, T. YANO et ces collaborateurs ont étudié l'effet sur la disponibilité et l'activité anticancéreuse du tocotriénol (T3) par l'administration orale du complexe d'inclusion de ( $\gamma$ - tocotriénol ( $\gamma$ T3)/ $\gamma$ - cyclodextrine).

Cette étude a démontré que la biodisponibilité du  $\gamma$ T3 est améliorée lors de l'administration orale d'un complexe d'inclusion de ( $\gamma$ T3/ $\gamma$ - CD). En outre, l'amélioration de la biodisponibilité a contribué in vivo à l'augmentation de l'activité anticancéreuse du  $\gamma$ T3 [105].

**En 2012**, T. GIERLACH-HLADON- et K. LANGE ont étudié le dosage de la vitamine E libre et dans des complexes d'inclusion avec la  $\beta$ -cyclodextrine naturelle et son dérivé HP $\beta$ -cyclodextrine, par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La méthode a été validée sur la base des paramètres suivants : la spécificité, la sélectivité, la linéarité, la précision, la répétabilité [106].

**En 2013**, D. Kamarun et al ont étudié l'analyse thermique et la morphologie de la surface du cholestérol à l'aide d'un complexe d'inclusion ( $\beta$ -cyclodextrine), ce complexe a été caractérisé par DSC et microscopie à balayage électronique (MEB). Les résultats de la DSC montrent l'apparition d'un pic endothermique dans le complexe d'inclusion, confirmant la formation de complexe d'inclusion. Les résultats du MEB ont montré que la morphologie du complexe d'inclusion est sous forme des particules cristallines irrégulières tout à fait différente de celle du cholestérol et de la  $\beta$ -cyclodextrine [107].

**En 2014**, C. MURPHY et al ont démontré que l'ajout de cholestérol au sperme de l'étalon avant la cryopréservation, stabilise la membrane spermatique, résultant en une amélioration post-dégel de la qualité du sperme en termes d'accroissement de la viabilité des spermatozoïdes, intégrité de la membrane et réduction de stress oxydatif [108].

## PARTIE V

---

### Travaux antérieurs

**En 2016**, S. FATMI et al ont étudié l'intérêt de l'utilisation des complexes d'inclusion (cholestérol/CDs) et ( $\alpha$ -tocophérol/CDs) lors de la congélation/décongélation de la semence canine.

La meilleure conservation du sperme en terme de mobilité a été obtenue par l'association (cholestérol/CD/ $\alpha$ -tocophérol) [109].

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

#### II.1. Vitamine E

##### II.1.1. Préparation des complexes d'inclusion

###### II.1.1.1. Matières premières et matériels utilisés

###### ➤ Matières premières

- Vitamine E (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- $\beta$ -CD (Roquette Frères (France)).
- HP $\beta$ CD (Wacker (Allemagne)).
- PM $\beta$ CD (Orsan (France)).

###### ➤ Appareillages

- Balance analytique (Denver).
- Plaque agitatrice multiple (Velp Scientifica).
- Rota vapeur (Buchi).

###### VI.1.1.2. Méthodes

###### A. Co- évaporation

- ❖ Peser la masse de vitamine E dans un bécher.
- ❖ Ajouter la masse de CD correspondante, calculée à base d'un ratio molaire 1 :1 (CDs/Vit E) (voir le tableau II.1.) [101].
- ❖ Verser 50 ml d'éthanol.
- ❖ Mettre sous agitation jusqu'à la dissolution complète (en moyenne 24 heures).
- ❖ Vérifier les conditions du rota-vapeur (débit de l'eau, vitesse de rotation et température).
- ❖ Mettre la solution sous rota-vapeur jusqu'à l'évaporation complète de l'éthanol et obtention d'une poudre sèche.
- ❖ Enfin récupérer et conserver les complexes dans des flacons.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

Tableau II.1. Les quantités des CDs utilisées.

Numéro d'essai	Type du cyclodextrine	Masse vitamine E (mg)	Masse des cyclodextrines (mg)
01	$\beta$ CD	50	131,7
02	HP $\beta$ CD	50	172,7
03	PM $\beta$ CD	50	154,4

#### B. Mélange physique

- ❖ Les cyclodextrines ( $\beta$ -CD, HP $\beta$ -CD et PM $\beta$ -CD) et la vit E à un ratio molaire (1:1) furent mélangés directement dans un mortier.
- ❖ Les poudres obtenues furent conservées dans des flacons.

#### II.1.2. Vérification de la méthode de dosage de la vitamine E par HPLC

La quantification de la vitamine E est faite par HPLC, en utilisant les équipements et les paramètres suivants :

##### II.1.2.1. Matières première et matériels utilisés

###### ➤ Matières premières

- Vitamine E (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen).
- Complexes d'inclusion (vit E/ $\beta$ CD, vit E/HP $\beta$ CD, vit E/PM $\beta$ C).

###### ➤ Appareillage

- Semi micro Balance (Sartorius).
- Plaque agitatrice multiple (VelpScientifica).
- HPLC (Waters e2695 alliance (Usine TAPHECO)).
- Bain ultrason (Selecta).

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

#### II.1.2.2. Méthodes

##### a) Vérification de la linéarité (courbe d'étalonnage)

###### - Conditions opératoires

**Phase mobile:** méthanol 100%.

**Diluant:** Eau distillée.

**Colonne :** C18, 15 cm.

**Débit :** 1 ml/min.

**Longueur d'onde :** 292 nm.

**Volume d'injection :** 20µl.

**Temps de rétention :** 7 min.

###### -Protocole opératoire

###### ➤ Préparation de la courbe d'étalonnage

- Six (06) concentrations différentes de vitamine E dans le méthanol (voir tableau II.2) ont été préparées.

**TableauII.2.** Préparation des solutions de la courbe d'étalonnage

<b>Concentration</b>	<b>Masse de la vitamine E</b>	<b>Compléter à</b>
C1 (0.5 mg/ml)	25 mg	50 ml
C2 (0.4mg/ml)	20 mg	50 ml
C3 (0.3mg/ml)	15mg	50 ml
C4 (0.2mg/ml)	10 mg	50 ml
C5 (0.1mg/ml)	5 mg	50 ml
C6 (0.05mg/ml)	2.5 mg	50 ml

- Agitation 10 min, sonication 5 min (faire attention à l'augmentation de la température).
- Filtrer et remplir les vials HPLC.
- Injecter dans l'HPLC.



## Chapitre II

### Matériels et méthodes

---

#### b) Vérification de la spécificité

Le but est de vérifier qu'aucuns des excipients, ne présentent de pic (absorbance) au temps d'apparition du pic de la vitamine E, pour ce faire nous avons suivi les étapes suivantes :

- Préparation de solutions de CDs.
- Préparation d'une solution témoin de vitamine E.
- Injection de : diluant, solutions de CDs et de la vitamine E.

#### c) Vérification de la répétabilité et paramètres de conformité (suitability)

Afin de juger de la répétabilité et du bon fonctionnement de l'équipement et de la méthode, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Injection de la solution C6 sept fois.
- Après récupération des données, nous avons calculé ; le RSD, le nombre de plateaux théoriques et le facteur de symétrie.

### II.1.3. Sélection de la CD adéquate pour la solubilisation de la vitamine E

#### II.1.3.1. Méthode

- Préparer des solutions (dans de l'eau) à base des complexes d'inclusion équivalentes à 1.2 mg/ml en vitamine E.
- Laisser sous agitation pendant 2 heures.
- Filtrer et remplir les vials HPLC.
- Doser les solutions par HPLC.

### II.1.4. Caractérisation des complexes d'inclusion

La meilleure préparation obtenue lors de l'étape précédente ainsi que le mélange physique correspondant ont été caractérisés par spectroscopie Infrarouge et par balayage calorimétrique différentielle (DSC). Ces caractérisations ont comme but principales de prouver l'inclusion de la vitamine E dans la CD.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

---

#### II.1.4.1. Analyse par spectroscopie IR

##### II.1.4.1.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières premières**

- PM $\beta$ CD (Orsan (France)).
- Vitamine E (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Complexe d'inclusion et mélange physique : Vitamine E/PM $\beta$ CD.
- Bromure de potassium KBr (Biochem).

➤ **Appareillages**

- Spectroscopie IR (IR SHIMADZU).
- Presse (SHIMADZU).

##### VI.1.4.1.2. Méthodes

Des pastilles à base de : KBr - complexe d'inclusion et KBr - mélange physique ont été préparés. Ils ont été analysés par la spectroscopie IR sous des fréquences allant de 4000  $\text{cm}^{-1}$  à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### II.1.4.2. Balayage Calorimétrique Différentiel (DSC)

##### II.1.4.2.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières premières**

- PM $\beta$ CD (Orsan (France)).
- Vitamine E (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Complexe d'inclusion et mélange physique : Vitamine E/PM $\beta$ CD.

➤ **Appareillages**

- DSC Linseis (STAPT 1600).

##### II.1.4.2.2. Méthodes

L'analyse thermique a été effectuée en utilisant un DSC Linseis (STAPT 1600) équipé d'un système d'alimentation compensé. Tous les échantillons ont été pesés à environ 5 mg

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

dans des capsules en aluminium et chauffé avec une vitesse de 10 °C / min dans un intervalle de températures allant de 30 °C à 350 °C sous un courant d'azote gazeux.

## II.2. Cholestérol

### II.2.1. Réalisation du plan d'expérience

La matrice d'expérience est obtenue à l'aide du logiciel MODD 6, en introduisant les différents facteurs que nous avons jugé pertinents sur la qualité de complexation : le ratio molaire, le volume de l'éthanol ainsi que le type des CDs. Les tableaux II.3. et II.4. présentent respectivement la matrice d'expérience obtenue et la matrice d'expérience avec des valeurs centrées réduites.

**Tableau II.3.** Plan d'expérience D-Optimal.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	cd	ratio	volume	Air de pic
1	1	N1	9	Incl	bcd	0,25	25	
2	3	N3	18	Incl	bcd	4	25	
3	4	N4	8	Incl	bcd	4	35	
4	5	N5	5	Incl	bcd	1	10	
5	6	N6	7	Incl	bcd	3	10	
6	7	N7	10	Incl	bcd	1	50	
7	8	N8	6	Incl	bcd	3	50	
8	10	N10	12	Incl	hpbcd	4	10	
9	11	N11	4	Incl	hpbcd	0,25	50	
10	12	N12	14	Incl	hpbcd	4	50	
11	13	N13	16	Incl	hpbcd	2	30	
12	14	N14	19	Incl	pmbcd	0,25	10	
13	15	N15	2	Incl	pmbcd	4	10	
14	16	N16	11	Incl	pmbcd	0,25	50	
15	17	N17	17	Incl	pmbcd	4	50	
16	18	N18	13	Incl	pmbcd	2	30	
17	19	N19	19	Incl	pmbcd	2	30	
18	20	N20	1	Incl	pmbcd	2	30	

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

**Tableau II.4.** Matrice d'expérience avec des valeurs centrées réduites.

1	Exp No	cd	ratio	volume
2	1	bcd	-1	-0,25
3	3	bcd	1	-0,25
4	4	bcd	1	0,25
5	5	bcd	-0,6	-1
6	6	bcd	0,467	-1
7	7	bcd	-0,6	1
8	8	bcd	0,467	1
9	10	hpbcd	1	-1
10	11	hpbcd	-1	1
11	12	hpbcd	1	1
12	13	hpbcd	-0,0667	0
13	14	pmbcd	-1	-1
14	15	pmbcd	1	-1
15	16	pmbcd	-1	1
16	17	pmbcd	1	1
17	18	pmbcd	-0,0667	0
18	19	pmbcd	-0,0667	0
19	20	pmbcd	-0,0667	0

### II.2.2. Préparation des complexes d'inclusion selon le plan d'expérience

#### II.2.2.1. Matières premières et matériels utilisés

##### ➤ Matières premières

- Cholestérol (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen).
- $\beta$ -CD (Roquette Frères (France)).
- HP $\beta$ CD (Wacker (Allemagne)).
- PM $\beta$ CD (Orsan (France)).

##### ➤ Appareillages

- Balance analytique (Denver).
- Plaque agitatrice multiple (VelpScientifica).
- Rota vapeur (Buchi).

#### II.2.2.2. Méthodes

##### A. Co-évaporation

- ❖ Peser la masse du cholestérol dans un bécher.
- ❖ Ajouter la masse de CD correspondante (voir les tableaux II.6.).
- ❖ Verser le volume du solvant (éthanol) approprié à chaque essai.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

- ❖ Mettre sous agitation jusqu'à la dissolution complète (en moyenne 24 heures).
- ❖ Vérifier les conditions du rota vapeur (débit de l'eau, vitesse de rotation et température).
- ❖ Mettre la solution au rota-vapeur jusqu'à l'évaporation complète de l'éthanol.
- ❖ Récupérer et conserver les complexes sous forme de poudre dans des flacons.

#### B. Par mélange physique

Les cyclodextrines ( $\beta$ -CD, HP $\beta$ -CD et PM $\beta$ -CD) et le cholestérol furent mélangés directement dans un mortier, ensuite la poudre obtenue a été conservée dans un dessiccateur.

### II.2.3. Vérification de la méthode de dosage du cholestérol par HPLC

La quantification du cholestérol est faite par HPLC, en utilisant les équipements et les paramètres suivantes:

#### II.2.3.1. Matières première et matériels utilisés

##### ➤ Matières premières

- Cholestérol (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen).
- Complexes d'inclusion (chol/ $\beta$ CD, chol/HP $\beta$ CD, chol/PM $\beta$ CD).

##### ➤ Appareillage

- Semi micro Balance (Sartorius).
- Plaque agitatrice multiple (VelpScientifica).
- HPLC (Waters e2695 alliance).
- Bain ultrason (Selecta).

#### II.2.3.2. Méthodes

##### a) Vérification de la linéarité (courbe d'étalonnage)

##### -Conditions opératoires

**Phase mobile:** acétonitrile /méthanol (70/30 %).

**Diluant:** méthanol et l'eau distillée.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

**Colonne :** C18, 15 cm.

**Débit :** 0,5 ml/min.

**Longueur d'onde :** 210 nm.

**Volume d'injection :** 20µl.

**Temps de rétention :** 4 min.

#### -Protocole opératoire

##### ➤ Préparation de la courbe d'étalonnage (std)

- Six (06) concentrations différentes de cholestérol dans du méthanol (voir tableau II.5).

**Tableau II.5.** Préparation des solutions de la courbe d'étalonnage

Concentration	Masse du cholestérol	Compléter à (fiolle)
C1 (4 mg/ml)	100 mg	25 ml
C2 (2 mg/ml)	50 mg	25 ml
C3 (1 mg/ml)	25mg	25 ml
C4 (0.5 mg/ml)	25 mg	50 ml
C5 (0.1 mg/ml)	5 mg	50 ml
C6 (0.05 mg/ml)	2.5 mg	50 ml

- Agitation 10 min, sonication 5 min (faire attention à l'augmentation de la température).
- Filtrer et remplir les vials HPLC.
- Injecter dans l'HPLC.

#### b) Vérification de la spécificité

Le but est de vérifier qu'aucuns des excipients, ne présentent de pic (absorbance) au temps d'apparition du pic du cholestérol, pour ce faire nous avons suivi les étapes suivantes :

- Préparation de solutions de CDs.
- Préparation d'une solution témoin de cholesterol.
- Injection de : diluant, solutions de CDs et du cholestérol.

#### c) Vérification de la répétabilité et paramètres de conformité (suitability)

Afin de juger de la répétabilité et du bon fonctionnement de l'équipement et de la méthode, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Injection de la solution C6 sept fois.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

- Après récupération des données, nous avons calculé ; le RSD, le nombre de plateaux théoriques et le facteur de symétrie.

#### II.2.4. Détermination de la réponse de notre matrice d'expérience

- Préparer des solutions (dans de l'eau) à base des complexes d'inclusion équivalentes à 1,7 mg/ml en cholestérol.
- Laisser sous agitation pendant 2 heures.
- Filtrer, et faire une dilution ½ dans du méthanol.
- Remplir les vials HPLC.
- Doser les solutions par HPLC.

#### II.2.5. Réalisation de l'essai optimum et son mélange physique équivalent

Après optimisation par les plans d'expérience, l'optimum obtenu est préparé par Co-évaporation selon le protocole déjà cité en II.2.2.

Il est à noter, que nous avons aussi préparé un mélange physique qui nous servira de point de repère dans la partie caractérisation.

#### II. 2.6. Caractérisation des complexes d'inclusion

La meilleure préparation obtenue (optimum) lors de l'étape précédente ainsi que le mélange physique correspondant ont été caractérisés par spectroscopie Infrarouge et par balayage calorimétrique différentielle (DSC). Ces caractérisations ont comme but principale de prouver l'inclusion du cholestérol dans la CD.

##### II. 2.6.1. Analyse par spectroscopie IR

###### II.2.6.1.1. Matières premières et matériels utilisés

###### ➤ Matières premières

- HPβCD (Orsan (France)).
- Cholestérol (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen).
- Complexes d'inclusions obtenus: cholestérol/HPβCD.
- Bromure de potassium KBr (Biochem).

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

---

#### ➤ Appareillage

- Spectroscopie IR (IR SHIMADZU).
- Presse (SHIMADZU).

#### II.2.6.1.2. Méthodes

Des pastilles à base de : KBr - complexe d'inclusion et KBr - mélange physique ont été préparés. Ils ont été analysés par la spectroscopie IR sous des fréquences allant de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### II.2.6.2. Balayage calorimétrique Différentiel (DSC)

##### II.2.6.2.1. Matières premières et matériels utilisés

#### ➤ Matières premières

- HP $\beta$ CD (Orsan (France)).
- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Complexe d'inclusion et mélange physique : Cholestérol/HP $\beta$ CD.

#### ➤ Appareillages

- DSC Linseis (STAPT 1600).

#### II.2.6.2.2. Méthodes

L'analyse thermique a été effectuée en utilisant un DSC Linseis (STAPT 1600), équipé d'un système d'alimentation compensé. Tous les échantillons ont été pesés à environ 5 mg dans des capsules en aluminium et chauffés avec une vitesse de  $10\text{ °C / min}$  dans un intervalle de températures allant de  $30\text{ °C}$  à  $350\text{ °C}$  sous un courant d'azote gazeux.



### II.3. Amélioration de la conservation du sperme bovin par l'addition des complexes vit E/ CD et CHL/CD

#### II.3.1. Réfrigération du sperme de bovin

##### II.3.1.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières**

- Complexes d'inclusion (VIT E/ CD et CHL/CD).
- Tris.
- Acide citrique.
- Fructose.
- Pénicilline.
- Testicules de bovin.

➤ **Appareillages**

- Balance analytique (Denver).
- Plaque agitatrice multiple (Velp Scientifica).
- Réfrigérateur biologique (LG).
- Microscope CASA (MiKoneclipse E200).

##### II.3.1.2. Méthodes

➤ **Préparations du tampon Tris (TB : tris buffer) [109]**

La solution de tris est préparée de la manière suivante : Dissoudre : 2.5 g d'acide acétique, 1.8 g de fructose, 4.35 g de tris et 0.2 g de pénicilline, dans 180 ml d'eau distillée.

➤ **Préparation des solutions des complexes d'inclusion**

Préparer des solutions (dans le tampon tris) à base des complexes d'inclusion équivalentes à 2 mg/ml en vitamine E et à 1,7 mg/ml en cholestérol. Laisser sous agitation à l'abri de la lumière pendant 2 heures.

## Chapitre II

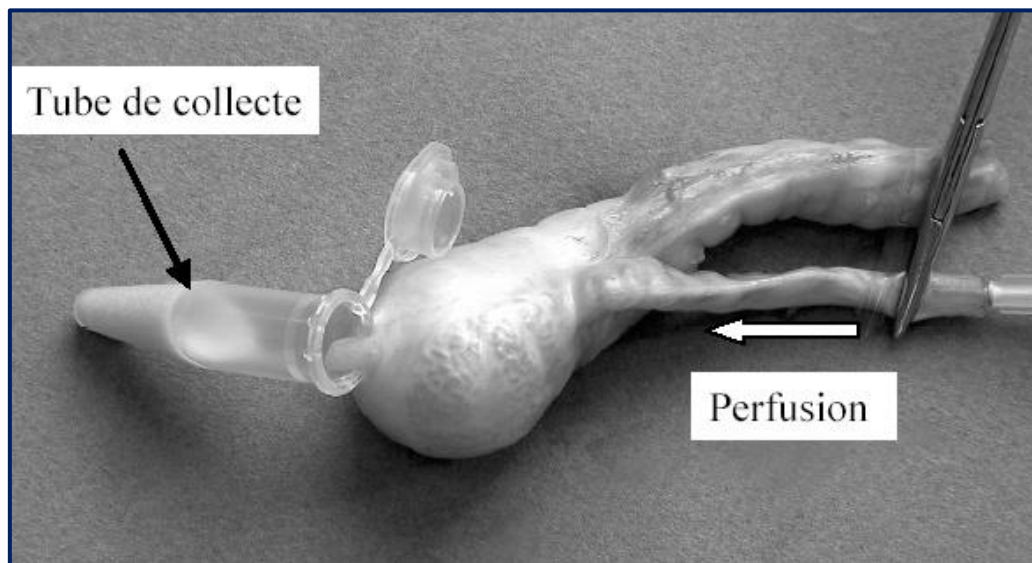
### Matériels et méthodes

#### ➤ Récolte du sperme épидидymaire du bovin

Après abattage, les gonades sont transportées dans une glacière au laboratoire dans les plus courts délais :

- Après nettoyage de la matrice, on commence par isoler l'épididyme et le canal déférent du testicule.
- Le tissu conjonctif est soigneusement séparé de l'épididyme.
- L'épididyme est ponctionné puis rincé avec une solution physiologique pour éviter toute contamination de la semence.
- Récupération du sperme par la méthode de pression à l'aide d'une seringue introduite dans le canal déférent et qui va pousser le sperme vers la sortie (incision) déjà faite au niveau de la queue épидидymaire.
- Les spermatozoïdes récupérés seront placés dans un eppendorf.

