

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté de Technologie  
Département de génie des procédés



Laboratoire associé écosystèmes marin et aquacole

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine : Sciences et Technologie Filière : Génie des Procédés**

**Spécialité : Génie des Procédés**

**Présentée par**

**TAOUZINET Lamia**

*Thème*

**Encapsulation de la vitamine E par des cyclodextrines, liposomes et PEG.  
Application dans la cryoconservation spermatique animale.**

**Soutenue le : 29 Juillet 2021**

**Devant le Jury composé de :**

**Nom et Prénom**

**Grade**

**Mr REZGUI Farouk**

**Professeur**

Univ. de Béjaïa

Président

**Mr FATMI Sofiane**

**M.C.A**

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

**Mr IGUER-OUADA Mokrane**

**Professeur**

Univ. de Béjaïa

Co- Rapporteur

**Mr HADJSADOK Abdelkader**

**Professeur**

Univ. de Blida 1

Examineur

**Mr DAOUD Kamel**

**Professeur**

Univ. de USTHB

Examineur

**Année Universitaire : 2020-2021**

*« Aimer la vie par le labeur est devenir intime avec le plus profond secret de la vie. »*

Gibran Khalil Gibran( Le prophète, chapitre 6)

*À la mémoire de mon père  
A ma Mère,  
A ma famille,  
A mes amis,*

## Remerciements

*Dr. Fatmi Sofiane*

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait profiter de vos grandes connaissances et cultures scientifiques ainsi Vos intuitions, vos grandes qualités humaines et votre sympathie. Votre compétence, votre intérêt pour la recherche et votre supervision ont été des atouts précieux et ont porté leurs fruits dans mon travail. Je vous remercie infiniment pour votre soutien inconditionnel sans faille et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années. Je vous en serais toujours reconnaissante.

*Pr. Mokrane IGUER-OUADA*

Je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements de m'avoir accueillie, dans un bon environnement de travail, au sein du Laboratoire de Recherche Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacole de l'Université de Bejaia, que vous dirigez. Je vous remercie profondément pour votre participation enrichissante dans le suivi de mon travail.

*Pr. REZGUI Farouk,*

Je vous suis sincèrement reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être le président.

*Pr. HADJ SADOK Abdelkader et Pr Daoud Kamel*

Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail de thèse en acceptant d'être les examinateurs.

Je tiens à remercier sincèrement les nombreuses personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Tout d'abord au sein du bloc 11 de l'université de Bejaia :

*Madame Salhi-Amrani Yasmina*, qui m'a beaucoup aidée au cours de ces années, avec de longues discussions que j'ai beaucoup appréciées. Merci pour votre expertise scientifique en chromatographie liquide haute performance ainsi que pour votre disponibilité et pour vos conseils, votre soutien et votre amitié.

*Madame Moukhtari Fouzia*, Je vous adresse mes vifs remerciements pour votre pertinence dans la réalisation des tests de granulométrie laser au sein du laboratoire de recherche LPMTSR à l'Université de Bejaia.

*Madame BRADAI, Madame RABHI et Madame BENAMOR*, Je vous exprime ma sincère reconnaissance pour votre disponibilité et votre aide dans les expériences. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre amitié.

*Madame SAADI-AHMED* ingénieure du laboratoire de biochimie alimentaire, je vous remercie de m'avoir permis d'accéder à votre laboratoire et d'utiliser le rota vapeur.

*Monsieur Azzoug Moufok*, Je vous exprime ma sincère reconnaissance pour votre disponibilité, vos conseils et votre soutien.

*Equipe des «4.M.P » : INOURI Ahlem , Dr KEBBI Rosa ,Dr KHELLOUF Allaeddine, BENABDELHAK Amira Chahrazad, BENBERKANE Amine , TITOUAH Hanane, DERBAK Hanane, AISSANOU Sofiane.* Merci à tous ces moments passés ensemble, dans ce bureau jamais vide au laboratoire ... Merci de m'avoir offert votre amitié et votre soutien qui m'ont permis d'affronter les difficultés de la thèse.

Mes chères amies

*Leticia, Hakima, Mohamed, Hacene, Thinhinane*, merci pour votre soutien et votre aide inestimables.

# Sommaire

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

### **Etude bibliographique**

1. Spermatozoïdes .....	6
2. Cryoconservation spermatique .....	7
2.1 Dommages cellulaires liés à la congélation et au refroidissement .....	7
2.1.1 Dommage liée au froid .....	8
2.1.2 Stress Oxydatif .....	9
3. Antioxydants et la qualité spermatique .....	10
3.1 Alpha tocophérol (vitamine E) .....	10
3.1.1 Structure et Sources de la Vitamine E .....	10
3.1.3. Mécanisme d'action antioxydant .....	12
3.2 Acide ascorbique .....	12
3.2.1 Structure et Sources de la Vitamine C .....	13
3.2.2 Mécanisme d'action antioxydant .....	14
4. Agents Cryoprotecteurs (renforcement membranaire) .....	15
4.1 Cholestérol .....	15
4.1.1 Structure et Sources du cholestérol .....	16
4.1.2 Mécanisme d'action .....	17
5. Les systèmes d'encapsulation .....	17
5.1 Cyclodextrines .....	17
5.1.1 Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines .....	18

5.1.2 Dérivés des cyclodextrines .....	20
5.1.3 Méthodes de préparation des complexes d'inclusion .....	20
5.1.4 Interactions des cyclodextrines avec les membranes .....	21
5.2 Liposomes .....	21
5.2.1 Composition des liposomes .....	22
5.2.2 Classification .....	26
5.2.3 Méthodes de préparation des liposomes .....	26
5.2.4 La stabilité des préparations à base des liposomes in vitro .....	29
5.2.4 Mécanisme d'interaction de liposome-cellules cibles et libération du PA .....	31
5.3 Dispersion Solide dans le Polyéthylène glycol (PEG).....	34
5.3.1 Dispersions solides .....	34
5.3.2 Polyéthylène glycols .....	34
5.4 Caractérisation des systèmes d'encapsulation.....	36
<b>Encapsulation nanotechnology in sperm cryopreservation: systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery .....</b>	<b>49</b>

## **Etude expérimentale**

<b>Partie 1 : Développement et validation d'une méthode de dosage simultanée de l'alpha-tocophérol (seule ou encapsulée) et du cholestérol dans un milieu de conservation spermatique.</b> .....	50
Résumé .....	50
<b>Development and validation of HPLC method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media.</b> ....	55
<b>Partie 2 : Encapsulation de l'alpha tocophérol dans les liposomes : Mise au point, optimisation, caractérisation et protection spermatique.</b> .....	56
Résumé .....	56
<b>Alpha Tocopherol loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection</b> .....	61
<b>Partie 3 : Un nouveau système liposomiale de vitamine E : Cinétique de libération, stabilité et protection spermatique lors de la cryoconservation.</b> .....	62
Résumé .....	62



**A new system vitamin E loaded in liposome: Drug release, Stability and efficiency in sperm cryoprotection.....67**

**Discussion générale.....83**

**Conclusion et perspectives.....101**

**Annexes**

## Liste des figures

### Etude bibliographique

<b>Figure 1:</b> Structure du sperme. ....	6
<b>Figure 2:</b> Dommages cellulaires liés à la congélation et le refroidissement. ....	10
<b>Figure 3:</b> Mécanisme antioxydant de la vitamine E. ....	12
<b>Figure 4:</b> Structure de l'acide ascorbique. ....	13
<b>Figure 5:</b> Mécanisme antioxydant de la vitamine C. ....	14
<b>Figure 6:</b> Réaction de la vitamine E avec des radicaux peroxydes et la régénération de la vitamine E radicalaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C. ....	15
<b>Figure 7:</b> Structure du cholestérol. ....	16
<b>Figure 8 :</b> Structures de : l' $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ cyclodextrine. ....	18
<b>Figure 9:</b> Structure de la $\beta$ Cyclodextrine. ....	18
<b>Figure 10:</b> Structure du liposome. ....	22
<b>Figure 11:</b> Composition structural du liposome. ....	23
<b>Figure 12:</b> Configuration trans et gauche des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique. ....	25
<b>Figure 13:</b> Schéma représentatif de la taille et nombre de lamelles des liposomes. ....	26
<b>Figure 14 :</b> Mécanisme d'interaction liposome-cellule. ....	33
<b>Figure 15:</b> Structure du PEGs. ....	34

### Discussion générale

<b>Figure 1 :</b> Les facteurs influencent le taux d'encapsulation. ....	85
<b>Figure 2 :</b> Les facteurs influencent la taille des liposomes. ....	86
<b>Figure 3 :</b> courbe iso-réponse du taux d'encapsulation. ....	88
<b>Figure 4 :</b> courbe iso-réponse de la taille des liposomes. ....	88
<b>Figure 5:</b> Micro-image MEB des matières premières (Phospholipide 90H, VitE, CHL), liposome placebo et la solution liposomiale optimale. ....	90
<b>Figure 6 :</b> Cinétique de libération de la vit E liposomiale. ....	92
<b>Figure 7 :</b> Stabilité physique et chimique du liposome –Vit E à 4 °C et à température ambiante. ....	94
<b>Figure 8 :</b> Effets des différents traitements sur les paramètres de mobilité spermatiques. ....	95

## Liste des tableaux

### Etude bibliographique

<b>Tableau 1:</b> Les principaux changements de la structure biologique lors de la congélation. ....	7
<b>Tableau 2:</b> Structures chimiques de l' $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - et $\delta$ -vitamine E. ....	11
<b>Tableau 3:</b> Propriétés physico-chimiques de la vitamine E. ....	12
<b>Tableau 4:</b> Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C. ....	14
<b>Tableau 5:</b> Propriétés physico-chimiques du cholestérol. ....	16
<b>Tableau 6:</b> Propriétés physico-chimiques des CDs natives (Szjetli, 1998; Challa et al, 2005 ; Loftsson et Brewster, 2011). ....	19
<b>Tableau 7:</b> Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines. ....	20
<b>Tableau 8:</b> Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides. ....	24
<b>Tableau 9:</b> Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides. Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides. ....	25

### Discussion générale

<b>Tableau 1:</b> Matrice d'essai. ....	84
<b>Tableau 2:</b> Conditions optimales. ....	87

## Liste d'abréviation

AA	Acide ascorbique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
$\alpha$ – TTP	Alpha tocopherol transfer protein (En français protéine de transfert de tocophérol)
BSP	Protéines binder of sperm
CDs	Cyclodextrines
CEHC	Carboxychromanol ou 2'-carboxyéthyl-6-hydroxychromanes.
Chol	Cholestérol
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	Distéaroylphosphatidylcholine
EE	Efficacité de piégeage
HP	Hydroxypropyle
LPO	Radicaux
LUV	Vésicules unilamillaires
$L_{\alpha}$	Etat désordonné ou configuration gauche
$L_{\beta}$	Etat ordonné ou configuration trans
NO	l'oxyde nitrique
OLV	Vésicules olégo lamillaires
ONOO-	Peroxynitrate
PC	Phosphatidylcholine
PEG	Polyéthylène glycol
ROO	Radical peroxide
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SBE	Sulfobutyléther
SOD	Superoxyde dismutase
$T_m$	Meeting temperature (température de transition)

VAP	Average path velocity (Vitesse moyenne)
VCL	Curvilinear velocity (Vitesse curviligne)
VitE	Vitamine E
VSL	Straight linear velocity (Vitesse linéaire)
$\alpha$ – TTP	Alpha tocopherol transfer protein (En français protéine de transfert de tocophérol)

# **Introduction générale**

## **Introduction générale**

---

Ces dernières années, la pollution croissante de l'environnement due à l'industrialisation continue et au stress psychologique (Botelho et al ,2021 ; Ilacqua et al ,2018 ) a entraîné une augmentation des problèmes d'infertilité dans le monde entier. L'infertilité chez l'homme représente aujourd'hui environ 50 % des problèmes liés à la fécondité (Ilacqua et al ,2018). L'infertilité est fréquemment observée chez les patients atteints de cancer et chez les hommes présentant une oligozoospermie ou une azoospermie grave due à un dysfonctionnement spermatogénique. Cependant, avec l'élargissement rapide de l'agriculture moderne intensifiée, la diversité génétique des espèces d'animaux de ferme se réduit rapidement dans de nombreuses régions du monde. Selon le deuxième rapport en 2014 sur l'état des ressources génétiques animales pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde, 99 espèces d'animaux d'élevage ont disparu de la planète pour toujours. Actuellement, l'insémination artificielle avec du sperme réfrigéré et/ou congelé-décongelé n'est pas une technique de routine ; son utilisation est limitée à des cas spécifiques, tels que la préservation de matériel génétique précieux, les stratégies de sécurité en cas de catastrophes naturelles, le transport de sperme sur de longues distances, et en combinaison avec le tri par sexe (Shanehbandi et al,2020 ; Lee et al, 2013 ; Konc et al,2014 ; Argyle et al, 2016 ; Peltoniemi et al, 2019 ; Zhang& Rawson,1996 ; Chatdarong ,2017 ; Brusentsev et al ,2018 ).

La cryoconservation du sperme, en tant que procédure courante et importante, offre une option thérapeutique précieuse dans le domaine de la reproduction assistée (Brotherton 1990 ; O'Connell et al. 2002 ; Oehninger et al. 2000). En effet, la plupart des ressources biologiques sont congelées dans des milieux contenant des produits d'origine animale, des agents cryoprotecteurs parmi eux les antioxydants. Ces derniers sont les principaux facteurs de défense contre le stress oxydatif (Silva et al. 2019). En fonction de leur structure chimique, il existe deux types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, tels que la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, le superoxydedismutase et la catalase (Alvarez et Storey 1989 ; Alvarez et al. 1987), et les antioxydants non enzymatiques comprennent le glutathion réduit (GSH), l'urate, l'acide ascorbique, la vitamine E (alpha tocophérol)....

Cependant, les antioxydants présentent certaines limites, tel que leur insolubilité et forte instabilité dans les milieux aqueux, particulièrement en raison de leur nature lipophile.

La nano-encapsulation peut être fortement utile pour protéger les antioxydants de la dégradation par contact direct avec des facteurs externes tels que la lumière, l'oxygène, les

## **Introduction générale**

---

produits chimiques, la chaleur et la pression..., ainsi que pour augmenter la biodisponibilité dans les membranes et fluides biologiques. Parmi les systèmes d'encapsulation les plus cités dans la littérature en retrouve :

- Les cyclodextrines (CDs) : Des molécules-cage ou cages moléculaires d'origine naturelle qui permettent d'encapsuler diverses molécules. Ce sont des oligomères cycliques composés de n chaînes de glucopyranose liés en  $\alpha$ -(1,4) (Patel et al 2020).

- Les liposomes : Des vésicules de matière molle, non toxiques et biodégradables. Leurs bicouches phospholipidiques, qui imitent les membranes cellulaires, font des liposomes des matrices d'encapsulation de premier choix en thérapie. Ils peuvent encapsuler des composés hydrophiles dans leur cœur aqueux ou bien des composés hydrophobes au sein de la bicouche phospholipidique (Eroğlu et al ,2019).

- Le polyéthylène glycol : Une chaîne polymérique, chimiquement inerte qui possède des caractéristiques idéales d'hydratation et de flexibilité (Neves et al, 2011).

L'objectif du présent travail de thèse est de mettre en œuvre un ou plusieurs systèmes innovants de vectorisation des principes actifs hydrophobes (vitamine E et/ou cholestérol) dans le milieu de la conservation spermatique. En effet, l'alpha-tocophérol et cholestérol sont largement utilisées particulièrement seule (non encapsulées), bien caractérisées et approuvées dans la cryoconservation spermatique.

La première partie de notre travail, est une étude d'optimisation des paramètres de formulation des liposomes chargées en vitamine E (encapsulée ou seule) par la méthode d'injection éthanolique. Dans cette partie, il a été nécessaire en amont de mettre au point et de valider la méthode de quantification par HPLC des principes actifs utilisés (vitamine E et cholestérol).

Par suite, afin de démontrer l'impact des formulations obtenues sur la solubilité et stabilité de la vitamine E et/ou cholestérol, une évaluation de la cinétique de libération de l'alpha-tocophérol encapsulée dans la solution liposomiale optimale ainsi qu'une étude de stabilité physique et chimique sur les liposomes ont été réalisées.

Finalement, l'efficacité cellulaire des solutions liposomiales a été démontrée lors de la cryoconservation spermatique de sperme d'origine animale.

Ce manuscrit a été divisé en deux parties :



## **Introduction générale**

---

La première partie concerne une étude bibliographique riche englobant ; la cryoconservation spermatique, les différents systèmes d'encapsulation et les différents cryoconservateurs utilisés. Cette partie a été valorisée par un article de synthèse intitulé : Encapsulation nanotechnology in sperm cryopreservation: systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery, publié dans une revue de renommée « **CryoLetters** ».

Dans la deuxième partie, nous exposons les travaux expérimentaux qui seront développés sous forme de trois sous parties, chacune valorisée par une publication scientifique.

Dans la première partie, vue la composition complexe du milieu de conservation spermatique à mettre en œuvre, un développement et validation d'une méthode de dosage simultanée de la vitamine E et cholestérol par HPLC, selon les critères des ICH, a été réalisé. Ce travail a été valorisé par un article de Recherche intitulé : Development and validation of HPLC method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media, publié dans un journal de renommé « **Biomedical Chromatography** ».

La deuxième partie s'intéresse à la préparation ainsi qu'à l'optimisation par la méthode des plans d'expériences du diamètre et de la capacité d'encapsulation de liposome de vitamine E en fonction de leur contenu en cholestérol et phospholipide. Par la suite un test sur la cellule spermatique a été effectué afin de déterminer l'efficacité de la solution optimale. Ce travail a été valorisé par un article de Recherche intitulé : Alpha Tocopherol loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection, publié dans un journal de renommé « **Drug Delivery Letters** ».

La troisième partie de cette thèse résume les résultats de la cinétique de libération de la vitamine E encapsulée dans les liposomes, ainsi que son étude de stabilité chimique et physique. Ce travail fait parti d'un projet d'article de Recherche intitulé : A new system vitamin E loaded in liposome: Drug release, Stability and efficiency in sperm cryopreservation protection, soumis à publication dans un journal de renommé « **CryoLetters** ».

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus durant de cette thèse a fait l'objet d'une discussion générale avant de terminer par une conclusion et l'identification des perspectives qui pourraient enrichir et compléter le travail déjà réalisé.

### **Références**

A. Neves de Lima, P. dos Santos, M. A. Marques de Lyra, F. L. dos Santos et P. Rolim-Neto, « Solid dispersion systems for increase solubility: cases with hydrophilic polymers in poorly water soluble drugs », *Rev. Bras. Farm.* 92: 269-278 (2011).

Alessandro Ilacqua, Giulia Izzo, Gian Pietro Emerenziani, Carlo Baldari, and Antonio Aversa . Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* , 16: 115 (2018) .

Alvarez JG & Storey BT . Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian Gamete *Res.* 23, 77–90 (1989).

Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L & Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity, *Journal of Andrology* 8: 338–348 (1987).

Argyle CE, Harper JC & Davies MC.

Oocyte cryopreservation: where are we now? , *Hum. Reprod. Update* 22:440–449 (2016).

Begam S, Panda N, Rana S, Behera L & Dehuri P . The Targeted Drug Delivery System; Review Literature On Nanotechnology, Nano Particles, *World Journal of Pharmaceutical Research* 8:11 (2019).

Botelho, M. T., et al. Unusual male size vs sperm count relationships in a coastal marine amphipod indicate reproductive impairment by unknown toxicants. *Aquatic Toxicology.* (2021).

Brusentsev E, Kizilova E, Mokrousova V, Kozhevnikova V, Rozhkova I & Amstislavsky S , Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media ,*Theriogenology* 110: 148–152 (2018).

Chatdarong K, Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa, *Reprod Dom Anim* 52: 261–264 (2017).

Eroğlu I & İbrahim M. Liposome–ligand conjugates: a review on the current state of art, *Journal of Drug Targeting* 28(3), 225-244 (2019).

## **Introduction générale**

---

J. Brotherton .Cryopreservation of Human Semen , journal of Reproductive Systems,181-195 (1990).

Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B Cseh S , New Advances in Reproductive Biomedicine ,BioMed Research International 1–9 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/307268>.

Korani S, Korani M, Bahrami S, Johnston TP, Butler AE, Banach M & Sahebkar, Application of nanotechnology to improve the therapeutic benefits of statins, Drug Discovery Today 24: 567–574 (2019).

Lee SH & Shin CH , Reduced male fertility in childhood cancer survivors ,Ann Pediatr Endocrinol Metab 18: 4-168 (2013).

M O'Connell, N McClure, S E M Lewis. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function, Hum Reprod, 17(3):704-9 (2002).

M, Shanebandi D, Hamdi K, Rahba, S & Pashaiasl M, Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview ,Cell Tissue Bank 21: 1–15(2020).

Patel MR, Lamprou DA & Vavia PR. Synthesis, Characterization, and Drug Delivery Application of Self-assembling Amphiphilic Cyclodextrin , AAPS PharmSciTech 21 : 11 (2020).

Peltoniemi O, Björkman S, Oropeza-Moe M & Oliviero C. Developments of reproductive management and biotechnology in the pig , Anim Reprod 16: 524–538 (2019). <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0055>

Sergio Oehninger, Jacob Maye,r Suheil Muasher.Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation, Molecular and Cellular Endocrinology 169: 73-77(2000).

Souza HM, Arruda LCP, Monteiro MM, Nery IHAV, Silva RAJA, Oliveira AS, Batista AM & Guerra MMP. The in vitro investigation of lycopene effects on post-thawed ram sperm , SAJAS 49:5 (2019).

Zhang T & Rawson DM. Feasibility Studies on Vitrification of Intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos ,*Cryobiology* 33: 1–13 (1996).

# **Etude bibliographique**

### 1. Spermatozoïdes

L'appareil génital mâle comprend les glandes génitales que sont les testicules, productrices des spermatozoïdes, et les voies spermatiques représentées successivement par l'épididyme, le canal déférent et l'urètre. Des glandes annexes se trouvent associées aux voies spermatiques ainsi que des formations érectiles. L'essentiel du tractus génital mâle se trouve hors de la cavité abdominale : testicules et épидидymes dans le scrotum, extrémité pénienne dans la cavité du prépuce. La cavité abdominale héberge les conduits excréteurs des gamètes et des liquides dans lesquelles ceux-ci baignent, ainsi que les glandes annexes génératrices de ces sécrétions. Les tubes séminifères constituent l'unité fonctionnelle des testicules chargées d'élaborer les spermatozoïdes. Le sperme est continuellement produit par les testicules et entreposé dans l'épididyme. La prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper) sécrètent le liquide spermatique. Le canal déférent faisant suite à l'épididyme présente un épaississement appelé ampoule différentielle qui est le lieu de stockage des spermatozoïdes avant l'éjaculation.

Les spermatozoïdes sont en suspension dans le liquide spermatique et l'ensemble est appelé « sperme ». Le fructose est la seule source énergétique de leur métabolisme. La pièce intermédiaire constitue la principale zone d'activité métabolique. Le flagelle constitué de fibrilles contractiles joue un rôle moteur. La capacité de motilité (mouvements sans déplacement) des spermatozoïdes est acquise lors du transit épидидymaire. Leur activité métabolique est aérobie dans le milieu extérieur et anaérobie dans le milieu intra-utérin. Leur durée de survie hors des voies génitales mâles est de 24 heures (Yaye, 2009).

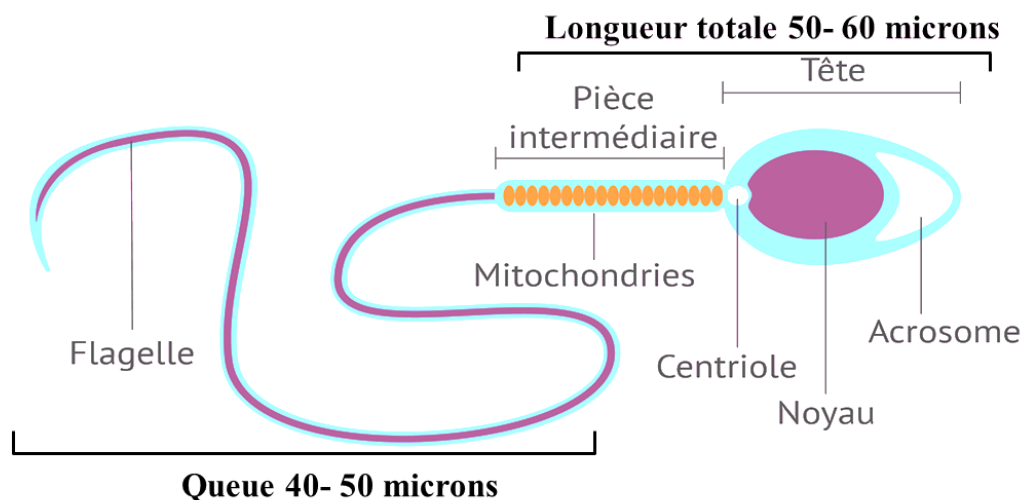


Figure 1: Structure du sperme.

### 2. Cryoconservation spermatique

Il est largement rapporté que le processus de cryoconservation impliquant le refroidissement, la congélation et la décongélation induit des modifications graves et préjudiciables des fonctions des spermatozoïdes (Colas et al. 2009). Il est bien connu que le processus de congélation et de décongélation du sperme entraîne non seulement des modifications néfastes de la composition des lipides membranaires, de l'état des acrosomes et de la motilité et de la vitalité des spermatozoïdes, mais aussi une augmentation des dommages causés à l'ADN des spermatozoïdes (de Paula et al. 2006 ; Hammadeh et al. 1999 ; Isachenko et al. 2004 ; Said et al. 2010 ; Thomson et al. 2009 ; Zribi et al. 2010). Pendant le processus de cryoconservation, les spermatozoïdes subissent de nombreux stress liés à la baisse de température, à l'ajout de cryoprotecteurs, à la formation de glace et à l'exposition à une osmolalité accrue du milieu pendant la congélation (Watson, 2000).

#### 2.1 Dommages cellulaires liés à la congélation et au refroidissement

Les dommages cellulaires (figure 1) sont d'origines multiples : biochimiques, mécaniques, génétiques, etc. Ces dommages sont créés pas plusieurs phénomènes liées à la cryoconservation (tableau 1). Comme souligné précédemment, les principaux dommages sont liés au froid, à la présence de glaces, à la déshydratation (pression osmotique) et à la toxicité des cryoprotecteurs (Kopeika et al 2015).

**Tableau 1:** Les principaux changements de la structure biologique lors de la congélation.

Facteurs physiques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Modification de la pression osmotique,</li><li>- Forces mécanique des cristaux de glace,</li><li>- Tension électrique entre les cristaux,</li><li>- Augmentation de la pression hydrostatique.</li></ul>
Facteurs chimique	<ul style="list-style-type: none"><li>- Redistribution des composants ioniques,</li><li>- Changement du pH,</li><li>- Transition de phase des biopolymères,</li><li>- Transformation redox,</li><li>- Effets des cryoprotecteurs,</li><li>- Radicaux libres.</li></ul>

### 2.1.1 Dommage liée au froid

Les dommages liés au froid, appelé « **chilling injur** », provoquent généralement des lésions au niveau de la membrane plasmique en absence de la glace. On distingue deux types de dommages :

- Les effets indésirables dus à l'exposition des cellules à des températures basses en dessous d'un certain seuil : « **Cold injury** ».
- Les effets indésirables dus à une cinétique de refroidissement trop élevée : « **Cold choc** » (Mazur P et al ,2008).

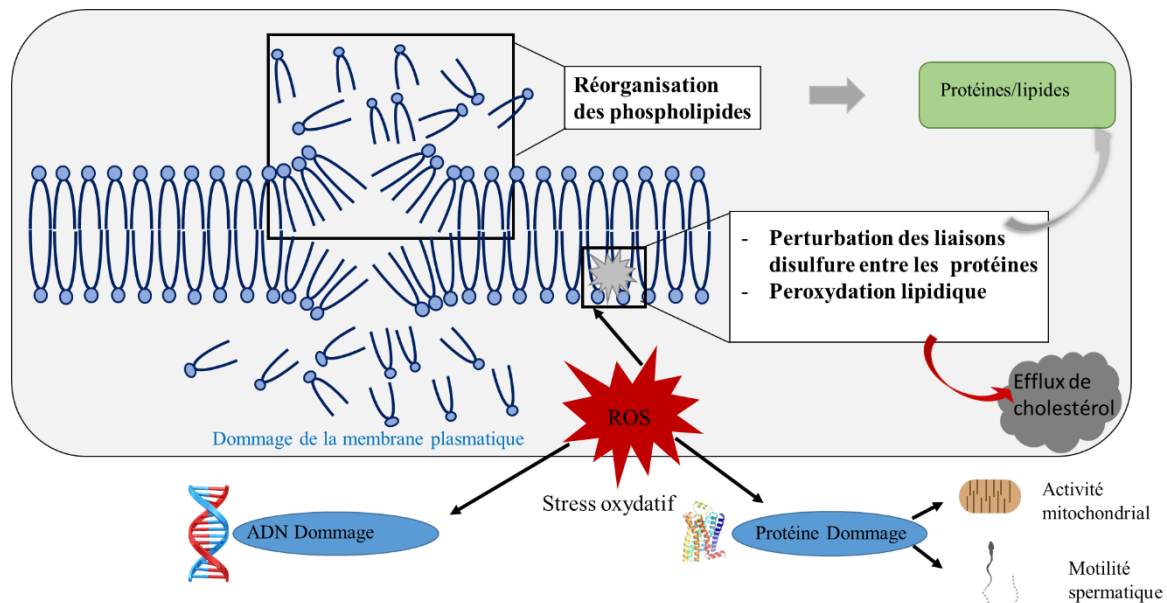
La composition et la capacité de réponse des membranes des spermatozoïdes déterminent, dans une large mesure, le degré de dommage subi lors des différentes vitesses de refroidissement, du passage de la phase de transition lipidique et des déséquilibres ioniques. Ce phénomène est communément appelé "choc froid" et provoque des changements dans la distribution des phospholipides à travers la double membrane, entraînant une altération de sa fonction et de ses capacités (Darin-Bennett et al, 1977 ; Sancho et al ,2007; Parks& Graham, 1992). En outre, étant donné que les protéines sont des composants importants des membranes des spermatozoïdes et que leurs interactions avec les lipides sont essentielles pour le fonctionnement efficace de la membrane entière, lorsque les spermatozoïdes sont soumis à une température de congélation inférieure à la température de la phase de transition, il en résulte un changement de l'état de gel et une addition progressive de lipides spécifiques au sein de la membrane. En conséquence, les interactions lipide-protéine sont interrompues et, par conséquent, les protéines n'agissent plus efficacement en tant qu'enzymes, récepteurs ou canaux ioniques. En général, les changements dans l'intégrité et la motilité de la membrane plasmique sont des indicateurs de la viabilité et de l'activité métabolique des spermatozoïdes (Lemma, 2011). En général, les dommages produits par le choc froid se manifestent par une diminution du métabolisme cellulaire, une altération de la perméabilité membranaire, une perte de composants intracellulaires, une perte irréversible de motilité et une augmentation du nombre de spermatozoïdes morts (Lemma, 2011). L'endommagement des membranes cellulaires a une grande importance car il a un effet domino sur d'autres structures et fonctions cellulaires, comme l'induction d'une réaction acrosomale prématurée, l'altération de la fonction mitochondriale, la réduction de la motilité et les défaillances de la décondensation de la chromatine, qui influencent la viabilité et la fertilité des spermatozoïdes (Curry, 2000 ; Holt, 2000 ).

### 2.1.2 Stress Oxydatif

Le stress oxydatif est causé par la production incontrôlée et excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), également appelées radicaux libres de l'oxygène, contiennent un ou plusieurs électrons non appariés et donc des agents oxydants très réactifs. Ils sont formés comme sous-produits lors de réactions enzymatiques avec l'oxygène au cours du métabolisme cellulaire normal (Agarwal et al 2014 ; Sikka 2001). Comme toutes les cellules vivantes dans des conditions aérobies, les spermatozoïdes sont également confrontés à l'oxygène ( $O_2$ ) et produisent donc des ROS pendant leur métabolisme normal (de Lamirande et al, 1997). Les radicaux libres "volent" les électrons des structures environnantes, provoquant ainsi des perturbations dans les structures voisines et transformant d'autres molécules en radicaux libres (Du Plessis et al, 2015). Des exemples de ROS hautement réactifs sont le radical anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde (ROO) et une sous-classe de radicaux libres dérivés de l'azote (par exemple, l'oxyde nitrique (NO), le peroxy-nitrate ( $ONOO^-$ ) (Sikka 2001; Lanzafame et al , 2009). Normalement, il existe un équilibre entre les oxydants et les systèmes antioxydants pour protéger les cellules contre les dommages potentiels causés par les ROS. Lorsque la production de ROS dépasse les défenses biologiques antioxydantes, un état appelé stress oxydatif se produit. Cela peut entraîner la destruction partielle ou totale de la physiologie cellulaire (Tremellen ,2008).

Les spermatozoïdes ne contiennent qu'une quantité minimale d'enzymes et de systèmes antioxydants; en raison de leur manque important de cytoplasme, la majorité des antioxydants sont contenus dans le liquide séminal (Kefer et al, 2009). Cela comprend des enzymes telles que la superoxydedismutase (SOD) et la catalase ainsi que des substances non enzymatiques comme l'acide ascorbique (vitamine C), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), la vitamine A (rétinoïde), l'urate, l'albumine, etc (Agarwal et al, 2008). Le stress oxydatif peut endommager divers composants et fonctions des spermatozoïdes. Il peut causer de graves dommages à la membrane plasmique et à l'ADN, et également induire l'apoptose (Agarwal et al 2014). La membrane plasmique des spermatozoïdes est particulièrement vulnérable, en raison de sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés, et donc en doubles liaisons (Henkel, 2011). Cela peut affecter les paramètres du spermatozoïde tels que la concentration, la motilité, la morphologie et donc la fécondation (Agarwal et al 2014, Agarwal et al , 2008). Bien que des concentrations excessives de ROS provoquent une pathologie du sperme, on estime qu'une concentration faible et contrôlée (niveaux physiologiques) est importante dans les processus importants de la physiologie normale du sperme et de la fécondation (Agarwal et al 2014).





**Figure 2:** Dommages cellulaires liés à la congélation et le refroidissement.

### 3. Antioxydants et la qualité spermatique

Les antioxydants, en général, sont des composés qui éliminent, neutralisent la formation de ROS et la peroxydation des lipides. Par conséquent, l'application de piègeurs de ROS est susceptible d'améliorer la fonction des spermatozoïdes. En raison de la petite taille du composant cytoplasmique, la capacité antioxydante des spermatozoïdes est limitée lors d'un stockage prolongé à des températures supérieures à 0°C. Les antioxydants ordinaires contenus dans le sperme comprennent : La vitamine E, la vitamine C, la superoxydedismutase, le glutathion et la thiorédoxine (David et al 2019).

#### 3.1 Alpha tocophérol (vitamine E)

Herbert M. Evans et Katherine S. Bishop, ont découvert un facteur appelé "facteur X" dans l'extrait lipidique de la laitue qui était nécessaire à la reproduction des rats (Evans et al, 1922). En 1924, le "facteur X" a été nommé vitamine E par Barnet Sure (Barnett, 1924). Olcott et Mattill (Olcott and Mattil, 1931) ont suggéré que l'action de la vitamine E devait être attribuée à ses propriétés antioxydantes, bien que d'autres mécanismes n'aient pas été exclus. L'idée que la fonction moléculaire de la vitamine E est celle d'un antioxydant a dominé le domaine jusqu'en 1988, date à laquelle un mécanisme moléculaire alternatif a été proposé par Mahoney et Azzi (Mahoney and Azzi, 1988).

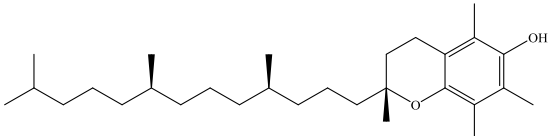
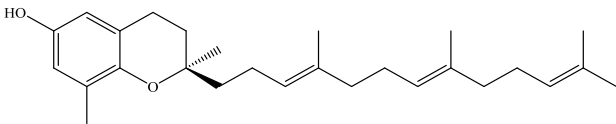
##### 3.1.1 Structure et Sources de la Vitamine E

La vitamine E, vitamine liposoluble a été découverte dans les légumes à feuilles vertes en 1922 (Evans et al, 1922). La vitamine E est une famille de 8 isoformes naturelles, à savoir,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$

## Etude bibliographique

isoformes de tocophérol et  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  isoformes de tocotriénol. Les tocophérols et les tocotriénols ont un cycle chromanol en commun. La chaîne latérale phytyle hydrophobe à 16 atomes de carbone est entièrement saturée en tocophérols alors qu'elle possède 3 doubles liaisons trans dans les tocotriénols. Quatre isoformes de chacun des tocophérols et des tocotriénols diffèrent par le degré de méthylation et la position du groupe méthyle attaché au cycle chromanol (**Tableau 2**). Les principales sources alimentaires de vitamine E sont les noix et les huiles végétales comestibles. Les sources de tocotriénols sont l'huile de palme, l'orge et les céréales (Etsuo and Kouichi, 2019).

**Tableau 2:** Structures chimiques de l' $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -vitamine E.

Composant	R1	R2	R3	Structure chimique
$\alpha$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	 <p style="text-align: center;">Tocophérol</p>
$\beta$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\gamma$ -tocophérol	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\delta$ -tocophérol	H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\alpha$ -tocotrienol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	 <p style="text-align: center;">Tocotriénol</p>
$\beta$ -tocotrienol	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\gamma$ -tocotrienol	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	
$\delta$ -tocotrienol	H <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	

### 3.1.2 Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

- La vitamine E est un liquide visqueux, de consistance huileuse et de coloration jaune pâle à température ambiante.
- Elle est soluble dans les graisses, huiles et solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, alcools éthyliques et méthyliques) et insoluble dans l'eau.
- L'oxydation de la vitamine E se fait en milieu basique à la lumière et à la température élevée.
- En l'absence d'oxygène et en milieu acide la vitamine E est stable.
- Elle présente une sensibilité aux rayons UV.

**Tableau 3:** Propriétés physico-chimiques de la vitamine E.

<b>Formule brute</b>	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
<b>Masse molaire</b>	430 ,69 g/mol
<b>T° de fusion</b>	3°C
<b>T° 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

### 3.1.3. Mécanisme d'action antioxydant

Suite à la suggestion originale d'Olcott et Mattill (Olcott and Mattil, 1931), les propriétés antioxydantes de la vitamine E ont été étudiées de manière intensive. En fait, il a été démontré que la vitamine E fonctionne *in vitro* comme une molécule piégeant les radicaux peroxyde et qu'elle inhibe la peroxydation des lipides. *In vivo*, après avoir réagi avec un radical libre, le groupe OH du chromanol n'est plus disponible et doit être régénéré pour maintenir le statut antioxydant. Bien qu'il ait été démontré que la régénération de la vitamine E a lieu *in vitro* (Traber and Atkinson, 2007), *in vivo*, et en particulier chez l'homme, le maintien de la vitamine E dans l'organisme n'a pas été clairement associé à sa régénération (Salonen et al, 2003). Les Académies nationales des sciences, de l'ingénierie et de la médecine écrivent : "On ne sait pas dans quelle mesure la vitamine E est recyclée chez l'homme et quelles espèces d'antioxydants sont utilisées de préférence pour le recyclage" (Krinsky et al, 2000). En conclusion, la vitamine E agit *in vivo* comme un antioxydant dans certaines conditions ; cependant, cela n'exclut pas son action par des mécanismes moléculaires différents ou supplémentaires. La question de savoir dans quelle mesure la protection contre les maladies est due à un antioxydant ou à d'autres propriétés moléculaires de la vitamine E est une question de recherche future.



**Figure 3:** Mécanisme antioxydant de la vitamine E.

### 3.2 Acide ascorbique

Au milieu du VIII<sup>e</sup> siècle, James Lind a démontré que le jus d'agrumes frais guérit le scorbut. L'agent actif, la forme énolique de la 3-céto-L-gulofuranlactone, baptisée acide ascorbique ou vitamine C, a été isolé à la fin des années 1920 par Albert Szent-Gyorgyi. Au milieu des années

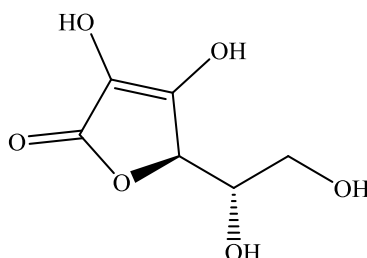
## Etude bibliographique

---

1930, des méthodes ont été mises au point pour synthétiser le composé, et il est rapidement devenu largement disponible à faible coût. Il a été rapidement établi que la substance était pratiquement non toxique, quel que soit le dosage. La fonction de base de la vitamine C était la prévention du scorbut.

### 3.2.1 Structure et Sources de la Vitamine C

La vitamine C, acide L-ascorbique (Figure 3), est un composé organique hydrosoluble, très répandue dans le monde vivant. De formule chimique générale  $C_6H_8O_6$ , la vitamine C appartient aux groupes des sucres à 6 atomes et est un dérivé du D-Glucose. Elle est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonction ène-diol et de deux fonctions alcools : l'une primaire et l'autre secondaire. L'AA possède deux formes optiques : lévogyre et dextrogyre, mais seule la forme lévogyre, forme naturelle (acide L-ascorbique) est biologiquement active (Martini et Seiller 2006). La vitamine C peut être extraite de la nature ou créée par voie de synthèse à partir du D-Glucose (Munnich et al. 1987). Les sources les plus riches en acide ascorbique sont notamment la groseille à maquereau indienne, les agrumes tels que le citron vert, les oranges et les citrons, les tomates, les pommes de terre, la papaye, les poivrons verts et rouges, les kiwis, les fraises et les cantaloups, les légumes à feuilles vertes tels que le brocoli, les céréales enrichies, leurs jus sont également de riches sources de vitamine C.



**Figure 4:** Structure de l'acide ascorbique.

**Tableau 4:** Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine C.

<b>Formule brute</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
<b>Masse moléculaire</b>	176.1241 g/mol
<b>Aspect</b>	Poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre.
<b>Solubilité</b>	Solubilité dans l'eau 1g/3ml à 25 C° Solubilité dans l'alcool 1g/40ml à 25 C°
<b>Stabilité</b>	Relativement stable à l'air sec, très oxydable en solution aqueuse et en mélanges, surtout en présence d'alcalin, de cuivre et de fer.
<b>pH</b>	2-3
<b>T° de fusion</b>	190 à 192 C°.
<b>Masse volumique</b>	1.65

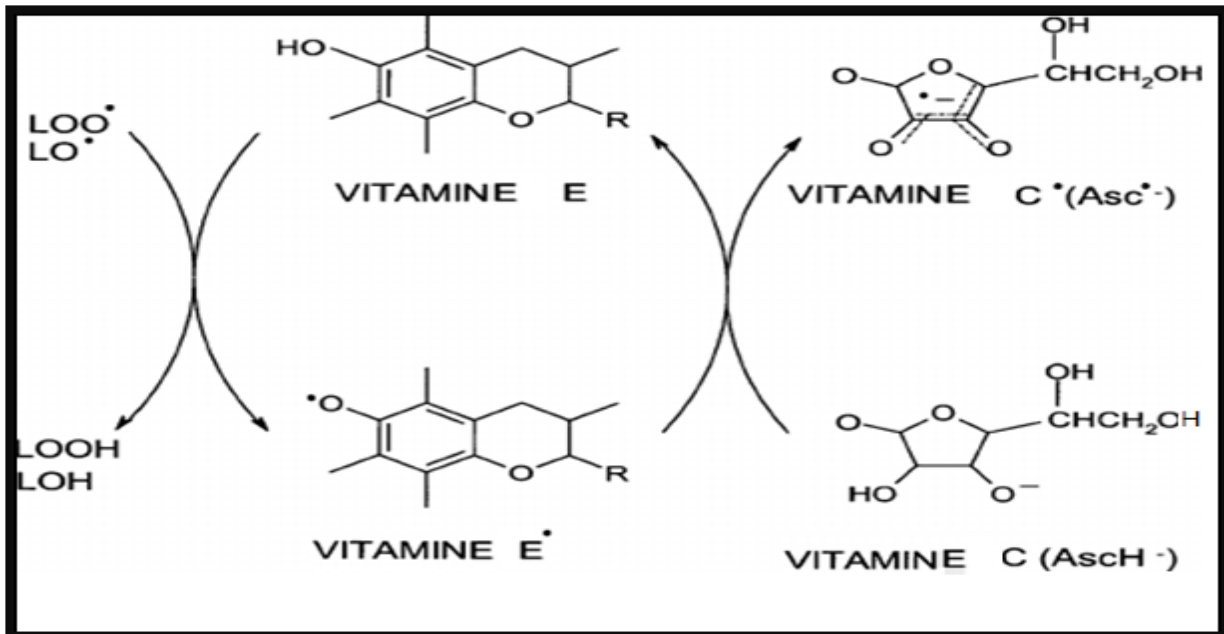
### 3.2.2 Mécanisme d'action antioxydant

Les propriétés chimiques et biologiques de l'acide ascorbique suggèrent qu'il peut agir comme un antioxydant in vivo (Levine et al, 1993). La vitamine C est un antioxydant primaire en ce sens qu'elle neutralise directement les espèces radicalaires. Elle est peu réactive avec les oxydants cellulaires courants tels que le peroxyde d'hydrogène et réagit probablement surtout avec les produits de dégradation du peroxyde d'hydrogène (Frei et al, 1988).



**Figure 5:** Mécanisme antioxydant de la vitamine C.

La vitamine C a la capacité de protéger contre la peroxydation des lipides en agissant comme un piègeur des ROS et par la réduction d'un électron des radicaux hydroperoxydes des lipides via le cycle redox de la vitamine E (Guilland, 2011) (Figure 4 et 5). Le radical LPO peut endommager les macromolécules (ADN, ARN et protéines) et peut déclencher des réactions cytotoxiques, génotoxiques et inflammatoires. La vitamine C convertit les produits de peroxydation des lipides en produits LPO de vitamine C non réactifs. Cela permet de prévenir l'interaction des macromolécules (ADN, ARN et protéines) avec les radicaux LPO. La vitamine C joue un rôle dans la régénération de la vitamine E ; elle donne un électron au radical tocophéryle (vitamine E-O<sup>-</sup>) et le réduit en tocophérol.



**Figure 6:** Réaction de la vitamine E avec des radicaux peroxydes et la régénération de la vitamine E radicalaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C.

#### 4. Agents Cryoprotecteurs (renforcement membranaire)

Les cryoprotecteurs sont des produits chimiques de faible poids moléculaire et très perméables utilisés pour protéger les spermatozoïdes des dommages causés par le gel lors de la cristallisation de la glace. Les cryoprotecteurs agissent en diminuant le point de congélation d'une substance, en réduisant la quantité de sels et de solutés présents dans la phase liquide de l'échantillon et en diminuant la formation de glace dans les spermatozoïdes. Il est nécessaire que le milieu interagisse avec les cellules. En effet, l'efficacité des substances cryoprotectrices est également fonction du temps d'interaction entre les cryoprotecteurs et les cellules. La supplémentation ou l'extraction de lipides et/ou de cholestérol peut modifier les propriétés des membranes cellulaires. Cela peut être réalisé en utilisant des cyclodextrines ou des liposomes chargés en cholestérol, qui modifient le rapport cholestérol/phospholipides ou la composition des phospholipides en augmentant les limites de tolérance osmotique, la sensibilité à la peroxydation des lipides et la cryostabilité (Harald et al ,2016).

##### 4.1 Cholestérol

En 1758, François-Paul Poulletier de la Salle a découvert une nouvelle substance organique dans les calculs biliaires. En 1816, un célèbre chimiste français Michel-Eugène Chevreul, énonce les caractéristiques physico-chimiques de cette substance lipidique et la nomme «cholestérine». En 1985, l'importance du cholestérol fut relevée par l'attribution du prix Nobel

## Etude bibliographique

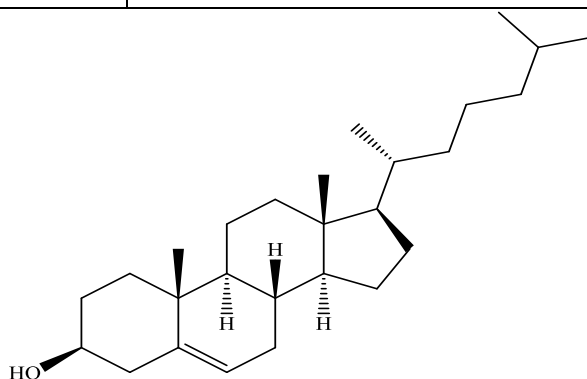
de Médecine à J.L. Goldstein et Mickael S. Brown pour leur découverte portant sur la régulation du métabolisme du cholestérol (Schlienger, 2012).

### 4.1.1 Structure et Sources du cholestérol

Le cholestérol (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O) est le principal composé de la famille des stérols et est présent dans les cellules d'origine animale, représentant le lipide le plus important dans les cellules eucaryotes (Figure 6). Il agit dans le contrôle de la fluidité et de la perméabilité des membranes cellulaires et dans la synthèse des acides biliaires, de la vitamine D et des hormones stéroïdes. De plus, il est un composant crucial dans la composition des lipoprotéines qui sont impliquées dans le transport et le métabolisme des lipides dans le corps (Harper & Jacobson, 1999). Le cholestérol peut être présent sous sa forme libre, combiné avec des acides gras à longue chaîne, ou sous forme d'esters de cholestérol (Morzycki, 2014). Sous sa forme libre, le cholestérol est un alcool polycyclique à longue chaîne avec un cycle tétracyclique commun aux stérols. Il possède un groupe hydroxyle en C3 et une insaturation entre les positions C5 et C6, ainsi qu'une chaîne latérale aliphatique (Hur et al, 2007).

**Tableau 5:** Propriétés physico-chimiques du cholestérol.

Formule chimique	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
Masse moléculaire (g/mol)	386,654
Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> )	1,07 à 20 °C
Point de fusion (°C)	147 à 150
Point d'ébullition (°C)	360
Point d'éclair (°C)	250
Solubilité	Pratiquement insoluble dans l'eau



**Figure 7:** Structure du cholestérol

### 4.1.2 Mécanisme d'action

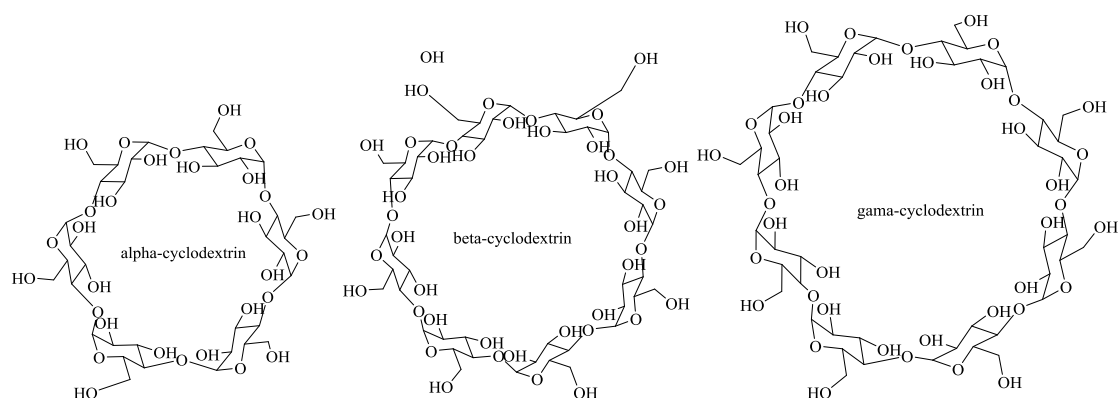
Les molécules de cholestérol apportent de la rigidité et de la stabilité à la membrane des spermatozoïdes. En conséquence, la libération du cholestérol de la membrane du sperme, due à l'action des protéines BS, diminue la résistance du sperme à la congélation, ce qui est préjudiciable à la qualité du sperme après la décongélation. Cependant, dans le sperme, ces protéines ont des effets bénéfiques sur la qualité du sperme après la décongélation, en protégeant les spermatozoïdes des dommages causés par la cryogénie (Mocé et al, 2010 ; Moore et al, 2005 ; Purdy and Graham, 2004).

## 5. Les systèmes d'encapsulation

### 5.1 Cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) ont été découvertes par Villiers en 1891. Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides cycliques, obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon, composés d'unités de D-glucopyranose liées en (1-4) Sur la base des unités de glucopyranose, les cyclodextrines naturelles sont disponibles sous les noms  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$  cyclodextrines comme indiqué sur la figure 7 (Arun et al., 2008; Zafar et al., 2014). Elles ont une forme tronconique typique, où les groupes hydroxyles primaires et secondaires sont orientés vers l'extérieur de la cavité et sont situés, respectivement, sur ses bords plus étroits et plus larges ; les atomes d'hydrogène et les ponts d'oxygène glycosidique sont au contraire tournés vers l'intérieur de la cavité, ce qui lui confère un caractère lipophile. La structure cyclique spéciale des molécules de CD, présentant une surface extérieure hydrophile et une cavité interne à caractère hydrophobe, est responsable d'une part de leur solubilité en milieu aqueux et, d'autre part, de leur capacité à piéger dans leur cavité des molécules hydrophobes de dimensions appropriées, conduisant ainsi à la formation d'un "complexe d'inclusion". Les caractéristiques des cyclodextrines sont énumérées dans le tableau 6 (Arun et al, 2008; Yang et al, 2010 ; Zafar et al, 2014). Les cyclodextrines peuvent former un complexe d'inclusion avec une variété de composés solides, liquides et même gazeux. Les complexes formés lors de l'utilisation des CDs sont surtout connus sous le nom de complexes hôte-invité. L'hôte (CD) et l'invité (principe actif, PA) se lient généralement dans un rapport de 1:1. Outre les complexes d'inclusion, des complexes de non-inclusion peuvent également être formés, dans lesquels la molécule hôte peut être fixée à la partie externe du CD.

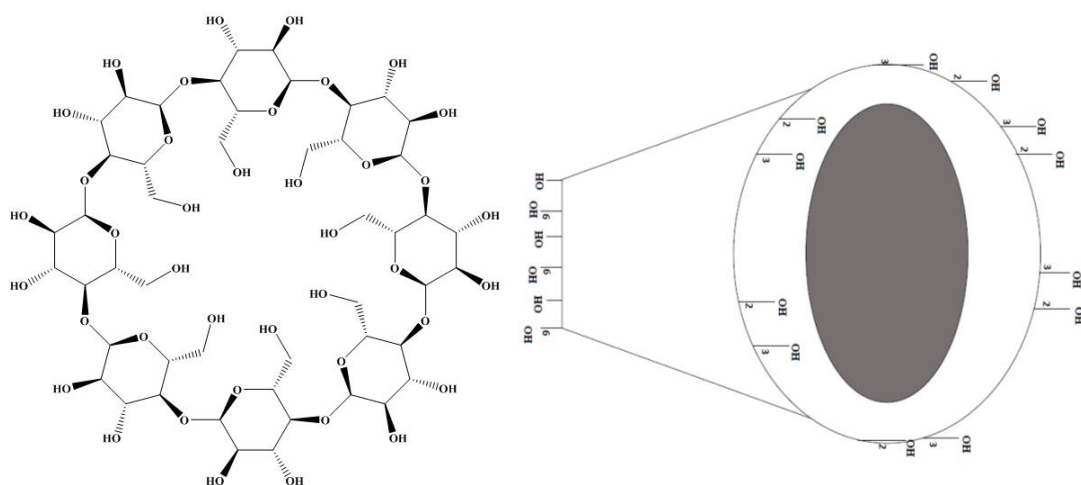




**Figure 8 :** Structures de : l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  cyclodextrine.

### 5.1.1 Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines

Les CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non-hygroscopiques (Zafar et al., 2014). Leurs principales caractéristiques sont rassemblées dans le tableau 6. Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire varient avec le nombre d'unités de glucose. Par contre, la hauteur est la même pour les trois CDs. Le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent en allant de l' $\alpha$ -CD à la  $\gamma$ -CD. Parmi les trois CDs natives, la  $\beta$ -CD est la plus intéressante du point de vue complexation (Blach et al, 2008). Mais, la  $\beta$ -CD possède la plus faible solubilité aqueuse (Tableau 6). Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogènes intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyles secondaires. Au sein de la  $\beta$ -CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau (Arun et al, 2008; Zafar et al, 2014).



**Figure 9:** Structure de la  $\beta$  Cyclodextrine.

## Etude bibliographique

---

**Tableau 6:** Propriétés physico-chimiques des CDs natives (Szjetli, 1998; Challa et al, 2005 ; Loftsson et Brewster, 2011).