La figure VI.1. représente la méthode de collecte des spermatozoïdes du bovin.



**Figure II.1.** La collecte des spermatozoïdes du bovin.

#### ➤ Réfrigération du sperme

- Juste après la récolte de la semence, le volume et la motilité massale sont évalués.
- On utilise le formol pour fixer les spermatozoïdes.
- On dilue la semence à 1/200 afin de déterminer la concentration (nombres des spermatozoïdes).

## Chapitre II

---

### Matériels et méthodes

- Ensuite on dilue le sperme dans 900  $\mu\text{L}$  avec ou sans traitement (contrôle) pour avoir une concentration finale de  $100 \times 10^6$  spz/mL.
- L'analyse s'effectue à l'aide du CASA, à 15 min, 2 heures, 4 heures et à 24 heures de réfrigération à  $T = 4^\circ\text{C}$ .

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussions**

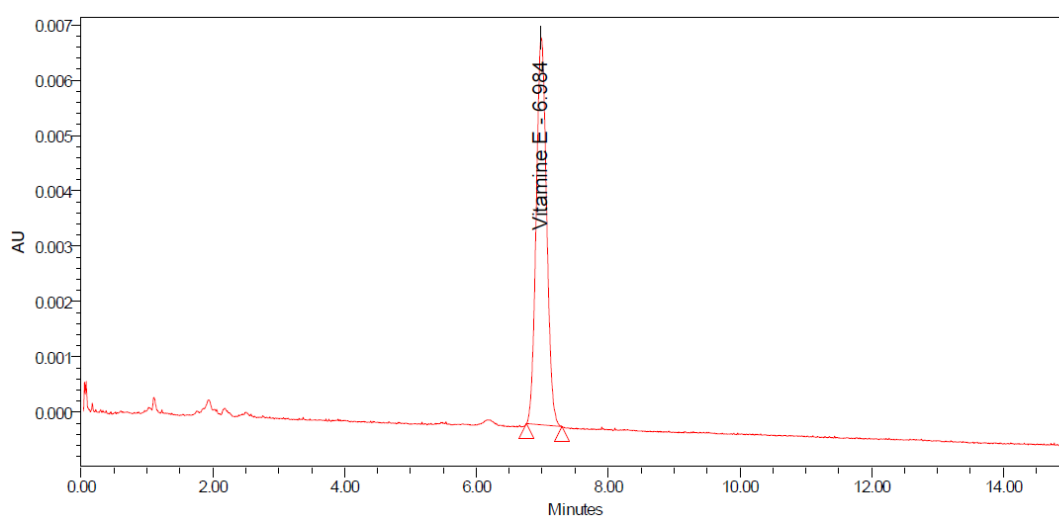
## III.1. Vitamine E

### III.1.1. Vérification de la méthode de dosage par HPLC

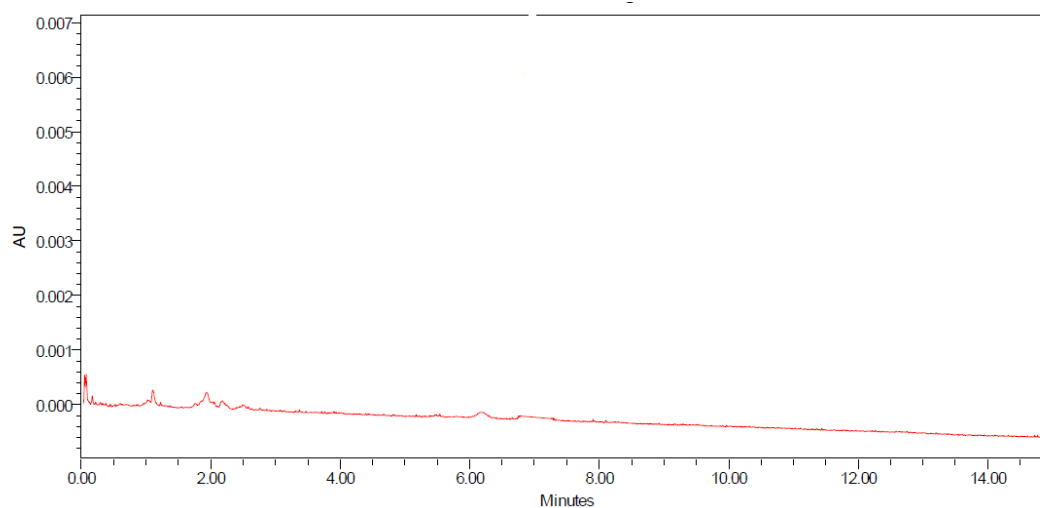
#### III.1.1.1. Spécificité

##### III.1.1.1.1. Résultats

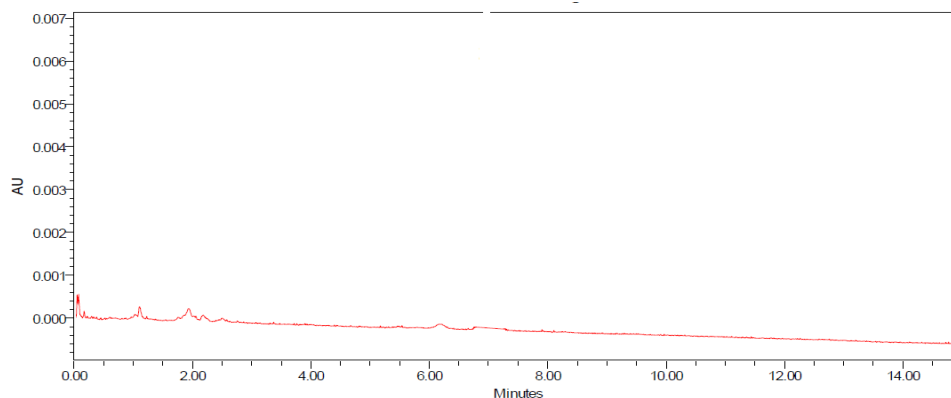
Les figures III.1, III.2 et III.3 représentent respectivement les chromatogrammes obtenus pour la vitamine E à (0,05 mg/ml), le diluant (eau distillée) et la  $\beta$ CD.



**Figure III.1.** Chromatogramme de la Vitamine E.



**Figure III.2.** Chromatogramme de l'eau distillée.



**Figure III.3.** Chromatogramme de la  $\beta$ -CD.

### III.1.1.1.2.Observations

Le chromatogramme de la vitamine E présente un pic à un temps de rétention égale à 7 min par contre le diluant (eau distillée) et  $\beta$ -CD ne présentent aucun pic dans cette zone de temps.

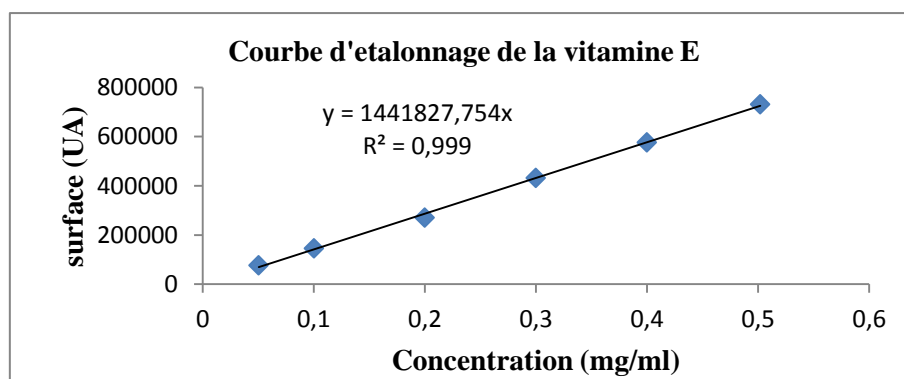
### III.1.1.1.3.Interprétations des résultats

Les résultats obtenus montrent que l'eau distillée et la  $\beta$ -CD n'interfèrent pas dans la quantification de la vitamine E, donc la **spécificité est montrée**.

### III.1.1.2. Linéarité et courbe d'étalonnage

#### III.1.1.2.1. Résultats

La figure III.4 représente la courbe d'étalonnage de la vitamine E.



**Figure III.4.** Courbe d'étalonnage de la vitamine E

### III.1.1.2.2 Observations

On remarque que la droite de régression passe par la majorité des points, cette dernière est sous forme  $y = a \cdot x$ , où  $a = 1441827,754$ .

### III.1.1.2.3. Interprétations des résultats

La courbe : surface = f (C) montre qu'il y a une relation linéaire entre les surfaces et les concentrations de la vitamine E dissoute. Ceci est justifié par le coefficient de corrélation  $R^2$  qui est égale à 0,999. Ainsi la **linéarité est vérifiée**.

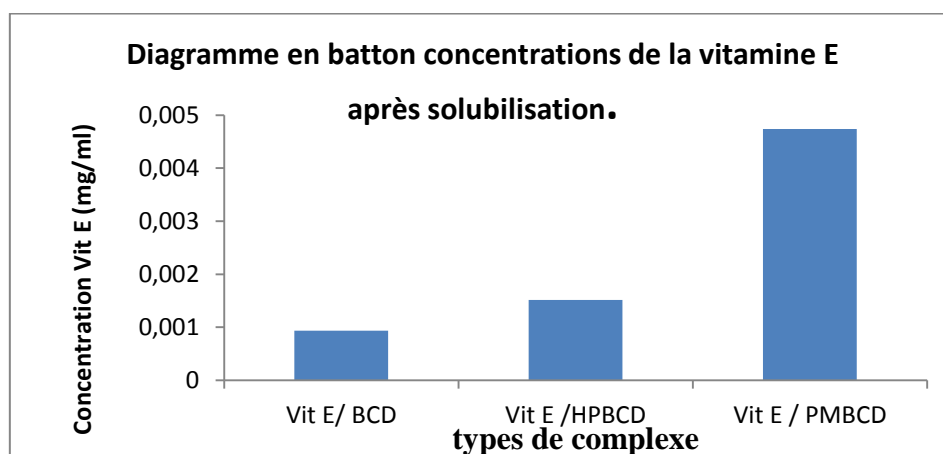
## III.1.2. Sélection de la cyclodextrine adéquate pour la solubilisation de la vitamine E

### III.1.2.1. Résultats

Les concentrations de la vitamine E dissoute dans l'eau distillée après agitation de 2H sont présentées dans le tableau III.1 ainsi que la figure III.5, les résultats bruts sont joints en annexe 2.

**Tableau III.1.** Concentrations de la vitamine E après solubilisation.

Echantillon	Air de pic	Concentration de Vit E (mg/ml)	Facteur de solubilisation
Vit E seule	/	0,000800000	/
Vit E / $\beta$ CD	1351	0,000937005	1,17
Vit E/HP $\beta$ CD	2182	0,001513357	1,89
Vit E/ PM $\beta$ CD	6827	0,004734962	5,92



**Figure III.5.** Concentrations de la vitamine E après solubilisation.

### III.1.2.2. Observations

On voit que la concentration de la Vit E varie selon le type des CDs, la valeur la plus petite est obtenue avec la CD native et les valeurs les plus grandes sont obtenues avec les CDs modifiés.

### III.1.2.3. Interprétations

D'après les résultats obtenus la PM $\beta$ CD est la plus efficace en termes d'amélioration de solubilité, son utilisation nous a permis d'obtenir une augmentation de 6 fois par rapport à la solubilité de la Vit E seule. Ceci peut être attribué à la présence des groupements méthyle, qui perturbent les liaisons hydrogènes, et augmentent la solubilité intrinsèque de la CD native [95].

En deuxième position on trouve HP $\beta$ CD qui augmente 2 fois plus la solubilité de la Vit E, Cela peut être expliqué par le fait du greffage des groupements hydroxy propylées sur les cyclodextrines, leurs conférant ainsi une solubilité intrinsèque plus importante [95]. Par conséquent ces dernières forment des complexes plus solubles. Des résultats similaires furent retrouvés lors de l'étude de l'impact des cyclodextrines sur la camptothécine [110, 111].

**NB :** La PM $\beta$ CD est le meilleur agent de la solubilisation de la Vit E, par conséquent il a été sélectionné pour la suite de nos travaux.

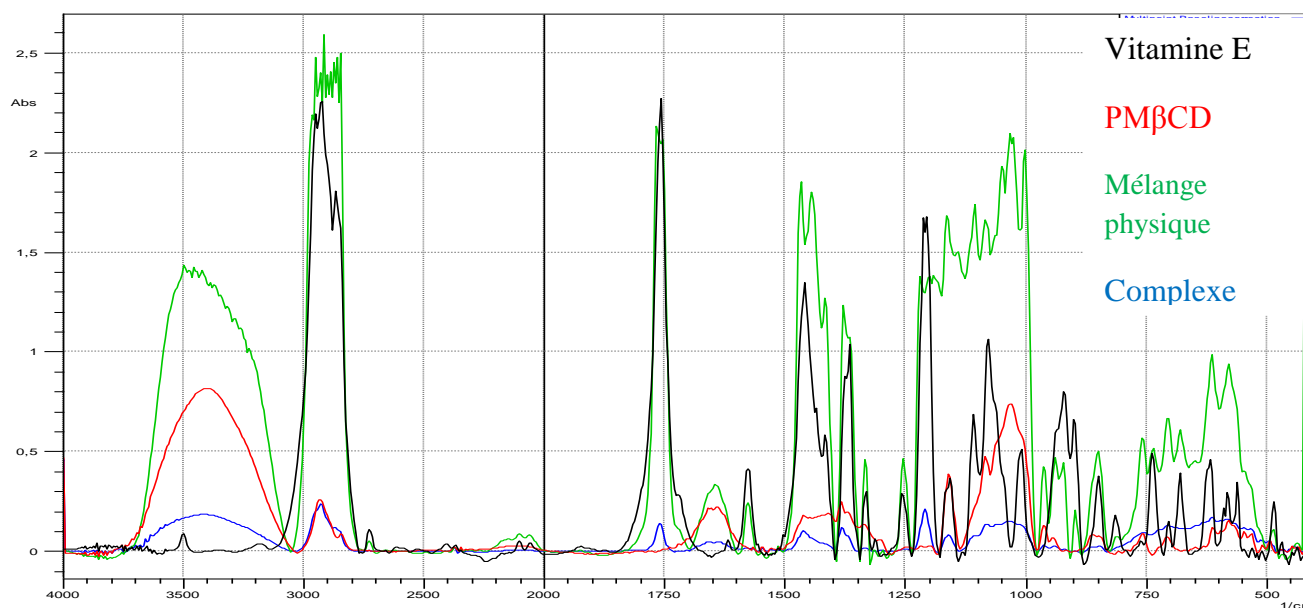
## III.1.3. Caractérisation des complexes d'inclusion

### III.1.3.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

#### III.1.3.1.1. Résultats

La superposition des spectres infrarouges des matières premières, mélanges physiques ainsi que le complexe d'inclusion est représentée dans la figure III.6. Les résultats bruts sont joints en annexe 3.





**Figure III.6.** Spectre Infrarouge de la Vitamine E, PM $\beta$ -CD, de leur mélange physique et de leur complexe

### III.1.3.1.2. Observations

- Pour le spectre de la vitamine E, on remarque trois (03) bandes caractéristiques à :  $\bar{\nu}_1= 2920\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_2=2860 \text{ cm}^{-1}$  et  $\bar{\nu}_3= 1760 \text{ cm}^{-1}$ .
- Le spectre de la PM $\beta$ CD possède trois (03) bandes caractéristiques à  $\bar{\nu}_1=2920 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_4= 3400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_5= 1650 \text{ cm}^{-1}$ .
- Dans le spectre du mélange physique, on retrouve les bandes caractéristiques :  $\bar{\nu}_1= 2920 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_2=2860 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_3=1760 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_4= 3400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_5= 1650 \text{ cm}^{-1}$ .
- Le complexe possède les bandes caractéristiques suivantes :  $\nu_1= 2920 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_2=2860 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_3=1760 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_4= 3400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}_5= 1650 \text{ cm}^{-1}$ .

### III.1.3.1.3. Interprétations

D'après les observations (a, b et c), on peut dire qu'il n'y a pas eu inclusion proprement dite dans le mélange physique ; car la présence de toutes les bandes caractéristiques sans changement notable indique fortement la présence de deux composés sans changement (PM $\beta$ CD et vit E).

- L'observation (d), nous indique :

- La formation de complexes ou du moins inclusion de certains groupements dans la cavité de la CD (diminution de l'intensité de certaines bandes  $\bar{\nu}_2= 2860 \text{ cm}^{-1}$  (groupement C-H) et  $\bar{\nu}_3= 1760 \text{ cm}^{-1}$  (groupement C=O). Cela est logique, car ces

groupements sont plutôt de nature apolaire, ce qui les pousse à interagir et à être attiré vers la cavité hydrophobe de la PM $\beta$ CD.

### **III.1.3.2. Balayage Calorimétrique Différentiel (DSC)**

#### **III.1.3.2.1. Résultats**

Les thermogrammes obtenus sont joints en annexe 4.

#### **III.1.3.2.2. Interprétations**

Les thermogrammes des cyclodextrines, vitamine E et complexe vit E/PM $\beta$ CD n'ont données aucun changement état, ce qui est en désaccords avec les donnée de la littérature [115, 116, 117, 118], la seule explication plausible, est un dysfonctionnement de l'appareil.

## **III.2. Cholestérol**

### **III.2.1. Vérification de la méthode de dosage par HPLC**

#### **III.2.1.1. Spécificité**

##### **III.2.1.1.1. Résultats**

Les chromatogrammes de cholestérol, diluant (méthanol/eau distillée) et  $\beta$ -CD, sont joint en annexe 5.

##### **III.2.1.1.2. Observations**

Le chromatogramme du cholestérol présente un pic à un temps de rétention égale à 4 min par contre le diluant (méthanol/eau distillée) et la  $\beta$ -CD ne représentent aucun pic à ce même temps (4min).

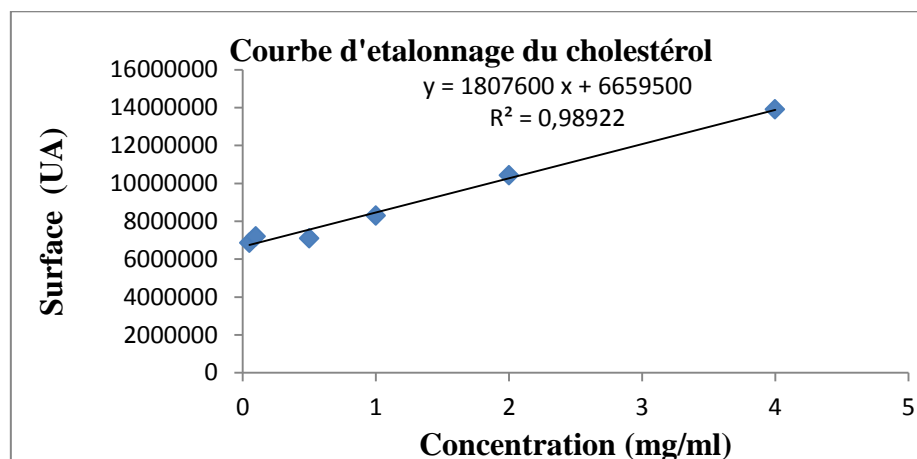
##### **III.2.1.1.3. Interprétations**

Les résultats obtenus montrent que le diluant et la  $\beta$ -CD n'interfèrent pas lors de la quantification du cholestérol, donc la **spécificité est vérifiée**.

#### **III.2.1.2. Linéarité et courbe d'étalonnage**

##### **III.2.1.2.1. Résultats**

La figure III.7. Représente la courbe d'étalonnage de cholestérol (courbe de linéarité)



**Figure III.7.** Courbe d'étalonnage de cholestérol

### III.2.1.2.2. Observations

On remarque que la droite de régression passe par la majorité des points, cette dernière est sous forme  $y = a \cdot x + b$  où  $a = 1807600$  et  $b = 6659500$ .