Propriété	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombres d'unités de glucose	6	7	8
Formule moléculaire	$(C_6H_{10}O_5)_6$	$(C_6H_{10}O_5)_7$	$(C_6H_{10}O_5)_8$
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse moléculaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	5.7	7.8	9.5
Diamètre de la périphérie (Å)	14.6-15	15.4-15.8	17.5-17.9
Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	173	262	427
Hauteur du cône (Å)	7.8	7.8	7.8
Molécules d'eau retenues dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275
pKa à 25°C	12.3	12.2	12.1
Log P à 25°C	-13	-14	-17
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/ml)	145	18.5	232

Les CDs présentent les avantages suivants (Szjetli, 1998; Nuchuchua et al, 2009):

- Biocompatibilité, biodégradabilité et non-toxicité (le glucose est le produit majeur de la dégradation);
- Non volatilité et non inflammabilité ;
- Faible activité pharmacologique ;
- Absence d'absorption dans la gamme d'UV utilisée pour la détection des solutés ;
- Stabilité dans une large gamme de pH ;
- Augmentation de la stabilité chimique, physique et thermique de la molécule encapsulée ;
- Augmentation de la solubilité aqueuse des molécules hydrophobes encapsulées ;
- Vitesse de libération contrôlée des molécules encapsulées ;
- Amélioration des activités biologiques de la molécule encapsulée.

## Etude bibliographique

### 5.1.2 Dérivés des cyclodextrines

De nombreux dérivés de CDs ont été synthétisés pour différents objectifs (Szente et al, 1999) :

- 1) améliorer la capacité de complexation des CDs ;
- 2) augmenter leur solubilité aqueuse ;
- 3) augmenter leur affinité pour une molécule donnée ;
- 4) introduire des groupements spécifiques facilitant la complexation ;
- 5) synthétiser des polymères ;
- 6) Réduire les dégâts provoqués au niveau des membranes cellulaires. Les groupements hydroxyles des CDs natives et surtout la  $\beta$ -CD peuvent être modifiés par voie chimique ou enzymatique (Szente, 1999). Les dérivés de cyclodextrines fréquemment rencontrés dans le domaine pharmaceutique sont de type méthyle, hydroxypropyle (HP) et sulfobutyléther (SBE) (Mosher et al, 2000).

Les dérivés de CD sont caractérisés par le degré de substitution molaire moyen (MS) qui est le nombre moyen de substitution par unité d' $\alpha$ -D-glucopyranose (le MS varie de 0 à 3) (Szente et al, 1999). Le tableau 6 résume les caractéristiques des dérivés de cyclodextrines.

**Tableau 7:** Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines.

Cyclodextrine	D.S	Masse moléculaire	Solubilité aqueuse a 25 C (g/100 ml)
Dimeb	2	1331	57 <sup>a</sup>
Trimeb	3	1429	31 <sup>a</sup>
Rameb	1,8	1312	> 50 <sup>b</sup>
Crysmeb	0,57	1191	22 <sup>c</sup>
HP-b-CD	0,65	1400	> 60 <sup>b</sup>
SBE-b-CD	0,9	2163	> 50 <sup>b</sup>
HP-g-CD	0,6	1576	> 50 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>(Mosher and Thompson, 2000), <sup>b</sup>(Loftsson and Duchêne, 2007),

### 5.1.3 Méthodes de préparation des complexes d'inclusion

Plusieurs méthodes de préparation sont utilisées pour former des complexes d'inclusion comme: La co-précipitation, le co-mélange, le pétrissage, l'extrusion, la neutralisation, la co-évaporation, la lyophilisation, l'atomisation ou pulvérisation, l'inclusion à sec, l'inclusion en

suspension, l'inclusion en méthode humide, l'inclusion par micro-ondes, l'inclusion au CO<sub>2</sub> supercritique (Nasir et al, 2012).

### 5.1.4 Interactions des cyclodextrines avec les membranes

Les interactions de différentes cyclodextrines avec les composants vitaux (phospholipides et cholestérol) des membranes biologiques permettent de mieux comprendre les conséquences de ces interactions au niveau cellulaire. Des monocouches de lipides et des liposomes sont souvent utilisés comme modèles membranaires pour étudier l'effet des CDs sur les membranes. Des monocouches constituées de lipides purs ou en mélange ont été utilisées pour étudier leur interaction avec des cyclodextrines natives en solution dans la phase aqueuse (Asgharian et al, 1988; Ohvo et al, 1996; Bernat et al, 2007; Grauby-Heywang et al, 2008). La  $\beta$ -CD n'a pas montré une interaction significative avec la DPPC, (Asgharian et al, 1988) et la DMPC (Grauby-Heywang et al, 2008). La  $\beta$ -CD extrait plus spécifiquement le cholestérol des monocouches vers la phase aqueuse (Asgharian et al, 1988 ; Ohvo et al, 1996). Au contraire de la  $\beta$ -CD, la cavité de l' $\alpha$ -CD semble être trop petite pour inclure et extraire le cholestérol (Ohvo et al, 1996). Les liposomes ont été également utilisés comme modèle membranaire pour des études des interactions avec les cyclodextrines et ses dérivés. Les propriétés électrostatiques de la tête polaire des phospholipides, sa charge et son moment dipolaire régissent l'action de l' $\alpha$ -CD (Debouzy et al, 1998). L'affinité de l' $\alpha$ -CD varie d'un phospholipide à un autre (Debouzy et al, 1998). Nishijo et al, 2000 ont étudié l'interaction des CDs et leurs dérivés avec des liposomes constitués de phospholipides qui diffèrent par la longueur de leurs chaînes d'acides gras. Les CDs ( $\alpha$ -CD, Dimeb et Trimeb ) entraîne la libération du carboxyfluorescéine dans les différents types de liposomes, par contre, la  $\beta$ -CD, l'HP- $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD n'entraînent pas la libération de carboxyfluorescéine (Nishijo et al., 2000). L'effet des CDs sur l'intégrité membranaire des liposomes est dépendant du type de vésicules, des lipides constitutifs du fait que les liposomes constitués des phospholipides saturés sont toujours plus stables que ceux formés à partir des phospholipides insaturés et du type de la cyclodextrine utilisé (Hatzi et al., 2007).

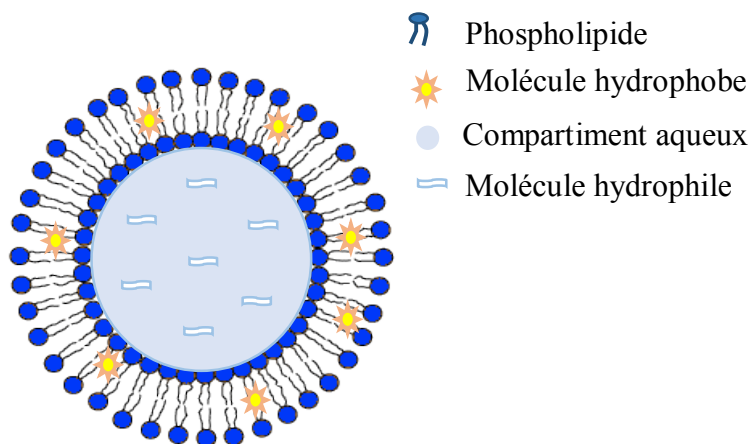
## 5.2 Liposomes

Les liposomes ont été fabriqués pour la première fois en 1965 par Bangham et ses collègues alors qu'ils faisaient des recherches sur la membrane cellulaire (Bangham et al, 1965). Les liposomes sont de petites vésicules dont la paroi est formée d'une ou plusieurs bicouches de nature phospholipidiques, renfermant un espace interne aqueux figure 9. Leur intérêt réside principalement sur la possibilité de vectoriser des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y

## Etude bibliographique

---

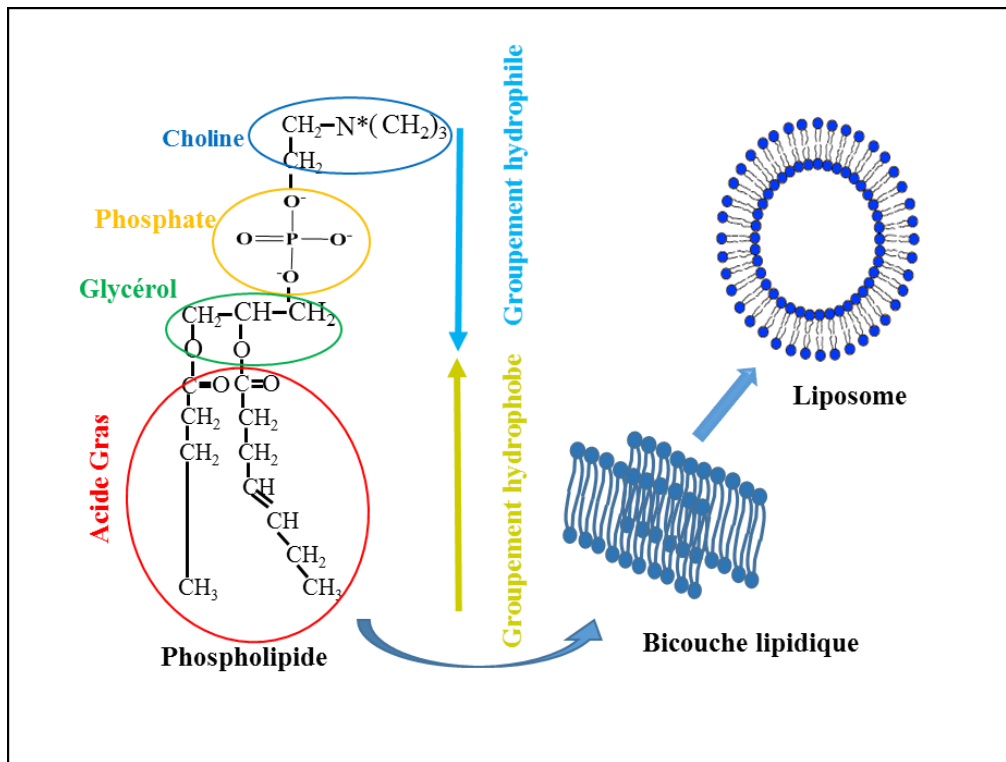
encapsuler des principes actifs de solubilité très différente (hydrophile, amphiphile ou lipophile). Différentes formes pharmaceutiques à base de liposomes ont été mises au point tel que les suspensions, les aérosols ou les formes semi-solides comme les gels et les crèmes. L'administration de ces formes se fait généralement soit par voie intraveineuse soit par voie topique. Les liposomes peuvent être utilisés comme vecteurs de thérapie génique en encapsulant des gènes ou des plasmides. Ils peuvent aussi être employés pour exposer des protéines virales à leur surface, dans ce cas on les appelle des virosomes et sont donc utilisés comme vaccins. A côté de ces utilisations en pharmacie, les liposomes sont également utilisés en cosmétologie et dans l'industrie agro-alimentaire (Laouini et al, 2012).



**Figure 10:** Structure du liposome.

### 5.2.1 Composition des liposomes

En général, la composition des liposomes comprend des phospholipides naturels et/ou synthétiques. Les bicouches liposomiques peuvent également contenir d'autres constituants tels que le cholestérol, le polymère hydrophile, des lipides conjugués et de l'eau. Un avantage évident des liposomes est le fait que la membrane lipidique est constituée de lipides physiologiques, ce qui diminue le danger de toxicité aiguë et chronique (Laouini et al, 2012).

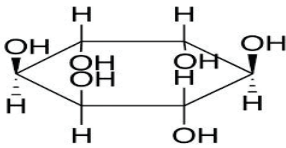


**Figure 11:** Composition structural du liposome.

### 5.2.1.1 Phospholipides

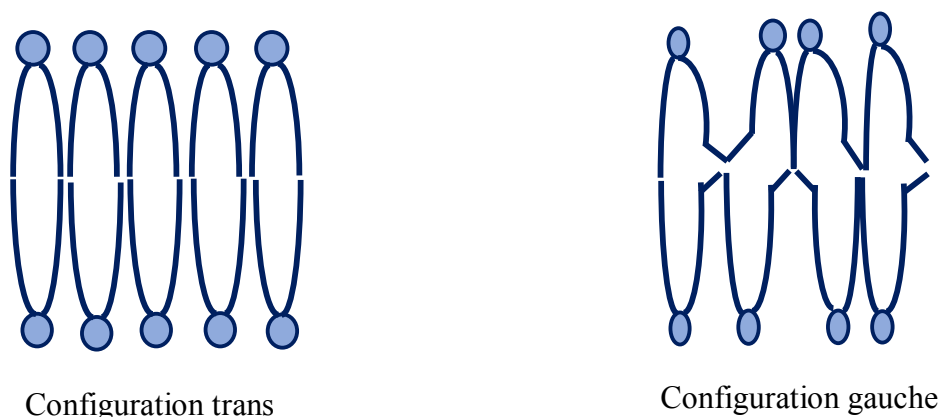
Les phospholipides font partie de la famille des glycérolipides. Les glycérolipides sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe phosphate polaire, lui-même estérifié par différents groupements (glycérol, choline, éthanolamine, sérine et inositol) (Tableau 8), constituant la tête polaire du phospholipide (Shashi et al, 2012). Les molécules de phospholipides ont tendance à s'organiser en solution de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires et inversement.

**Tableau 8:** Exemples de groupement chimique associé au phosphate des phospholipides.

Nom	Abréviation	Formule chimique du groupement associé au phosphate des phospholipides
Acide phosphatidique	PA	<b>-H</b>
Phosphatidylcholine	PC	<b>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup></b>
Phosphatidyléthanolamine	PE	<b>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>
Phosphatidylsérine	PS	<b>-CH<sub>2</sub>-CH-(COO)NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylglycérol	PG	<b>-CH<sub>2</sub>CHOH-CH<sub>2</sub>OH</b>

### 5.2.1.1.1 Température de transition de phase des phospholipides

Les phospholipides possèdent une température de transition de phase qui correspond au passage réversible d'un état ordonné ( $L_\beta$  ou configuration trans) vers un état désordonné ( $L_\alpha$  ou configuration gauche) via un état intermédiaire  $P_\beta$  (Figure 11). La température de transition de phase dépend de la longueur et de la saturation des chaînes des phospholipides. Pour les phospholipides les plus utilisés (phosphatidyl choline), la température de transition de phase est comprise entre 271 et 328 K. Les deux états,  $L_\beta$  et  $L_\alpha$ , résultent d'une rotation possible autour des liaisons C-C des queues des chaînes hydrocarbonées. A une température inférieure à la température de transition de phase, les chaînes hydrocarbonées sont étirées au maximum (état  $L_\beta$ ). Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire. La probabilité d'une isomérisation trans - gauche s'accroît alors. Au-delà de la température de transition de phase, les phospholipides passent d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée ( $L_\beta$  à  $L_\alpha$ ). Dans la configuration désordonnée, les chaînes hydrocarbonées ne sont plus étirées (Lorin et al, 2004; Maxfield et al, 2005).



**Figure 12:** Configuration trans et gauche des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique.

Les liposomes ne se forment que si la proportion d'eau est suffisante et si sa température est supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. En cas de mélange de phospholipides, la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la température de transition de phase du phospholipide ayant la plus élevée (tableau 9).

**Tableau 9:** Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides. Illustration d'exemple de la température de transition de phase de certains phospholipides.

Phospholipides	$T_m$ (°C)
DMPC (14 :0)	23
DPPC (16 :0)	41
DSPC (18 :0)	55

### 5.2.1.2 Cholestérol

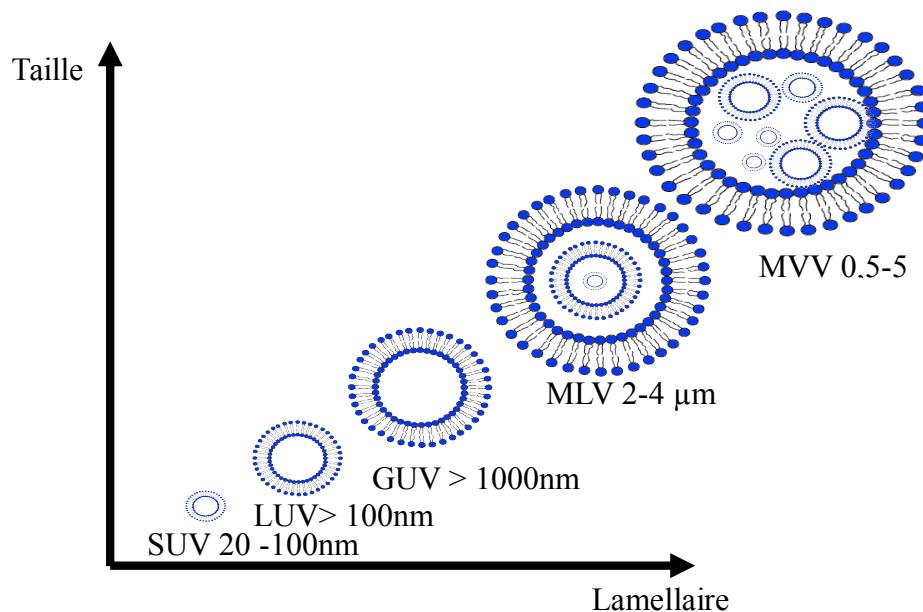
Le cholestérol est utilisé dans la formulation des liposomes car il permet de réduire (atténuer) les effets de la température sur la bicouche lipidique. Dans les membranes, la partie polaire du cholestérol est en contact avec les têtes polaires et la partie hydrophobe avec les chaînes hydrocarbonées dans le cœur de la bicouche. Dans le cas où la température est inférieure à la température de transition de phase, le cholestérol réduit la rigidité de membrane, dans le cas contraire, lorsque la température est supérieure à la température de transition de phase, il diminue le mouvement des phospholipides au sein de la bicouche (Maxfield et al, 2005; Matsingou et al, 2007).



### 5.2.2 Classification

Les liposomes peuvent être classés en fonction :

- De la composition et l'application *in vivo*, en cinq types (Sharma and U. Sharma, 1997) : (i) les liposomes classiques ; (ii) les liposomes sensibles au pH ; (iii) les liposomes cationiques ; (iv) les immunoliposomes et (v) les liposomes à longue circulation.
- De leur morphologies, la taille et du nombre de bicouches, dans (Figure 12) : (i) Petites vésicules unilamellaires (SUV) : 20 - 100 nm ; (ii) Grandes vésicules unilamellaires (LUV) : > 100 nm ; (iii) Vésicules unilamellaires géantes (GUV) : > 1000 nm ; (iv) Vésicules oligolamellaires (OLV) : 100 - 500 nm et (v) Vésicules multilamellaires (MLV) (Bordi et al , 2006).
- De nouveaux types de liposomes, appelés double liposome (DL) (Ebato et al ,2003) et vésicules multivésiculaires (MVV) (Grant et al ,2004).



**Figure 13:** Schéma représentatif de la taille et nombre de lamelles des liposomes.

### 5.2.3 Méthodes de préparation des liposomes

De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été développées mais seules quelques-unes permettent d'encapsuler des quantités suffisantes de principes actifs hydrosolubles. Le choix de la méthode de préparation des liposomes dépend de plusieurs paramètres (Mozafari et al, 2008):

## **Etude bibliographique**

---

1. Les propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée et celles des composants liposomiques,
2. La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques seront dispersées,
3. La concentration de la substance encapsulée et sa toxicité potentielle,
4. La taille optimale, la polydispersité et la durée de vie des vésicules pour l'application prévue,
5. La reproductibilité de la méthode et la possibilité de production à grande échelle des liposomes.

Rongen et al (1997) proposent une classification de ces méthodes de fabrication en quatre groupes :

1. Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides,
2. Les méthodes basées sur l'élimination du tensioactif,
3. Les méthodes basées sur la transformation de liposomes préformés,
4. Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique.

### **5.2.3.1. Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides**

#### **- Hydratation du film lipidique**

En 1965, Bangham et al, ont décrit la formation de vésicules lipidiques par hydratation du film phospholipidique. Au contact d'une solution aqueuse, plusieurs bicouches lipidiques superposées, s'hydratent, deviennent fluides, gonflent puis se décollent des parois du ballon pour former spontanément des vésicules. Ce procédé permet d'obtenir des vésicules multilamellaires de grande taille (de l'ordre du micromètre). La distribution de la taille est par ailleurs très hétérogène (Bangham et al, 1965).

#### **- Sonication**

Saunders et al (1962) propose l'utilisation des ultrasons afin de réduire le diamètre des liposomes MLV en SUV unilamellaires de petite taille ayant un diamètre compris être 15 à 50 nm selon la composition en lipides. On utilise un bain à ultrasons ou une sonde. Les ultrasons fournissent de l'énergie acoustique induisant une pression brisant les MLV en petites vésicules unilamellaires de type SUV (Cho et al, 2013). La durée, la température ainsi que la puissance de sonication influencent la taille des vésicules traitées (Cho et al, 2013).

### **- Extrusion**

L'extrusion des liposomes est réalisée soit à travers des membranes de polycarbonate ou bien sur une presse de French.

La membranes de polycarbonate consiste a forcer une suspension des liposomes à traverser un filtre de polycarbonate ayant une taille des pores bien définies afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores de la membrane utilisée (Lapinski et al, 2007), sous atmosphère d'azote et sous pression modérée (100-250 psi) à une température supérieure à la  $T_m$  du phospholipide (MacDonald et al, 1991). L'extrusion des liposomes peut également s'effectuer sur une presse de French décrite par Hamilton en 1980. La suspension liposomiale est placée dans une chambre presse de French à température ambiante, extrudé à l'aide d'un piston sous une pression plus élevée que celle utilisée avec les membranes de polycarbonate.

### **- Microfluidisation**

La microfluidisation est utilisée pour homogénéiser les suspensions de MLV. Elle consiste à forcer les suspensions de MLV sous haute pression (10000 psi) à travers un filtre ayant des pores de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, la suspension est séparée en deux canaux qui se rejoignent dans une chambre d'interaction où les vésicules vont s'entrechoquer à une grande vitesse pour former des petites vésicules de taille homogène. Plus on augmente le nombre de passage à travers le microfluidiseur, plus la taille des liposomes et leur polydispersité diminuent (Vemuri et al, 1990).

#### **5.2.3.2. Les méthodes basées sur l'élimination du tensioactif**

Les phospholipides sont solubilisés dans un milieu aqueux à l'aide d'un tensioactif (Tween 20, Triton x100), il y'aura alors formation de micelles mixtes lorsque le tensioactif est éliminé. Ceci résulte de la formation des micelles riches en phospholipides qui fusionneront pour devenir des liposomes LUV. L'élimination du tensioactif se fait par dialyse, par chromatographie d'exclusion stérique sur un gel de sephadex ou par chromatographie d'adsorption sur des résines hydrophobes.

#### **5.2.3.3. Les méthodes basées sur l'élimination du solvant**

##### **- Evaporation en phase inverse**

Cette méthode permet l'obtention des liposomes unilamellaires avec une grande cavité aqueuse LUV. Le solvant organique le plus souvent utilisé est le chloroforme ou un mélange de chloroforme/éther isopropylique (1:1), et d'y ajouter la phase aqueuse contenant les molécules

## **Etude bibliographique**

---

hydrophiles à encapsuler, la phase aqueuse pouvant contenir un principe actif est ajoutée à la phase organique. Le mélange non-miscible va subir une agitation mécanique ou ultrasonique. Cette agitation donne une émulsion eau/huile constituée des micelles inverses dans lesquelles la phase aqueuse est enfermée à l'intérieur des micelles. L'élimination de la phase organique entraîne le rapprochement des monocouches de phospholipides pour former les liposomes (Szoka et Papahadjopoulos, 1978).

### **- Injection de solvant organique**

Des phospholipides dissous dans l'éther éthylique, l'éthanol ou un mélange éther éthylique/méthanol sont injectés à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse contenant le principe actif. La solution aqueuse est sous agitation et à une température supérieure à la  $T_m$  de phospholipides. Le solvant organique est ensuite éliminé par une évaporation sous vide (Song et al, 2011 ; Deamer et al., 1976)

### **5.2.3.4 Les méthodes utilisant des liposomes préformés : La congélation-décongélation (Freeze-thawmethod)**

Une suspension des liposomes MLV hétérogènes subit successivement une congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation à une température supérieure à la  $T_m$  des phospholipides du MLV. Cette procédure aboutit à la rupture des MLV et à la formation d'une population homogène de LUV dont le diamètre est inférieur à 150 nm. En augmentant le nombre de cycles de congélation/décongélation, la taille et la lamellarité des MLV diminuent (Xia et al, 2005; Akbarzadeh et al, 2013 ).

### **5.2.4 La stabilité des préparations à base des liposomes in vitro**

L'utilisation du liposome comme vecteur, nécessite une stabilité physique, chimique et microbiologique dans le temps et dans les conditions de stockage choisies. Les principaux problèmes d'instabilité des liposomes et leurs solutions sont abordés ci-dessous.

#### **5.2.4.1 Facteurs influençant la stabilité d'une préparation liposomiale**

##### **- La composition qualitative et quantitative de la bicouche phospholipidique**

Une paroi de liposome constituée de cholestérol et phospholipides ayant une  $T_m$  élevée est plus rigide et moins perméable. Les phospholipides possédant des chaînes carbonées saturées diminuent la perméabilité de la bicouche phospholipidique. La proportion des différents composants de la paroi est aussi un facteur déterminant de la stabilité. Il faut trouver une proportion optimale pour la stabilité physico-chimique de la préparation et pour le profil

## **Etude bibliographique**

---

pharmacocinétique (la biodisponibilité) souhaité (Weinstein et al, 1984 ; Justo et al,2011; Shashi et al., 2012) .

### **- Le rapport PA/Phospholipide**

La quantité des phospholipides utilisés doit être suffisante pour une encapsulation optimale de la quantité du PA à administrer. Ce rapport est variable selon le PA, la méthode d'encapsulation et les composants du liposome. Ce paramètre est important et permet d'avoir la quantité suffisante des phospholipides pour véhiculer le PA intègre jusqu'au site d'action.

### **- La méthode de préparation**

Les méthodes de la préparation des liposomes et l'encapsulation du PA jouent un rôle dans la stabilité de la préparation liposomale finale. Pour les PA qui sont des bases faibles, l'encapsulation par le gradient de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  donne des sels de sulfate ayant une meilleure stabilité à l'intérieur des liposomes qu'une encapsulation par un simple gradient de pH. Dans l'utilisation de gradient de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , il y a la protonation et la formation de sel.

## **5.2.4.2 Les différents types d'instabilité**

### **- Instabilité physique**

Dans une suspension liposomiale, une coalescence peut se produire aboutissant à la formation des vésicules de plus grande taille (agrégation) .Ce phénomène peut être évité en utilisant :

- Des phospholipides chargés négativement ou positivement comme composant de la bicouche phospholipidique (répulsion électrostatique) (Weinstein et al., 1984; Piel et al., 2006),
- Du cholestérol au sein des liposomes (Tseng et al., 2007; Kyrikou et al., 2005),
- Le greffage des polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes (répulsion stérique) (Kontogiannopoulos et al., 2014). .

La fuite du contenu d'un liposome peut être le résultat d'interactions entre les composants de la bicouche et son environnement. L'utilisation de phospholipides de très faible  $T_m$  et l'absence de cholestérol dans la composition de la paroi liposomiale favorise le risque de fuite du contenu à la température du corps humain et avant d'arriver à son site d'action.

### **- Instabilité chimique**

Les phospholipides peuvent subir deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturés. La peroxydation

## **Etude bibliographique**

---

lipidique est une réaction catalytique qui se définit par un enchaînement de réactions radicalaires aboutissant au clivage de la chaîne hydrocarbonée et la formation des peroxydes. Elle se déclenche en présence de l'oxygène, de la lumière, de la chaleur et des métaux. Les liaisons esters d'un phospholipide peuvent subir une réaction d'hydrolyse dans un milieu aqueux. Les esters de carboxyle s'hydrolysent plus rapidement que les esters de phosphate. Cette hydrolyse donne des acides gras libres. Cette réaction est dépendante du pH et de la température (Mosca et al., 2011; Liu et al., 2012).

### **Les conditions de stockage des préparations à base de liposome (Haile , 2017)**

Afin de résoudre les problèmes d'instabilité des préparations liposomiales, les conditions de stockage suivantes sont proposées :

- à basse température (- 4°C) ;
- à l'abri de la lumière et de l'air ;
- dans un récipient non métallique ;
- à pH neutre ;
- après lyophilisation : cette technique consiste en plusieurs cycles de congélation-séchage. La congélation transforme l'eau en cristaux de glace. Le séchage par sublimation sous vide poussé élimine les cristaux de glace en les passant directement de l'état solide à l'état gazeux. Mais cette méthode risque d'entraîner l'agrégation/fusion des liposomes et de donner des vésicules de grande taille. Elle peut aussi impacter l'intégrité de la bicouche avec un risque de fuite de PA. Pour éviter ces problèmes, la lyophilisation se fait en présence de cryoprotecteurs. Les cryoprotecteurs le plus souvent utilisés sont des sucres (glucose, lactose, mannitol, tréhalose, etc.) ou des polyalcools (glycérol). Ces cryoprotecteurs interagissent avec les phospholipides du liposome par la liaison hydrogène. Cette liaison hydrogène est créée entre les fonctions hydroxyles des cryoprotecteurs et les phosphates des phospholipides constituant le liposome.

#### **5.2.4 Mécanisme d'interaction de liposome-cellules cibles et libération du PA**

Un PA encapsulé dans le liposome n'est pas biodisponible pour agir, c'est seulement après sa libération du liposome qu'il devient disponible. Cette libération doit être réalisée au sein de tissu cible. La cinétique de libération du PA de son vecteur liposome est un paramètre décisif car il détermine la concentration du PA au sein du site d'action. En fonction de la fenêtre thérapeutique de chaque PA, cette concentration peut être toxique ou non.

## **Etude bibliographique**

---

Les liposomes interagissent avec les cellules cibles (figure 13) selon différents mécanismes

- Adsorption sur membrane cellulaire (spécifique ou non spécifique),
- Echange de lipides entre liposomes et cellules,
- Fusion membranaire,
- Pénétration intracellulaire par endocytose et dégradation intracellulaire.

L'adsorption par les cellules phagocytaires est normalement suivie par une endocytose ou rarement, une fusion. Quand la membrane du liposome fusionne avec celle des cellules, son contenu est directement transféré dans le cytoplasme. Au cours de l'endocytose, différentes étapes plus complexes se succèdent avec englobement de la particule dans une vacuole isolée, le phagosome, qui fusionne avec des granules lysosomiaux intra cytoplasmiques pour former un phagolysosome. La digestion de la paroi liposomiale par de nombreuses enzymes libère son contenu qui diffuse ensuite à travers la paroi des phagolysosomes.

Certains auteurs jugent que la fusion membranaire est peu probable et que dans la plupart des cas, on observe des transferts de lipides (liposomes-HDL) ou une internalisation des liposomes par endocytose. Ce phénomène dépend ensuite de la nature des liposomes, de leurs tailles mais aussi des caractéristiques de la cellule cible et du milieu environnant (Weinstein et Leserman, 1984).

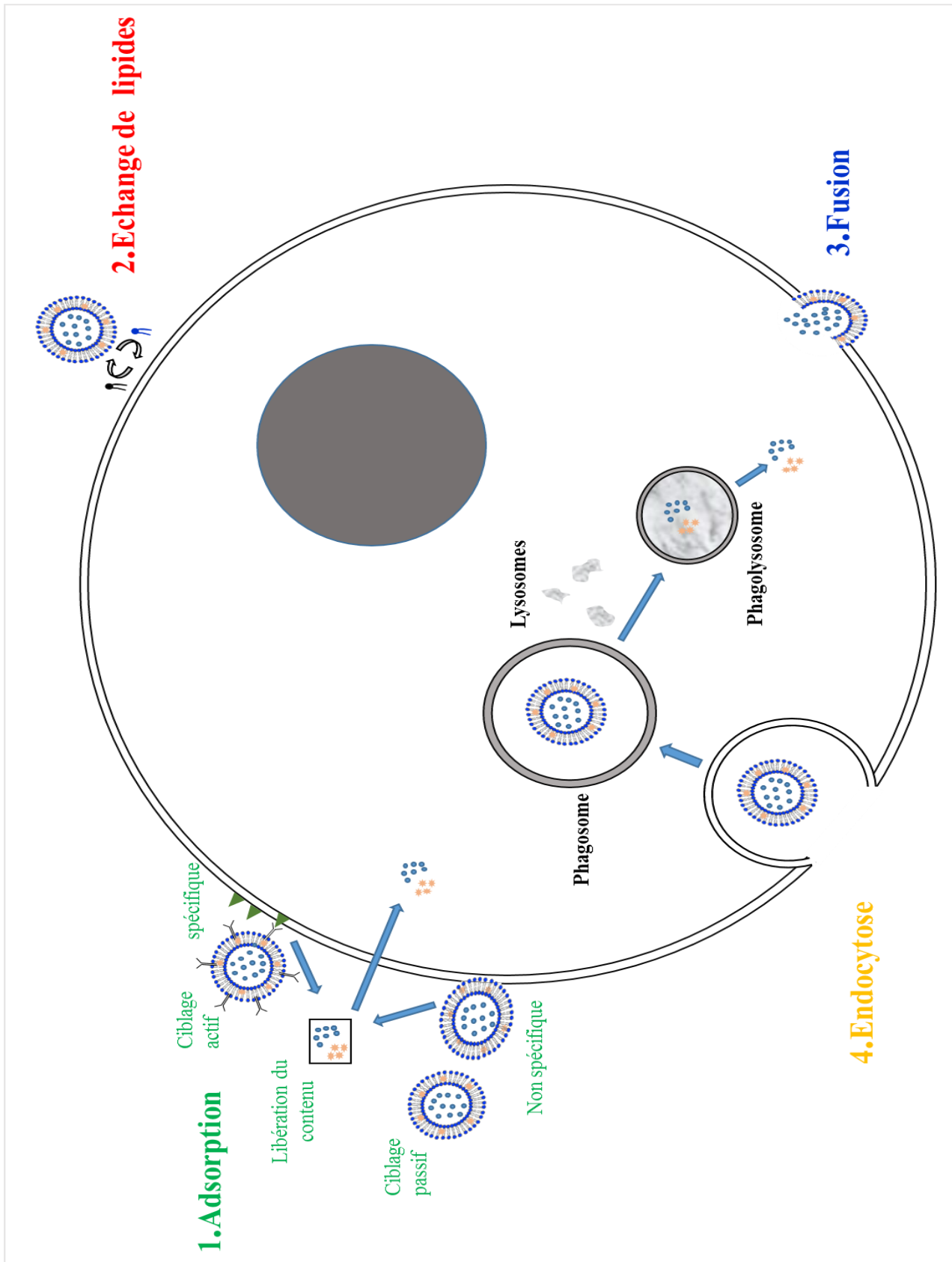


Figure 14 : Mécanisme d'interaction liposome-cellule



### 5.3 Dispersion Solide dans le Polyéthylène glycol (PEG)

#### 5.3.1 Dispersions solides

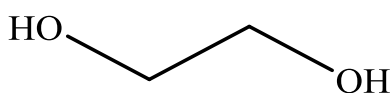
Les dispersions solides sont des dispersions d'un solide dans un autre parmi lesquelles on distingue les mélanges eutectiques, qui ont été les premiers découverts par Sekiguchi dans les années 60 et les solutions solides qui ont été préparées initialement par Levy et Kanig (Patel et al, 2008; Dhirendra , 2009; Kalivoda, 2012 ).

- **Les mélanges eutectiques** : Un mélange eutectique est un mélange solide de cristaux très fins de deux composants (A et B) miscibles à l'état liquide, ne le sont normalement pas à l'état solide, sauf à une composition de mélange particulière : l'eutectique (Leuner and Dressman, 2000).
- **Les solutions solides** : les solutions solides correspondent à un mélange solide de deux composants à la différence près que la taille de la phase dispersée est, dans le cas des solutions solides, réduite à son maximum, la taille moléculaire. Les solutions solides peuvent être classées de deux façons : en fonction de leur miscibilité (continue et discontinue), ou selon la manière dont le principe actif est distribué dans le vecteur (substitutionnel, interstitiel ou amorphe) (Goldberg et al , 1966).

Les dispersions solides permettent le fractionnement des principes actifs peu solubles dans l'eau dans des vecteurs hydrophiles qui les libèrent au contact de la phase aqueuse . L'augmentation de la surface solide de principe actif en contact avec le milieu liquide permet ainsi d'augmenter leur solubilité.

#### 5.3.2 Polyéthylène glycols

Les polyéthylènes glycols sont des polymères d'oxyde d'éthylène dont la masse moléculaire varie entre 200 et 300000. C'est un matériau neutre de formule chimique :  $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$  (Figure 14). Il est synthétisé par polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène (Neves et al, 2011).



**Figure 15:** Structure du PEGs.

##### 5.3.2.1 Propriétés physicochimiques du PEG :

À température ambiante, le PEG est un liquide visqueux incolore lorsqu'il a une masse moléculaire inférieure à  $600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et un solide cireux lorsque sa masse moléculaire est

## **Etude bibliographique**

---

supérieur à  $800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le PEG liquide est miscible en toute proportion avec l'eau tandis que le PEG solide est hautement soluble dans l'eau et il peut dissoudre des sels inorganiques divers par complexation. De plus, la viscosité du PEG diminue lorsque la température augmente. Par exemple, le PEG-6000, la température de fusion se situe vers  $56\text{--}63 \text{ }^\circ\text{C}$ , sa température d'ébullition est de  $250^\circ\text{C}$  et sa température d'auto-inflammation est d'environ  $360 \text{ }^\circ\text{C}$  (Rowe et al, 2009).

### **5.3.2.2 Solubilité du PEG :**

La structure du polyéthylène glycol lui confère un caractère amphiphile. Il est soluble dans des phases organiques et des phases aqueuses.

En phase aqueuse et à température ambiante, le PEG possède une forte capacité de liaison à l'eau, ses chaînes sont fortement hydratées, chaque monomère peut lier deux à trois molécules d'eau ce qui est à l'origine des propriétés osmotiques du PEG en solution, cependant cette solubilité diminue avec l'augmentation de la température (Hin et al 1998).

### **5.3.2.3 Dégradation du PEG :**

Les PEGs sont biodégradables malgré la large diversité des masses molaires. Plusieurs tests de biodégradation ont été réalisés sur des poly (éthylène glycol) de différentes masses molaires [400-20000] g/mol, dans des conditions aérobiques et même anaérobiques. Cependant, la biodégradation du PEG dans le milieu anaérobique est plus lente (Rowe et al , 2009).

### **5.3.2.4 Méthodes de préparation des dispersions solides (Ghosh et al, 2018)**

#### **- Par Fusion**

La méthode de fusion est utilisée lorsque les matières premières sont cristallines. Les premières dispersions solides créées pour des applications pharmaceutiques ont été justement préparées par la méthode de fusion.

#### **- Par la méthode du Hot Melt**

Cette méthode permet la formulation de solutions solides en mélangeant tout d'abord le principe actif et le vecteur à une température supérieure à celle de l'eutectique. Le mélange est alors refroidi rapidement : la solidification du vecteur entraîne une sursaturation du principe actif qui, à l'état moléculaire, est emprisonné dans la matrice du vecteur au fur et à mesure de sa solidification. La maîtrise du process, et essentiellement le taux de refroidissement et le degré

## Etude bibliographique

---

de sursaturation obtenu lors de cette étape, est importante pour s'assurer de la dispersion moléculaire du principe actif dans le vecteur.

### - Par solvant

La première étape de la méthode du solvant est la préparation d'une solution contenant à la fois la matrice, le matériau et le PA. La deuxième étape consiste à éliminer le solvant, ce qui entraîne la formation d'une dispersion solide. Il est préférable de mélanger au niveau moléculaire, car cela permet d'obtenir des propriétés de dissolution optimales. La méthode de préparation par solvant suscite deux défis. Le premier, consiste à mélanger le PA et la matrice dans une seule solution, ce qui est difficile lorsqu'ils diffèrent considérablement en termes de polarité. Le deuxième défi, est de minimiser la taille des particules de PA dans la dispersion solide, le PA et la matrice doivent être dispersés dans le solvant aussi finement que possible.

### - Par fusion-solvant

Dans cette méthode, le PA est d'abord dissous dans une solution de solvant liquide appropriée, puis il est incorporé directement dans la masse fondue de polyéthylène glycol pouvant être obtenue en dessous de 700 °C sans éliminer le solvant liquide. Il a été démontré que 5 à 10 % (p/p) du composé liquide pouvaient être incorporés dans le polyéthylène glycol 6000 sans perte significative de sa propriété solide.

## 5.4 Caractérisation des systèmes d'encapsulation

Les principaux objectifs de la conception des nano-porteurs en tant que système de diffusion sont de gérer la taille des particules, les propriétés de surface ainsi que la libération des médicaments afin d'atteindre les objectifs souhaités. Par conséquent, la caractérisation de ces 'nanocarriers' est très importante pour contrôler leur comportement *in vitro* et *in vivo*. Les nano-porteurs pharmaceutiques sont caractérisés par diverses techniques sophistiquées basées sur la taille, la structure de surface et le potentiel de charge. Les propriétés de surface et la taille modifient la stabilité ainsi que le comportement *in vivo* de ces porteurs. La morphologie et la taille de la surface sont mesurées par microscopie électronique (EM), tandis que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la spectroscopie de corrélation photonique sont utilisées pour déterminer la taille et la distribution de la taille des particules.

## **Etude bibliographique**

---

### **- Taille**

La taille est un paramètre crucial qui différencie les nanoparticules des autres systèmes de distribution de médicaments. Plusieurs méthodes sont disponibles pouvant être utilisées pour déterminer la taille et l'utilité des nano-porteurs, à savoir :

- **Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic light scattering(DLS))**

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), également connue sous le nom de spectroscopie par corrélation de photons, est utilisée pour effectuer l'analyse de la distribution de la taille des liposomes. Elle mesure la fluctuation de la lumière diffusée par les particules en mouvement brownien. Cette technique permet de calculer la taille des particules, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta.

- **Spectroscopie par diffraction laser (Laser diffraction spectroscopy)**

La LD est une technique précieuse qui couvre un champ de détection beaucoup plus large (20-2000 nm). Elle est également connue sous le nom de diffusion de la lumière laser, qui peut être utilisée seule ou en combinaison avec PCS pour obtenir une taille totale de la population allant des minuscules aux macroparticules. La LD dépend du fait qu'une fois qu'un faisceau laser est traversé un liquide contenant des particules en suspension, les plus grosses particules diffusent la lumière à des angles étroits tandis que les petites on diffuse la lumière à des angles plus larges. Les résultats produits par la LD est utilisée pour estimer le rayon sphérique correspondant de particules selon la solution de diffusion de Mie (également connue sous le nom la "théorie de Mie").

### **- Morphologie des surface**

- **Microscopie électronique (EM)**

La morphologie globale des nanoparticules est déterminée à l'aide des techniques l'EM permettant d'établir leur profil de toxicité. L'application la plus importante des nanocarriers est la modulation de la libération et du ciblage des médicaments. Il est très difficile d'observer des particules de petite taille en utilisant la lumière. Par conséquent, une plus grande résolution est souhaitée, telle que le rayonnement électromagnétique de longueur d'onde plus courte.

#### ***Microscopie électronique à balayage (SEM)***

Pour étudier les nano-porteurs au SEM, il faut d'abord les transformer en une poudre sèche, puis les déposer sur un porte-échantillon, puis les recouvrir d'un métal conducteur tel que l'or, le platine, le graphite, l'osmium, l'iridium, le tungstène, l'osmium, le chrome ou un alliage

## **Etude bibliographique**

---

or/palladium, à l'aide d'une coucheuse par pulvérisation cathodique. Ensuite, un faisceau d'électrons de haute énergie est envoyé à l'échantillon pour produire une diversité de signaux à la surface des spécimens d'objets. L'instrument comprend un canon à électrons, des lentilles de condensateur et un système de vide. Le MEB produit principalement trois types d'images principales : des cartes de rayons X externes, des images d'électrons rétrodiffusés et des images d'électrons secondaires. La surface de l'échantillon a émis les électrons secondaires utilisés pour acquérir les propriétés de surface des particules.

### ***Microscopie électronique à transmission (TEM)***

TEM est la méthode la plus utilisée pour caractériser l'ultrastructure des nanoparticules, principalement leur forme, leur taille et leur structure interne, elle présente une plus grande résolution que le SEM. Grâce à cette méthode, les liposomes peuvent être caractérisés par trois techniques, la coloration négative, la congélation et la congélation en plongée ou cryo-microscopie électronique.

#### **- Encapsulation des principes actifs et capacité de charge**

L'efficacité de l'encapsulation et la capacité de charge du médicament varient beaucoup en fonction de la solubilité du médicament à l'état solide dans les matrices (état uniformément soluble ou état discret), qui dépend aussi de la masse moléculaire du polymère, de sa composition, de son interaction avec le médicament et des groupes fonctionnels trouvés sur la chaîne polymère externe (ester ou carboxyle). De plus, l'efficacité de piégeage (EE) dépend principalement du type de nano système, de la méthode de préparation utilisée pour ce porteur particulier et les propriétés spécifiques du principe actif ainsi que les propriétés intrinsèques du polymère. La quantité du principe actif encapsulé dans le les nanosystème influencent la cinétique de libération, d'où l'intérêt de déterminer l'efficacité de l'encapsulation. La quantité encapsulée par unité de poids de nano système est estimée après retrait du médicament libre. La séparation du médicament libre peut être effectuée par ultracentrifugation, dialyse extensive, ultrafiltration, filtration sur gel ou ultrafiltration centrifuge et en utilisant la technique de la chromatographie d'exclusion de taille pour les nano systèmes vésiculaires tels que les liposomes et les niosomes. La quantité de médicament après séparation du médicament libre est estimée à l'aide d'une technique analytique standard telle que la spectroscopie UV ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'efficacité de l'encapsulation peut également être évaluée en dissolvant les nano systèmes dans un solvant approprié ou en extrayant le médicament dans un solvant approprié et une analyse ultérieure au moyen des techniques analytiques standard. L'efficacité du chargement est généralement exprimée comme la quantité de principe actif

## **Etude bibliographique**

---

emprisonnée dans les particules divisée par la quantité totale présente dans la formulation appelé EE. L'EE est généralement exprimé en %.

Cette partie bibliographique a été valorisée par un article de synthèse publié dans un journal de renommé : « **Cryo Letters, Perspectives** ».

### **Références**

- A. Neves de Lima, P. dos Santos, M. A. Marques de Lyra, F. L. dos Santos et P. Rolim-Neto, « Solid dispersion systems for increase solubility: cases with hydrophilic polymers in poorly water soluble drugs », *Rev. Bras. Farm.* 92: 269-278 (2011).
- A. Sharma and U. Sharma, *Int. J. Pharm.* 154, 123 (1997) .
- Adela Kalivoda, « Solubility enhancement of poorly water-soluble drugs by solid dispersion », thèse de doctorat, Université de Düsseldorf, Allemagne (2012).
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, 59(1):2-11 (2008).
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*,32(1):1-17(2014).
- Arun R, Ashok Kumar CK, Sravanthi VVNSS. Cyclodextrins as drug carrier molecule : a review. *Science Pharmaceutics* 76 :567-598 (2008).
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC,. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13: 238-252 (1965).
- Barnett, S. Dietary requirements for reproduction: ii. The existence of a specific vitamin for reproduction. *J. Biol. Chem.* 58: 693–710 (1924).
- Carmen Colas, Concepcion Junquera, Rosaura Perezpe , Joseacebrian Perez, and Teresa Muin Oblanco. Ultrastructural Study of the Ability of Seminal Plasma Proteins to Protect Ram Spermatozoa against Cold-shock. *Microscopy Research and Technique* 72:566–572 (2009).
- Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK,. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS Pharmscitech* 6, 329-357 (2005).
- Darin-Bennett A, White I. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock, (1977).
- David Martin-Hidalgo, Maria Julia Bragado , Ana R. Batista, Pedro F. Oliveira and Marco G. Alves. Antioxidants and Male Fertility: From Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants*, 8 : 89 (2019).
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of reproduction*,2(1):48-54 (1997).
- Delamere N. Ascorbic Acid and the Eye. *Subcellular Biochemistry*,313-329 (1996).

## **Etude bibliographique**

---

Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(4):509-20 (2015).

E.Isachenko, V. Isachenko, I.I. Katkov, G. Rahimi, T. Schöndorf, P. Mallmann, S. Dessole, F. Nawroth . DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*, 19 (4): 932–939 (2004).

Etsuo Niki and Kouichi Abe. Vitamin E: Structure, Properties and Functions , in *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits*. The Royal Society of Chemistry's 1-11(2019).

Evans, H. M., and Bishop, K. S On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56: 650–651 (1922).

F. Bordi C. Cametti, and S. Sennato, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* edited by Academic Press (2006), pp 281–320.

Fraga C.G. Motchnik P.A. Shigenaga M.K. Helbock HJ. Jacob RA. & Ames B.N. L'acide ascorbique protège contre les dommages oxydatifs endogènes de l'ADN dans le sperme humain. *PNAS* 88 , 11003-11006. (1991)

Frei B., Stocker R. & Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 9748-9752 (1988).

G. J. Grant, Y. Barenholz, E. M. Bolotin, M. Bansinath, H. Turndorf, B. Piskoun, and E. M. Davidson, *Anesthesiology* 101, 133 (2004).

Guilland, JC. Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *OCL, Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, (2011).

Hammadeh, Askari, Georg, Rosenbaum, & Schmidt. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 22(3): 155–162 (1999).

Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*, 13(1):43(2011).

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:3–22.

J.E.Parks, J.K.Graham . Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* , 38(2): 209-222 , ( 1992).

K,Satinder K, Bharat P. A complete review on: Liposomes. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 10-16 (2012).



## **Etude bibliographique**

---

K. Dhirendra « Solid dispersions : A review », Pak. J. Pharm. Sci., 22: 234-246 (2009).

Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. International journal of Urology, 16(5):449-57 (2009).

Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. Hum Reprod Update, 21:209-27(2015).

Krinsky, N. I., Beecher, G. R., Burk, R. F., Chan, A. C., Erdman, J. J. W., et al. (2000) Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, DC.

L.K. Thomson, S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Iuliis, J.-A. Zieschang, A.M. Clark. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Human Reproduction, 24 (9) 2061–2070 (2009).

Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. Reproductive biomedicine online, 19(5):638- 59(2009).

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H, a. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. Journal of Colloid Science and Biotechnology 1, 147-168 (2012a).

Lemma A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: Manafi M, éditeur. Artificial Insemination in Farm Animals [Internet]. InTech; 2011 [cité 5 mars 2015]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-sperm-quality-and-fertility> .

Levine M. Dhariwal KR. Wang Y et al. Ascorbic acid in neutrophils. In: Frei B Natural Oxidants in Health and Disease. Academic Press, San Diego, 469-488(1994).

Loftsson T, Brewster ME, 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins : effects on drug permeation through biological membranes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63: 1119-1135, (2011).

Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics 329, 1-11(2007).

Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les Liposomes: description, fabrication et applications. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 8, 163-176 (2004).

## **Etude bibliographique**

---

Mahoney, C. W., and Azzi, A. Vitamin E inhibits protein kinase C activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 694–697(1988).

Mark R. Curry. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5 : 46–52 (2000).

Matsingou C, Demetsoz C. The perturbing effect of cholesterol on the interaction between labdanes and DPPC bilayers. *Thermochimica Acta*, 452:116-123 (2007).

Maxfield FR, Tabas I. Review, Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621 (2005).

Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*, 78:2-12 (2008).

Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham J. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;45:57-66.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*.;51:241-9 (2005).

Mosher G, Thompson DO,. Complexation and Cyclodextrins. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 19, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 49-88 (2000).

Nasir A, Harikimar SL, Amanpreet K. Cyclodextrins: an excipient tool in drug delivery. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 44-50 (2012).

Nassira Zribi , Nozha Feki Chakroun, Henda Euch, Jalel Gargouri, Ali Bahloul, Leila Ammar Keskes. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*, 93(1) :159-66 (2010).

O, Saesoo S, Sramala I, Puttipipathachorn S, Soottitantawat A, Ruktanonchai U. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. *Food Research International* 42, 1178-1185 (2009).

Olcott, H. S., and Mattill, H. A. The unsaponifiable lipids of lettuce: III Antioxidant. *J. Biol. Chem.* 91: 65–70 (1931).

P.F. Watson. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 481–492 (2000).

## **Etude bibliographique**

---

Purdy PH, Graham JK. Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertility. *Biol Reprod*, 71:522-7 (2004).

R. C. Rowe, P. J. Sheskey et M. E. Quinn, « Handbook of Pharmaceutical Excipients », sixième édition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2009).

R. P. Patel, D. J. Patel, D. B. Bhimani, et J. K. Patel, « Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K30 » *Dissolution Technologies*, 17-25 (2008).

S Sancho, I Casas , H Ekwall , F Saravia , H Rodriguez-Martinez , J E Rodriguez-Gil , E Flores , E Pinart , M Briz , N Garcia-Gil , J Bassols , A Pruneda , E Bussalleu , M Yeste and S Bonet. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 134 : 111–121 (2007).

Salonen, R. M., Nyysönen, K., Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., Voutilainen, S., et al. (2003) Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study. *Circulation* 107, 947–953.

Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current medicinal chemistry*, 8(7):851-62 (2001).

Szente L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives : Chemistry, properties and trends in development,. *Advance Drug Delivery Reviews* 36:17-38 (1999).

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry,. *Chemical Reviews* 98, 1743-1753 (1998).

Tamer M Said, Aarti Gaglani, Ashok Agarwal. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online* 21:456– 46221 (2010).

Thais Serzedello de Paula, Ricardo Pimenta Bertolla, Deborah Montagnini Spaine, Maria Adelaide Cunha, Nestor Schor, and Agnaldo Pereira Cedenho. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility* 86 : 3 (2006).

Traber, M. G., and Atkinson, J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 4–15.

Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3):243-58(2008).

## **Etude bibliographique**

---

- Valko M, Izakovic M, Mazur M.J, Rhodes C. & Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* VI 266: 37–56 (2004).
- Y. Ebato, Y. Kato, H. Onishi, T. Nagai, and Y. Machida, *Drug Develop. Res.* 58, 253 (2003).
- Yang LJ, Yang B, Chen W, Huang R, Yan SJ, Lin J,. Host-guest system of nimbin and  $\beta$ -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,58: 8545-8552 (2010).
- Zafar N, Fessi H, Elaissari A,. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics* 461:351-366 (2014).
- Martini M-C et Seiller M.. *Actifs et additifs en cosmétologie*. Éditions Tec & Doc, Éditions médicales internationales, Paris : Cachan, 1051 (2006).
- Munnich A, Ogier H, Saudubray J-M et Amédée-Manesme O. *Les Vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Masson, Paris, 428 (1987).
- Levine, M., Dhariwal, K. R. & Cantilena, C. C.) *World Rev. Nutr. Diet.* 72, 114-127 (1993).
- Kenneth J Carpenter. The discovery of vitamin C. *Ann Nutr Metab*, 61(3):259-64 (2012).
- Harald Sieme Harriëtte Oldenhof Willem F. Wolkers. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* ,169:2-5(2016).
- Charles R. Harper, Terry A. Jacobson, *New Perspectives on the Management of Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol*. *Arch Intern Med*,10:1049-1057(1999).
- Jacek W. Morzycki. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids*, 83: 62-79(2014)
- SJ Hur, GB Park, ST Joo, Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products - *Food Control*, (2007).
- Jean-Louis Schlienger, The edifying cholesterol story: From ‘gall stone’ to the LDL receptor. *Médecine des maladies Métaboliques*, 1: 6 (2012).
- P, Fourmentin S, Landy D, Cazier F, Surpateanu G. Cyclodextrins : a new efficient absorbent to treat waste gas streams. *Chemosphere*, 70: 374-380 (2008).
- Nuchuchua O, Saesoo S, Sramala I, Puttipipathachorn S, Soottitantawat A, Ruktanonchai U. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. *Food Research International* ,42: 1178-1185 (2009).

## **Etude bibliographique**

---

Asgharian B, Cadenhead DA, Goddard ED. The Sequestering of Surfactants from Insoluble Monolayers by  $\alpha$ -,  $\beta$  - and  $\gamma$ -Cyclodextrins. *Colloids and Surfaces* 34: 143-149 (1988).

H, Slotte JP. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 35: 8018-8024 (1996).

Bernat V, Ringard-Lefebvre C, Le Bas G, Lesieur S. Action of alpha-cyclodextrin on phospholipid assemblies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57: 113-119 (2007).

C, Turllet JM,. Study of the interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 322: 73-78 (2008).

JC, Fauvelle F, Crouzy S, Girault L, Chapron Y, Göschl M, Gadelle A. Mechanism of alpha-cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87: 59-66 (1998).

Nishijo J, Shiota S, Mazima K, Inoue Y, Mizuno H, Yoshida J. Interactions of cyclodextrins with dipalmitoyl, distearoyl, and dimyristoyl phosphatidyl choline liposomes. A study by leakage of carboxyfluorescein in inner aqueous phase of unilamellar liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48: 48-52 (2000).