### III.2.1.2.3. Interprétations

La courbe obtenue montre qu'il y a une relation linéaire entre les aires des pics et les concentrations en cholestérol, ceci est justifié par un coefficient de corrélation  $R^2$  égal à 0,98922 proche de l'unité. Sauf que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement proche de zéro, c'est ainsi que nous avons choisi de travailler avec les aires de pic que les concentrations.

## III.2.2. Optimisation du complexe d'inclusion (CHL/CD)

### III.2.2.1. Analyse de la matrice d'expérience complétée

#### III.2.2.1.1. Résultats

Les résultats bruts obtenus lors du test de solubilité, sont insérés dans la matrice d'expérience (Tableau III.2.). Les résultats bruts sont joints en annexe 6.

**Tableau III.2.** Matrice d'étude complétée

Factors: 3 (uncontrolled: 0)		Responses: 1	Runs: 18	Objective: RSM			D-Optimal - quadratic		
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	cd	ratio	volume	Air de pic	
1	1	N1	9	Incl	bcd	0,25	25	5,62091e+006	
2	3	N3	18	Incl	bcd	4	25	7,07658e+006	
3	4	N4	8	Incl	bcd	4	35	6,78126e+006	
4	5	N5	5	Incl	bcd	1	10	6,41774e+006	
5	6	N6	7	Incl	bcd	3	10	6,90279e+006	
6	7	N7	10	Incl	bcd	1	50	5,20066e+006	
7	8	N8	6	Incl	bcd	3	50	6,08252e+006	
8	10	N10	12	Incl	hpbcd	4	10	7,56184e+006	
9	11	N11	4	Incl	hpbcd	0,25	50	6,30257e+006	
10	12	N12	14	Incl	hpbcd	4	50	7,18413e+006	
11	13	N13	16	Incl	hpbcd	2	30	7,06754e+006	
12	14	N14	19	Incl	pmbcd	0,25	10	5,99742e+006	
13	15	N15	2	Incl	pmbcd	4	10	7,28178e+006	
14	16	N16	11	Incl	pmbcd	0,25	50	6,72942e+006	
15	17	N17	17	Incl	pmbcd	4	50	6,93226e+006	
16	18	N18	13	Incl	pmbcd	2	30	6,27228e+006	
17	19	N19	19	Incl	pmbcd	2	30	6,27228e+006	
18	20	N20	1	Incl	pmbcd	2	30	6,27228e+006	

### III.2.2.1.2. Observations

On remarque que les airs de pics varient selon le ratio molaire, le volume et le type de CD. La valeur minimale est obtenue avec la  $\beta$ CD à un ratio 1 :1. Les plus grandes airs des pics sont obtenues lors de l'utilisation de : l'HP $\beta$ CD, à un ratio de 4 et à des faibles volumes de solvant.

### III.2.2.1.3. Interprétations

Les résultats obtenus suggèrent que HP $\beta$ CD est l'agent solubilisant le plus efficace pour le cholestérol. Cela est en rapport avec : sa solubilité intrinsèque plus élevée par rapport à la  $\beta$ CD [112].

### III.2.2.2. Modèle mathématique proposé

Réponse = cts +  $a_1$  CD +  $a_2$  ratio +  $a_3$  volume +  $a_4$  ratio<sup>2</sup> +  $a_5$  volume<sup>2</sup> +  $a_1 a_2$  CD\*ratio +  $a_1 a_3$  CD\*volume +  $a_2 a_3$  ratio\*volume.

Avec :

- Réponse : est la solubilité.
- $a_1, a_2, a_3, a_4$  et  $a_5$  sont les coefficients du polynôme.

Ci-dessous les équations correspondantes pour chaque type de CDs :

**Pour la  $\beta$ CD :** Solubilité = cts - 346472  $\beta$ CD + 505127 ratio - 198943 volume + 158489 ratio<sup>2</sup> + 85895,3Volume<sup>2</sup> + 187221 CD\*ratio - 315148  $\beta$ CD\*volume - 99931,7 ratio\*volume.

**Pour la HP $\beta$ CD :** Solubilité = cts + 349995HP $\beta$ CD + 505127 ratio - 198943 volume + 158489 ratio<sup>2</sup> + 85895,3Volume<sup>2</sup> - 59440,2 HP $\beta$ CD \*volume - 99931,7 ratio\*volume.

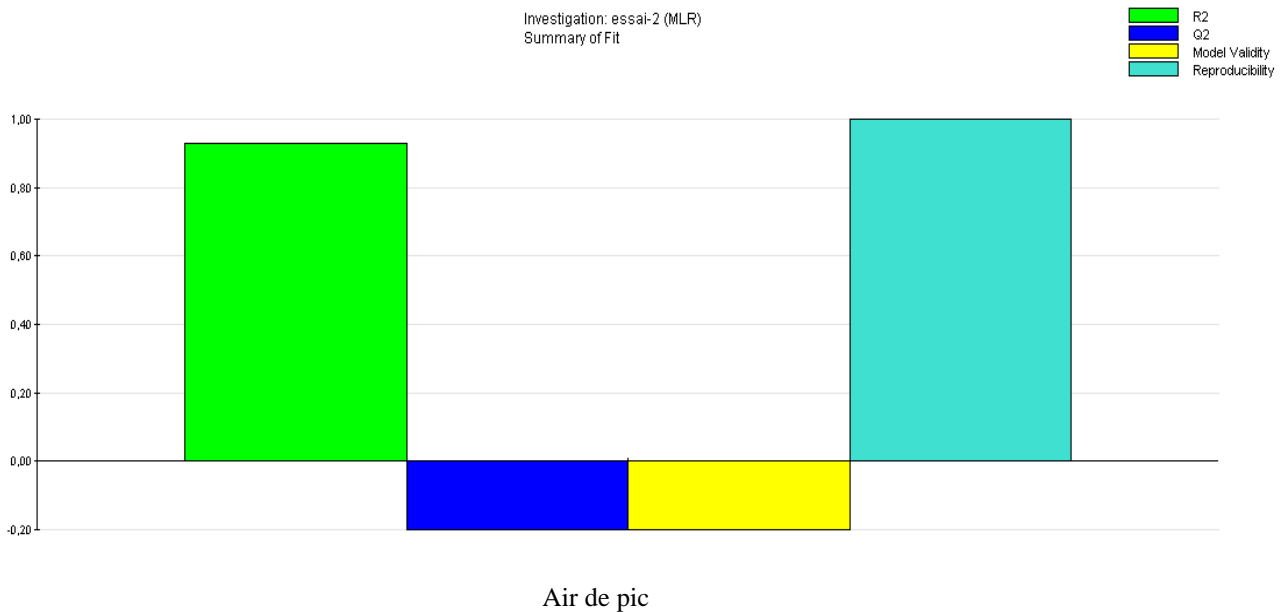
**Pour la PM $\beta$ CD :** Solubilité = cts + -3522,99PM $\beta$ CD + 505127 ratio - 198943 volume + 158489 ratio<sup>2</sup> + 85895,3Volume<sup>2</sup> - 127781 PM $\beta$ CD \* ratio + 294564 PM $\beta$ CD \*volume - 99931,7 ratio\*volume.

### III.2.2.3. Analyse des effets propres des facteurs sur la réponse

#### III.2.2.3.1. Résultats

- Les paramètres statistiques  $R_2$  et  $Q_2$  traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus. Lorsque ces deux derniers tendent vers 1, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse totalement. En revanche lorsque  $R_2$  ou  $Q_2$  tendent vers 0, alors le modèle ne peut être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses.
- Lorsque la barre de la validité du modèle est plus grande que 0,25, il n'y a pas de manque d'ajustement du modèle (l'erreur du modèle est dans la même plage que l'erreur pure). Une barre de la validité du modèle de 1 représente un modèle parfait. Lorsque la validité du modèle est inférieure à 0.25 il y a une importante FL et l'erreur du modèle est nettement plus grande que l'erreur pure (reproductibilité).

La figure III.8. Représente un résumé des facteurs statistiques obtenus après fitting de nos résultats.



**Figure III.8.** Facteurs statistique obtenus.

Pour mieux exploiter ces résultats, les valeurs numériques de ces caractéristiques statistiques sont résumées dans le tableau III.3.

**Tableau III.3.** Valeurs numériques des caractéristiques numériques.

	R <sub>2</sub>	Q <sub>2</sub>	Validité du modèle	Reproductibilité
Air de pic	0,929742	-87,7352	-0,2	1

### III.2.2.3.2. Interprétation des résultats

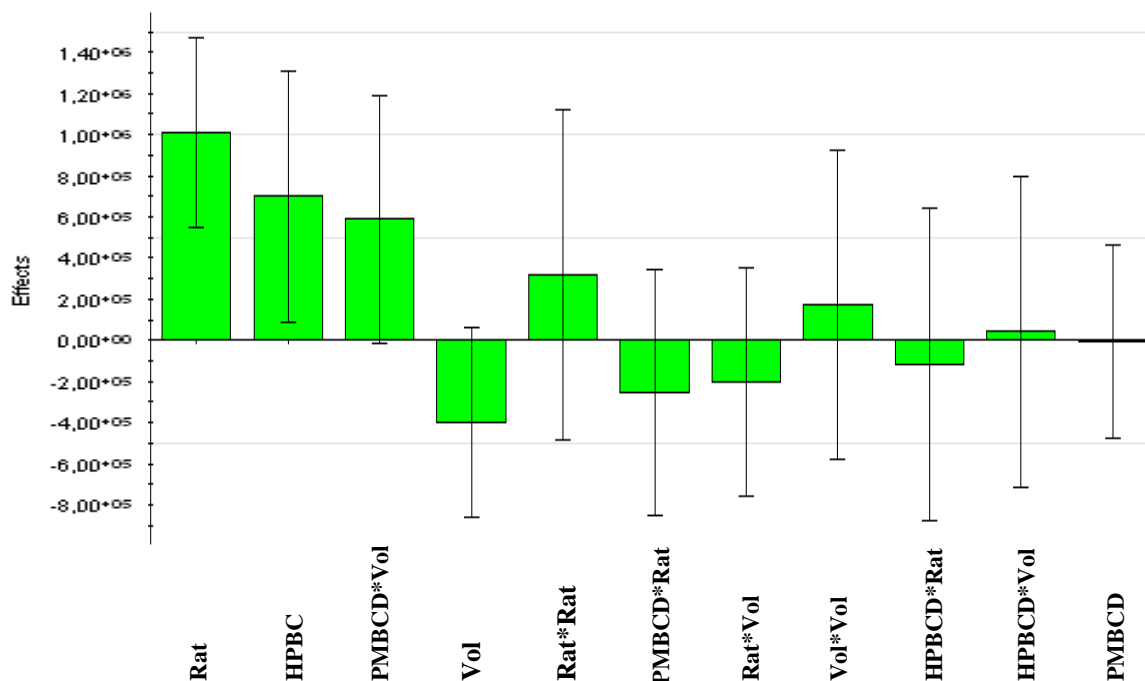
D'après les résultats obtenus :

- la valeur de R<sub>2</sub> tend vers 1(0,9297) par conséquent on peut dire que notre model explique l'effet des facteurs sur la réponse choisit. Par contre la valeur de Q<sub>2</sub> est de -87,7352, ce qu'indique que le modèle obtenu ne prédit pas les quantités de cholestérol dissoute après complexation.
- La validité du modèle est inférieure à 0,25, donc y a un manque d'ajustement du modèle (l'erreur du modèle est nettement plus grande que l'erreur pure (reproductibilité).
- Pour la reproductibilité, nous avons une valeur à 100%, Cela signifie que dans les mêmes conditions, les valeurs de la réponse sont identiques.

### III.2.2.4. Etude des effets propre des facteurs sur les réponses

#### III.2.2.4.1. Résultats

La figure III.9. représente les effets propres des facteurs sur la solubilité du cholestérol.



**Figure III.9.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la solubilité du cholestérol

#### III.2.2.4.2. Observations

- ✓ On remarque que les deux facteurs (ratio molaire et type des CDs) influent positivement (barre dirigée vers le haut), et le troisième facteur (le volume) influe négativement (barre dirigée vers le bas).

#### III.2.2.4.3. Interprétations

- ✓ L'influence positive des deux facteurs (ratio molaire et type des CDs) sur la réponse, montre que l'HP $\beta$ CD à un ratio de 4 donne une meilleure solubilité au CHL, c'est un résultat qui est dans la continuité de ce que nous avons déjà trouvé, il peut être expliqué par :
  - Présence des groupements hydroxy propylés.

- L'inclusion partielle de la molécule de CHL par la cavité de la CD, ce qui explique le nombre d'association de 4 CDs : 1 CHL, des résultats similaires ont déjà été trouvés lors de l'étude du complexe d'inclusion du cholestérol/HP $\beta$ CD par Robert Williams [112].

- ✓ L'influence négative du troisième facteur (le volume) indique que l'on doit utiliser le moins possible de solvant, là aussi c'est un résultat qui reste dans la continuité de ce que l'on a déjà trouvé.

### III.2.2.5. Détermination de la région optimale et de l'optimum

#### III.2.2.5.1. Résultats

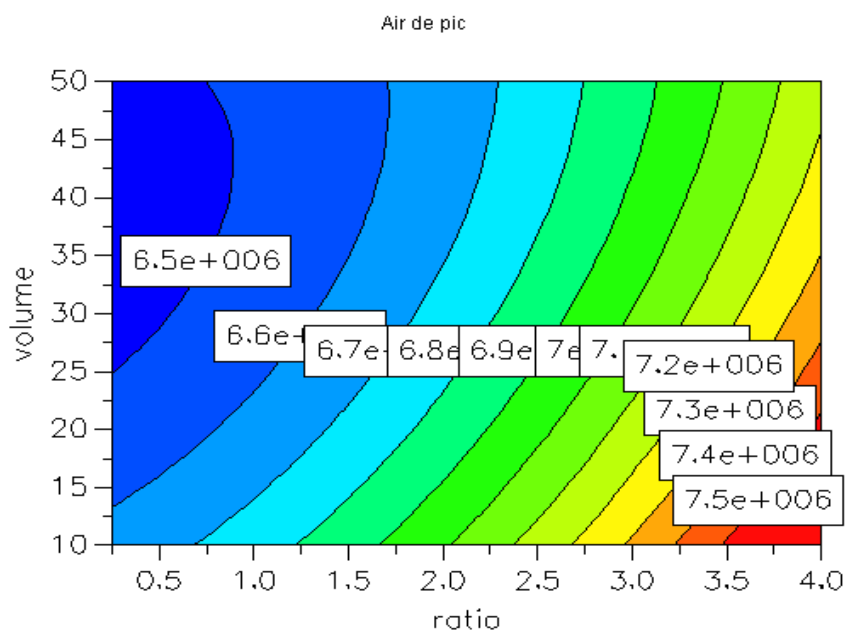
- En introduisant les valeurs obtenues des airs de pics dans la matrice d'expérience, on obtient l'optimum présenté dans le tableau III.4.

**Tableau III.4.** Détermination de l'optimum

cd	ratio	volume	Air de pic
hpbcd	3,9999	10,0017	7,72947e+006
hpbcd	4	10	7,72953e+006
hpbcd	4	10,0031	7,72944e+006
hpbcd	3,9537	10,0001	7,70831e+006
hpbcd	4	10,0045	7,72941e+006
hpbcd	4	10,0006	7,72951e+006
hpbcd	4	10	7,72953e+006
hpbcd	3,9537	10,0001	7,70831e+006

- La figure III.10. ci-dessous présente la courbe iso-réponse obtenue par le logiciel MODDE6.





**Figure III.10.** Courbe iso-réponse

### III.2.2.5.2. Observations

On remarque que l'optimum est obtenu lorsque les facteurs prennent les valeurs suivantes :

- Ratio molaire est de 4.
- Volume du solvant est de 10 ml.
- Type de CD est HP $\beta$ CD.

D'après la courbe iso-réponse les meilleurs résultats de solubilité sont obtenus dans l'intervalle [3, 5, 4] pour le ratio molaire et [10-15] pour le volume (zone rouge).

### III.2.2.5.3. Interprétations

D'après les résultats obtenus :

- L'HP $\beta$ CD est la plus efficace en termes d'amélioration de solubilité, cela peut être expliqué par le fait du greffage des groupements hydroxy propylés sur les CDs, leurs conférant ainsi une solubilité intrinsèque plus importante [4].
- L'inclusion partielle de la molécule de CHL par la cavité de la CD, ce qui explique le nombre d'association de 4CDs : 1 CHL, des résultats similaires ont déjà été trouvés lors de l'étude du complexe d'inclusion du cholestérol/HP $\beta$ CD par Robert Williams et al [112].

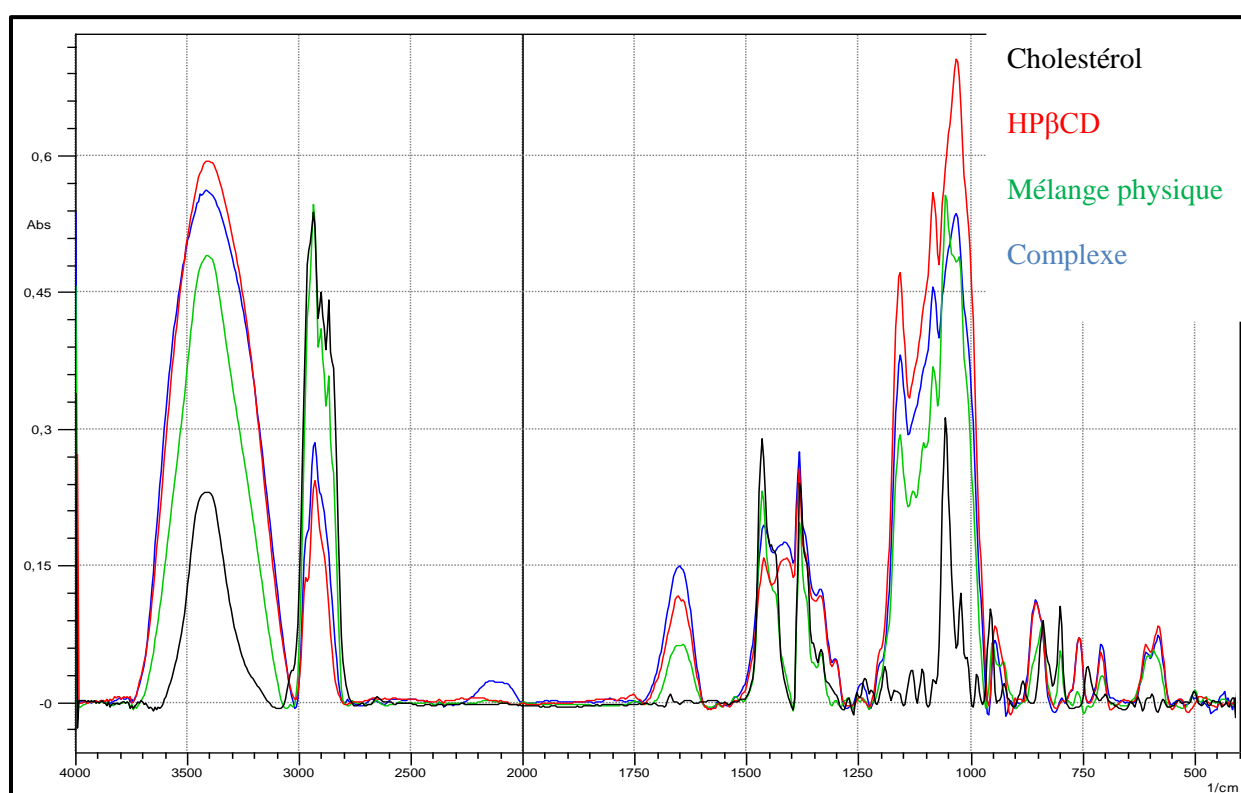
**NB :** La courbe iso-réponse montre que la région optimal est située vers la borne inférieure droite, cela indique que si on allait plus loin dans les concentrations on peut obtenir des meilleurs résultats de solubilité.

### III.2.3. Caractérisation du complexe d'inclusion CHL/CD

#### III.2.3.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

##### III.2.3.1.1. Résultats

La superposition des spectres infrarouges des matières premières, mélanges physiques ainsi que le complexe d'inclusion est représentée dans la figure III.11. Les résultats bruts sont joints en annexe 7.



**Figure III.11.** Spectre Infrarouge du cholestérol, HPβ-CD, de leur mélange physique et de leur complexe.

##### III.2.3.1.2. Observations

On remarque que les quatre spectres donnent trois pics caractéristiques  $\bar{\nu}_1 = 3400 \text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $\bar{\nu}_2 = 2900 \text{ cm}^{-1}$  (C-H), et  $\bar{\nu}_3 = 1650 \text{ cm}^{-1}$  (C=C).

##### III.2.3.1.3. Interprétations

Finalement, comme déjà soulevé dans la littérature, l'IR n'est pas la meilleure méthode qui nous permet de prouver l'inclusion, surtout lorsque la molécule invitée présente presque les mêmes groupements que les CDs, ce qui le cas pour le cholestérol [112].

### III.2.3.2. Balayage calorimétrique Différentiel (DSC)

#### III.2.3.2.1. Résultats

Les thermogrammes obtenus sont joints en annexe 8.