Hatzi, P, Mourtas, S, Klepetsanis, PG, Antimisiaris, SG. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *International Journal of Pharmaceutics* ,333:167-176 (2007).

Shashi K, Satinder K, Bharat P. A complete review on: Liposomes. *International Research Journal of Pharmacy* ,3: 10-16 (2012).

A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les Liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 8, 163-176 (2004).

Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C,. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research* , 18: 309-327(2008).

Rongen HA, Bult A, Van Bennekom WP. Liposomes and immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 204: 105-133 (1997).

## **Etude bibliographique**

---

Cho NJ, Hwang LY, Solandt JJR, Frank CW, Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. *Materials*, 63:294-3308 (2013).

Lapinski MM, Castro-Forero A, Greiner AJ, Ofoli RY, Blanchard GJ. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*, 23:11677-11683 (2007).

MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BPM, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR, Smallvolume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biomembranes* , 1061: 297-303 (1991).

Vemuri S, Yu CD, Wangsatorntanakun V, Roosdorp N. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16: 2243-2256 (1990).

Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase. *Proceeding to the National Academy of Sciences* ,75: 4194-4198 (1978).

Song J, Shi F, Zhang Z, Zhu F, Xue J, Tan X, Zhang L, Jia X. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes. *Molecules*, 16: 7880-7892 (2011).

Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta* ,443: 629-634 (1976).

Akbarzadeh A, Sadabady RR, Daaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* , 8:102-110 (2013).

Xia S, Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International* ,38: 289-296 (2005).

J N Weinstein, L D Leserman. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* ,2:207-33 (1984).

Justo OR, Moraes AM. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. *Chemical Engineering and Technology*, 89: 785-792 (2011).

## **Etude bibliographique**

---

Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L, Betamethasoneincyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 312:75-82 (2006).

Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Huang YY, Liu DZ,. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27: 29-34 (2007).

Kyrikou I, Georgopoulos A, Hatziantoniou S, Mavromoustakos T, Demetzos C,. A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 133: 125-134 (2005).

Kontogiannopoulos KN, Tsermentseli SK, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP,. Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin. *Journal of Liposome Research*, 24: 230-240 (2014).

Mosca M, Ceglie A, Ambrosone L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164:158-165 (2011).

Liu W, Ye A, Liu C, Liu W, Singh H,. Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Research International*, 48:499-506 (2012).

BOBO, Gemechis Haile, l'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux, thèse de doctorat, France, (2017).

Leuner C., Dressman I, improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J Pharm. Biopharm.*, 50: 47-60 (2000).

Goldberg AH., Gibaldi M., Kanig J.L., Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures IV- chloramphenicol-urea system. *J Pharm.Sci*, 55: 581-583 (1966).

Hin S., Oh L, Lee Y, Choi H., Enhanced dissolution of furosemide by coprecipitating or cogrinding with crospovidone. *J Pharm.*, 175 : 17-24 (1998).

Prosun Kanti Ghosh, Hemanta Kumar Sharma, Nayanmoni Boruah. Different Methods Used In Solid Dispersion. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 8: 28-38 (2018).

### **Encapsulation nanotechnology in sperm cryopreservation: systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery**

Lamia TAOUZINET <sup>\*1,2</sup>, Sofiane FATMI <sup>1,2,3</sup>, Malika LAHIANI-SKIBA <sup>3</sup>, Mohamed SKIBA <sup>3</sup> and Mokrane IGUER-OUADA <sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

<sup>2</sup>Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Biopharmaceutics Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, Rouen, France.

CryoLetters **42 (1)**, 1 - 12 (2021)

[PMID : 33973986](#)



## PERSPECTIVE

# ENCAPSULATION NANOTECHNOLOGY IN SPERM CRYOPRESERVATION: SYSTEMS PREPARATION METHODS AND ANTIOXIDANTS ENHANCED DELIVERY

Lamia TAOUZINET <sup>\*1,2</sup>, Sofiane FATMI <sup>1,2,3</sup>, Malika LAHIANI-SKIBA <sup>3</sup>, Mohamed SKIBA <sup>3</sup>  
and Mokrane IGUER-OUADA <sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria.

<sup>2</sup>Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria.

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Blvd. Gambetta, 76183, Rouen, France.

\*Corresponding author's details: taouzinet193.univ@gmail.com (E-mail); 0000-0001-8992-1591 (ORCID)

### Abstract

Sperm cryopreservation promotes the storage and transport of germplasm for its use in artificial insemination (AI) and other advanced reproductive technologies. However, sperm cryopreservation causes several stresses including thermal shock, osmotic damage, and ice crystal formation, thereby reducing sperm quality. Supplementing cryoprotectant media with antioxidants has been reported to be positive in different species. It has been widely suggested to combine antioxidants with nanotechnology, to maximize therapeutic activity and to minimize undesirable side effects. In this review, we discuss the role of different antioxidants in sperm cryopreservation and their improved therapeutic effect through their formulation using nanotechnology. In addition, we report the different nano-systems preparation methods present in literature. Whilst the use of nanotechnology in animal production is still in its infancy, encouraging results from nutrition, biocidal, remedial, and reproductive studies are driving further investigations.

**Keywords:** antioxidants; nano-systems; preparation methods; sperm cryopreservation.

### INTRODUCTION

Sperm cryopreservation has an essential impact on the long-term preservation of genetically superior males of the species (1). In humans, sperm cryopreservation becomes an important issue in preserving male fertility particularly before medical treatment like radiotherapy or chemotherapy, which may lead

to ejaculatory dysfunction or testicular failure (2, 3, 4). In addition cryopreservation is also very relevant for the reproductive management of domesticated animals (5, 6), as it allows the breeding of animals of immense commercial value by collecting spermatozoa after castration or necropsy, and subsequent use in breeding programs (7, 8). Moreover, cryopreservation facilitates the distribution of semen over

distance. Which has contributed considerably to the development of reproductive technologies such as artificial insemination and in vitro fertilization worldwide (9).

Cryopreservation aims to keep sperm viability and functionality by a sequential process of reduction in temperature (10), dehydration of the cell, freezing, storage and then thawing (11). Throughout the freezing-thawing process, spermatozoa are subjected to several negative effects, including a drop in temperature, ice crystal formation, and various types of stresses (physical, chemical, osmotic, and oxidative). These effects can critically compromise sperm quality and fertility (1, 12, 13, 14). Thereby, the post-thawing quality of the spermatozoa is significantly reduced, with motility loss that can be in the region of 40%-60% (15).

Cold shock is associated with the lipid composition of the membrane bilayer (14). The decrease in temperature during cooling produces a phospholipid transition that affects the membrane rigidity and fragility, leading to lipid phase separation (16, 17). In addition, oxidative stress results from the formation of large amounts of reactive oxygen species (ROS) or molecules that contain free radicals (RL) (18). As a result there is the loss of the pro-oxidant/anti-oxidant equilibrium (19).

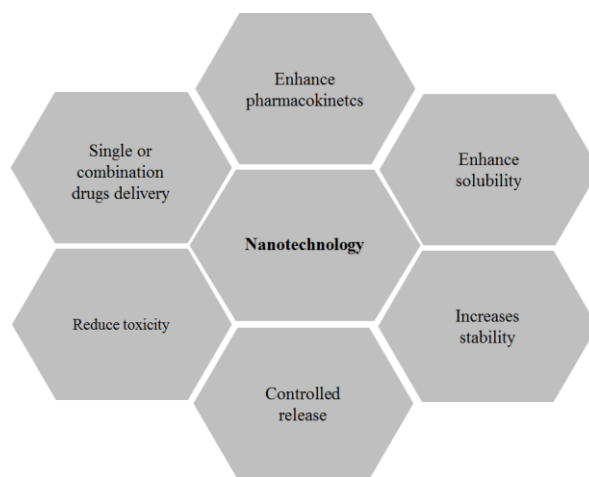
Different strategies are used to ensure that free radicals are scavenged and post-thaw sperm function is improved; in particular, the addition of antioxidants and cryoprotective agents (20-23). Antioxidants are the main defence factors against oxidative stress (24). There are two types of antioxidants, based on their chemical structure: enzymatic antioxidants, such as glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, and catalase (25, 26); and non-enzymatic antioxidants (27), including reduced glutathione (GSH), urate, ascorbic acid, carotenoids ( $\beta$ -carotene) and vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) (28).

However, antioxidants present some limitations, like the low durability to harsh conditions and poor solubility and stability in aqueous media (29). Encapsulation nanotechnology can be applied to protect antioxidants from degradation by direct contact of external factors such as light, oxygen, chemicals, heat, and pressure. This technology can also increase antioxidant solubility and stability giving a better bioavailability in biological fluids (30).

In this review, we discuss the role of different antioxidants in sperm cryopreservation and their improved therapeutic effect through their formulation using nanotechnology. In addition, we report the different nano-systems preparation methods currently reported in the literature.

## NANOTECHNOLOGY FOR ANTIOXIDANTS DELIVERY IN SPERM CRYOPRESERVATION

Encapsulation nanotechnology advances have contributed to the design of novel nano-antioxidant compounds that possess protective properties in sperm cryopreservation. The nanotechnology is able to transport the drug to a specific destination (nanocarriers) to perform its therapeutic activity with maximum safety, improve delivery of poorly water-soluble protectants, and co-delivery of two or more drugs for combination therapy (31, 32) (Figure 1). The following section presents the different examples of nano-systems that have been reported in the literature in relation to sperm cryopreservation.



**Figure 1.** Nanotechnology advantages in drug delivery.

### *Liposome*

The liposomes are artificial vesicles of spherical shape, consisting of two or more layers of lipids with an internal aqueous cavity (33). Liposomes are composed of phospholipid for biocompatibility and cholesterol for stability, they enable entrapment of water-soluble drugs

that would otherwise not pass through the bilayer membrane easily, and are able to load lipophilic drugs in the lipid layers to make them dispersible in aqueous media (34, 35). There are several advantages in applying liposomes including: (33, 36)

- Ease of synthesis;
- Pharmacokinetics and pharmacodynamics are easily manoeuvrable;
- Applicable to drugs with different properties;
- High biocompatibility and similarity with the biological membrane;
- Enhanced therapeutic index;
- Biodegradable;
- Producing on a large scale.

Today, liposomes are used in several areas such as vaccine delivery, cosmetic formulations, nanomedicines, and sperm cryopreservation (37). Recent studies have stimulated interest in using liposomal formulations as preservation diluents, reducing the risk of egg yolk contaminant, and escalated the values of semen quality through better protection of sperm from damage (38, 39).

### ***Cyclodextrins***

Cyclodextrins (CDs) represent a family of non-toxic cyclic oligosaccharides, obtained by enzymatic degradation of starch. They have six, seven, or eight glucose units connected by a -1-4 bonds, named respectively  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CD. Various modified CDs functional groups could be joined to native CDs, leading to a modification in their solubility and/or stability (40, 41). They have a shape like to a cone; with a hydrophilic outside surface, which makes CDs water-soluble. A non-polar internal cavity is formed, enabling the formation of inclusion complexes of lipophilic guest molecules (42). Due to their capacity to change the physicochemical properties of drugs and other compounds, CDs are generally indicated as enabling pharmaceutical excipients. One or more drug molecules can form a complex with one CD molecule and one or more CD molecules can form a complex with one drug molecule. Usually, one drug molecule creates a complex with one CD molecule (43). It was established that treating diverse species sperm with cyclodextrins pre-loaded with an appropriate drug molecule (antioxidants, essential oil) before cryopreservation, can improve sperm quality after freezing-thawing process (44, 45).

### ***Polyethylene glycol***

Poly (ethylene glycol) is a neutral non-toxic polymer with the  $\text{HOH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$  structure and different molecular weights. Polyethylene glycol (PEG), is presently one of the most used polymeric materials in drug delivery (46). Further, PEG can modify the pharmacokinetics and usually toxicity of bioactive molecules (47). Moreover, PEG may improve the lifetime of the “drug-carrier” assembly, thus enabling the administration of lower concentrations of the “drug-carrier” composite and consequently reducing toxicity (48). PEG covers a large-scale of beneficial properties that include high solubility in aqueous media as well as organic solvents, making it simple for end-group modification (49). It is also widely employed for modification of carriers used in therapeutics (50). The use of PEGs in sperm cryopreservation has a positive effect. Amokrane et al. (2020) demonstrated that treating rabbit semen with vitamin E dispersed in PEG 6000 (PEG/Vit E) is effective in protecting sperm cells during chilling at 4°C (51).

## **METHODS OF PREPARATION**

### ***Solvent injection***

It is a common method regarding the displacement of solvents. The principle of this method is dissolving the lipid in a water-miscible solvent such as ethanol, acetone, or isopropanol and injected the obtained solution into the aqueous phase using an operating syringe. The solvent migrates rapidly in the water and lipid particles precipitate in the aqueous phase (52). The solvent injection technique has a lot of advantages, such as the ability of using pharmacologically acceptable organic solvents (Table 1) (52).

### ***Solvent emulsification evaporation technique***

The double emulsion solvent evaporation method can be described as the dispersed phase including one or more types of a smaller dispersed phase in it. This technique involves a double emulsion of water-in-oil-in-water emulsion. A water-in-oil emulsion (w/o) is first provided by adding a drug containing aqueous solution into a polymer and lipid-containing an organic solvent. Then, the emulsion is joined into another aqueous phase to form a water-in-oil-in-water emulsion (w/o/w). The organic

solvent is immediately removed by evaporation (53, 54).

### **High-pressure homogenization technique**

This technique is used on a large scale. It includes two approaches: cold homogenization method; or hot homogenization technique. By the application of high pressure through very high shear, stress on the lipid is applied and it is forced through a specifically designed homogenization valve to form suspended particles with a uniform size distribution. It is important to know that both elevated temperature or below room temperature may be used depending on the nature of the drug and excipients (55, 56).

### **Microemulsions**

The microemulsion technique is defined as creating clear, thermodynamically stable, isotropic liquid mixtures between a nonpolar liquid (oil) and a polar liquid (aqueous) and surfactant, generally in combination with a cosurfactant. Ultrafine emulsion droplets are formed as a result of microemulsion breakage, which immediately crystallizes; further, the excess water is removed by lyophilization (57).

### **Melting dispersion technique**

The dispersion technique consists of a dispersed of one or more active components in an inert solid-state carrier or matrix prepared by melting (fusion), solvent or melting solvent

**Table 1.** Advantages and drawbacks of numerous nanocarrier system preparation methods.

Methods of Preparation	Advantage	Drawback(s)
Solvent injection	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Robust, simplest and versatile method.</li> <li>• Method involving the displacement of solvents.</li> <li>• Use of pharmaceutically acceptable organic solvents. (94)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Population is heterogeneous.</li> <li>• Use organic solvents and high temperature (95, 96).</li> </ul>
High-pressure homogenization	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Narrow particle size distribution.</li> <li>• Use of water-based technology. (97).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Energy-intensive process.</li> <li>• Biomolecule damage.</li> <li>• Low efficiency of the process. (98).</li> </ul>
Solvent emulsification/evaporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avoidance of heating.</li> <li>• Drug delivery controlled. (62)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The complexity of controlling the evaporation rate. (99).</li> </ul>
Membrane contactor technique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The facility of use.</li> <li>• Control of particle size. (63).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The presence of membrane barrier between the two phases introduces an extra resistance to the overall mass transfer process.</li> <li>• Membranes clogging (100)</li> </ul>
Micro-emulsion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spontaneous formation.</li> <li>• Thermodynamic stability.</li> <li>• Improvement of drug solubilization and bioavailability. (99).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High water content, difficulties in the excess water removal.</li> <li>• The uses of a high concentration of surfactants and co-surfactants. (101).</li> </ul>
Ultra-sonication	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduced shear stress (102).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Physical instability like particle growth upon storage. (103).</li> </ul>
Melting dispersion technique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A low temperature is required for the evaporation of organic solvents.</li> <li>• Increased efficiency of the drug. (104)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited to drugs with a low therapeutic dose.</li> <li>• The number of polymers that can be used by this method is limited. (105).</li> </ul>

**Table 2.** Utilization of nanotechnology in the delivery of antioxidants for the protection of sperm during cryopreservation.

Active molecule	Nano-technology type	Function during cryopreservation	Sperm species	Ref
Ellagic acid	Liposomes	Improved total motility, membrane functionality and viability.	Rooster	(93)
Soy lecithin and cholesterol	Liposomes	Replace the chicken egg yolk from human semen cryopreservation media without compromising post-thaw outcome.	Human	(80)
Lycopene	Liposomes	Improve the quality spermatozoa after freeze-thawing	Rooster	(106)
Vitamin E	Liposomes	Improve sperm motility	Bovine	(72)
Cholesterol	Cyclodextrin	Stabilizing sperm plasma membrane. Improve parameters progressive motility, rapid sperm percentage and acrosomal membrane integrity. Decreasing levels of superoxide anion formation.	Ram	(107)
Cholesterol and vitamin E	Cyclodextrin	Effective on post thawing sperm motility.	Dog	(108)
Vitamin E	Cyclodextrin	Effect on sperm motility and gamete integrity.	Ram	(109)
Cholesterol and vitamin E	Cyclodextrin	A powerful protection in cryopreserved semen to fight simultaneously against cold shock and oxidative stress.	Bovine	(110)
Cholesterol	Cyclodextrin	Membrane protects it against H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> or cryo-induced oxidative damage.	Ram	(77)
Cholesterol and vitamin E	Cyclodextrin	Protecting concomitantly against cold shock and oxidativestress.	Ram	(111)
Cholesterol and vitamin E	Cyclodextrin	Improved significantly the post-thaw kinematic parameters.	Rabbit	(73)
Cholesterol	Cyclodextrin	Improve sperm cryosurvival	Goat	(112)
Cholesterol	Cyclodextrin	Protect against cryodamage. Reducing the ryocapacitation	Bull	(113)
Cholesterol	Cyclodextrin	Improved sperm cryopreservation, low freezability.	Ram	(114)
Cholesterol	Cyclodextrin	Improve quality of frozen-thawed ram sperm.	Ram	(115)
Cholesterol	Cyclodextrin	Increasing cryopservability of stallion spermatozoa.	Marwari Stallion*	(9)
Cholesterol	Cyclodextrin	Improves sperm resistance to seminal plasma-mediated injury and protects sperm quality.	Goat	(116)
Cholesterol	Cyclodextrin	Improved sperm viability, motility, and acrosome integrity.	Goat	(117)
Vitamin E	Poly Ethylene Glycol	protecting sperm cells during chilling at 4°C	Rabbit	(51)

\**Equus ferus caballus*

method. The melting method includes the formation of a physical mixture of a drug and a water-soluble carrier and heating it immediately

until it is melted. The melted mixture is then solidified rapidly in an ice-bath under energetic

stirring. Finally, solid mass is crushed, pulverized and sieved (58).

#### ***Ultrasonication technique***

This technique was initially used to prepare solid lipid nanodispersions. These methods do not use organic solvents, a large amount of surfactants or any additives. The method involves heating a solid lipid at a temperature of 5 to 10°C above its melting point and dispersing into previously heated aqueous surfactant solution under high-shear homogenization conditions, followed by ultrasonication using a sonicator; the resulting emulsion is cooled to room temperature (59).

#### ***Supercritical fluid technique***

The supercritical fluid method is mostly applied to carbon dioxide. CO<sub>2</sub> is considered as environmentally friendly and has been identified as a prime candidate to develop alternative clean processes for the preparation of drug-loaded polymeric matrixes. Matrix and drug are dissolved and sprayed with lower pressure and then the particles are formed. The adiabatic expansion of the composite results in its rapid cooling (60).

#### ***Microwave-assisted technology***

Microwave-assisted technology offers uniform heating and yields low polydispersity particles with a small size. This process consumes little energy and is based on a microemulsion-technique. After completion of the microemulsion synthesis, the hot (o/w) microemulsion is dispersed rapidly into cold water and under magnetic stirring (61).

#### ***Solvent evaporation technique***

The solvent evaporation method was the first one developed for the preparation of nanoparticles. This method consists of two steps. First, dissolving, dispersing, or emulsifying the drug into an organic solvent, which is then emulsified into an aqueous or oil phase. Second, the solvent is evaporated by increased temperature and reduced pressure with continuous stirring to form microspheres. The solvent method offers the advantage of prevention from thermal decomposition of drugs or carriers because of the low temperature required for the evaporation of organic solvents (62).

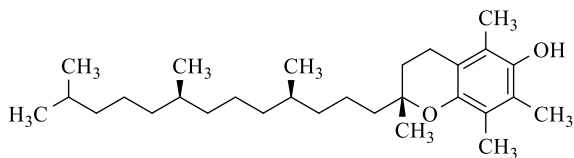
#### ***Membrane contractor technique***

This method is based on melt dispersion, using a low energy process. The membrane contractor allows the lipid phase to be introduced through the membrane pores at the melting temperature of the lipid, into another phase (aqueous phase) which flows tangentially to the membrane surface and sweeps away the droplets forming at the pore outlets. During cooling at room temperature forms the particles form (63).

### **UTILIZATION OF NANOTECHNOLOGY IN THE DELIVERY OF ANTIOXIDANTS FOR PROTECTION DURING SPERM CRYOPRESERVATION**

#### ***Vitamin E***

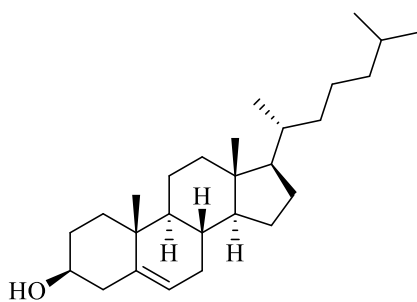
Vitamin E (Figure 2) has been identified as a potent fat-soluble (non-enzymatic) antioxidant through extensive research. Alpha-tocopherol is the biologically most active form of vitamin E. Vitamin E, is a chain-breaking antioxidant with the capability of inhibiting oxidative degradation (64, 65, 66). This vitamin was approved as an important dietary supplement for growth, reproduction, immune function, disease prevention and tissue integrity (67). Several studies have reviewed the importance of an adequate vitamin E status for protection from cryopreservation damages (65). It was also established that the vitamin E levels in seminal plasma have a direct relationship with the percentage of motile spermatozoa in semen. Moreover, in the semen of infertile men, low levels of vitamin E are observed (68, 69). In a study on the vitamin E impact on semen characteristics, it was observed that tocopherol promoted progressive motility and viability of spermatozoa both before and after cryopreservation (70). However, there are a number of challenges associated with incorporating vitamin E into the cryoprotectant medium due to its chemical instability, poor water solubility, and variable bioavailability (71). Alternatively, it needs to be incorporated or encapsulated into a suitable delivery system. An important antioxidant effect resulting in better semen cryopreservation has been observed when vitamin E was preloaded in liposomes, or cyclodextrins, or polyethylene glycol (51, 72, 73).



**Figure 2.** Alpha-tocopherol.

### **Cholesterol**

Cholesterol (Figure 3) is a lipid-type molecule and it is one of the most important structural components of cell membranes (74). Cholesterol has a great influence on cell membrane fluidity and permeability by interacting with both the hydrophilic head groups and the hydrophobic tails of phospholipids (75, 76). These molecules have several applications, such as in drug delivery, bioimaging, as liquid crystals, as gelators, as anticancer agents and in antioxidant agents (77, 78). Cholesterol plays an important role in sperm membrane protection and sperm capacitation. It was hypothesized that increasing sperm cholesterol content, increases the lifespan of cryopreserved sperm cells (79). Cholesterol-loaded cyclodextrin and liposomes technology have been widely studied in human and various animal species, to reduce sperm capacitation, increase preservation of sperm membranes and increase sperm motility after cryopreservation (77, 80).

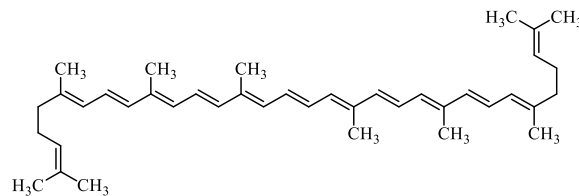


**Figure 3.** Cholesterol.

### **Lycopene**

Lycopene (Figure 4) is a natural pigment, from the carotenoid family (81). Chemical and in vitro cell studies have revealed that this hydrophobic antioxidant molecule (82) can limit diseases caused by oxidative stress, such as specific cancers, cardiovascular diseases (83, 84) and infertility (85). Several studies have reported that the addition of lycopene to semen extenders positively affects ram semen cryopreservation

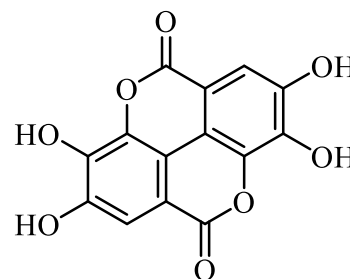
(86). It also raises the survivability of turkey spermatozoa, by reducing lipid peroxidation and partially rescuing the structural damage incurred to the spermatozoa during refrigeration and cryopreservation (87). Najafi et al (2018) revealed that lycopene could improve the quality of rooster spermatozoa after freeze-thawing, and lycopene entrapment with nanoliposomes seems to be promising (106).



**Figure 4.** Lycopene.

### **Ellagic acid (EA)**

Ellagic acid (Figure 5), is a polyphenolic antioxidant of poor water solubility (88). It possesses multiple pharmacological properties such as anti-inflammatory (89), anti-mutagenic, anti-clastogenic, anticarcinogenic (90) and neuroprotective effects (91). Recently, the antioxidant effect of EA was assessed during the semen ram preservation. The results showed that EA supplementation has a potential effect on sperm quality and protection from oxidative stress during the cryopreservation (92). Najafi et al (2019) studied the antioxidant effect of EA loaded in liposomes during post-thawing of rooster spermatozoa. It was found that the association of EA with the liposome significantly improves sperm parameters and increases the sperm protective effect of EA (93).



**Figure 5.** Ellagic acid.

## FUTURE PERSPECTIVES AND CONCLUSION

Antioxidant supplementation in semen extender improves post-thaw semen quality and fertility. Nanotechnology might convey advantages by protecting and delivering the antioxidants to the cells and enhancing these effects. In this review, several antioxidants with different therapeutic benefits in sperm cryopreservation have been cited and discussed. Moreover, several studies focusing on the application of nanotechnology in the delivery of these antioxidants have already shown promise in enhancing their therapeutic benefits in sperm cryopreservation. Several strategies can be developed to create multifunctional nanoencapsulation systems with active targeting incorporation to enhance uptake in specific cells, or surface charge modification and attachment of specific ligands for target tissue. Besides, the understanding of mechanisms by which these nanoencapsulation systems are taken up by the spermatozoa cells and their intracellular fate is of primary importance to optimize their intended functions. This approach can be successfully used to treat male infertility, especially in farm animals, and enhance testicular functions. In addition, more information is required regarding the fate, toxicity, kinetics, and physical-chemical properties of different types of nanoencapsulation systems in biological systems and environments. This may require multidisciplinary cooperation to assess the release, transportation, transformation, accumulation, toxicity, and uptake of engineered nanoencapsulation systems from the biological systems into the environment.

**Acknowledgments:** The authors thank ‘Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences’ and ‘Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology’ University of Bejaia and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University’, for all the support provided.

## REFERENCES

1. Ezzati M, Shanehbandi D, Hamdi K, Rahba, S & Pashaiasl M (2020) *Cell Tissue Bank* **21**, 1–15.
2. Lee SH & Shin CH (2013) *Ann Pediatr Endocrinol Metab* **18**, 4-168.
3. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B Cseh S (2014) *BioMed Research International* 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/307268>.
4. Argyle CE, Harper JC & Davies MC (2016) *Hum. Reprod. Update* **22**, 440–449. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw007440-49>
5. Peltoniemi O, Björkman S, Oropeza-Moe M & Oliviero C (2019) *Anim Reprod* **16**, 524–538. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0055>
6. Zhang T & Rawson DM (1996) *Cryobiology* **33**, 1–13.
7. Chatdarong K (2017) *Reprod Dom Anim* **52**, 261–264. <https://doi.org/10.1111/rda.12855>
8. Brusentsev E, Kizilova E, Mokrousova V, Kozhevnikova V, Rozhkova I & Amstislavsky S (2018) *Theriogenology* **110**, 148–152.
9. Kumar P (2019) *Journal of Animal Research* **9** (2), 227-235. <https://doi.org/10.30954/2277-940X.02.2019.2>
10. Woods EJ, Benson JD, Agca Y & Critser JK (2004) *Cryobiology* **48**, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>
11. Bakhach J (2009) *Organogenesis* **5**, 119–126. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.9583>
12. Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, Wolkers WF & Sieme, H (2013) *Biology of Reproduction* **88**, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.104661>
13. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M & Nekoonam S (2016) *Cell Tissue Bank* **17**, 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
14. Watson P (1995) *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 871. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
15. Kunkitti P, Chatdarong K, Suwimonteerabutr J, Nedumpun T, Johannisson A, Bergqvist A-S, Sjunnesson Y & Axné E (2017) *Animal Reproduction Science* **185**, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.014>
16. Gao D & Critser JK (2000) *ILAR Journal* **41**, 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>



17. Yeste M (2016) *Theriogenology* **85**, 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
18. Ramos-Tovar E & Muriel P (2020) *J Appl Toxicol.* **40** (1), 151-168. <https://doi.org/10.1002/jat.3880>
19. Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Fernández-Santos MR, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Montoro V & Garde JJ (2020) *International J Med Sci* **21(8)**, 2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
20. Bilodeau J-FO, Chatterjee S, Sirard M-A & Gagnon C (2000) *Mol Reprod Devel* **55(3)**, 282-288.
21. Lasso L, Storey T, Noiles E & Alvarez G (1994) Mechanism of Superoxide Dismutase Loss from Human Sperm Cells during Cryopreservation. *J Andrology* **15(3)**, 255-265.
22. Agarwal A, Virk G, Ong C & du Plessis SS (2014) *World J Mens Health* **32(1)**, 1-17. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
23. Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A & Memili E (2019). *Front. Vet. Sci.* **6**, 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
24. Majzoub A & Agarwal A (2020) in *Male Infertility*, (eds) Parekattil SJ, Esteves SC & Agarwal A, Springer International Publishing, Cham, pp 671–678. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4\\_54](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_54)
25. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L & Storey BT (1987) *Journal of Andrology* **8**, 338–348. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x>
26. Alvarez JG & Storey BT (1989) *Gamete Res.* **23**, 77–90. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120230108>
27. Turaja KIB, Vega RS, Saludes TA, Tandang AG, Bautista JAN, Salces AJ & Rebancos CM (2019) *Philippine J. Sci.* **148** (4), 619-626.
28. Kefer JC, Agarwal A & Sabanegh E (2009) *International Journal of Urology* **16**, 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x>
29. Martinelli C, Pucci C, Battaglini M, Marino, A & Ciofani G (2020) *Adv. Healthcare Materials* **9** (3), 1901589. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901589>
30. Khalil I, Yehye WA, Etxeberria AE, Alhadi, AA, Dezfooli SM, Julkapli NBM, Basirun WJ & Seyfoddin A (2019) *Antioxidants* **9**, 24. <https://doi.org/10.3390/antiox9010024>
31. Begam S, Panda N, Rana S, Behera L & Dehuri P (2019) *World Journal of Pharmaceutical Research* **8**, 11.
32. Korani S, Korani M, Bahrami S, Johnston TP, Butler AE, Banach M & Sahebkar A (2019) *Drug Discovery Today* **24**, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.023>
33. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Mohammadnejad Arough J, N Helder M & Zandieh-doulabi B (2017) *Cell J* **19** (suppl. 1), 55-65. <https://doi.org/10.22074/cellj.2017.4502>
34. Eroğlu I & İbrahim M (2019) *Journal of Drug Targeting* **28(3)**, 225-244. DOI: 0.1080/1061186X.2019.1648479.
35. Cheng R, Liu L, Xiang Y, Lu Y, Deng L, Zhang H, Santos HA & Cui W (2020) *Biomaterials* **232**, 119706. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119706>
36. Pathak N & Pathak P (2019) *Asian J Pharmaceutical Res Devel* **7(1)**, 62-65.
37. Allen TM & Cullis PR (2013) *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
38. Al-Shati IR (2020) *The Journal of Research on the Lepidoptera* **51(1)**, 536–552. <https://doi.org/10.36872/LEPI/V51I1/301048>
39. Medina-León AZ, Domínguez-Mancera B, Cazalez-Penino N, Cervantes-Acosta P, Jácome-Sosa E, Romero-Salas D & Barrientos-Morales M (2019) *Austral J Vet Sci* **51**, 119–123. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322019000300119>
40. Gharib R, Greige-Gerges H, Fourmentin S, Charcosset C & Auezova L (2015) *Carbohydrate Polymers* **129**, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.048>
41. Szejtli J (1998) *Chem. Rev.* **98(5)**, 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>
42. Pereva S, Nikolova V, Sarafska T, Angelova S, Spassov T & Dudev T (2020) *Journal of Molecular Structure* **1205**, 127575.

- <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127575>
43. Patel MR, Lamprou DA & Vavia PR (2020) *AAPS PharmSciTech* **21**, 11. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1572-z>
  44. Lee W-H, Kim W-H, Cheong H-T, Yang B-K & Park C-K (2019) *Dev. Reprod.* **23**, 11–19. <https://doi.org/10.12717/DR.2019.23.1.011>
  45. Benberkane A, Khellouf A, Benhenia K, Fatmi S & Iguer-ouada M (2019) *CryoLetters* **40**, 219–225.
  46. D'souza AA & Shegokar R (2016) *Expert Opinion on Drug Delivery* **13**, 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
  47. Ishihara H (2013) *Biological Pharmaceutical Bulletin* **36**, 883–888. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00087>
  48. Zhang X, Wang H, Ma Z & Wu B (2014) *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **10**, 1691–1702. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967679>
  49. Özdemir C & Güner A (2007) *European Polymer Journal* **43**, 3068–3093. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.02.022>
  50. Zong C, Sun Y, Zhang N, Wang F, Li A, Li Q & Lyu Z (2019) Synthesis of Chitosan-g-Macromol. *Res.* **27**, 772–780. <https://doi.org/10.1007/s13233-019-7113-5>
  51. Amokrane A, Kaidi R & Iguer-Ouada M (2020) *CryoLetters* **41**, 19–25.
  52. Naskar S, Kuotsu K & Sharma S (2019). *Journal of Drug Targeting* **27**, 379–393. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1512112>
  53. Jin C, Bai L, Wu H, Tian F & Guo G (2007) *Biomaterials* **28**, 3724–3730. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.032>
  54. Tan C & Nakajima M (2005) *Food Chemistry* **92**, 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.044>
  55. Zielińska A, Ferreira NR, Feliczak-GuziK A, Nowak I & Souto EB (2020) *Pharm Dev Technol.* **25(7)**, 832–844. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1744008>
  56. Janakiraman K, Krishnaswami V, Sethuraman V, Natesan S, Rajendran V & Kandasamy R (2020) *AAPS PharmSciTech* **21**, 34. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1581-y>.
  57. Soleimani M, Aflatouni F & Khani A (2013) *Colloid J* **75**, 112–116. <https://doi.org/10.1134/S1061933X12060142>
  58. Hasegawa S, Hamaura T, Furuyama N, Kusai A, Yonemochi E & Terada K (2005) *International Journal of Pharmaceutics* **302**, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.021>
  59. Jia L-J, Zhang D-R, Li Z-Y, Feng F-F, Wang Y-C, Dai W-T, Duan C-X & Zhang Q (2010) *Drug Delivery* **17**, 11–18. <https://doi.org/10.3109/10717540903431586>
  60. Duarte ARC, Costa MS, Simplício AL, Cardoso MM & Duarte CMM (2006) *International Journal of Pharmaceutics* **308**, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.012>
  61. Shah RM, Bryant G, Taylor M, Eldridge DS, Palombo EA & Harding IH (2016) *RSC Advances* **6**, 36803–36810. <https://doi.org/10.1039/C6RA02020H>
  62. Hwisa NT, Katakam P, Chandu BR & Adiki SK (2013) *Vedic Research International Biol Med Chem* **1**, 8–22. <https://doi.org/10.14259/bmc.v1i1.29>
  63. Charcosset C & Fessi H (2005) *Journal of Membrane Science* **266**, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.05.016>
  64. Azzi A (2018) *Molecular Aspects of Medicine* **61**, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
  65. Ullah Z, Khan H, Hussain SM, Tarique Tunio M, Raihan Dilshad SM, Gohar A, Zahid H & Ali A (2019) *Acta Scientiae. Vet.* **47**, 1641. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.90447>.
  66. Evans HM & Bishop KS (1922) *Science* **56**, 650–651. <https://doi.org/10.1126/science.56.1458.650>.
  67. McDowell LR, Williams SN, Hidiroglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L & Wilkinson, NS (1996) *Animal Feed Science and Technology* **60**, 273–296. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(96\)00982-0](https://doi.org/10.1016/0377-8401(96)00982-0).
  68. Therond P, Auger J, Legrand A & Jouannet P (1996) *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 739–744.

69. Omu AE, Fatinikun T, Mannazhath N & Abraham S (2002) *Andrology* **31** (6), 347–354.
70. Zubair M, Ali M, Ahmad M, Sajid SM., Ahmad I & Gul ST (2015) *Journal of Entomology and Zoology Studies* **3**(1), 82–82.
71. Muddineti OS, Ghosh B & Biswas S (2017) *Expert Opinion on Drug Delivery* **14**, 715–726.  
<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1229300>
72. Taouzinet L, Fatmi S, Khellouf A, Skiba M & Iguer-ouada M (2020) *DDL* **10**(3), 228–236(9).  
<https://doi.org/10.2174/2210303110666200302113209>
73. Nabi I, Fatmi S, Zerrouki-Daoudi N & Iguer-Ouada M (2017) *Revue Méd. Vét.* **168**, 4–6.
74. Jaipuria G, Leonov A, Giller K, Vasa SK, Jaremko Ł, Jaremko M, Linser R, Becker S & Zweckstetter M (2017) *Nature Commun* **8**, 14893.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms14893>.
75. Van der Paal J, Verheyen C, Neyts EC & Bogaerts A (2017) *Science Rep* **7**, 39526.  
<https://doi.org/10.1038/srep39526>
76. Lyu D, Zhang L & Zhang Y (2020) *RSC Advances* **10**, 11088–11094.  
<https://doi.org/10.1039/D0RA00624F>
77. Naseer Z., Ahmad E, Aksoy M, Küçük N, Serin İ, Ceylan A, Boyacıoğlu M & Kum C, (2015) *Cryobiology* **71**, 18–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.06.007>
78. Karasinska JM, Topham JT, Kalloger SE, Jang GH, Denroche RE, Culibrk L, Williamson LM, Wong H-L, Lee MKC, O’Kane GM, Moore RA, Mungall AJ, Moore MJ, Warren C, Metcalfe A, Notta F, Knox JJ, Gallinger S, Laskin J, Marra MA, Jones SJM, Renouf DJ & Schaeffer DF (2020) *Clin Cancer Res* **26**, 135–146.
79. Carro M de las M, Peñalva DA, Antollini SS, Hozbor FA & Buschiazzi J (2020). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1862**, 183357.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183357>
80. Mutalik S, Salian SR, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde AR., Kumar P & Kalthur G, Adiga SK (2014) *Systems Biology in Reproductive Medicine* **60**, 183–188.  
<https://doi.org/10.3109/19396368.2014.902521>
81. Wang Q, Cao T-J, Zheng H, Zhou C-F, Wang Z, Wang R & Lu S (2019) *J. Agric. Food Chem.* **67**, 4300–4310.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00756>
82. Hu M-Y, Li Y-L, Jiang C-H, Liu, Z-Q., Qu S-L & Huang Y-M (2008) *Nutrition* **24**, 1030–1038.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.05.006>
83. Kong K-W, Khoo H-E, Prasad KN, Ismail A, Tan C-P & Rajab NF (2010) *Molecules* **15**, 959–987.  
<https://doi.org/10.3390/molecules15020959>
84. Mordente A, Guantario B, Meucci E, Silvestrini A, Lombardi E, Martorana G, Giardina B & Bohm V (2011) *Current Medicinal Chemistry* **18**, 1146–1163.  
<https://doi.org/10.2174/092986711795029717>
85. Palan P & Naz R (1996) *Archives of Andrology* **36**, 139–143.  
<https://doi.org/10.3109/01485019608987090>
86. Souza HM, Arruda LCP, Monteiro MM, Nery IHAV, Silva RAJA, Oliveira AS, Batista AM & Guerra MMP (2019) *SAJAS* **49**(5), 876–883.  
<https://doi.org/10.4314/sajas.v49i5.10>
87. Rosato MP, Centoducati G, Santacroce MP & Iaffaldano N (2012) *British Poultry Science* **53**, 545–552.  
<https://doi.org/10.1080/00071668.2012.716508>
88. Walton IM, Cox JM, Benson CA, Patel D G, Chen Y-S & Benedict JB (2016) *New J. Chem.* **40**, 101–106.  
<https://doi.org/10.1039/C5NJ01718A>
89. Cornélio Favarin D, Martins Teixeira M, Lemos de Andrade E, de Freitas Alves C, Lazo Chica JE, Artério Sorgi C, Faccioli LH & Paula Rogerio A (2013) *Mediators of Inflammation* ID 164202, 13 pp.  
<https://doi.org/10.1155/2013/164202>
90. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS & Mohan H (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2200–2206.  
<https://doi.org/10.1021/jf011275g>
91. Shen Y-C, Juan C-W, Lin C-S, Chen C-C & Chang C-L (2017) *African J Trad Complementary Alt Med* **14**(4), 22–30.  
<https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.3>
92. Numan Bucak M, Bodu M, Başpınar N, Güngör Ş, İli P, Acibaeva B, Rezaei Topragaleh T & Dursun Ş (2018) *Cell J*

- 21(1), 7-13.  
<https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5593>
93. Najafi A, Taheri RA., Mehdipour M, Martínez-Pastor F, Rouhollahi AA & Nourani MR (2019) *Poultry Science* **98**, 440–446. <https://doi.org/10.3382/ps/pey353>
  94. Patil H, Tiwari RV & Repka MA (2016). *AAPS PharmSciTech* **17**, 20–42. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0360-7>
  95. Maniruzzaman M, Boateng JS, Snowden, MJ & Douroumis D (2012) *ISRN Pharmaceutics* ID 436763, 9 pp. <https://doi.org/10.5402/2012/436763>
  96. Schubert M (2003) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **55**, 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3)
  97. Ünner M, Wissing SA & Yener G (2005) *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Science* **60(10)**, 751-755
  98. Patrignani F & Lanciotti R (2016) Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety. *Front. Microbiol.* **7**, 1132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01132>
  99. Madhav S & Gupta D (2011) *International J Pharm Sci Res* **2(8)**, 1888-1899.
  100. Parhi R & Suresh P (2010) *J Chem Pharm Res.* **2(1)**, 211–227.
  101. Ambroziak K, Kielczewska K, Mickiewicz D & Dąbrowska A (2019) *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **69**, 279–287. <https://doi.org/10.31883/pjfn/109987>
  102. Shirodkar RK, Kumar L, Mutalik S & Lewis, S (2019) *Pharm Chem J* **53**, 440–453. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02017-9>
  103. García-Fuentes M, Torres D & Alonso MJ (2003) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **27**, 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00053-X)
  104. Singh MMC, Sayyad AB & Sawant DSD (2010) *Journal of Pharmacy Research* **3(10)**, 2494-2501.
  105. Ghosh PK, Sharma HK & Boruah N (2018) *IOSR J Pharmacy* **8(7)**, 28-38.
  106. Najafi A, Taheri RA, Mehdipour M, Farnoosh G & Martínez-Pastor F (2018) *Anim Reprod Sci.* **195**, 168-175.
  107. Marques Silva JP, Berto de Almada AF, De Lima JS, De Freitas Guitolini CR, Crespilho AM, Dell’Aqua CDPF, Dell’Aqua Junior JA, De Oliveira Sestari DA & Dias Maziero RR (2019) *Acta Scientiae. Vet.* **47**, 1685. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.96576>
  108. Belala R, Fatmi S, Kaidi R & Iguer-Ouada M (2016) *Revue Méd. Vét.* **167 (1-2)**, 22-27.
  109. Benhenia K, Rahab H, Smadi M-A, Benmakhlouf H, Lamara A, Idres T & Iguer-Ouada M (2018) *Animal Reproduction Science* **195**, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.004>
  110. Khellouf A, Benhenia K, Fatm S & Iguer-Ouada M (2018) *CryoLetters* **39(2)**, 113-120
  111. Benhenia K, Lamara A, Fatmi S & Iguer-Ouada M (2016) *Small Ruminant Research* **141**, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.009>
  112. Elshamy AA, Assi MMA, Ghandour RA & Hozyen HF (2019) *Middle East J. Appl. Sci.* **9(2)**, 548-555.
  113. Yadav HP, Kumar A, Shah N, Chauhan DS, Saxena A, Yadav S & Swain DK (2017) *Theriogenology* **96**, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.016>
  114. Batissaco L, Arruda RP, de Alves MBR, Torres MA, Lemes KM, Prado-Filho RR, Almeida TG, de Andrade AFC & Celeghini ECC (2020) *Reproductive Biology* **20**, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.002>
  115. Inanc M, Gungor S, Ozturk C, Korkmaz F, Bastan I & Cil B (2019) *Veterinarni Medicina* **64**, 118–124. <https://doi.org/10.17221/146/2018-VETMED>
  116. Salmon VM, Leclerc P & Bailey JL (2017) *Cryobiology* **74**, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.010>
  117. Salmon VM, Leclerc P & Bailey JL (2016) *Biology of Reproduction* **94(4)**, 85, 1-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.128553>

# **Etude Expérimentale**

### **Partie 1 : Développement et validation d'une méthode de dosage simultanée de l'alpha-tocophérol (seule ou encapsulée) et du cholestérol dans un milieu de conservation spermatique.**

#### **Résumé**

La cryoconservation spermatique est une approche essentielle dans l'optique de conserver la biodiversité des espèces animales menacées et pour contrôler la reproduction chez ces derniers (Comizzoli & Holt, 2019; Silva et al, 2018). Par ailleurs, la cryoconservation permet de conserver le sperme pendant de longues périodes dans des conditions inférieures à zéro (-196C) ou à plus petite durée à 4 °C et facilite l'échange du matériel génétique entre des populations éloignées (Bailey et al, 2003; Bailey et al 2008). La structure et la fonction des spermatozoïdes sont affectées au cours des différentes étapes du processus de cryoconservation, la dilution, cryoprotection, refroidissement ou congélation, stockage et décongélation (Bailey et al, 2000 ; Ezzati et al, 2019). Le milieu de cryopréservation contient un mélange de plusieurs composants [hydroxy méthyl aminométhane (TRIS), glucose, pénicilline, acide acétique, glycérol, fructose, zinc...]. Cette composition dépend de l'espèce étudiée (Fabozzi et al, 2016). L'ajout d'antioxydants et de cryoprotecteurs tels que l'alpha tocophérol et du cholestérol au sperme améliore la qualité du sperme et a un effet protecteur sur l'activité métabolique, et la viabilité des cellules pendant le processus de cryopréservation (Güngör et al, 2019 ; Inanc et al, 2019 ; Yu et al, 2019). Avant l'utilisation des deux molécules hydrophobes (Vit E et Chol) dans des milieux cryopréservés, il a été établi qu'il est utile de les encapsuler dans des cyclodextrines, liposome, ou polyéthylène glycol, pour améliorer leur solubilité dans les solutions aqueuses (Amokrane et al, 2020; Khellouf et al, 2018; Taouzin et al, 2020). Les essais biologiques prennent du temps et nous informe uniquement sur l'effet des cellules protectrices du traitement (Khellouf et al, 2018), mais ne donne aucune information sur la pharmacocinétique, la biodisponibilité et la stabilité des antioxydants et des agents cryoprotecteurs utilisés lors le processus de cryoconservation.

Parmi les méthodes de quantification de pointe de la vitamine E et du cholestérol les plus largement citées dans la littérature on trouve la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Cela dit, aucune n'abordait la quantification des deux molécules simultanément (encapsulés ou non). Ainsi, la première partie de notre travail fut l'élaboration (développement) et validation (selon les lignes directrices de l'US Pharmacopeia et de la Conférence internationale sur l'harmonisation).

## **Etude expérimentale**

---

L'objectif de la présente étude était de développer et de valider une méthode de dosage simultanée de l'alpha-tocopherol (seule ou encapsulée) et du cholestérol dans un milieu de conservation spermatique.

La méthode HPLC a été développée et validée pour le dosage de l'alpha-tocophérol et du cholestérol dans les milieux de cryoconservation. Une séparation chromatographique a été effectuée sur un système isocratique, en utilisant une colonne C-18. La phase mobile était composée d'un mélange de méthanol:acétonitrile: eau 68:28:4 (v/v/v), avec un débit de 1,5 ml/min et 20 µl de volume d'injection, à une longueur d'onde de 208 nm. La méthode a été validée selon les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation.

Dans la partie de la vérification de la spécificité, le but est de vérifier qu'aucun des excipients, ne présente de pic (absorbance) au temps d'apparition de la vitamine E et du cholestérol. Ainsi, nous avons préparé des solutions qui contiennent des : Cyclodextrines, phospholipides, PEGs, méthanol, vitamine E, cholestérol, tris, complexes CD /vitE, CD/Chol ou liposomes chargés en vitamine E.

Les résultats ont montré que la vitamine E et le cholestérol présentent des pics aux temps de rétention respectivement de 6,25 et 7,16 minutes. Les autres échantillons n'ont montré aucun pic à ces temps-là. Ainsi, l'ensemble des constituants n'interfèrent pas dans le dosage et la détection de la vitamine E et le cholestérol dans les conditions de notre travail. Ce qui démontre que la méthode développée est bien **spécifique**.

Afin de vérifier la linéarité de la méthode, des solutions à différents niveaux de concentration ont été préparées, les gammes de concentrations sont comme suit: 0,24 - 1,44 mg/ml et 0,4 - 2,4 mg/ml de vitamine E et de cholestérol. Après injection de la gamme étalon, on a obtenu une courbe d'étalonnage avec une droite de régression de la forme :  $y = b x + a$ . La valeur des coefficients de détermination  $R^2$ , qui sont assez proches de l'unité, et montre qu'il y a un lien entre les deux distributions  $x$  et  $y$ . Les résultats montrent que la méthode de dosage de la vitamine E et du cholestérol par HPLC dans la gamme étudiée est **linéaire**.

L'exactitude a été démontrée par l'étude de recouvrement. À chaque niveau, des échantillons ont été préparés en triple, et le pourcentage de recouvrement a été déterminé. La fidélité a été démontrée par les tests de répétabilité et reproductibilité. La répétabilité de la méthode d'analyse a été évaluée en effectuant la quantification de cinq préparations de Vit E et de Chol par rapport à une référence injectée le même jour. Ces essais ont été répétés sur trois jours consécutifs afin

## **Etude expérimentale**

---

de déterminer reproductibilité entre les jours. Ces mêmes résultats ont permis de calculer la fidélité ou % RSD (écart-type relatif).

Les études de recouvrements ont été réalisées dans une fourchette de concentration de 80 à 120 %. Les pourcentages de recouvrements se sont avérés être en moyenne de 100,1 % et 99,9 % pour la vitamine E et le chol, respectivement. Cette méthode s'est révélée suffisamment exacte. Le pourcentage de l'écart type relatif (RSD) a été calculé et s'est avéré inférieur à 2 % et 5 % pour la répétabilité et la reproductibilité, respectivement. Ainsi, il a été prouvé que la méthode est **fidèle**.

Ce travail, a permis de déterminer la limite de détection et de quantification en utilisant les formules suivantes:

$$LDM=(3,3*S) / b$$

$$LQM=(10*S) / b$$

Avec : S : Ecart type des concentrations.

b : Pente de la droite de régression.

La limite de détection et la limite de quantifications retrouvées furent très intéressantes car elles permettent de doser des concentrations en vitamine E et cholestérol à voisinant les µg/ml, à savoir :

\* **LDM** = 2,09 µg/ml et **LDM**= 25,87 µg/ml pour la vitamine E et le cholestérol, respectivement.

\* **LQM** = 6,96 µg/ml et **LQM** = 80,26 µg/ml pour la vitamine E et le cholestérol, respectivement.

En résumé cette partie de notre travail a permis la mise au point d'une méthode est simple et rapide, qui fait preuve d'une grande précision et d'une grande exactitude, offrant l'avantage du dosage simultané de la vitamine E et du cholestérol, (seul, complexés, ou chargés dans les liposomes), dans le milieu de la cryoconservation spermatiques.

Ce travail a été valorisé par un article de Recherche publié dans un journal de renommé : « **Biomedical Chromatography** ».



### Références

Amokrane, A., Kaidi, R., & Iguer-Ouada, M. The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (peg) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters*, 41: 19–25(2020).

Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 83:393–401(2003).

Bailey, J. L., Franc, J., Bilodeau, O., & Cormier, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21: 49–62 (2000).

Bailey, J. L., Lessard, C., Jacques, J., Breque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., & Galantino-Homer, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*70:1251-1259 (2008).

Comizzoli, P., & Holt, W. V. Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biology of reproduction* , 101: 514–525 (2019).

Ezzati, M., Shanebandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. *Cell and Tissue Banking*, 21: 1–15 (2019).

Fabozzi, G., Flavia Starita, M., Rega, E., Alteri, A., Colicchia, A., Piscitelli, C., & Giannini, P.. Evaluation of the efficiency of two different freezing media and two different protocols to preserve human spermatozoa from cryoinjury. *International Journal of ReproductiveMedicine*, 6: 1–6 (2016).

Güngör, S., Ata, A., Inanç, M. E., & Kastelic, J. P. Effect of various antioxidants and their combinations on bull semen cryopreservation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43:590–595 (2019).

Inanc, M. E., Gungor, S., Ozturk, C., Korkmaz, F., Bastan, I., & Cil, B. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinary Medicine - Czech*, 3:118–124 (2019).

International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, (2005).

## **Etude expérimentale**

---

Khellouf, A., Benhenia, K., Fatmi, S., & Iguer-Ouada, M. The complementary effect of cholesterol and vitamin E preloaded in Cyclodextrins on frozen bovine semen: Motility parameters. Membrane Integrity and Lipid Peroxidation. *CryoLetters*, (2018) 39: 113–120.

Rodrigues Silva, H. V., Rodrigues Silva, A., Machado da Silva, L. D., & Comizzoli, P. Semen cryopreservation and banking for the conservation of Neotropical carnivores. *Biopreservbiobank*, 17: 183–188 (2018).

Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Skiba, M., & Iguer-ouada, M. Alpha tocopherol loaded in liposome: Preparation, optimization, characterization and sperm motility protection. *Drug Delivery Letters*, 10:228–236 (2020).

Yu, X., He, S., Wang, L., Kang, M., Zhu, Y., Wang, S., & Sun, X. Effects of vitamin C and vitamin E on cryopreservation of Guanzhong donkey semen. *Pakistan Journal of Zoology*, 51:1777–1781 (2019).

**Development and validation of HPLC method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media.**

**Lamia Taouzinet<sup>1,2</sup>, Sofiane Fatmi<sup>1,2,3</sup>, Yasmina Salhi-Amrani<sup>1</sup>, Malika Lahiani-Skiba<sup>3</sup>, Mohamed Skiba<sup>3</sup>, Mokrane Iguer-Ouada<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.


<sup>2</sup>Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Biopharmaceutics Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, Rouen, France.

Biomedical Chromatography.2020;e5018. <https://doi.org/10.1002/bmc.5018>

## SHORT COMMUNICATION

# Development and validation of HPLC method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media

Lamia Taouzinet<sup>1,2</sup> | Sofiane Fatmi<sup>1,2,3</sup>  | Yasmina Salhi-Amrani<sup>1</sup> |  
Malika Lahiani-Skiba<sup>3</sup> | Mohamed Skiba<sup>3</sup> | Mokrane Iguer-Ouada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria

<sup>2</sup>Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, Rouen, France

## Correspondence

Fatmi Sofiane, Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria.  
Email: fatmi.sofiane@gmail.com

## Abstract

The HPLC method was developed and validated for assaying alpha-tocopherol and cholesterol in cryopreservation media. Chromatographic separation was performed on an isocratic system, using a C-18 column. The mobile phase was composed of a mixture of methanol:acetonitrile:water 68:28:4 (v/v/v), using a flow rate of 1.5 mL/min and 20 µL injection volume, at a wavelength of 208 nm. The method was validated according to International Conference on Harmonization guidelines. The method proved to be specific, accurate, precise, and linear with correlation coefficients greater than 0.996 over a wide concentration range of both analytes. Vitamin E and cholesterol presented limits of detection of 0.002 mg/mL, 0.026 mg/mL and limits of quantitation of 0.006 mg/mL, 0.086 mg/mL, respectively. This method is simple and rapid, shows high precision and accuracy, and offers the advantage of simultaneous assaying of vitamin E and cholesterol (alone, in cyclodextrins complexes or in liposome loaded) on semen cryopreservation media.