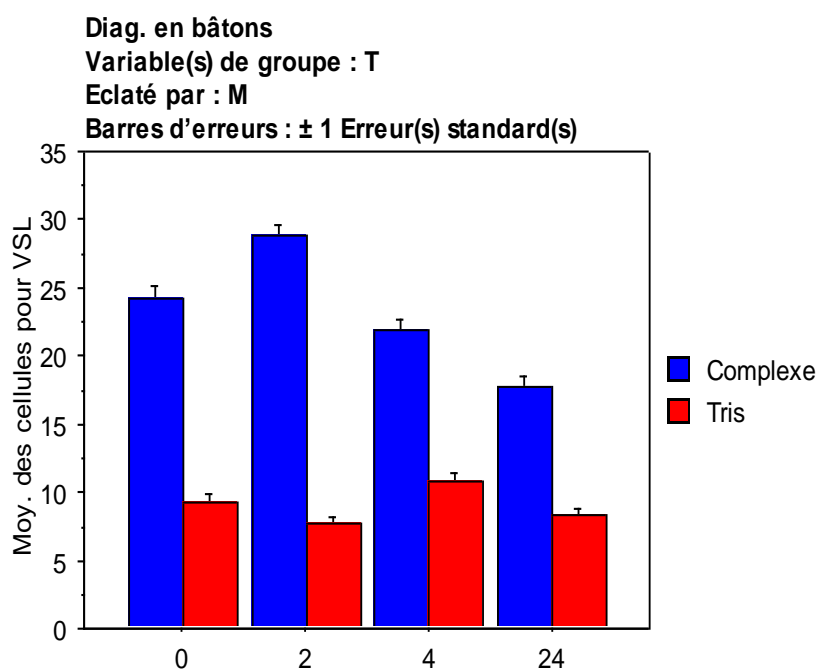
#### III.2.3.2.2. Interprétations

Les thermogrammes des cyclodextrines, cholestérol et complexe chol/HP $\beta$ CD n'ont donnés aucun changement état, ce qui est en désaccords avec les résultats trouvés dans la littérature [115, 116, 117, 118], nous proposons une explication plausible, qui est un dysfonctionnement de l'appareil.

## III.3. Amélioration de la conservation du sperme bovin par l'addition des complexes vit E/ CD et CHL/CD

### III.3.1. Résultats

La figure III.12 représente les vitesses linéaires VSL des spermatozoïdes.



**Figure III.12.** Diagramme en bâton des vitesses linéaire (VSL) des spermatozoïdes

### III.3.2. Observations

On observe que les valeurs maximales de la VSL, sont obtenues lors du traitement de la semence par le mélange de complexes d'inclusion.

### III.3.3. Interprétations

Le fait d'avoir des vitesses plus élevées chez les SPZ traités par l'addition des deux complexes Vit E/ PM $\beta$ CD et Chl/HP $\beta$ CD par rapport aux contrôles prouve que :

- Les CDs ont améliorés la solubilités des deux molécules hydrophobe Vit E et Chol.
- le CHL a joué son rôle cryoprotecteur en maintenant la stabilité membranaire à basse température [4],
- la Vit E a aussi joué son rôle d'antioxydant en aidant à la préservation et la protection des SPZ de l'oxydation.

Une tendance similaire a été retrouvée par FATMI et al [109], lors de l'étude de l'impact des complexes d'inclusion vit E/ CD et CHL/ CD sur le sperme du chien.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

---

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est un antioxydant qui agit sur la membrane du spermatozoïde en se fixant aux radicaux libres, protégeant ainsi la cellule spermatique au cours de sa conservation. Le cholestérol a également un rôle important lors de cette conservation en réduisant la perméabilité des membranes spermatiques, ce qui conduit à la diminution des transferts d'eau, maintenant intact la structure membranaire des cellules au moment de la cryoconservation [3, 4, 5]. Cependant la faible solubilité de ces deux molécules dans des milieux physiologiques limite leurs actions.

Pour cela, nous nous sommes fixé comme objectifs :

- L'amélioration de la solubilité et la stabilité de la vitamine E (Vit E) et le cholestérol (Chol).
- La conservation du sperme du bovin.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons opté pour l'utilisation des cyclodextrines (CDs) en mettant à profit leurs propriétés structurales et physico-chimiques, notamment leur propriété de complexation.

Cette démarche a nécessité le passage par plusieurs étapes qui peuvent être résumées comme suit :

- L'optimisation et préparation des complexes d'inclusions Vit E/CDs et Chol/CDs par co-évaporation.

Les HP $\beta$ CD et PM $\beta$ CD sont apparues respectivement comme les meilleurs agents de solubilisation du Chol et Vit E, elles ont été ainsi sélectionnées pour les étapes ultérieures de notre travail expérimental.

- Par suite, nous avons caractérisé les complexes d'inclusions optimaux à l'aide de la méthode IR, ce qui a permis de démontrer que la Vit E et Chol ou une partie de ces dernières ont été encapsulées dans les cyclodextrines.

## Conclusion générale

---

- En dernier, il nous ait apparu plus qu'impératif, d'étudier l'impact de l'association des deux complexes optimaux : Vit E/PM $\beta$ CD et Chol/HP $\beta$ CD sur la conservation du sperme bovin. Cette étude, a montré clairement que la présence de la vitamine E et du cholestérol sous formes complexées améliore la conservation du sperme bovin.

En général, dans ce mémoire on a pu améliorer la solubilité du cholestérol et de la vitamine E en utilisant les CDs d'une part, tout en découvrant un effet synergique entre la vitamine E et d'autre part le cholestérol sous leurs formes complexées sur la conservation du sperme.

- Cela dit, ce travail peut être amélioré et complété par :
  - Des tests supplémentaires tels que : la solubilité et dissolution en milieu artificiel.
  - Des analyses ATG, DRX et RMN afin de prouver et de localiser l'inclusion des deux molécules hydrophobes étudiées.
  - Utiliser des marqueurs fluorescents afin de suivre le déplacement *in vivo* de nos molécules.
  - Ajouter à nos complexes après solubilisation de la vitamine C, qui selon la littérature, renforcera l'action de la vitamine E.

# **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

---

- [1]: E. Mocé, P.H. Purdy, J. K. Grahama: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V(2009).
- [2]: T. Takeo, T. Hoshii, Y. Kondo, H. Toyodome, H. Arima, K. Yamamura, T. Irie et N. Nakagata, Methyl-Beta-Cyclodextrine improves fertilizing 57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from cells, *Biology of reproduction*, Japan, (2008).
- [3]: Ammar Keskes, N. Feki, T. Rebai, *et al*: Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 49: (2003) 83-94.
- [4]: A I. Glazar, S F. Mullen, J. Benson, D. Critser, K. Squires & J K. Graham: Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59 (2009) 201-6.
- [5]: M. Aksoy, O. Akman, N C. Lehimcioglu, H. Erdem: Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 120 (2010) 166-72.
- [6]: Chafia Mammasse et Sara Matoube : Etude de l'impact des cyclodextrines sur la solubilité de la vitamine E et du cholestérol (2013).
- [7]: G. Somogyi , J. Posta, L. Buris , M. Varga: Cyclodextrin (CD) complexes of cholesterol – their potential use in reducing dietary cholesterol intake(2005).
- [8]: T.Gierlach, H. Ado and K. Lange: High performance liquid chromatographic determination of  $\alpha$ -tocopherol inclusion complexes with cyclodextrins (2011).
- [9] S. Moutard : relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles. Thèse de Doctorat. Université de Picardie Jules Verne.
- [10] : Jacquet Romain : Cyclodextrines hydrophiles: caractérisation et étude de leur propriétés énantioselective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse (2007).
- [11]: J. Szejtli: Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Budapest, Hungary: Akademiai Kiado (1982) 100-109.

## Références bibliographiques

---

- [12]: K. Matsunga, M. Imanaka, T. Ishida: Application of  $\gamma$ -Cyclodextrin to the separation of compounds extracted with organic solvents Anal. Chem ( 1982-1986).
- [13]: J. Szejtli: Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chem. Rev, vol. 98 (1998) pp. 1743-1753.
- [14] : Pascale Bonnet : Etude par modilisation moléculaire de dimeres des cyclodextrine et de leurs complexes d'inclusions.
- [15]: K. Uzkama: Pharmaceutical application of methylated cyclodextrins. Pharm. Int., 6 (1985) 61-65.
- [16]: K. Uekama et T. Irie: Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrin derivatives. In Duchene D, Cyclodextrins and Their Industrial Uses, Editions de santé, Paris (1987) 393-439.
- [17]: A.Yoshida, K. Arima, K.Uekama et J. Pitha: Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of  $\beta$ -cyclodextrins. Int. J. Pharm., 46 (1988) 217-222.
- [18]: K. Koizumi, Y. Okada et Y. Kubota: Inclusion complexes of poorly water-soluble drugs with glycosyl cyclodextrins. Chem. Pharm. Bull. 35 (1987) 3413-3418.
- [19]: M.Yamamoto, A.Yoshida et F. Hirayama : Some physicochemical propreties of branched  $\beta$ -cyclodextrins and their inclusion characteristics. Int. J. Pharm., 49 (1989) 163-171.
- [20]: J.Szejtli: Highly soluble  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. Starch/Starke, 36 (1984) 779-789.
- [21]: J. Szejtli: *cyclodextrin technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988).
- [22] : Guillaume Fleury : Des polyrotaxotaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique : les gels à points de réticulation glissants (2005).
- [23] : C. Marcopolus : Insertion cyclodextrines amphiphiles dans les membranes lipidiques (2011).
- [24]: R. Challa, A. Ahuja et J. Ali: Cyclodextrins in Drug Delivery. AAPS Pharm SciTech, Departement of Pharmaceutics, Faculty of Phamacy, Hamdard University, (New Delhi), pages 329-350 (2005).
- [25]: W.L. Hinze: Applications of cyclodextrins in chromatographic separations and purification methods, Separation and Purification (1981) 159-237.
- [26]: Forming et Szejtli: Cyclodextrins in pharmacy. K luwer Acad.pres, (Dordrecht)

## Références bibliographiques

---

- [27]: S. Charumanee, S. OKONOKI, et J. Sirithunyalug : Improvement of the Dissolution Rate by Surface Solid Dispersion, CMU. Journal, (3): (2004) 77.
- [28] : D. Castagne : Etude des interactions entre les cyclodextrine et les membranes liposomes ou biologique, thèse doctorat, université de Liège, Belgique (2005).
- [29] : M. Tharin : Synthèse de polyéthers linéaires et cycliques substitués par des cyclodextrines. Application en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire, thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, France (2002).
- [30] : S. Moutard : relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelle cyclodextrine amphiphile, thèse de doctorat, Université de Picardie, France (2000).
- [31] : Slimani née A. Kenech : Synthèse de nouveaux dérivés aziridines-cyclodextrine.
- [32]: T. Higuchi et K. Connors : Phase solubility technique. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, (1965).
- [33] :R., Snigh, N. Bahrti, J. Madan et S.N. Hiermath : Caractérisation of CD inclusion complexes- A review, *Journal of Pharmaceutical Science and Technologie*, Vol. 2 (2010) 171-183.
- [34]: H. Yang : Beta-cyclodextrin complexation and formulation as an anti HIV microbicide, thèse de doctorat, université de Pittsburg, USA(2008).
- [35]: C. Doijad, M. Kanakal et F. Manvi: Effet of processing variables on dissolution and solubility of piroxam: Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexe, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.69 (2007) 323- 326.
- [36]: Nitin MaskI, Arulkumaran, Kundlik Girhepunje, Prashant Ghode, Surajkumar Randive and Ranju Pal: Studies on the preparation, characterization and solubility of  $\beta$ -cyclodextrin-Diacerein inclusion complexes, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 1, Issue 2 (2009).
- [37]: Mukesh Chandra Sharma 1 et Smita Sharma: Preparation, physicochemical characterization, dissolution, formulation and spectroscopic studies of  $\beta$ -cyclodextrins inclusion complex, *International Journal of ChemTech Research* Vol.3, No.1 (2011) 104-111.

## Références bibliographiques

---

- [38]: Ana Figueiras, Laura Ribeiro et J. Torres-Labandeira: Evaluation of host-guest complex formation between a benzimidazolic derivative and cyclodextrins by UV-vis spectrophotometry and differential scanning calorimetry, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* (2007).
- [39]: Bisson-Boutelliez Catherine: *Desulfovibrio spp* dans la maladie parodontale : Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires, Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-1(2009).
- [40]: Michel Marin : La lyophilisation pour des produits de haute qualité. CBAI, INRA /INA P-G78850. Thiverval – Grignon (2003).
- [41]: M. Sauceau et J. Fages: Preparation of inclusion complex of piroxam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide], *Journal of Supercritical Fluids*, Vol.47 (2008) 326-332.
- [42]: K. Sekiguchi et N. Obi: Studies on absorption of eutectic mixture. II. Absorption of fused conglomerates of chloraphenicol and urea in rabbits, *Chem.Pharma.Bull*, Vol.12 (1964) 134-144.
- [43]: M. S. A. Khan: Solid dispersions: Formulation, caractérisation, perméabilité and genomec evaluation, these de doctorat, Université d'Aston, Angleterre (2010).
- [44]: P. JOB: Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. Chim.*, (9): (1928) 113-203.
- [45]: D. Duchene: Cyclodextrin and their Industriel Uses. Editions de Santé, (Paris), (1987).
- [46]: Ramnik Singh, Nitin Bharti, yotsana Madan et S. N. Hiremath: Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* Vol. 2 (3) (2010).
- [47]: J. Gross : Caractérisation de surfaces bio fonctionnalisées pour l'étude de protéines de la chaîne respiratoire par spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie, thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France (2011).
- [48]: Protocole expérimental et techniques d'analyse. Chapitre II.

## Références bibliographiques

---

- [49] : Y. Bakkour : Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées, thèse de fin d'étude Université des Sciences et Technologies de Lille1 (2005).
- [50] : Khalil Hanna : Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules cage dans la dépollution des sols. Solubilité et extraction de polluants organique par les cyclodextrines. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 18 novembre (2004).
- [51]: Sarah Gould et C. Scott: 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review. Science Direct. Food and Chemical Toxicology 43(2005) 1451–1459.
- [52]: Enhancement in susceptibility of cancer cells to Carb and 5-FU by MCD. Involvement of Akt, NF- $\kappa$ B and Bcl-2.
- [53] : Hélène Jeulin: Impact virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine aux cyclodextrines sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincare (2008).
- [54]: Delna Ghadiali : Aminolysis of the 4-acetoxybenzoate anion catalysed by cyclodextrins. Thèse de Doctorat. Université Montréal Québec canada (Aout 2000).
- [55] : Henri Pacheco : Le cholestérol, deuxième édition, Presses Universitaires de France (1969).
- [56]: T. Rog, M. Pasenkiewicz, I. Vattulainen and M. Karttunen: Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 1788(1) (2009)97-121.
- [57]: Aurélien Pommier : Rôle du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans le cancer de la prostate .Directeur de thèse (2010).
- [58]: J. Chakrabarty, D. Banerjee: Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54 (2007) 27-35.
- [59]: R. Amann, P. Pickett: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7 (1987) 145-73.
- [60]: P. Mazur: Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* (1984) 247 C125-42.
- [61]: A. Darin-Bennett et I G.White: Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14 (1977) 466-70.
- [62]: P F. Watson: The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 62 (1981) 483-92.

## Références bibliographiques

---

- [63]: I. White: Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5 (1993) 639-58.
- [64]: Bernatowicz et al: Bernatowicz, P, Nowakowski, M, Dodziuk, H & Ejchart: Determination of association constants at moderately fast chemical exchange: complexation of camphor enantiomers by alpha-cyclodextrin. *J Magn Reson* 181 (2006) 304-9.
- [65]: A M. Bliss, S P. Berghorn, K A. Haughian, J M. Farmerie, T A. Graham et Roberson: Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J Biol Chem* 278 31(2003) 593-602.
- [66]: P. Purdy et H. Graham: Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48 (2004) 36-45.
- [67]: H.Evans, K.S.Bishop: On the relation between fertility and nutrition. I. The ovulation rhythm in the rat on a standard nutritional regime. *J. Metab. Res* (1992) 1-319.
- [68]: Vincent Gembus : Sur quelques utilisations d'époxydes en synthèse organique ; nouvelles voies d'accès au tocophérol et synthèse formelle de la borrélidine. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur (2006).
- [69]: Michèle Ake : Vitamines A, E et fer: statut de l'enfant d'âge préscolaire en Côte D'ivoire. Apports en nutriments de l'alimentation traditionnelle. Thèse de Doctorat. Université Montpellier-I (1999).
- [70]: Jennifer Hillan: Facts about vitamin E. IFAS Extension. FCS8641. Université de Florida (2006).
- [71] Pauline Elisabeth Pidou : La vitamine E chez le cheval : Synthèse bibliographique. Thèse Doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse (2010).
- [72]: Sarah Regina Pereira Camelo : Encapsulation de molécules hydrophobes par des structures bi-gels générées par prilling : relation structure-propriétés.
- [73]: C.Cuvelier, O. Dotreppe et L. Istass : Sources alimentaires et dosage de la vitamine E pdf.
- [74]: Claude Fernand Bourgeois : les vitamines dans l'industrie agroalimentaires. ISSN: 0243-5624. ISBN: 2-7430-0524-6. Editions Tec-Doc (2003).
- [75]: Absorption Distribution Métabolisme Elimination du Médicament.

## Références bibliographiques

---

- [76] : J. Pincemail, JO. Defraigne, M. Meurisse et R. Limet : Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. Medi-Sphere. MS 90. Décembre (1998).
- [77] : Djamia Wessem : détermination de la capacité antioxydante des huiles végétales : Huile d'olive de la wilaya de Tlemcen.
- [78] : C. Cuvelier, O. Dotreppe et L.Istasse : Département des Productions Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège B43, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.
- [79]: DL-alpha-tocopherol, Products for the Dietary Supplement, Beverage and Food Industries – Technical Information May (2005).
- [80]: E. Belajovà, M.Suhaj, Food Chemistry (2004) 339-343.
- [81]: G. Shui, L. Leong : Journal of Chromatography Chiaramonti N, thèse de Troisième Cycle, Université de Corse, (1996).
- [82] : R.Rosset et M. Cande : Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson, Paris (1991).
- [83]: U. Justesen, P. Knuthsen et L. Torben: Journal of Chromatography A, 799 (1998) 101-110.
- [84]: A. Escarpa et M. Gonzalez: Journal of Chromatography A, (1998), 823, 331-337.
- [85]: M.Careri, L. Elveri, A. Mangia et M. Musci: Journal of Chromatography A, 881, 449- 460. 53-Abidi S.L, Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. J.Chromatogr. A, 881 (2000) 197-216.
- [86] : Evolution des pratiques d'autoconservation de sperme et de garde des embryons avant et après les lois de bioéthique de Juillet 1994 : Incidences sur l'organisation des centres d'assistance médicale à la procréation.
- [87] : Sylvie Pinsonneault et Gail Ouellette : fertilité et milieux de travail. Fédération du Québec pour le planning des naissances, ISBN 2-9802393 (1997) 1-3.
- [88] : Jasmine Lefebvre : Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : Clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques. Thèse de Doctorat. Université de Montréal (2009).

## Références bibliographiques

---

- [89]: E. Tukaszewicz: Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa (2001).
- [90]: J. Peláez, D. C. Bongalhardoet, et J. A. Long: Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poult* (2011).
- [91]: E. Tukaszewicz, Wroclaw, Poland: Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa (2001) 55:1819-1829.
- [92]: S. Salamon, W.M.C. Maxwell: Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (1995) 185-249.
- [93]: Réviers Min Sauveur Bernard : Reproduction des volailles et production d'œufs, INRA paris (1988) 219-449 .
- [94]: Paméla et Virginie fuertes : congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale (2008).
- [95]: Kaneto Uekaa, Yashide Horiuchi, Masahiko Kikchi et Fmitoshi Hirayama: Enhanced dissolution and oral bioavailability of  $\alpha$ - tocophryl esters by dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation. *Journal of inclusion phenomena* (6) (1988) 167-174.
- [96]: N. KARUPPIAH, P. B. KAUFMAN, S. A. KAPUSTKA and A. SHARMA: Use of Cyclodextrine-Cholesterol Complex as a Primary Standard in Cholesterol Analysis (1993).
- [97]: M. Astrid: Separation and characterization of cis-trans isomers of a-tocotrienol by HPLC using a permethylated b-cyclodextrin phase. *Z Lebensm Unters Forsch A* (1998) 206: 9±13. Springer-Verlag (1998).
- [98]: S. K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. Vn Deurs and K. Sandvig: Extraction of Cholesterol with Méthyle- $\beta$ -cyclodextrine Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. *Molecular Biology of the Cell* (1999).
- [99]: A. Iaconinoto<sup>1</sup>, M. Chicca<sup>2</sup>, S. Pinamonti<sup>2</sup>, A. Casolari<sup>1</sup>, A. Bianchi<sup>1</sup>et S.Scalia<sup>1</sup>: Influence of cyclodextrin complexation on the photodegradation and antioxidant activity of a-tocopherol (2004).
- [100]: E-M. Han, J. Ahn and H-S. Kwak: Optimizing cholesterol removal from cream using  $\beta$ -CD cross-linked with adipic acid, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Journal of Dairy Technology, Seoul, Korea (2007).