## KEYWORDS

alpha-tocopherol, cholesterol, cryopreservation media, HPLC, simultaneous validation

## 1 | INTRODUCTION

Cryopreserved semen is an essential aspect of genome resource banking to conserve the biodiversity of endangered animal species and to control reproduction in these animals (Comizzoli & Holt, 2019; Rodrigues Silva, Rodrigues Silva, Machado da Silva, & Comizzoli, 2018). Besides, cryopreservation ensures the storage of semen for lengthy periods under subzero condition (−196°C) and facilitates genetic material exchange among distant populations (Bailey et al., 2008; Bailey, Morrier, & Cormier, 2003). Sperm structure and function are affected during several steps of the cryopreservation process, dilution, cryoprotection, cooling or freezing, storage, and thawing (Bailey, Franc, Bilodeau, & Cormier, 2000; Ezzati, Shanehbandi, Hamdi, Rahbar, & Pashaiasl, 2019). The cryopreservation medium contains a mixture of several components [hydroxymethylaminomethane (TRIS), glucose,

penicillin, acetic acid, glycerol, fructose, zinc, DMSO]; this composition and the dosages depend on the species studied (Fabozzi et al., 2016). The addition of antioxidants and cryoprotectants such as alpha-tocopherol and cholesterol to semen improves sperm quality and has a protective effect on metabolic activity, and cell viability during the cryopreservation process (Güngör, Ata, Inanç, & Kastelic, 2019; Inanc et al., 2019; Yu et al., 2019). Prior to the use of the two hydrophobic molecules (Vit E and Chol) in cryopreserved media, it was established that it is useful to encapsulate them in cyclodextrins, liposome, or polyethylene glycol, to enhance their solubility in aqueous solutions (Amokrane, Kaidi, & Iguer-Ouada, 2020; Khellouf, Benhenia, Fatmi, & Iguer-Ouada, 2018; Taouzinet, Fatmi, Khellouf, Skiba, & Iguer-ouada, 2020). Bioassay is time-consuming and informs us only about the protective cell effect of treatment (Khellouf, Benhenia, Fatmi, & Iguer-Ouada, 2018, but does not give

any information about the pharmacokinetics, bioavailability, and stability of the antioxidants and cryoprotectant agents used during the cryopreservation process. HPLC is the method of choice for Vit E and Chol determination in cryopreservation media. The aim of present study was to develop and validate a new simultaneous routine HPLC assay of vitamin E and cholesterol (free or encapsulated) in sperm cryopreservation media.

## 2 | EXPERIMENTAL

### 2.1 | Chemicals and reagents

Alpha-tocopherol (vitamin E) was purchased from Sigma-Aldrich (USA, T3634, lot#SLBJ1634, PCODE:1002263195, CAS: 59-02-9). Cholesterol was purchased from Sigma-Aldrich (USA, C8503, and lot #SLBR0583V. PCODE: 1002334996. CAS: 57-88-5). Saturated phospholipids were purchased from Rhone Poulenc (France), Phospholipon 90H lot:90060). TRIS was purchased from Sigma Aldrich (USA, T6066, lot #SLBS9646, PCODE: 101860987, CAS: 77-86-1).  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) was obtained from Roquette Frères (France). Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) was purchased from Biochem Chemopharma (France, PCODE: 516 600,500, CAS: 25322-68-3), and HPLC-grade methanol (CAS:67-56-1), HPLC-grade acetonitrile (CAS:75-05-8) were purchased from Biochem Chemopharma (France).

### 2.2 | Equipment and chromatographic conditions

Quantitative analysis of Vit E and Chol was performed using a HPLC column, coupled to a UV detector set to 208 nm. HPLC-UV system (UltiMate 3000 RS-Variable Wavelength detector) was equipped with an auto-injector LC 1650, consisting of vacuum degasser, temperature-controlled well-plate autosampler, column thermostat, quaternary pump, and photodiode array detector. Chromatographic analysis was performed using a C-18 column (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size, 80 $^{\circ}$ A pore size) from Thermo (Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted of 68% methanol, 28% acetonitrile, 4% water, with a flow rate of 1.5 mL/min, injection volume was 20  $\mu$ L, and the column temperature was fixed at 36 $^{\circ}$ C  $\pm$  0.5 $^{\circ}$ C.

### 2.3 | Standard preparation

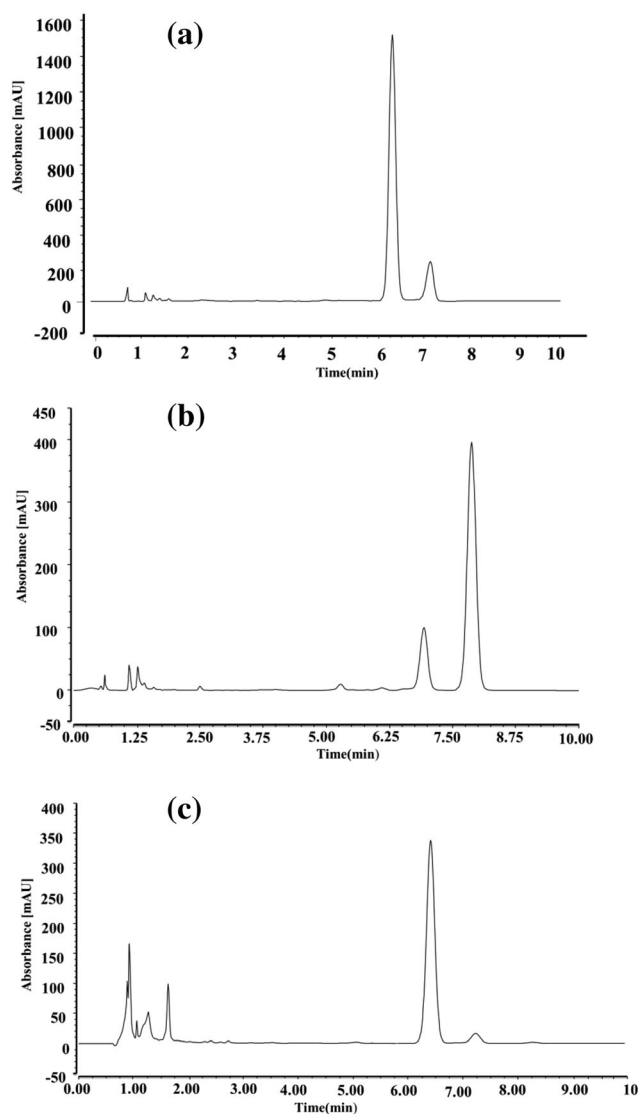
The standard solutions of Vit E and Chol were prepared in methanol. Different quantities 0.024–0.027, 0.03–0.033, and 0.036 g, 0.04–0.045, 0.05–0.055, and 0.06 g of Vit E and Chol, respectively, were dissolved in 25 mL of methanol. These solutions were used to study linearity, accuracy, and precision. Specificity study was achieved by the preparation of different solutions containing PEG 6000,  $\beta$ -CD, phospholipids 90H, Vit E, or Chol with target concentrations.

### 2.4 | Sample preparation

Sample solutions were prepared by adding the target concentrations of complexes  $\beta$ -CD/Vit E,  $\beta$ -CD/Chol, liposome-loaded Vit E and Chol in TRIS buffer (the TRIS buffer solution was prepared by dissolving 2.5 g acetic acid, 1.8 g fructose, 4.35 g TRIS, and 0.2 g penicillin in 180 mL of distilled water).

### 2.5 | Method validation

Specificity was determined by analyzing samples containing cyclodextrins, phospholipids, PEG 6000, methanol, mobile phase, mixer



**FIGURE 1** Chromatograms of cryopreserved media samples: (a) standard solution, (b) cyclodextrin complexes, (c) liposome formulation. Standard solution: [VitE] = 0.33 mg/mL, [Chol] = 0.5 mg/mL; cyclodextrin complexes: (CD/VitE) and (CD/Chol) ratio 1:1; liposome formulation: Phospholipide 90H = 159 mg, Vit E = 80 mg, Chol = 25.5 mg

**TABLE 1** Linearity, precision, and recovery data for vitamin E and cholesterol

Samples	Added standard (mg/mL)	Linearity (R <sup>2</sup> )	Accuracy (% recovery)	Precision (%RSD)		LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
				Intra-day	Inter-day		
Vit E	0.96	0.99	100.77	0.34	3.71	2.09	6.96
	1.08		100.01				
	1.20		98.19				
	1.32		101.03				
	1.44		100.04				
Chol	1.60	0.99	98.59	1.26	3.36	25.87	80.26
	1.80		100.75				
	2.00		101.04				
	2.20		100.38				
	2.40		99.17				

Note. LD, detection limit; LQ, quantitation limit; RSD, relative standard deviation.

solution (containing all substances), cholesterol and vitamin E, and the sample solutions. All chromatograms were examined to determine if Vit E and Chol co-eluted with any other excipient peak. The calibration standard was tested in the concentration range of 0.24–1.44 mg/mL and 0.4–2.4 mg/mL of vitamin E and cholesterol, respectively. Peak areas (*y*-axis) versus drug concentrations (*x*-axis) were plotted and subjected to regression analysis by the least-squares method, and calibration equations  $y = m x + a$  were obtained. Accuracy was established by recovery studies. Each level, samples were prepared in triplicate, and recovery percentage was determined. Precision was validated through intra-day and inter-day testing. The intra-day precision of the assay method was evaluated by carrying out five independent assays of Vit E and Chol samples against qualified reference standards on the same day, and these studies were repeated on three consecutive days to determine inter-day precision. Precision was expressed as % RSD (relative standard deviation) of analyte concentration. Quantitation limit (LQ) and detection limit (LD) were determined based on the standard deviation of the response and the slope.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The HPLC method described was developed for simultaneous quantification of vitamin E and cholesterol following International Conference on Harmonization (International Conference on Harmonization, 2005) guidelines.

#### 3.1 | Method validation

##### 3.1.1 | Specificity

Under the described conditions, the retention times of Vit E and Chol were 6.25 and 7.16 min, respectively. Chromatograms of all compound solutions confirmed the absence of other peaks at the retention time of two active molecules (vitamin E and cholesterol). Also, no

peak interferences were found in cryopreserved media containing liposome formulations, cyclodextrin/Vit E complexes, and cyclodextrin/Chol complexes (Figure 1).

#### 3.1.2 | Linearity, accuracy, and precision

The method exhibited a good linearity over a concentration range of 0.24–1.44 mg/mL and 0.4–2.4 mg/mL of vitamin E and cholesterol, respectively. A representative regression line was  $y = 6.91x + 82.87$  and  $y = 1.55x + 3.44$  of Vit E and Chol, respectively, with the correlation coefficient always greater than 0.996. The results of intra- and inter-day accuracy and precision were within the acceptance criteria as shown in Table 1.

#### 3.1.3 | Detection and quantitation limits

Vitamin E and cholesterol presented limits of detection of 2.09, 25.87 µg/mL and limits of quantitation of 6.96, 80.26 µg/mL, respectively. The results obtained are presented in Table 1 and indicated that the sensitivity of this HPLC method was suitable for the quantitative determination of Vit E and Chol.

### 4 | CONCLUSION

Analytical HPLC simultaneous assay of Vit E and Chol was developed and validated satisfactorily for various parameters: accuracy, precision, linearity, and specificity per ICH guidelines. This method is simple and rapid, shows high precision and accuracy, and offers the advantage of simultaneous assay of vitamin E and cholesterol (alone, in complexes, or loaded with liposome) in semen cryopreservation media. Besides, this work offers an excellent alternative to classical methods already existing for Vit E and Chol determination in sperm cryopreservation media.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank 'Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences' and 'Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, University of Bejaia and Biopharmaceutics Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University', for all the support provided. The authors thank Direction Générale de la Recherche Scientifique et Développement Technologique, Algeria.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

**ORCID**

Sofiane Fatmi  <https://orcid.org/0000-0001-9925-7831>

**REFERENCES**

- Amokrane, A., Kaidi, R., & Iguer-Ouada, M. (2020). The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (peg) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters*, *41*, 19–25.
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, *83*, 393–401. <https://doi.org/10.4141/A03-024>
- Bailey, J. L., Franc, J., Bilodeau, O., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, *21*, 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Bailey, J. L., Lessard, C., Jacques, J., Breque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., & Galantino-Homer, H. L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, *70*, 1251–1259. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.014>
- Comizzoli, P., & Holt, W. V. (2019). Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biology of Reproduction*, *101*, 514–525. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox031>
- Ezzati, M., Shانهbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. (2019). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. *Cell and Tissue Banking*, *21*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>
- Fabozzi, G., Flavia Starita, M., Rega, E., Alteri, A., Colicchia, A., Piscitelli, C., & Giannini, P. (2016). Evaluation of the efficiency of two different freezing media and two different protocols to preserve human spermatozoa from cryoinjury. *International Journal of Reproductive Medicine*, *6*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/6059757>
- Güngör, Ş., Ata, A., Inanç, M. E., & Kastelic, J. P. (2019). Effect of various antioxidants and their combinations on bull semen cryopreservation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *43*, 590–595. <https://doi.org/10.3906/vet-1907-39>
- Inanc, M. E., Gungor, S., Ozturk, C., Korkmaz, F., Bastan, I., & Cil, B. (2019). Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinary Medicine - Czech*, *3*, 118–124. <https://doi.org/10.17221/146/2018-VETMED>
- International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (2005).
- Khellouf, A., Benhenia, K., Fatmi, S., & Iguer-Ouada, M. (2018). The complementary effect of cholesterol and vitamin E preloaded in Cyclodextrins on frozen bovine semen: Motility parameters. *Membrane Integrity and Lipid Peroxidation. CryoLetters*, *39*, 113–120.
- Rodrigues Silva, H. V., Rodrigues Silva, A., Machado da Silva, L. D., & Comizzoli, P. (2018). Semen cryopreservation and banking for the conservation of Neotropical carnivores. *Biopreservbiobank*, *17*, 183–188. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0104>
- Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Skiba, M., & Iguer-ouada, M. (2020). Alpha tocopherol loaded in liposome: Preparation, optimization, characterization and sperm motility protection. *Drug Delivery Letters*, *10*, 228–236. <https://doi.org/10.2174/2210303110666200302113209>
- Yu, X., He, S., Wang, L., Kang, M., Zhu, Y., Wang, S., & Sun, X. (2019). Effects of vitamin C and vitamin E on cryopreservation of Guanzhong donkey semen. *Pakistan Journal of Zoology*, *51*, 1777–1781. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.5.1777.1781>

**How to cite this article:** Taouzinet L, Fatmi S, Salhi-Amrani Y, Lahiani-Skiba M, Skiba M, Iguer-Ouada M. Development and validation of HPLC method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media. *Biomedical Chromatography*. 2020;e5018. <https://doi.org/10.1002/bmc.5018>

### **Partie 2 : Encapsulation de l'alpha tocophérol dans les liposomes : Mise au point, optimisation, caractérisation et protection spermatique.**

#### **Résumé**

La vitamine E est un terme générique qui fait référence à une famille de huit composés naturels, divisée en deux sous-groupes appelés tocophérols et tocotriénols (Duhem and Danhier,2014). L'alpha-tocophérol est la molécule la plus importante exprimant une puissante activité antioxydante, en particulier lors de la cryoconservation du sperme, réduisant la peroxydation des lipides (Gagné et al, 2003; Donnelly et al 1999 ; Hezavehei et al 2018 ; Jeong et al ;2009 ; Belala e al 2016 ; Benhenia et al 2018). Néanmoins, la vitamine E présente l'inconvénient d'être chimiquement instable avec une faible solubilité dans l'eau (Neunert et al ,2010). Par conséquent, de nos jours, il existe différentes approches pour améliorer la solubilité et la biodisponibilité des médicaments hydrophobes, notamment la vitamine E basée sur la complexation avec les cyclodextrines (Belala e al 2016 ; Benhenia et al, 2018), la dispersion solide (Fatmi et al, 2015) et les solutions liposomiales (Uhumwangho and Okor , 2009). Les liposomes constituent l'un des modèles membranaires qui tentent de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques. Ils sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires intervenant au niveau de la membrane comme la perméabilité, la stabilité et la fluidité. D'autre part, certains auteurs ont relié l'activité biologique exercée par certaines molécules à leur action au niveau de la membrane biologique. Ainsi, pour fournir une base moléculaire de cette activité, l'interaction de diverses molécules bioactives avec la membrane biologique a été étudiée en utilisant les liposomes comme modèles mimétiques de la membrane (Akbarzadeh et al ,2013; Matos et al., 2012 ;Hou et al, 2003; Potamitis et al., 2011). Un large éventail de techniques a été développé. Elles donnent accès à des informations diverses, telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'organisation des vésicules.

Dans cette étude, l'objectif est l'optimisation de la formulation des solutions liposomiales chargées en vitamine E, par une approche factorielle et l'exploration de son application dans la protection spermatique lors de la cryoconservation.

En premier lieu, la méthode d'injection éthanolique a été utilisée pour la préparation des solutions liposomiales, utilisant comme constituant principal les phospholipides naturels de soja



## **Etude expérimentale**

---

saturés (Phospholipon 90H). Ensuite, afin d'optimiser le process de fabrication (formulation) des liposomes chargés en vitamine E nous avons utilisé un plan factoriel. Ainsi, la quantité de cholestérol et celle des phospholipides ont été choisis comme facteurs, et le taux d'encapsulation ainsi que la taille des liposomes ont été sélectionnés comme réponses. L'intervalle d'optimisation des deux facteurs a été fixé à [10-50 mg/ml] et [1,5 – 10 mg/ml] pour les phospholipides et le cholestérol, respectivement.

La concentration en vitamine E présente dans les solutions liposomiales a été déterminée à l'aide d'un dosage par HPLC. Aussi, la taille des liposomes dans les différentes préparations a été déterminée en utilisant un granulomètre laser.

L'influence des facteurs de formulation sur le taux d'encapsulation et la taille des liposomes a été étudiée à l'aide d'un plan factoriel. Ce dernier, nous a aussi permis de déterminer un optimum et une région optimale (courbes iso-réponses).

Les meilleurs résultats en termes de taux d'encapsulation (**78,47 %**) et de taille de liposome (**99,86 nm**), ont été obtenus lors de l'utilisation des concentrations optimales suivantes :

**10,9 mg/ml de phospholipides et 1,7 mg/ml de cholestérol.**

La formule liposomiale optimale obtenue fut caractérisée en termes de taille et taux d'encapsulation afin d'assurer la fiabilité du modèle d'optimisation (validation de modèle). L'analyse de la morphologie des matières premières, placebo et solution liposomiale optimale a aussi été réalisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage.

Les images obtenues ont confirmé la formation de vésicules sphériques, unilamellaires et de taille nanométrique.

Finalement, un test de motilité spermatozoïque a été effectué en utilisant le Computer-Aided Sperm Analysis (CASA), pour évaluer l'activité antioxydante (indirecte) de la solution liposomiale optimale.

Les résultats furent très encourageants dans le sens où les spermatozoïdes traités par les solutions liposomiales ont montré une meilleure motilité par rapport au contrôle (VitE seule). De plus, cet effet protecteur se prolonge dans le temps. La présence de la VitE et du Chol favorisent la conservation prolongée des spermatozoïdes.

En résumé, l'encapsulation par les liposomes a amélioré l'effet de ces deux molécules (VitE et chol) en protégeant ainsi les spermatozoïdes contre des agents chimiques et physiques (tel que les prooxydants et le choc thermique). Les liposomes chargés en vitamine E préparés dans cette étude sont une alternative très prometteuse aux milieux de conservation spermatozoïques usuels.

## **Etude expérimentale**

---

Cette deuxième partie a été valorisée par un article de Recherche publié dans un journal de renommé : « **Drug Delivery Letters**».

### Référence

Abolfazl Akbarzadeh, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi, and Kazem Nejati-Koshki. Liposome: classification, preparation, and applications. *Liposome: classification, preparation, and applications, Nanoscale Res Lett.* 8: 102 (2013).

Belala, R.; Fatmi, S.; Kaidi, R.; Iguer-Ouada M. Benefits of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded, cyclodextrins in dog semen cryopreservation, *Rev. Méd Vét.*, 1: 22-27 (2016).

Benhenia, K.; Rahab, H.; Smadi, M-A.; Benmakhlouf, H.; Lamara, A.; Idres, T.; Iguer-Ouada, M. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm, *Anim. Reprod. Sci.*, 195: 266-273 (2018).

Carla Matos , Carla Moutinho , Paulo Lobao. Liposomes as a Model for the Biological Membrane: Studies on Daunorubicin Bilayer Interaction. *J Membrane Biol* 245:69–75(2012).

Donnelly, E.T.; McClure, N.; Lewis, S.E.M. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa, *mutage.*, 148: 505–512 (1999).

Duhem ,N.; Danhier, F.; Pr at ,V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery ,*JCR*,182: 33–44 ( 2014).

Fatmi ,S.; Bournine, L.; Iguer-Ouada, M.; Lahiani, M.; Bouchal, F.; Skiba, M.; Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000, *Acta Pol Pharm.*, 72: 179-92 (2015).

Gagné, A.; Wei, S.Q.; Fraser ,W.D.; Julien, P. Absorption, Transport, and Bioavailability of Vitamin E and its Role in Pregnant Women, *J. Obstet. Gynaecol Can.*, 19: 210–217( 2003).

Hezavehei, M.; Sharafi, M.; Kouchesfahani, H- M.; Henkel, R.; Agarwal, A.; Esmaeili, V.; Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches, *Reprod Biomed Online.*, 37: 327-339 (2018).

Hou G, Niu J, Song F, Liu Z, Liu S,. Studies on the interaction between ginsenosides and liposomes by equilibrium dialysis combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 923-924 (2013).

## **Etude expérimentale**

---

Jeong ,Y.-J.; Kim, M.-K.; Song,H.-J.; Kang, E.-J.; Ock,S.-A.; Mohana Kumar, B.; Balasubramanian, S.; Rho, G.-J. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes, *Cryobiology.*, 58: 181–189(2009).

Neunert, G.; Polewski, P.; Markiewicz, M.; Walejko, P.; Witkowski, S.; Polewski, K. Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods, *Biophys. Chem.*, 146: 92–97(2010).

Potamitis C, Chatzigeorgiou P, Siapi E, Viras K, Mavromoustakos T, Hodzic A, Pabst G, Cacho-Nerin F, Laggner P, Rappolt M,. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* ,1808: 1753- 1763 (2011).

Uhumwangho, M.; Okor, R. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review, *J. Med. Biomed. Res.*, 4 (2009).

**Alpha Tocopherol loaded in Liposome: Preparation, Optimization,  
Characterization and Sperm Motility Protection.**

**Lamia Taouzinet<sup>1,2</sup>, Sofiane Fatmi<sup>1,2,3,\*</sup>, AllaeddineKhellouf<sup>2</sup>, Mohamed Skiba<sup>3</sup> and  
Mokrane Iguer-Ouada<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

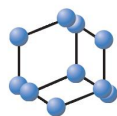
<sup>2</sup>Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Biopharmaceutics Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, Rouen, France.

Drug Delivery Letters, 2020, 10, 228-236.

<https://doi.org/10.2174/2210303110666200302113209>

## RESEARCH ARTICLE

BENTHAM  
SCIENCE

## Alpha Tocopherol loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection



Lamia Taouzinet<sup>1,2</sup>, Sofiane Fatmi<sup>1,2,3,\*</sup>, Allaeddine Khellouf<sup>2</sup>, Mohamed Skiba<sup>3</sup> and Mokrane Iguer-Ouada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Technology Pharmaceutical Laboratory, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria; <sup>2</sup>Faculty of Nature and Life Sciences, Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria; <sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Blvd. Gambetta, 76183, Rouen, France

**Abstract: Background:** Alpha-tocopherol is a potent antioxidant involved in sperm protection particularly during cryopreservation. However, its poor solubility limits the optimal protection in aqueous solutions.

**Objective:** The aim of this study was to enhance the solubility of  $\alpha$ -tocopherol by the use of liposomes.

**Methods:** The experimental approach included loading vitamin E in liposomes prepared by ethanol injection method and the optimization carried out by an experimental design. The optimum solution was characterized by high performance liquid chromatography and scanning electron microscope. Finally, the impact on sperm motility protection was studied by the freezing technic of bovine sperm.

**Results:** The optimum solution was obtained when using 10.9 mg/ml of phospholipids, 1.7 mg/ml of cholesterol and 2 mg/ml of vitamin E. The liposome size was 99.86 nm, providing 78.47% of loaded efficiency. The results showed a significant positive impact on sperm motility after hours of preservation.

**Conclusion:** In conclusion, the current results showed the interest of liposome preparation as an alternative to enhance vitamin E solubility and to protect spermatozoa during cryopreservation.

## ARTICLE HISTORY

Received: November 14, 2019  
Revised: December 17, 2019  
Accepted: December 20, 2019

DOI:  
10.2174/2210303110666200302113209



**Keywords:** Experimental design, alpha tocopherol, cholesterol, liposome, morphology, sperm motility.

## 1. INTRODUCTION

Vitamin E (VitE) belongs to the family of tocopherols and tocotrienols [1] including eight forms  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherol, and  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocotrienol [2]. Alpha-tocopherol is the most important molecule expressing potent antioxidant activity especially during semen cryopreservation reducing lipid peroxidation [3-8]. Nevertheless, vitamin E presents the inconvenient of being chemically instable with poor water solubility [9]. Consequently, nowadays, different approaches are available to enhance hydrophobic drug solubility and bioavailability including vitamin E based on cyclodextrins complexation [7, 8], solid dispersion [10] and liposome loading [11].

Liposomes are artificial vesicles, in which aqueous phase is enclosed totally by phospholipids presenting sizes ranging from 30 nm to several micrometers [12, 13]. Liposomes are able to load either hydrophilic drugs within the inner aqueous compartment, lipophilic molecules in the lipid bilayer or

amphiphilic substances at the aqueous-lipid interface [11, 13] offering thus alternatives to enhance drug stability and solubility [14-16].

Numerous research showed that liposome based formulations are extremely promising for vitamin E in the enhancement of solubility, stability and bioavailability [17-20]. However, only few of these studies investigated the formulation of vitamin E loaded in liposome using experimental design [21-23]. Loaded efficiency and particle size are the central parameters to be considered in liposome formulation [24]. However, the number of formulation and processing variables during liposome preparation can affect these parameters and it is particularly hard to study the effect of interactions between different variables and preparation by the conventional methods [21]. Thus, a factorial design approach consisting of a collection of statistical experimental design, empirical modeling, and mathematical technique is an interesting alternative to study the combined effects of different variables/factors [25]. Literature review exposed no previous reports to formulate liposome load vitamin E preparation using experimental design approach, especially to demonstrate the influence on cryopreserved sperm. In this respect, the investigation of the impact on cell models, including

\*Address correspondence to this author at the Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria; Tel/Fax: + (213) 034 22 15 49; E-mail: fatmi.sofiane@gmail.com

spermatozoa, remains of high importance in relation to the numerous toxic compounds, as tween, used in the solubilizing studies known for its potential toxicity, and where the increased solubility does not necessarily means a high therapeutic effect at cell level [26].

Based on the presented background, the aim of this study was to carry out a systematic statistical study on preparation of liposome load vitamin E formulation using factorial design approach and to explore its application in sperm protection during cryopreservation.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Material

Alpha-tocopherol (vitamin E) was purchased from SIGMA-ALDRICH, T3634, lot#SLBJ1634, PCODE: 1002263195, CAS: 59-02-9.

Cholesterol was purchased from SIGMA-ALDRICH, C8503, and lot #SLBR0583V. PCODE: 1002334996. CAS: 57-88-5.

Saturated phospholipids were purchased from RHONE POULENC (Phospholipon 90H lot: 90060).

Fructose was purchased from SIGMA-ALDRICH, F0127, lot#SLBM7710V, PCODE: 101675782, CAS: 57-48-7.

TRIS (hydroxymethyl) aminomethane, SIGMA ALDRICH, T6066, lot #SLBS9646, PCODE: 101860987, CAS: 77-86-1.

Ethanol and methanol HPLC grade was purchased from Biochem, PCode: 205042500, 64-17-5.

### 2.2. Method

#### 2.2.1. Buffer TRIS Preparation

Buffer TRIS solution was prepared by dissolving 2.5 g acetic acid, 1.8 g fructose, 4.35 g TRIS and 0.2 g penicillin in 180 ml of distilled water.

### 2.2.2. Loaded Liposomes

#### 2.2.2.1. Experimental Design and Liposomes Characterization

Factorial design was implemented for vitamin E loaded liposome optimization. Cholesterol and phospholipids quantities were chosen as factors, liposome size and loaded efficiency were selected as responses. Two independent factors were set at two different levels. High and low, levels of each factor were coded +1 and -1 with [10 to 50] and [1.5 to 10] respectively, as reel values (Table 1).