## Références bibliographiques

---

[101]: Fei Peng Jiao and Ling Yang: Preparation and spectra properties of inclusion complexes of vitamin E with  $\beta$ -CD (2008).

[102]: Yoshiyuki Watanabe, Takashi Yamashita, Marie Yamashita and Shuji Adachi: Suppressive Effect of  $\alpha$ -Tocopherol Complexed with  $\beta$ -Cyclodextrin on the Oxidation of Methyl Linoleate. *Food Sci. Technol. Res.*, 15 (5) (2009) 479 – 482.

[103]: Noriyuki Miyoshi, Yohei Wakao, Susumu Tomono, Masayuki Tatemichia, Tomohiro Yano et Hiroshi Ohshima : The enhancement of the oral bioavailability of  $\gamma$ -tocotrienol in mice by  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion. *Science Direct. Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (2010) 1121–1126.

[104]: Yoshimi Sueishi, Masashi Hori et Naoya Inazumi: Characterization of inclusion complex of vitamin E compound with 2,6-di-O-methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer and its kinetic determination for radical scavenging ability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 72:467–472. DOI 10.1007/s10847-011-0018-3 (2012).

[105]: T. Yano, A. Sato, M. Sekine et K. Kashiwagi: The enhancing effect of  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion on  $\gamma$ -Tocotrienol-dependent negative growth control of mesothelioma cells in a xenograft model. *Functional Foods in Health and Disease*, 1(12) (2011) 508-515.

[106]: T. Gierlach, H. Ado and Kingalance: High performance liquid chromatographic determination of alpha tocopherol in inclusion complexes with CDs (2011).

[107]: Dzaraini Kamarun, Siti Norasmah Surip, Noor Najmi Bonnia, Rozana Mohd Dahan, Famiza Abd. Latiff and Azemi Samsuri : Thermal Analysis and Surface Morphology Study of Cholesterol:  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex (2013).

[108]: C. Murphy, Anne-Marie English, Shap Holden et Sean Fair: Cholesterol-Loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm (2014).

[109]: S. Fatmi, R. Belala, R. Kiadi, M. Iguer-ouada: Benefits of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation (2016).

[110]: Y. Jiang, X. Sha, W. Zhang et X. Fang: Complex of 9-nitro-camptothecin in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: In vitro and in vivo evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 397 (2010) 116-121.

## Références bibliographiques

---

- [111]: L. Rita, T. Amit et G. Chandrashekar: Current trends in  $\beta$ -cyclodextrin based drug delivery systems, IJRAP, Vol. 2 (2011).
- [112]: W. Robert, V. Mahaguna et M. Sriwongjanya: Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (1998).
- [113]: K. Ogungbenro, G. Graham, I. Gueorguieva et L. Aarons: The use of a modified exchange algorithm to optimize sampling times for population pharmacokinetic experiments. Computer Methods and Programs in Biomedicine 80 (2005) 115-125.
- [114]: Jean-Pierre Gauchi: Plans d'expériences optimaux, un exposé didactique (2005).
- [115]: N.K. Thakral, A.R. Ray, D. Bar-Shalom, A.H. Eriksson et D.K. Majumdar, « Soluplus- solubilized citrated camptothecin—a potential drug delivery strategy in colon cancer », AAPS Pharm Sci Tech, Vol. 13 (2012) 59-66.
- [116]: M. S. Hasnain, A. K. Nayak, « Solubility and dissolution enhancement of ibuprofen by solid dispersion technique using peg 6000-pvp k 30 combination carrier », Bulgarian Journal of Science Education, Vol. 21 (2012) 118-132.
- [117]: M. Wulff et M. Aldén, « Solid state studies of drug-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000 prepared by a new method », European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 8 (1999) 269 -281.
- [118]: J. Dutet, M. Lahiani-Skiba, L. Didier, J. Soizic, F. Bounoure, C. Barbot, P. Arnaud et M. Skiba, « Nimesulide/cyclodextrin/PEG 6000 ternary complexes: physico-chemical characterization, dissolution studies and bioavailability in rats », J Incl Phenom MacrocyclChem, Vol. 57 (2007) 203-209.

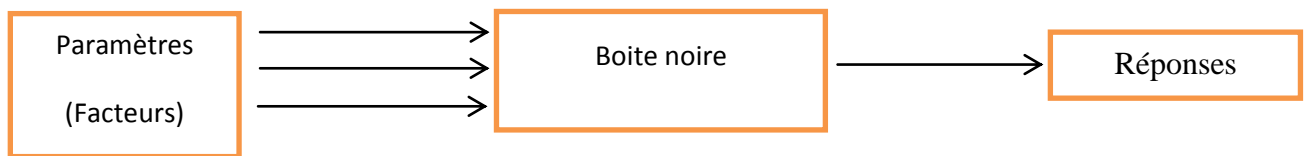
# **Annexes**

## Annexe 1 : Plan d'expérience

### 1. Introduction

Un plan d'expériences est une suite d'essais organisée à l'avance de manière à déterminer un minimum d'essais, un maximum de précision et l'influence de multiples paramètres sur une ou plusieurs réponses [113].

Ce type de problème peut être schématisé par une boîte noire :



**Facteurs** : sont les grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses.

**Réponses** : sont les grandeurs étudiées ou grandeurs de sorties.

### 2. Objectif

- ✓ Obtenir une meilleure précision.
- ✓ Etablir la modélisation du phénomène étudié
- ✓ Déterminer la solution optimale

Dans notre cas, on s'intéresse au plan d'expérience D optimale à mesure continu.

### 3. Définition

C'est un objet mathématique ou en d'autre terme un outil opérationnel pour réaliser des expériences réelles. Mais cet outil va s'avérer être très fructueux quand on va le compléter avec la propriété de convexité de l'ensemble des matrices d'information continues correspondantes. En effet, un des résultats importants sera que le déterminant ou son logarithme (fonction concave) d'une matrice d'information continue atteint un maximum global sur l'ensemble de définition, convexe, constitué des matrices d'information continues [114].

## 4. Procédure de réalisation du plan d'expérience D optimale

### Etape 1 : Formaliser la problématique

La première étape consiste à définir le sujet de l'étude. Il se traduit par une problématique d'étude qui peut être très diverse.

### Etape 2 : Phase de conception

Cette étape consiste à fixer :

- Les facteurs (paramètres).
- Les réponses.
- Le modèle du travail.

### Etape 3 : Construction du plan

Au niveau de cette étape, nous pouvons construire la matrice d'expériences. C'est le tableau qui indique la liste des expériences à réaliser et la façon de faire varier les facteurs.

### Etape 4 : Réalisation des essais

Il faut réaliser tous les essais prévus, en respectant tous les indications données dans la matrice et en mesurant la réponse de chaque essai.

Tout essai non conforme au plan défini est déclaré nul. S'il ne peut être refait, l'analyse des résultats du plan sera moins performante [114].

### Etape 5 : Analyser les résultats

Il existe deux analyses complémentaires :

#### L'analyse graphique :

Elle donne une représentation simple des résultats. Elle permet de visualiser l'influence des paramètres et de leurs interactions.

#### L'analyse statistique :

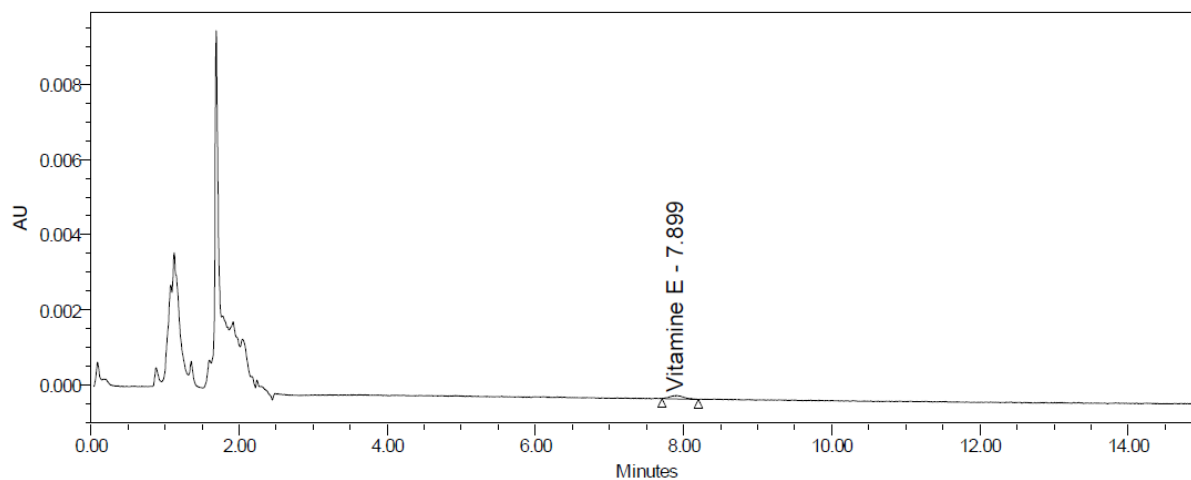
L'analyse de la variance vise à distinguer les variations globales de la réponse et l'influence réelle des paramètres.

Cette analyse :

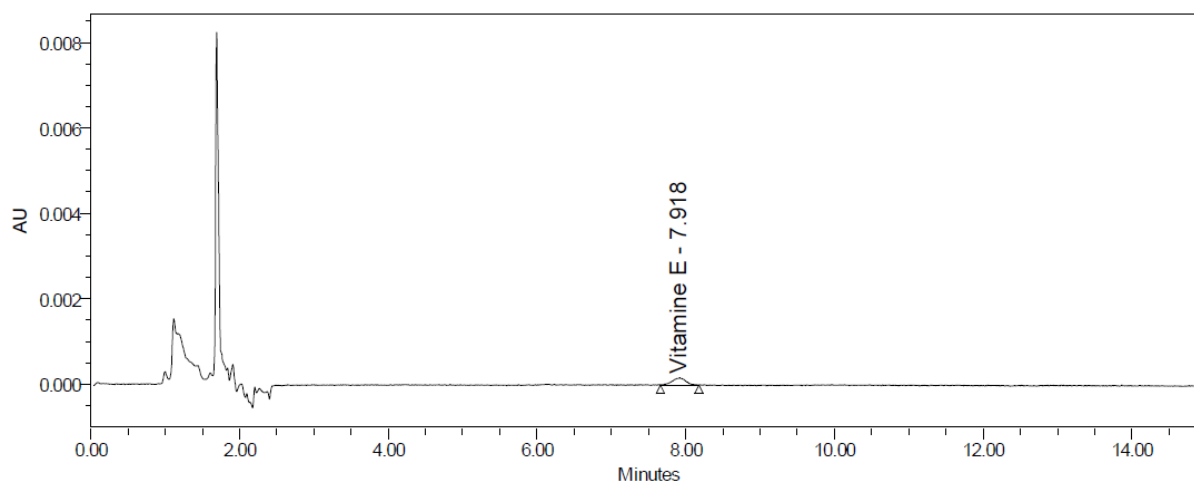
- Complète l'analyse graphique.
- Donne un taux de confiance statistique aux résultats.
- Calcule la contribution de chaque paramètre à la variation globale de la réponse.

**Annexe 2** : Résultats bruts de la cyclodextrine adéquate pour la solubilisation de la Vit E

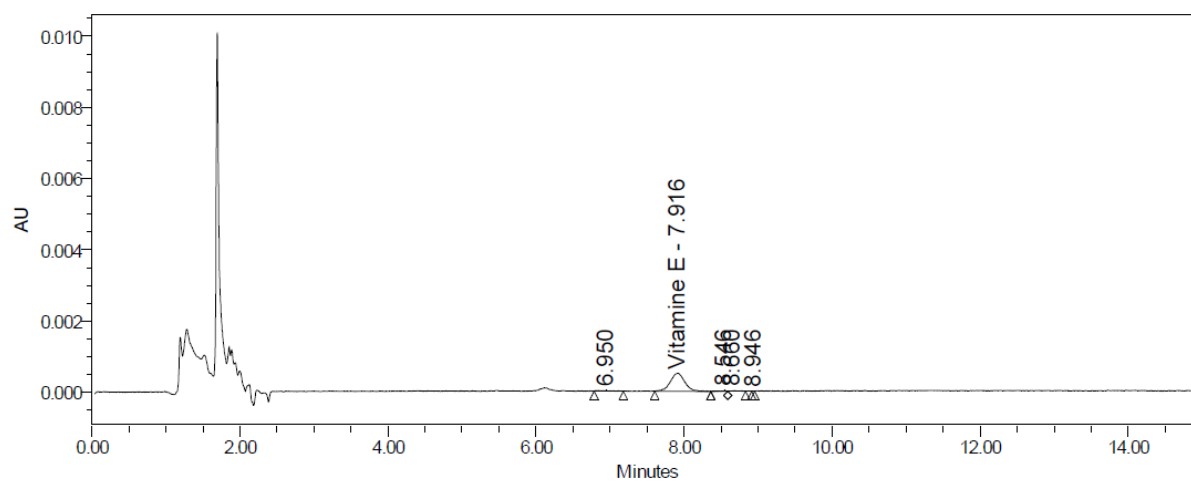
a) Chromatogramme de complexe Bcd/Vit E



b) Chromatogramme de complexe HP $\beta$ CD/Vit E

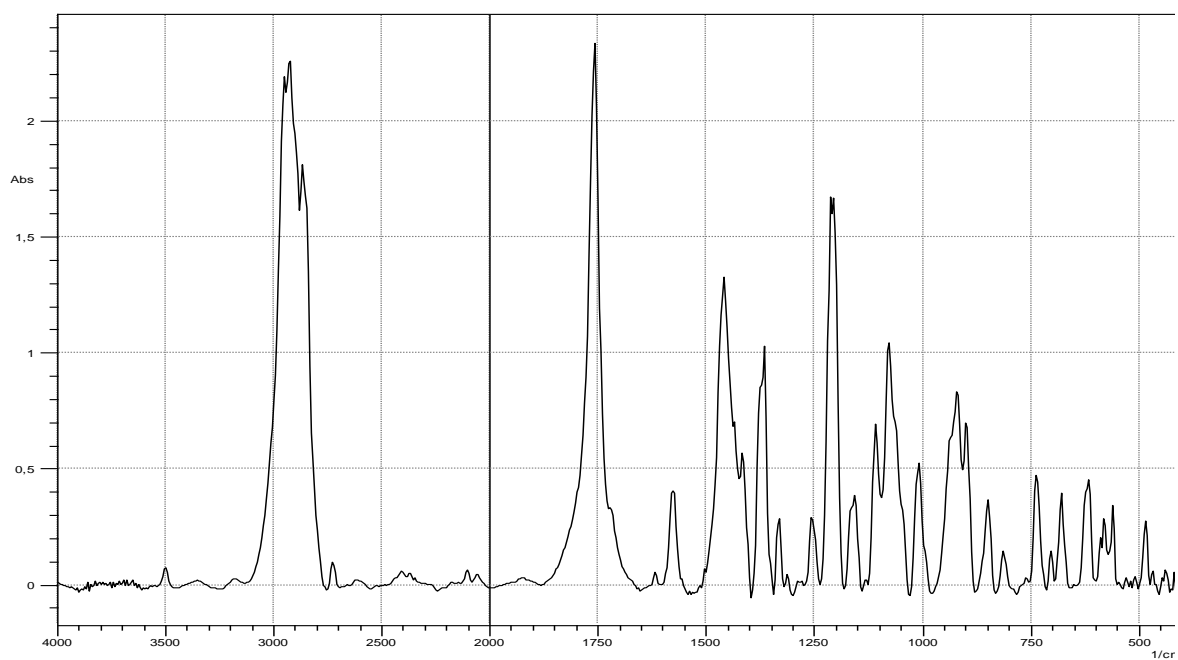


c) Chromatogramme de complexe PM $\beta$ CD/Vit E

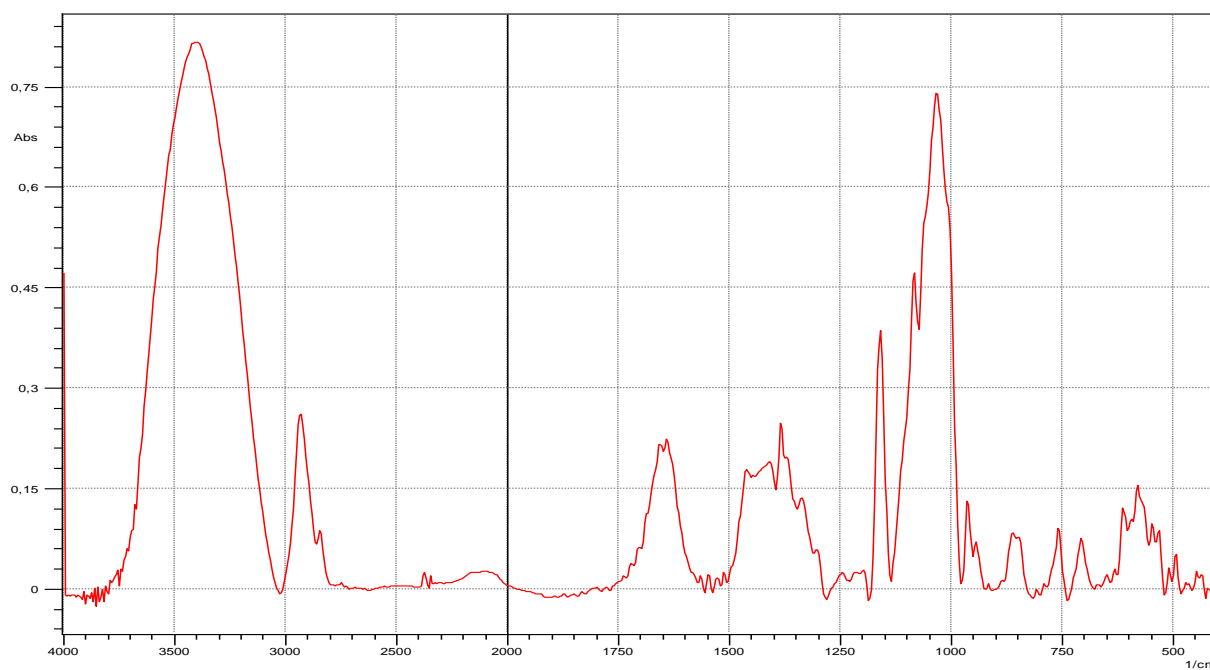


**Annexe 3:** Résultats bruts de la caractérisation des complexes d'inclusions par FTIR

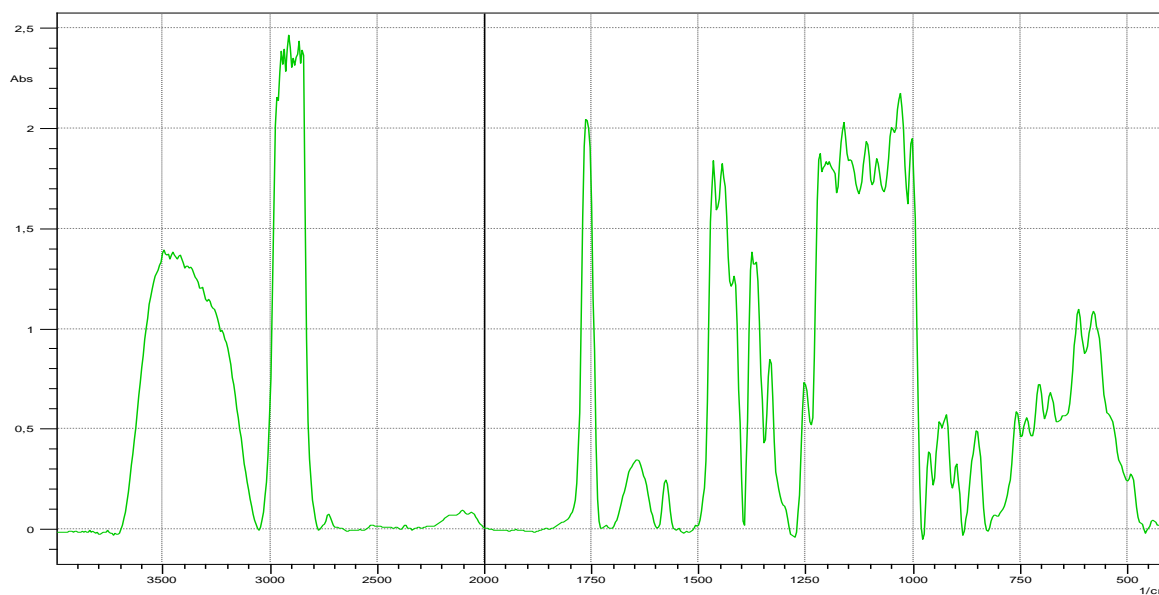
a) Spectre infrarouge de la Vit E



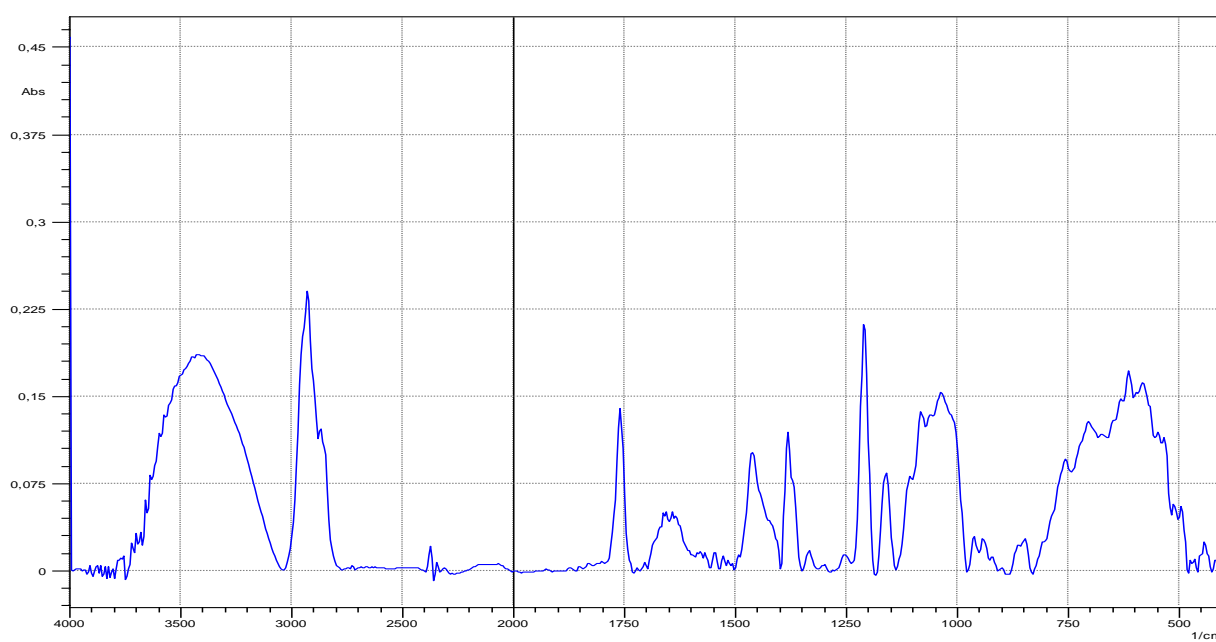
b) Spectre infrarouge de la PM $\beta$ CD



c) Spectre infrarouge du mélange physique



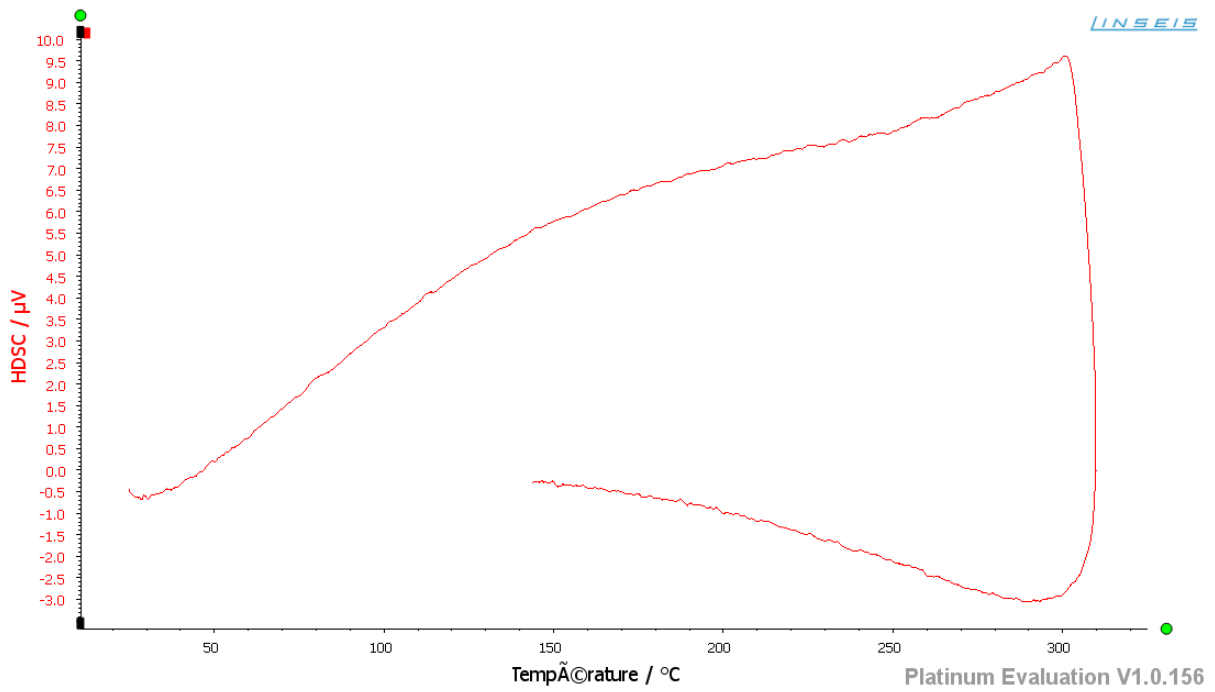
d) Spectre infrarouge du complexe d'inclusion PM $\beta$ CD/Vit E



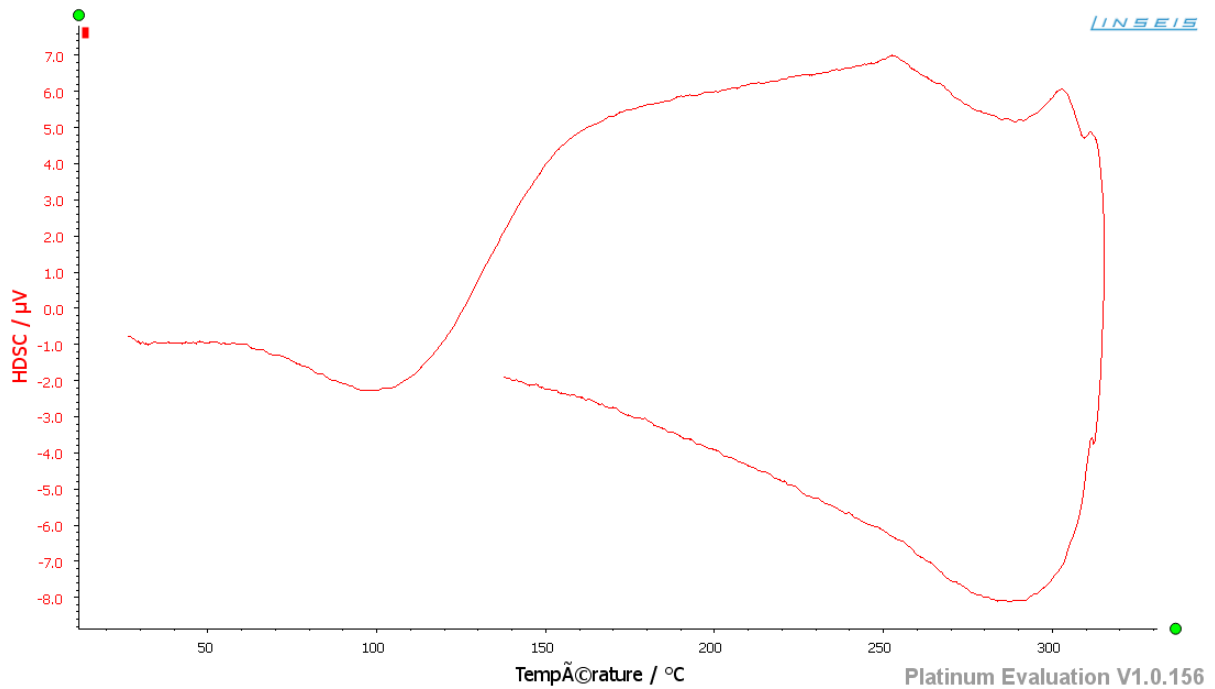


**Annexe 4** : Résultats bruts de la caractérisation des complexes d'inclusion par DSC

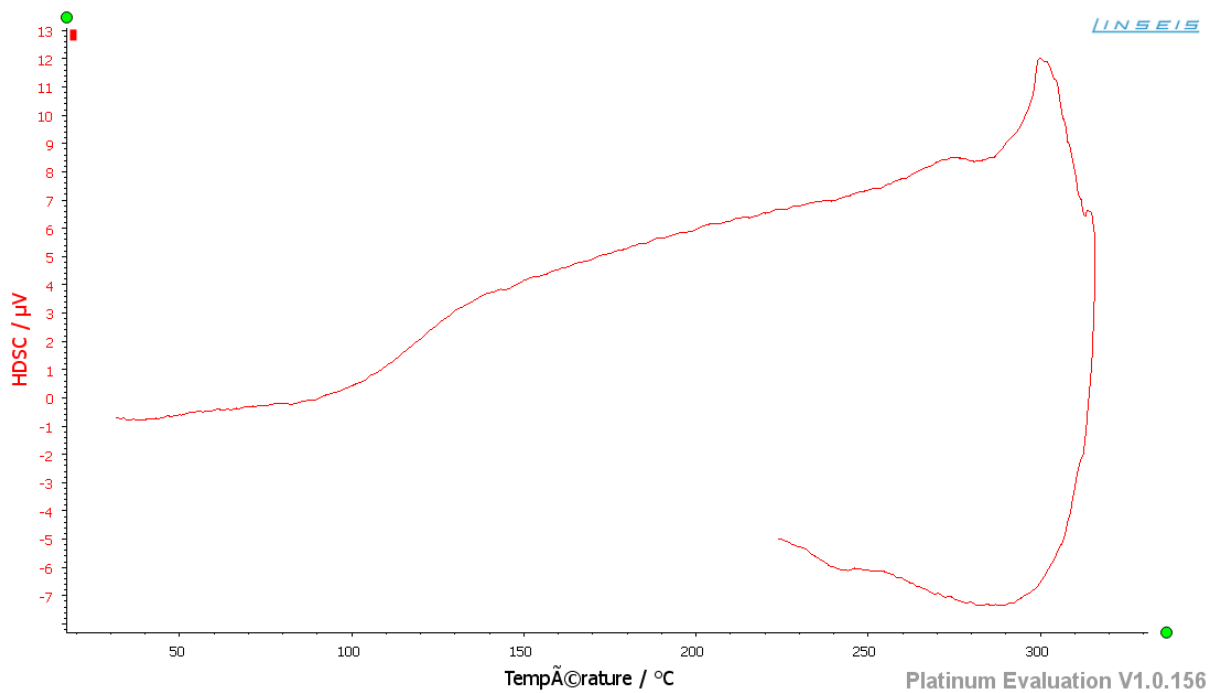
a) Thermogramme Vit E



b) Thermogramme PMβCD

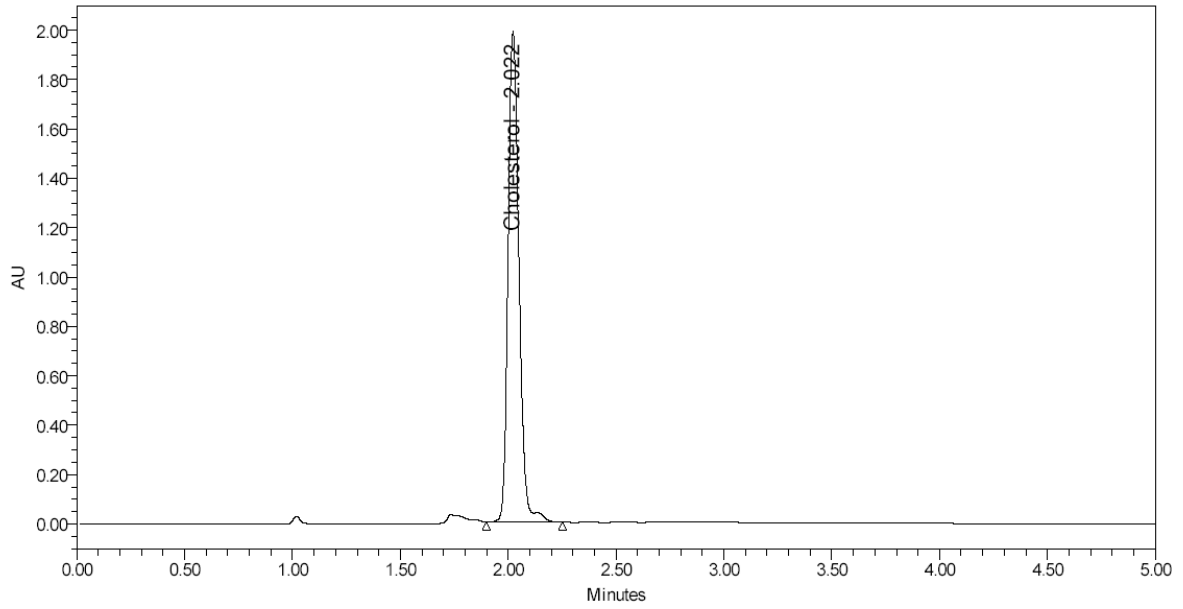


c) Thermogramme complexe PM $\beta$ CD/Vit E



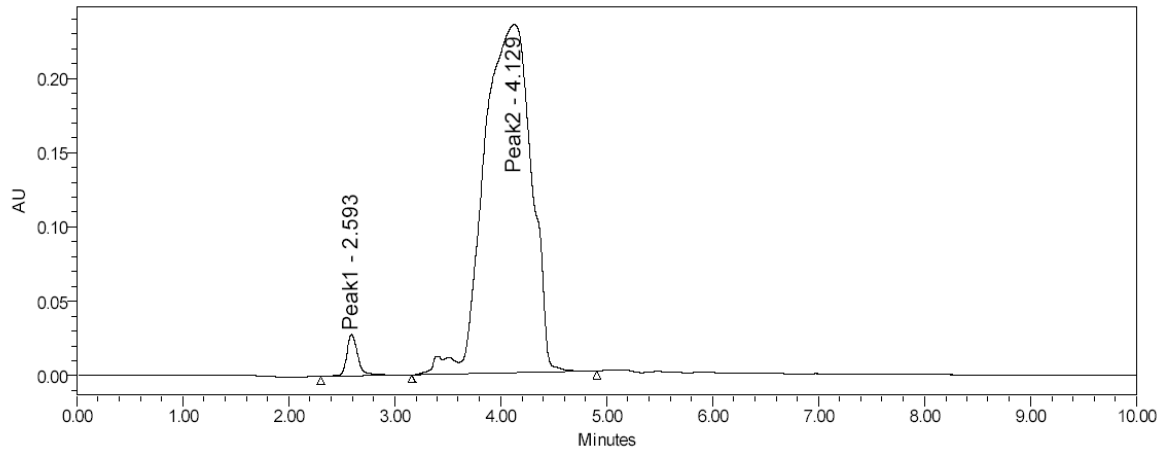
**Annexe 5 :**

a) Chromatogramme du cholestérol

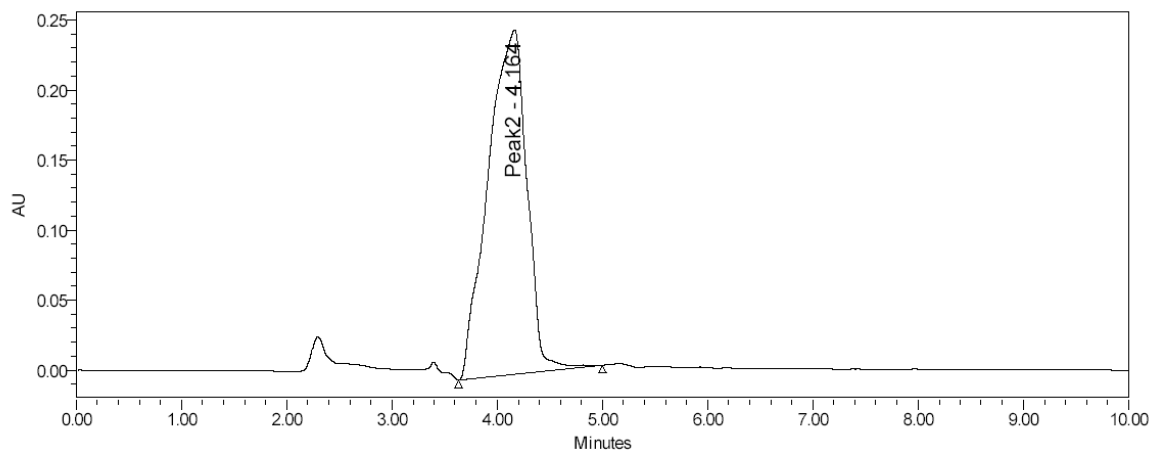


**Annexe 6** : Résultats bruts de l'analyse de la matrice d'expérience complétée.

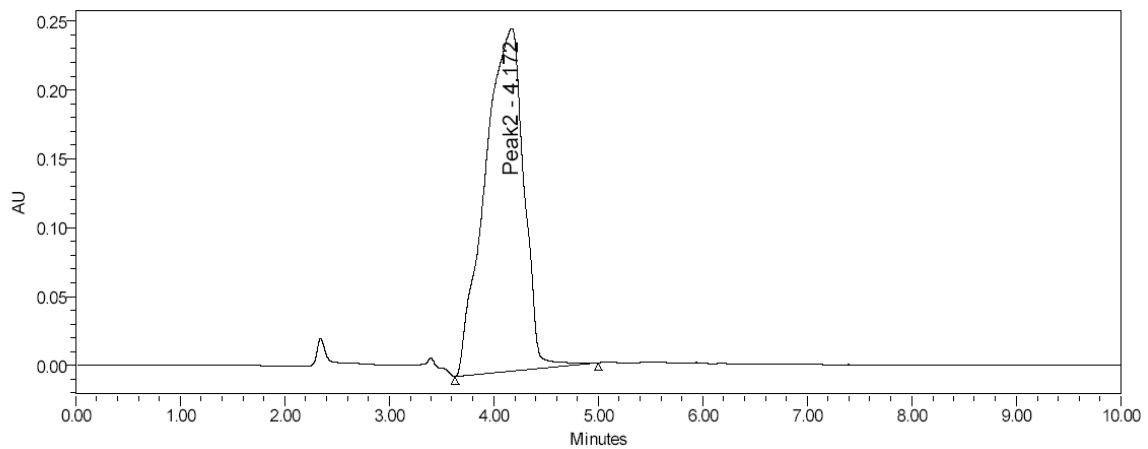
a) Chromatogramme de l'essai 2



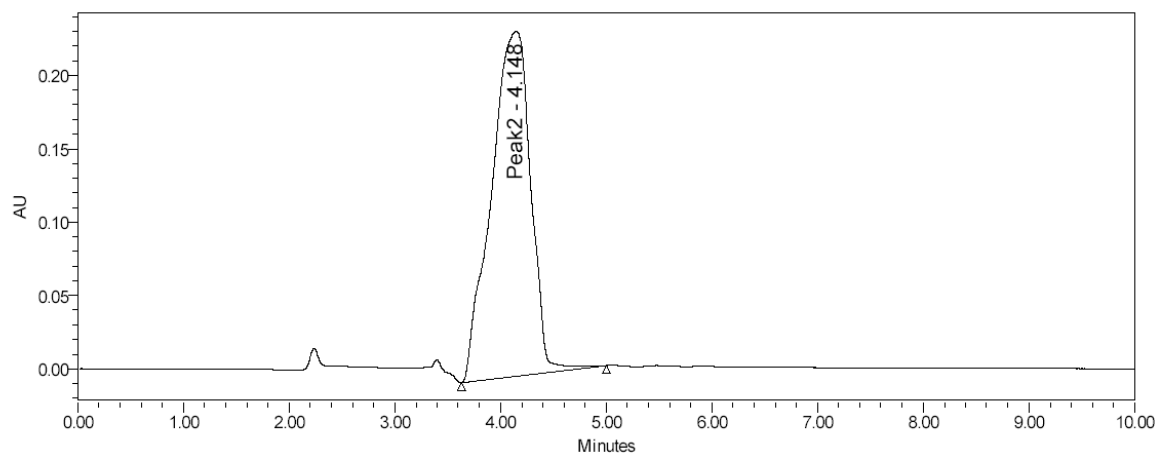
b) Chromatogramme de l'essai 4



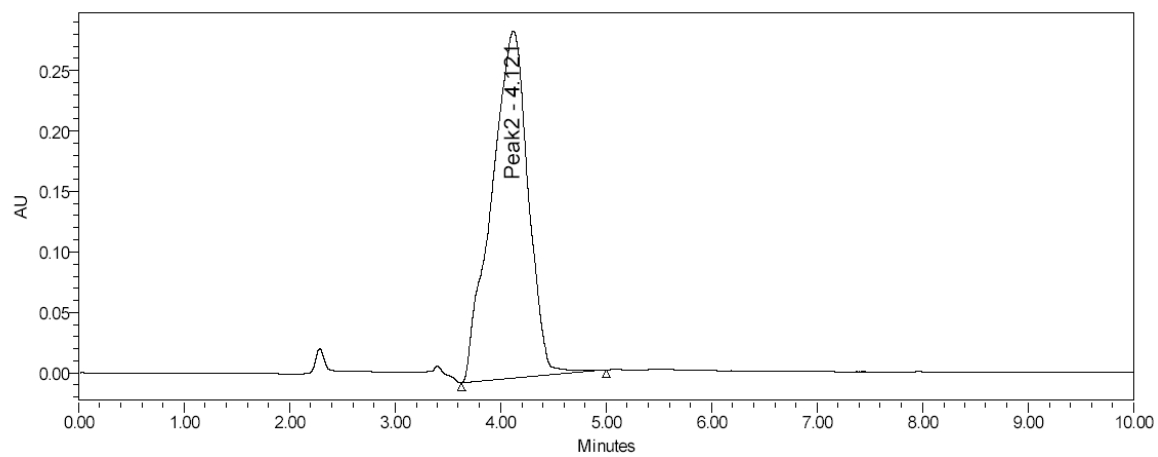
c) Chromatogramme de l'essai 5



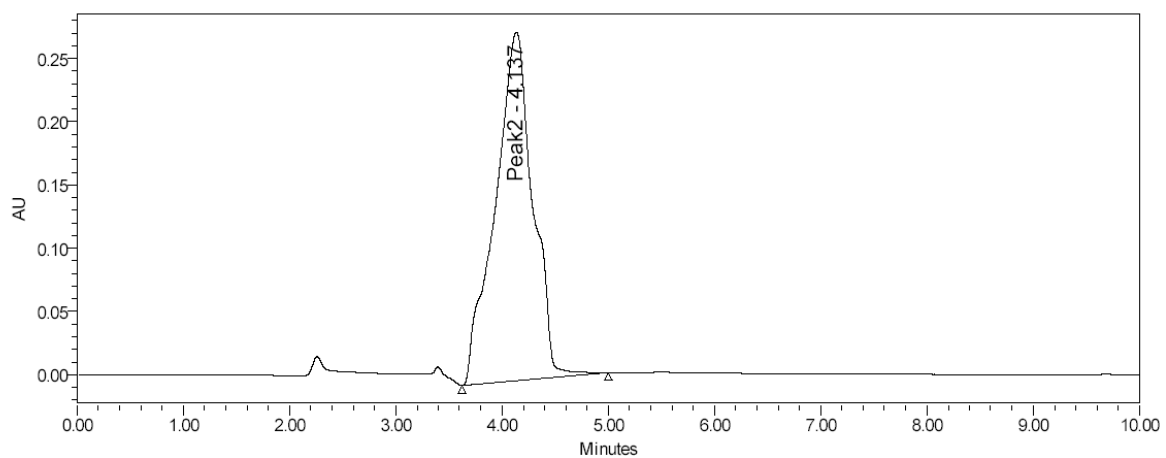
d) Chromatogramme de l'essai 6



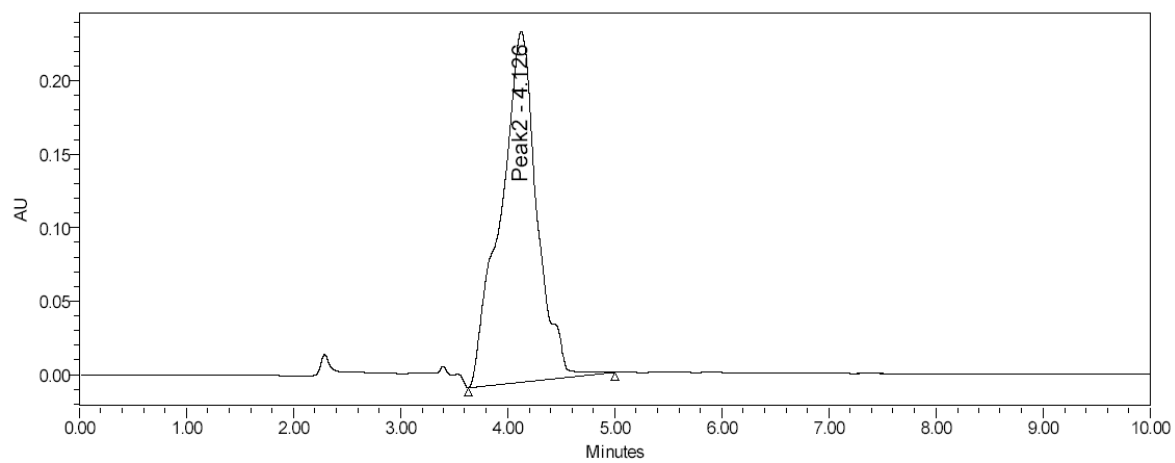
e) Chromatogramme de l'essai 7



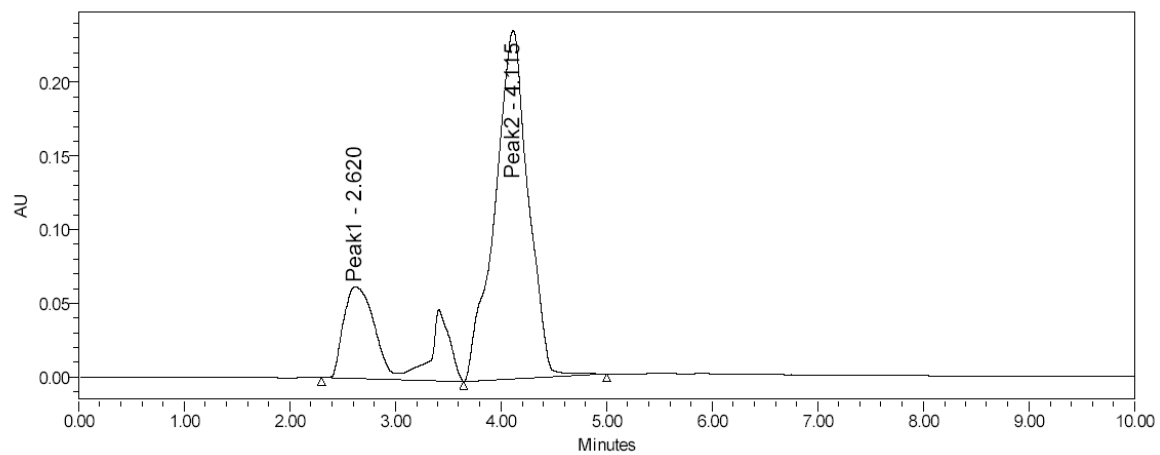
f) Chromatogramme de l'essai 8



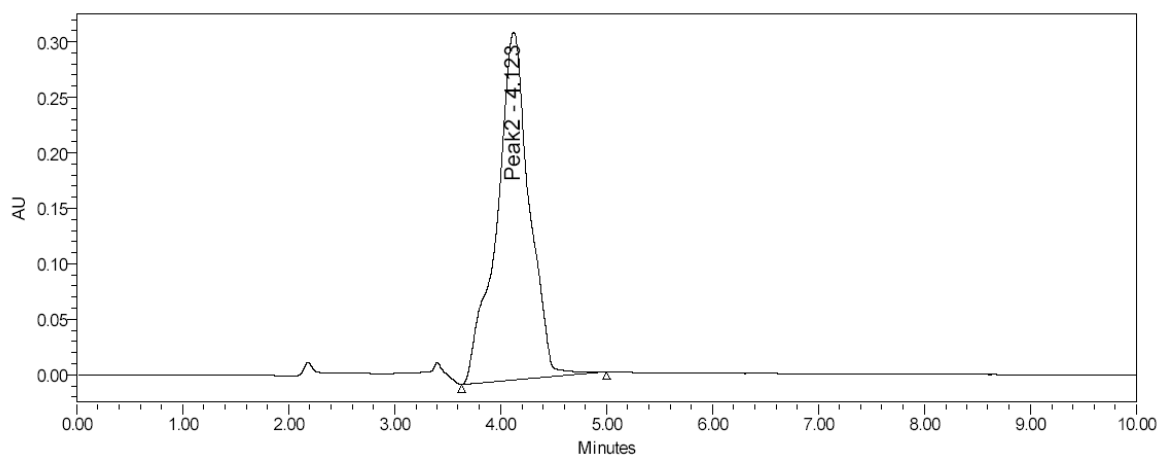
g) Chromatogramme de l'essai 9



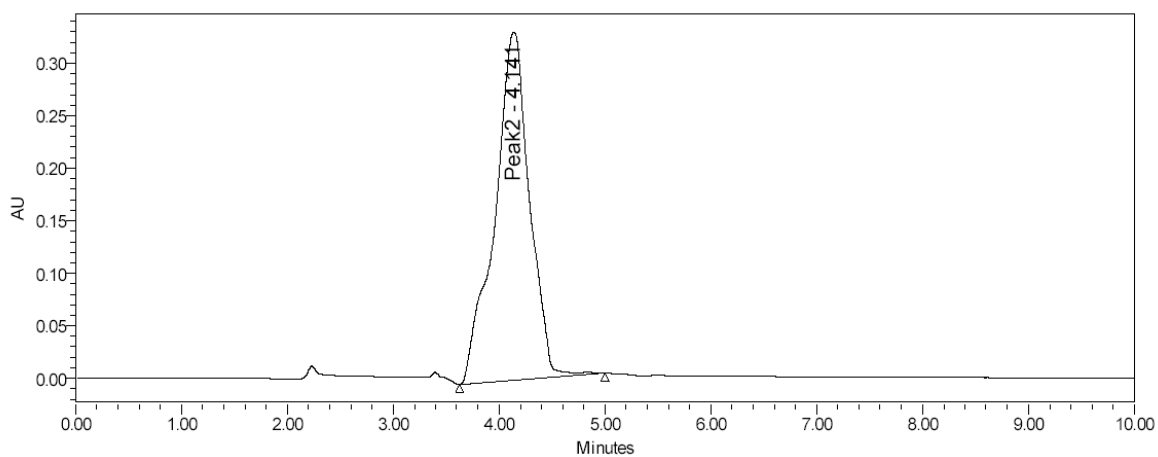
h) Chromatogramme de l'essai 10



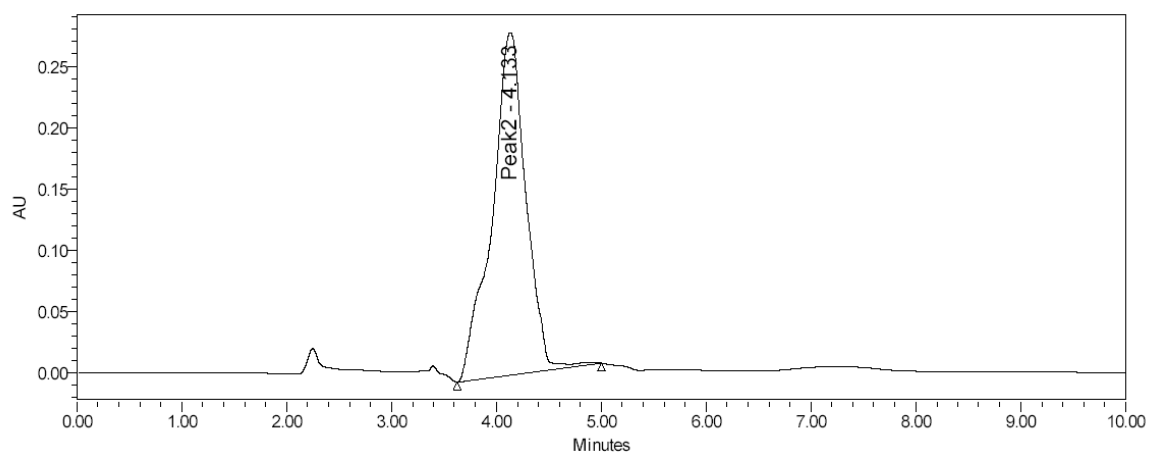
i) Chromatogramme de l'essai 11



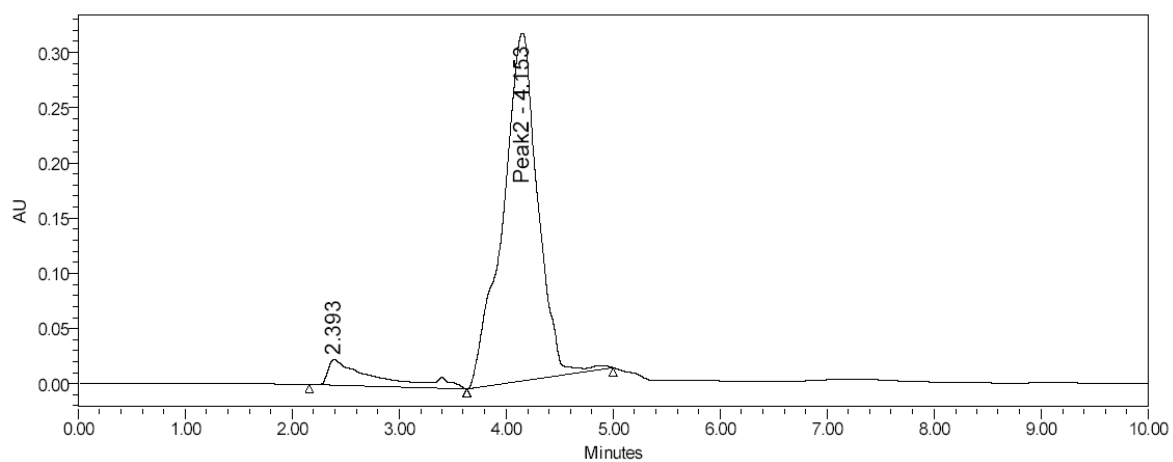
j) Chromatogramme de l'essai 12



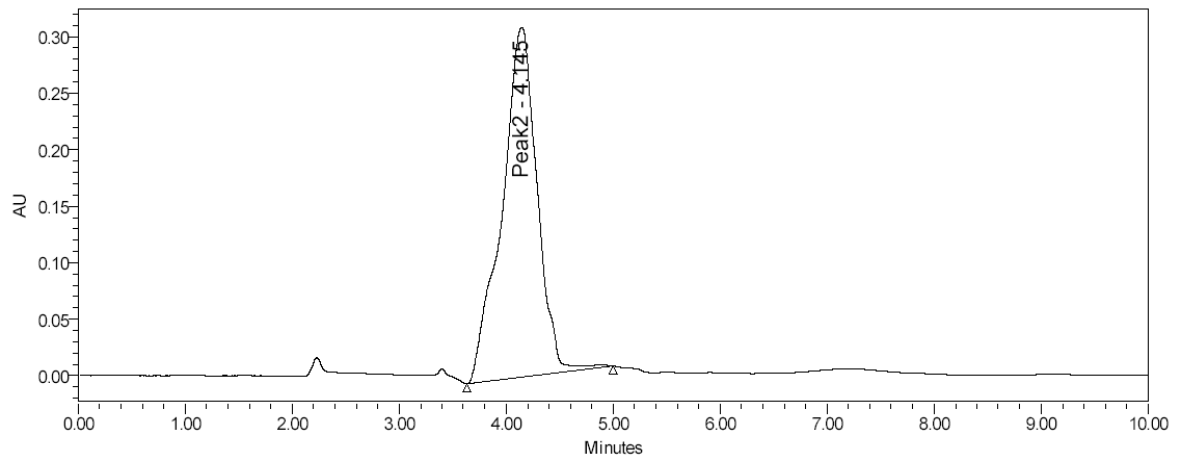
k) Chromatogramme de l'essai 13



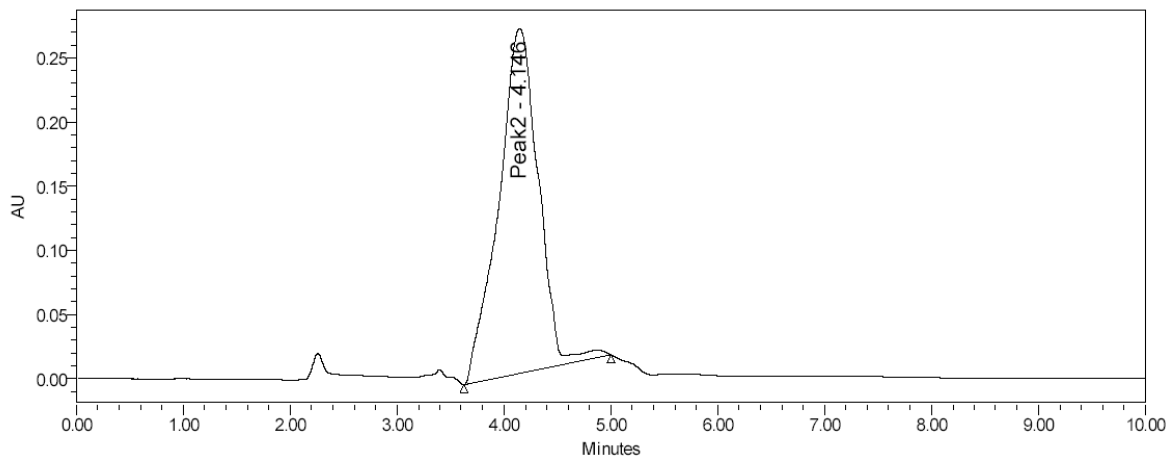
l) Chromatogramme de l'essai 14



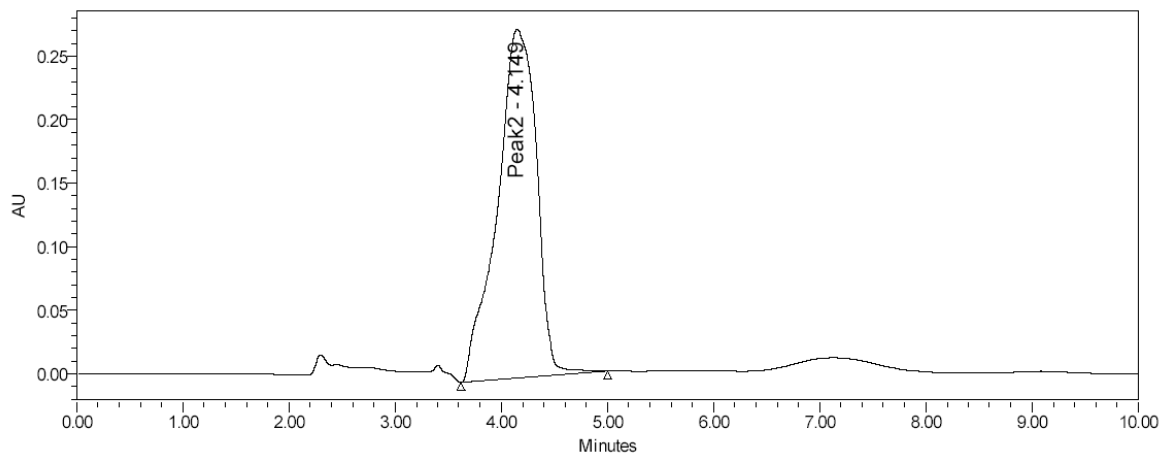
m) Chromatogramme de l'essai 16



n) Chromatogramme de l'essai 17

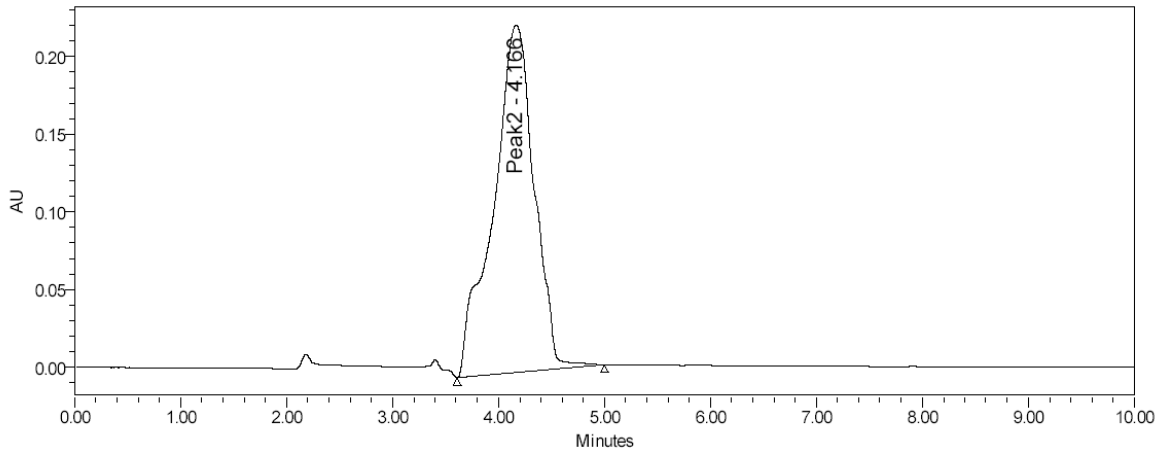


o) Chromatogramme de l'essai 18



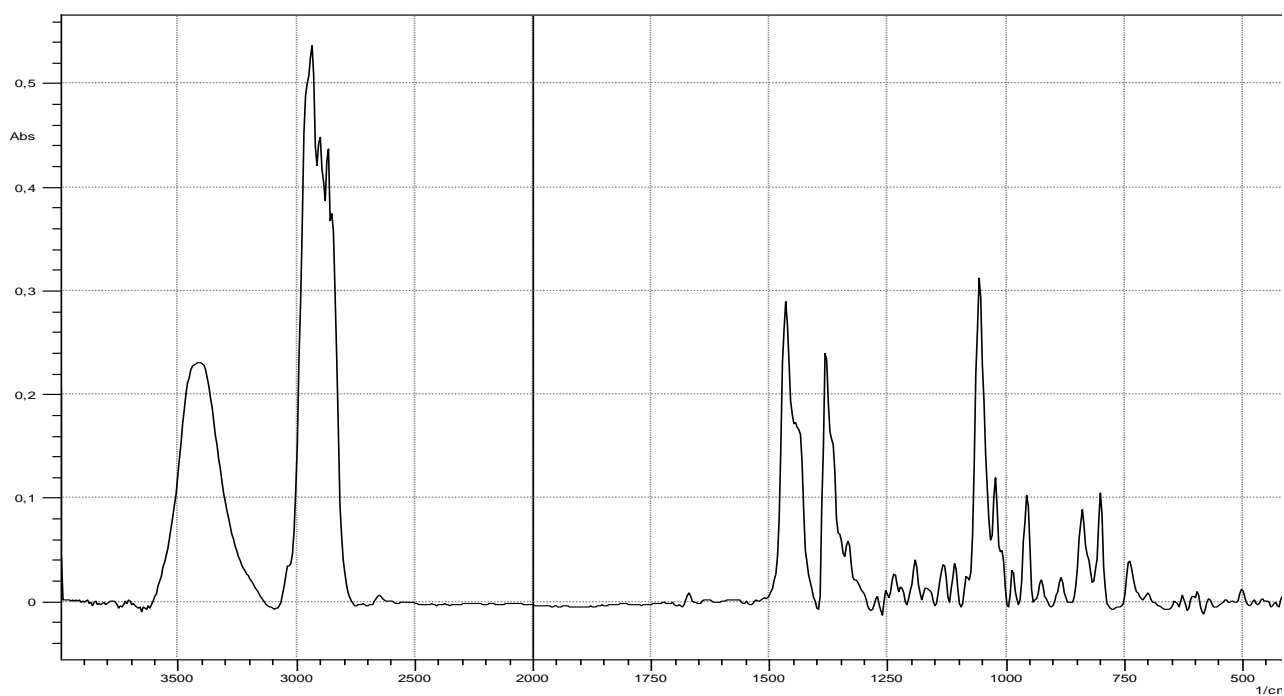


p) Chromatogramme de l'essai 19

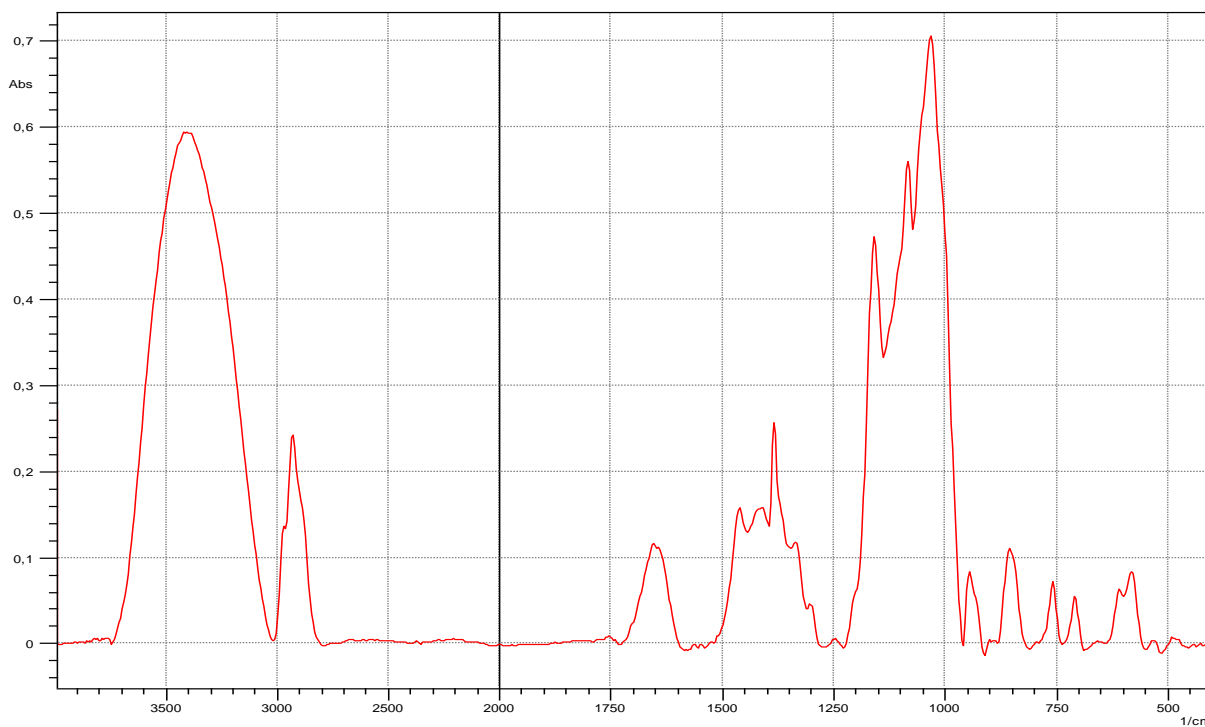


**Annexe 7 : Résultats bruts de la caractérisation des complexes d'inclusions par FTIR**

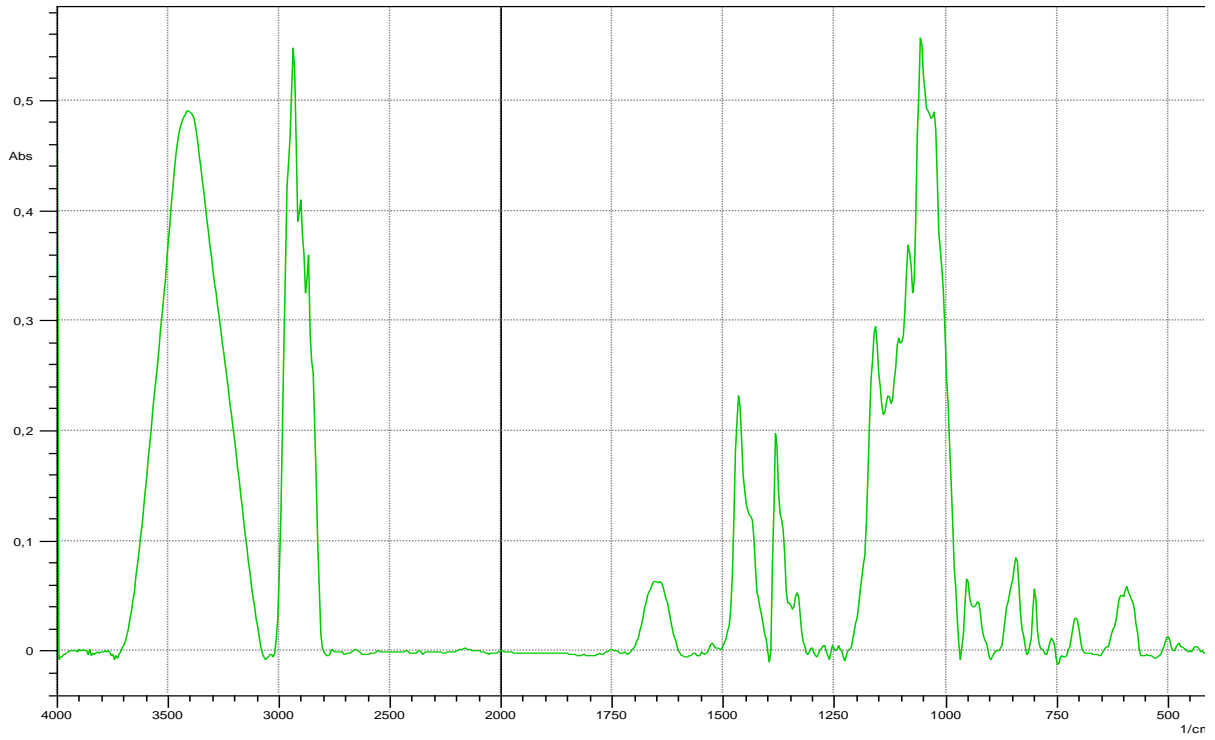
a) Spectre infrarouge du cholestérol



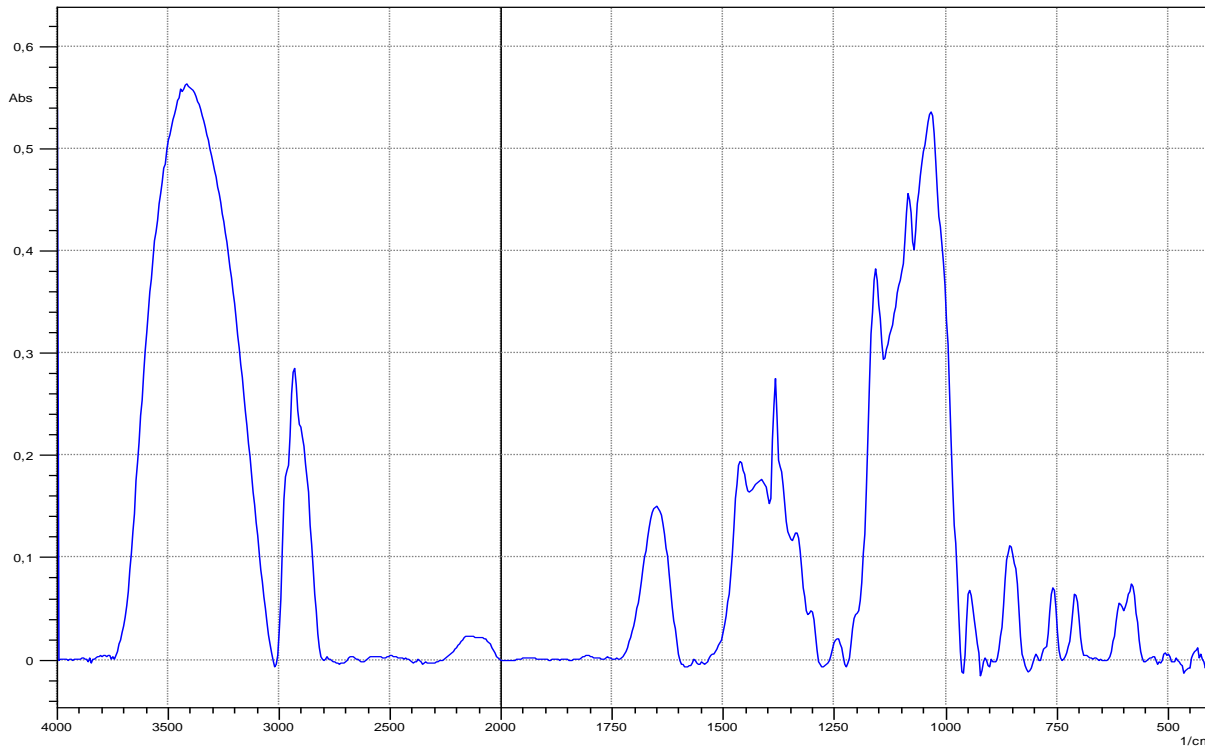
b) Spectre infrarouge de HP $\beta$ CD



c) Spectre infrarouge du mélange physique

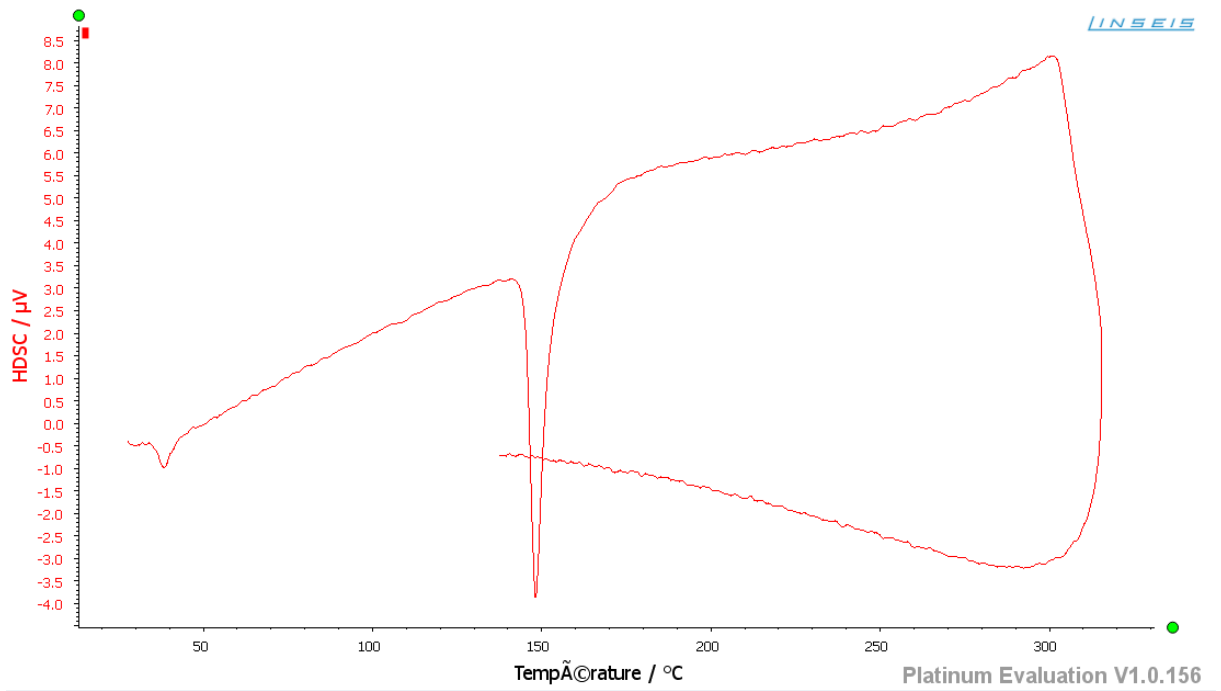


d) Spectre infrarouge du complexe d'inclusion Chol/HPβCD

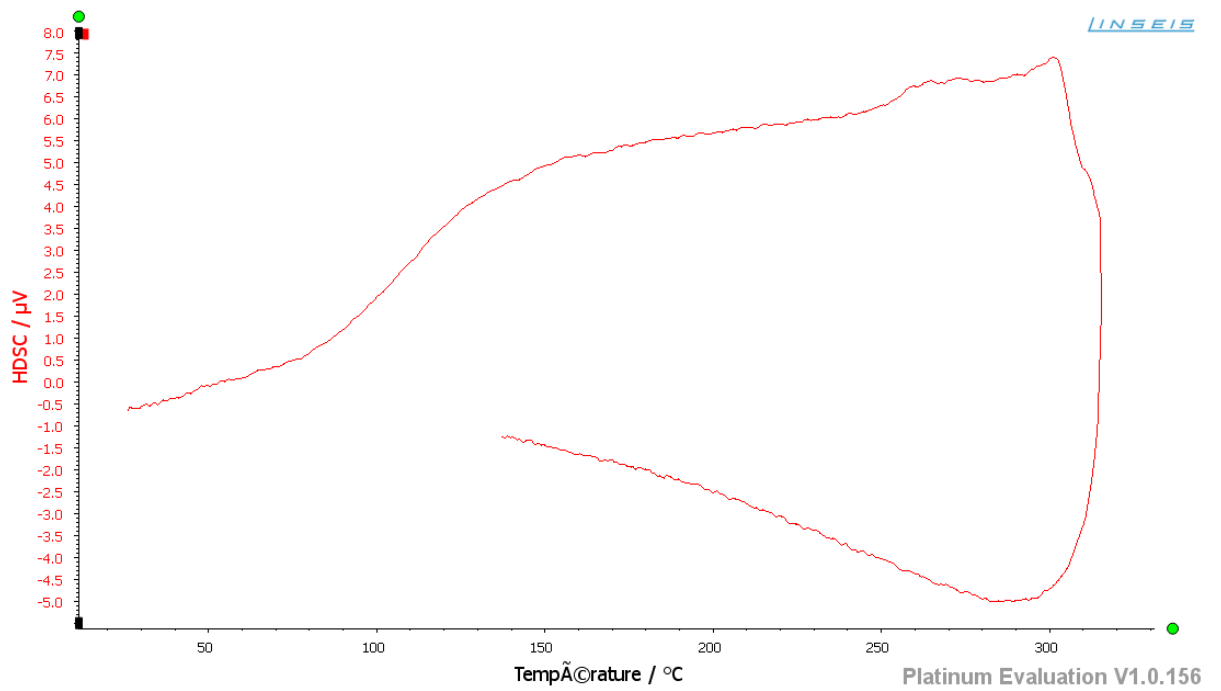


**Annexe 8** : Résultats bruts de la caractérisation des complexes d'inclusion par DSC

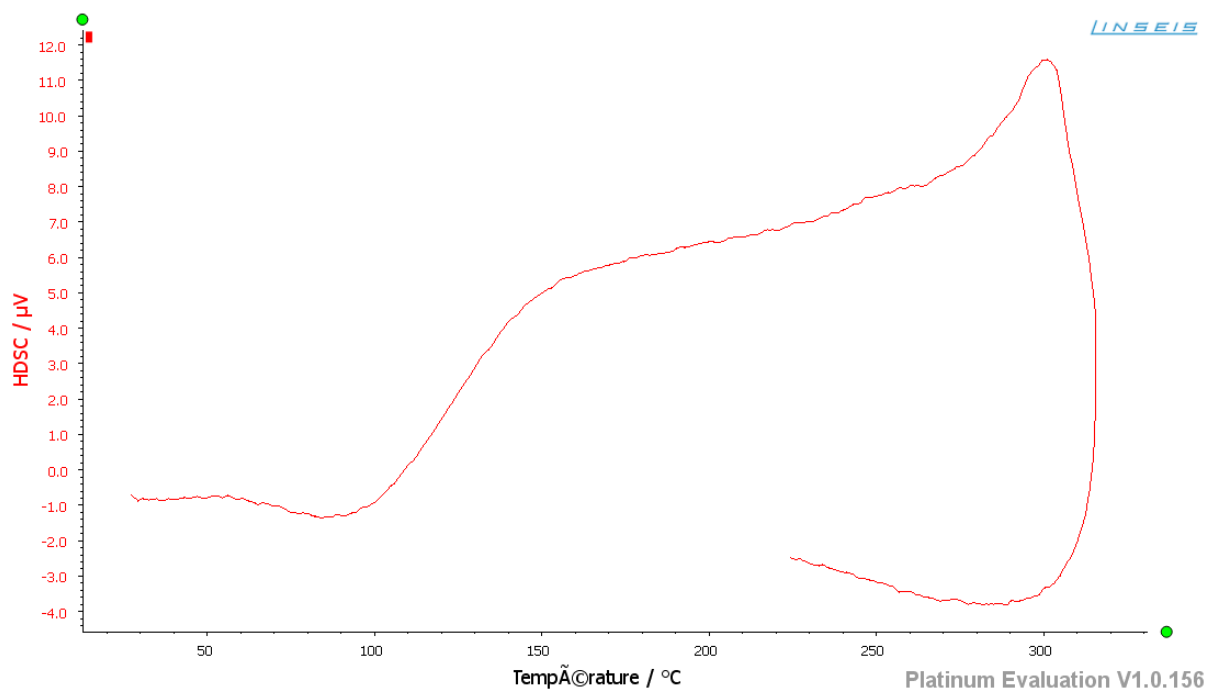
a) Thermogramme Chol



b) Thermogramme HP $\beta$ CD



c) Thrmogramme complexe Chol/HP $\beta$ CD



## **Résumé**

Dans ce travail, nous nous sommes fixé comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme de bovin, ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E et du cholestérol en milieu aqueux.

Pour cela nous avons optimisé à l'aide des plans d'expérience des complexes d'inclusions, que par la suite nous avons caractérisé par IR. La dernière étape de notre travail fut d'étudier l'impact des complexes obtenus sur la conservation du sperme bovin.

Les résultats obtenus montrent que d'une part, nous avons pu améliorer la solubilité de la vitamine E et du cholestérol, en utilisant les cyclodextrines, et découvert un effet synergique entre la vitamine E et le cholestérol sous leurs formes complexées sur la conservation du sperme d'autre part.

**Mots clés :** cholestérol, cyclodextrine, sperme, vitamine E

## **Abstract**

The aim of this work, was the improvement of bovine semen conservation, this passing by an intermediate objective; improvement of vitamin E and cholesterol solubility in aqueous medium.

For this, we have optimized inclusion complexes with design experience, which were characterized by FTIR. The last step of this work was to study the complexes impact on bovine semen conservation.

The results obtained show that we have been able to improve the vitamin E and Cholesterol solubility, using cyclodextrins, and discovered a synergistic effect between the vitamin E and cholesterol under their complexed forms on the semen conservation.

**Key words:** cholesterol, cyclodextrin, semen, vitamin E