Polynomial equation generated by this experimental design is:  $Y_i = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2$ . Where  $Y_i$  is the dependent variable,  $b_0$  is the arithmetic mean response and  $b_i$  is the estimated coefficient for the factor  $X_i$ . The main effects ( $X_1$  and  $X_2$ ) represent the independent variable. The interaction terms ( $X_1 X_2$ ) show the response when two factors are simultaneously changed. The polynomial terms ( $X_1^2$  and  $X_2^2$ ) are included to investigate non-linearity. The polynomial equation is used to draw conclusion after considering the magnitude of coefficient and the mathematical sign it carries (*i.e.* positive or negative).

#### 2.2.2.2. Liposomal Solution Preparation

Liposomes were prepared by ethanol-injection method [15]. Phospholipon 90H, cholesterol and vitamin E were dissolved in 15ml of absolute ethanol and the resulting organic phase was injected into 40 ml of aqueous phase under magnetic. Then, ethanol was removed by rotary evaporation under reduced pressure and spontaneous liposomes were formed as shown in Fig. (1).

### 2.2.3. Liposomes Characterization

#### 2.2.3.1. Loading Efficiency Determination

Vitamin E concentration in liposome formulations was determined by HPLC system consisted of LPG 3400 pumps, ACC 3000 auto sampler and VWD 3400 RS variable wavelength detectors. Chromatographic separation was achieved

Table 1. Experimental design 3<sup>2</sup> used for vitamin E loaded liposome optimization.

Batch	Variable Level in Coded Form		Variable Level in Actual Form	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Phospholipids (mg/ml)	Cholesterol (mg/ml)
1	-1	-1	10.00	1.50
2	1	-1	50.00	1.50
3	-1	0	10.00	5.75
4	0	0	30.00	5.75
5	-1	1	10.00	10.00
6	0	1	30.00	10.00
7	1	1	50.00	10.00
8	0	0	30.00	5.75
9	0	0	30.00	5.75

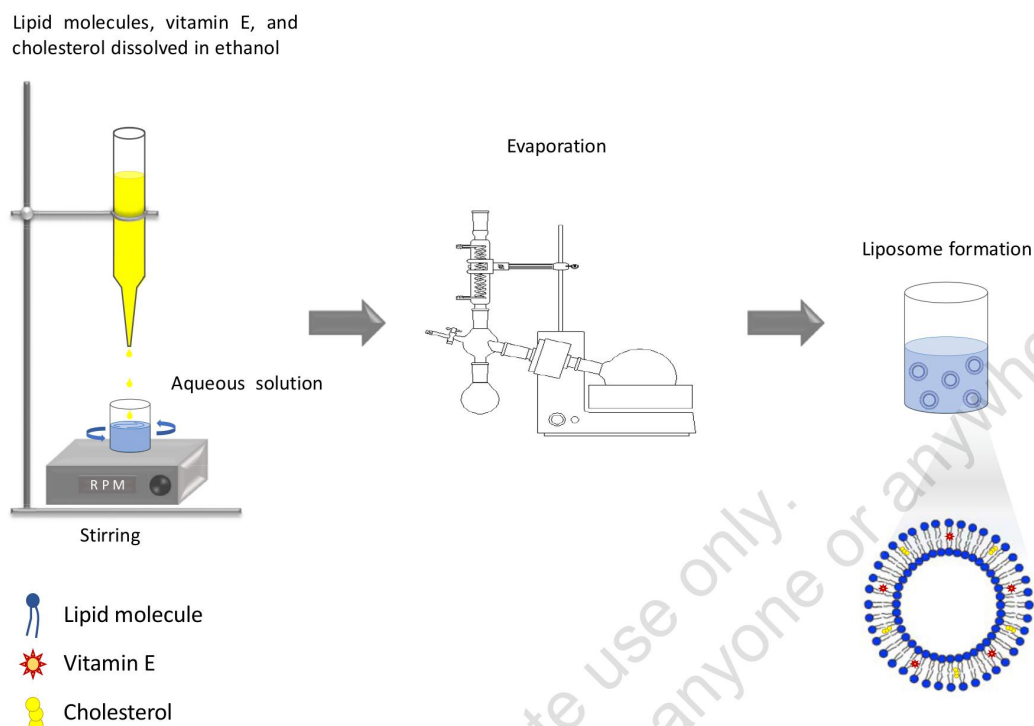


Fig. (1). Ethanol injection method for liposome.

on a C-18 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) HPLC column. Methanol grade HPLC was used as mobile phase at isocratic flow-rate of 1.0 ml/min.

Standard preparation: Standard solution was prepared by dissolving VitE in methanol.

Samples preparation: Liposomal solutions aliquots were centrifuged at 15,000 rpm for 2 h at 4 C°. The aliquots were filtered through 0.45 $\mu$ m membrane and quantified by HPLC. Loaded ratio was calculated using Eq. (1).

$$\text{Loaded efficiency} = \left( \frac{\text{Entrapped drug}}{\text{Total added drug}} \right) * 100 \quad (1)$$

#### 2.2.3.2. Size

Laser granulometry was used to determine liposomal mean size by collecting particle-size distribution data.

#### 2.2.3.3. Morphological Characterization by Scanning Electron Microscopy

Liposomal suspensions were imaged using a scanning electron microscope (SEM) (quanta 200 FEI). Dry liposome was placed in the slats with magnification 10-50  $\mu$ m.

#### 2.2.3.4. Motility Analysis

Sperm motility characteristics were assessed using computer aided sperm analysis (CASA; (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0) to facilitate image capture and avoid spermatozoa cells over lapping, the sperm were diluted to achieve a concentration less than 40  $\times$  10<sup>6</sup> Spz/ml. Five (05)  $\mu$ l of each sperm samples was placed in a

Mackler® chamber (Sefi Instrument) previously heated (37°C) and examined with a phase-contrast microscope (Nikon E200®-LED microscope). Images were captured using a video camera (Camera Digital Basler A312fc) at magnification x10 (negative phase contrast).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Vitamin E loaded Liposome Modeling and Optimization

The influence of liposome formulation on loaded efficiency and particles size using 3 full factorial designs is exposed in Table 2. In the different experimental batches, vitamin E concentration (2mg/ml), ethanol volume (15 ml) and TRIS buffer volume (40 ml) were kept as constant.

#### 3.1.1. Statistical Analysis

The model quality provided by data analysis was estimated by two magnitudes: variability percentage ( $R^2$ ) and response variability percentage ( $Q^2$ ). Numerical results are given in Table 3.

**R2**: Variability percentage explained by the model response.

**Q2**: Response variability percentage that can be predicted by the model.

Variability percentage values explained by the model response (**R2**) and the response variability percentage that can be predicted by model (**Q2**) were found to be respectively 0.9977 and 0.7999, indicating good fit and good prediction model. Loaded efficiency values measured for the



Table 2. Liposome formulations optimization using 3 full factorial Design.

Batch	Variable Level in Coded Form		Variable Level in Actual Form		Response Variables	
	X1	X2	Phospholipids Amount	Cholesterol Amount	Loaded Efficiency (%)	Liposome Size (nm)
1	-1	-1	10	1.50	81.96	131
2	1	-1	50	1.50	39.85	40800
3	-1	0	10	5.75	55.62	243
4	0	0	30	5.75	35.87	28200
5	-1	1	10	10.00	62.48	151
6	0	1	30	10.00	40.59	550
7	1	1	50	10.00	19.34	22400
8	0	0	30	5.75	37.83	61500
9	0	0	30	5.75	37.83	61500

Table 3. Numerical values of the statistical analysis.

-	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Model Validity	Reproducibility
Loaded efficiency (%)	0.9977	0.7999	0.6532	0.9961
Liposome size (nm)	0.7391	-18.9726	0.7090	0.4491

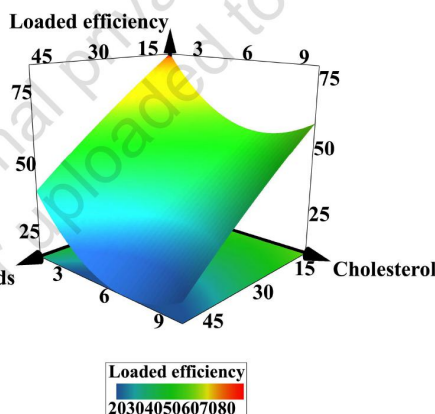


Fig. (2). Response surface plot of loaded efficiency.

different batches showed wide variation, (minimum of 19.34 % to a maximum of 81.96 %). Regarding liposome size, the R<sup>2</sup> values (0.7391) indicated good fit and the reproducibility (0.4491) was acceptable, however the value of Q<sup>2</sup> was negative indicating that this model is insignificant in predicting the liposome size.

Data were analyzed statistically by ANOVA. The polynomial factorial equation for the percentage of loaded efficiency was generated by multiple linear regressions.

$$\text{Loaded efficiency} = 36.8338 - 21.0544 \text{ phospholipid} - 10.2564 \text{ cholesterol} - 0.255975 \text{ phospholipid} \cdot \text{cholesterol} - 1.23604 \text{ phospholipid}^2 + 15.0527 \text{ cholesterol}^2 \quad (2)$$

The results clearly indicate that the loaded efficiency value is strongly affected by the variables selected for the

study. This is reflected by the wide range of values for terms coefficients of Eq. (2). Coefficients b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, and b<sub>22</sub> were found to be significant at P < 0.05, while the significance level of the coefficient b<sub>12</sub> and b<sub>11</sub> was found to be > 0.05. Thus, it appears that interaction term b<sub>12</sub> and b<sub>11</sub> does not contribute significantly to the prediction of loaded efficiency. The results revealed that increasing X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> values induces a decrease in the loaded efficiency. In summary, it was found that vitamin E loaded efficiency in liposomes depends on the lipid composition, phospholipids and cholesterol amount. In addition, mechanical stability and rigidity requirement were fulfilled by incorporating cholesterol [27]. A response surface plot reinforces these facts as shown in Fig. (2).

Polynomial factorial equation for liposome size generated by multiple linear regressions is (Eq. 3):

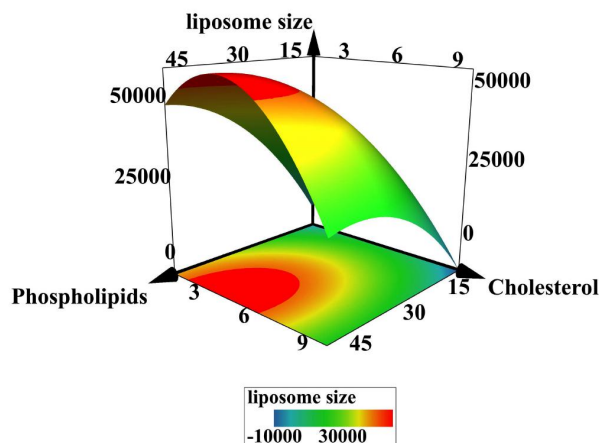


Fig. (3). Response surface plot of liposome size.

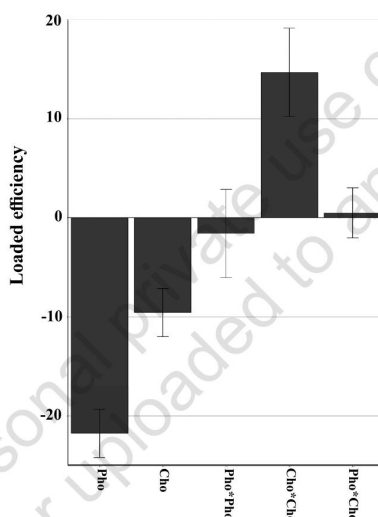


Fig. (4). Factors influencing on the loaded efficiency.

Liposome size = 45518.6 + 19390.6 phospholipids – 8256.05 cholesterol – 4605 phospholipid\*cholesterol -11240.8 phospholipid<sup>2</sup> - 22068.3 cholesterol<sup>2</sup> (3)

Among the independent variables selected and their interactions, only X<sub>1</sub> (phospholipids) presented positive values indicating a favorable effect on liposomes size. The coefficients b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>11</sub>, b<sub>12</sub>, and b<sub>22</sub> were found to be non-significant (P>0.05). This reveals that, increasing X<sub>1</sub> values enhances liposome size. Our results are in agreement with those reported in the literature. In fact; Princely and Dhana-raju, reported that the presence of lipid molecules in high amount induces the formation of larger size vesicles [28], a response surface plot is shown in Fig. (3).

### 3.1.2. Factors Effects

The effect of the independent variables and their interaction on the dependent variable is reported in Fig. (4) depicting the main effect of the independent variables and interactions with their relative significance on the loaded efficiency.

The positive and negative values indicate the impact of cholesterol and phospholipids weights. The fact that the results of phospholipids (Phs), cholesterol (CHL) and Phospholipids\*cholesterol are negative indicate that these terms influence vitamin E loaded efficiency negatively. This reinforces the results of equation 2 (polynomial factorial). This is in agreement with the observation of Baillie et al. [29], who reported that high cholesterol amount decreases the loaded efficiency. This result can be explained by the fact that VitE needs space at liposome bilayer level. Cholesterol decreases the fluidity or micro viscosity of the bilayers by filling empty spaces among the phospholipid's anchoring them more strongly into the structure [30]. Phospholipids are the most compounds of liposome, but their presence in a high amount affects negatively drug entrapment [13]. Liposome loaded VitE vesicle size was found to be in the range of 131 nm to 61500 nm. The impact of the phospholipids, represented in Fig. (5), indicates the favorable effect on liposome size as shown in Equation 3 where the coefficient of phospholipids was positive, this could be explained by the fact that phos-

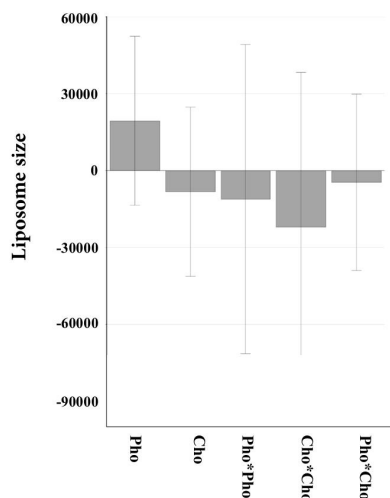


Fig. (5). Factors influencing on liposome size.

Table 4. Optimum and confirmed formulation values of loaded efficiency and liposome size for the vitamin E loaded in liposome preparation.

	Optimum values	Confirmed formulation values
Loaded efficiency (%)	78.47 ± 0.9%	79.17
Liposome size (nm)	99.86 ± 0.8%	99.05

pholipids are the basic component of liposome [31]. Cholesterol and Phospholipids\*cholesterol induced a negative effect, revealed through negative values for vesicle size. The negative effect of cholesterol could be related to the increase in liposome membrane rigidity forming consequently larger liposomes [27, 28].

### 3.2. Optimum Determination

The effect of the independent variables revealed values offering the optimum responses. It is evident from the polynomial equations (eq2 and eq3), plots (Figs. 4 and 5) that increasing cholesterol and phospholipids decreases loaded efficiency, and increases liposome size. Using a computer optimization process, we selected the values 1.6 mg/ml and 10.79 mg/ml for cholesterol and phospholipids, respectively, as optimum for the formulation of liposomes offering the highest loaded efficiency 78.47 % and the lowest liposome size 99.86 nm.

To validate the experimental design, a fresh formulation was prepared at the optimum levels of the independent variables, and evaluated for the responses. The loaded efficiency was determined by HPLC assay. Particles size was obtained using laser granulometry. The observed values of loaded efficiency and particles size were 79.17 % and 99.05 nm respectively, significantly close to those revealed in the theoretical investigation as shown in Table 4. Hence, the current model provided satisfactory prediction for liposome loaded vitamin E.

### 3.3. Optimal Liposome Solution Characterization

#### 3.3.1. Morphological Characterization by Scanning Electron Microscopy

Morphology of pure materials (phospholipids 90H, vitamin E and cholesterol) were determined using electron microscopy. Fig. (6) shows smooth porous surface for pure phospholipid 90H particles, barred forms for cholesterol, crystals and heterogeneous forms for vitamin E. The results revealed also that optimal liposomal formulation is more uniform and thinner than the blank liposome with well-identified spheres of unilamellar vesicles.

#### 3.3.2. Liposome Impact on Sperm Cryopreservation

To explore the real effect of the developed formulation, we studied the protection impact during cryopreservation of bovine sperm of vitamin E loaded in liposomes compared to vitamin E and cholesterol complex solubilized in cyclodextrins. Previously, several studies have shown the main cryoprotective effect of vitamin E and cholesterol cyclodextrin complexes in different animal species [7, 8, 32].

Data regarding the liposome-VitE effect compared to cyclodextrin-CHL and cyclodextrin-VitE on post-thaw bovine sperm are presented in Fig. (7).

The lowest values were observed in the control group without any supplementation and the highest values were observed when using liposome-VitE treatment. This is probably due to simultaneous effect of VitE and CHL against

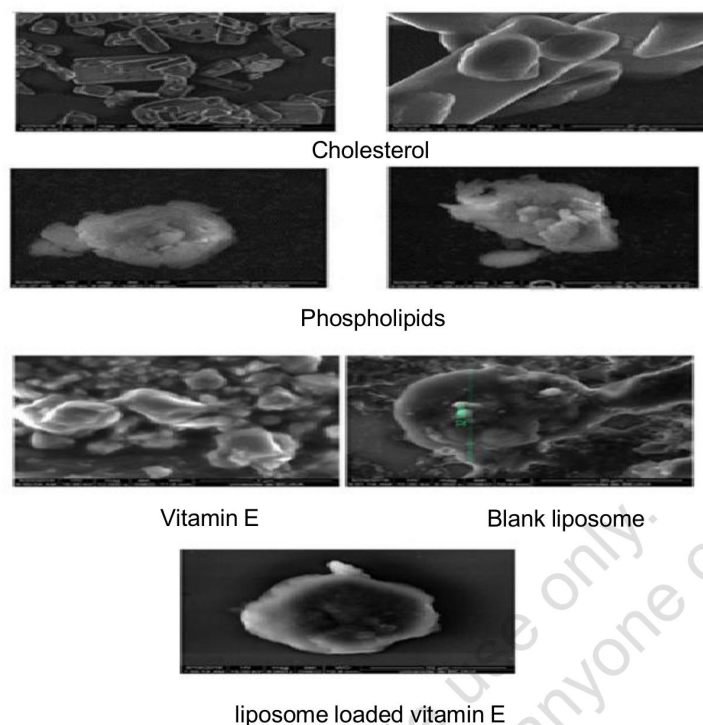


Fig. (6). SEM micrographs of pure materials (phospholipid 90H, vitamin E, and cholesterol), blank and optimum liposomal formulation.

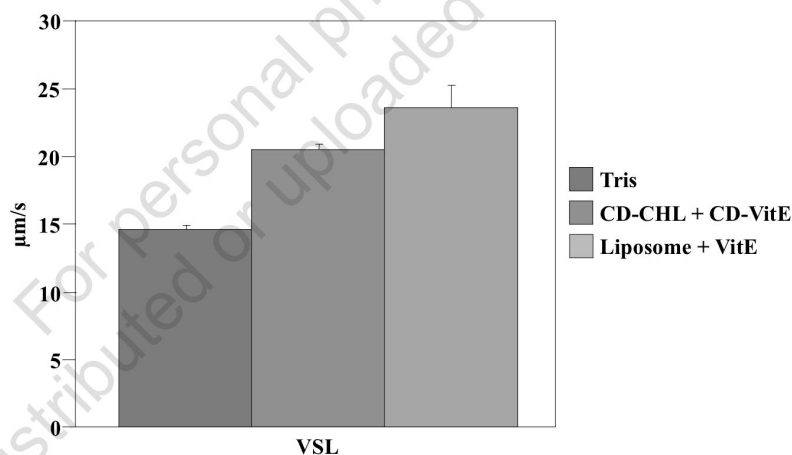


Fig. (7). Effect of Lip-VitE compared to CD-CHL-VitE on post-thaw bull sperm motility (VSL).

peroxidation and cold shock stress. This simultaneous effect is in agreement with the results of Khellouf et al., who reported that highest protection of bull semen was obtained when the solubilized cholesterol and vitamin E were used in association [32]. In addition, it is known that liposome structure (by lecithin presence) without any active molecule can protect spermatozoa against oxidation [33].

## CONCLUSION

In this study, we have investigated the interest of liposomes to enhance the solubility of vitamin E and their

impact on cryopreserved bovine sperm. The results of a  $3^2$  full factorial design revealed that the amount of cholesterol and phospholipids significantly affect the dependent variables, loaded efficiency and liposome size. Thus, it is concluded that by adopting a systematic formulation approach, optimum results can be reached in a short time with minimum efforts. The best loaded efficiency (78.47%) and liposome size (99.86 nm) was obtained when using: 10.9 mg/ml of phospholipid, 1.6 mg/ml of cholesterol and 2mg/ml of vitamin E. The theoretical results were strengthened by a real positive impact on sperm cells during cryopreservation.

The vitamin E loaded in liposome prepared in this study could be developed as promising formulation for sperm protection during cryopreservation. Future studies will evaluate the pharmacokinetics and bioavailability of the vitamin E loaded in liposomes as well as their efficacy to release the vitamin at an appropriate rate.

#### LIST OF ABBREVIATIONS

CASA	=	Computer Aided Sperm Analysis
CD	=	Cyclodextrin
CHL	=	Cholesterol
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
Lip	=	Liposome
Phs	=	Phospholipids
SEM	=	Scanning Electron Microscope
TRIS	=	(hydroxymethyl) aminomethane
VitE	=	Vitamin E

#### ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

#### HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used in the study that are the basis of this research.

#### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

#### AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

#### FUNDING

None.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank 'Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia' and 'Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University', for all the support provided.

#### REFERENCES

- [1] Duhem, N.; Danhier, F.; Pr at, V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release*, **2014**, *182*, 33-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.009> PMID: 24631865
- [2] Gonnet, M.; Lethuaut, L.; Boury, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release*, **2010**, *146*(3), 276-290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037> PMID: 20600399
- [3] Gagné, A.; Wei, S.Q.; Fraser, W.D.; Julien, P. Absorption, transport, and bioavailability of vitamin E and its role in pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, **2009**, *31*(3), 210-217. [http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34118-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34118-4) PMID: 19416566
- [4] Donnelly, E.T.; McClure, N.; Lewis, S.E.M. *The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa, mutagenesis*, **1999**. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/14.5.505>
- [5] Hezavehei, M.; Sharafi, M.; Kouchesfahani, H-M.; Henkel, R.; Agarwal, A.; Esmacili, V.; Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, **2018**, *37*(3), 327-339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012> PMID: 30143329
- [6] Jeong, Y-J.; Kim, M-K.; Song, H-J.; Kang, E-J.; Ock, S-A.; Kumar, B.M.; Balasubramanian, S.; Rho, G-J. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, **2009**, *58*(2), 181-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.12.004> PMID: 19141297
- [7] Belala, R.; Fatmi, S.; Kaidi, R.; Iguer-Ouada, M. Benefits of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Rev. Med. Vet.*, **2016**, *1*, 22-27.
- [8] Benhenia, K.; Rahab, H.; Smadi, M-A.; Benmakhlouf, H.; Lamara, A.; Idres, T.; Iguer-Ouada, M. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, **2018**, *195*, 266-273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.004> PMID: 29891254
- [9] Neunert, G.; Polewski, P.; Markiewicz, M.; Walejko, P.; Witkowski, S.; Polewski, K. Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods. *Bioophys. Chem.*, **2010**, *146*(2-3), 92-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2009.10.009> PMID: 19931243
- [10] Fatmi, S.; Bournine, L.; Iguer-Ouada, M.; Lahiani-Skiba, M.; Bouchal, F.; Skiba, M. Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000. *Acta Pol. Pharm.*, **2015**, *72*(1), 179-192. PMID: 25850214
- [11] Uhumwangho, M.; Okor, R. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *J. Med. Biomed. Res.*, **2009**, *4*.
- [12] Johnston, M-J-W.; Semple, S-C.; Klimuk, S-K.; Ansell, S.; Maurer, N.; Cullis, P-R. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrospingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768*(5), 1121-1127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2007.01.019> PMID: 17321495
- [13] Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. **2013**.
- [14] Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C. Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; and Fessi, H.; Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, **2012**, *1*, 147-168.
- [15] Sebaaly, C.; Jraij, A.; Fessi, H.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chem.*, **2015**, *178*, 52-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067> PMID: 25704683
- [16] Gilbert, S.C. Virus-like particles as vaccine adjuvants. *Mol. Biotechnol.*, **2001**, *19*(2), 169-177. <http://dx.doi.org/10.1385/MB:19:2:169> PMID: 11725486
- [17] Costa, R.; Santos, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technol.*, **2017**, *322*, 402-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086>
- [18] Koudelka, S.; Turanek Knotigova, P.; Masek, J.; Prochazka, L.; Lukac, R.; Miller, A.D.; Neuzil, J.; Turanek, J. Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. *J. Control. Release*, **2015**, *207*, 59-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.003> PMID: 25861728
- [19] Vijayakumar, M.R.; Vajanthri, K.Y.; Balavigneswaran, C.K.; Mahato, S.K.; Mishra, N.; Muthu, M.S.; Singh, S. Pharmacokinetics,

- biodistribution, in vitro cytotoxicity and biocompatibility of Vitamin E TPGS coated trans resveratrol liposomes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, *145*, 479-491.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurf.2016.05.037> PMID: 27236510
- [20] Laouini, A.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Holdich, R.G. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes - investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E. *RSC Adv.*, **2013**, *3*(15), 4985- 4994  
<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA23411H>.
- [21] Padamwar, M.N.; Pokharkar, V.B. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *320*(1-2), 37-44.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.001> PMID: 16707237
- [22] Ma, Q.H.; Kuang, Y.Z.; Hao, X.Z.; Gu, N. Preparation and characterization of tea polyphenols and vitamin E loaded nanoscale complex liposome. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2009**, *9*(2), 1379-1383.  
<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2009.C161> PMID: 19441529
- [23] Basiri, L.; Rajabzadeh, G.; Bostan, A. Physicochemical properties and release behavior of Span 60/Tween 60 niosomes as vehicle for  $\alpha$ -Tocopherol delivery. *LWT*, **2017**, *84*, 471-478.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.009>
- [24] Betz, N.E.; Hammond, M.S.; Multon, K.D. Reliability and Validity of Five-Level Response Continua for the Career Decision Self-Efficacy Scale. *J. Career Assess.*, **2005**, *13*, 131-149.  
<http://dx.doi.org/10.1177/1069072704273123>
- [25] Priyanka, K.; Sahu, P.L.; Singh, S. Optimization of processing parameters for the development of Ficus religiosa L. extract loaded solid lipid nanoparticles using central composite design and evaluation of antidiabetic efficacy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2018**, *43*, 94-102.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.08.006>
- [26] Kaur, G.; Mehta, S.K. Developments of polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *Int. J. Pharm.*, **2017**, *529*(1-2), 134-160.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059> PMID: 28642203
- [27] Patel, R.; Patel, H.; Baria, A. **2009**.
- [28] Princely, S.; Dhanaraju, Md. Design, formulation, and characterization of liposomal-encapsulated gel for transdermal delivery of fluconazole. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **2018**, *11*, 417.  
<http://dx.doi.org/10.22159/ajper.2018.v11i8.25621>
- [29] Baillie, A.J.; Florence, A.T.; Hume, L.R.; Muirhead, G.T.; Rogerson, A. The preparation and properties of niosomes--non-ionic surfactant vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, *37*(12), 863-868.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04990.x> PMID: 2868092
- [30] Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R-L.; Neves, N-M. *Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine*; J. R So, **2014**, p. 18.
- [31] Li, J.; Wang, X.; Zhang, T.; Wang, C.; Huang, Z.; Luo, X.; Deng, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.*, **2015**, *10*, 81-98.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- [32] Khellouf, A.; Benhenia, K.; Fatmi, S.; Iguer-Ouada, M. *The complementary effect of cholesterol and vitamin e preloaded in cyclodextrins on frozen bovine semen: motility parameters, membrane integrity and lipid peroxidation, cryoletters.*, **2018**.
- [33] Belala, R.; Delay, J.; Amirat, L.; Ropers, M-H.; Guillou, J.L.; Anton, M.; Schmitt, E.; Thorin, C.; Michaud, S.; Kaidi, R.; Tainturier, D.; Bencharif, D. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4°C. *Anim. Reprod. Sci.*, **2016**, *168*, 100-109.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.032> PMID: 26952759

For personal private use only  
 Not be distributed or uploaded to any website

### **Partie 3 : Un nouveau système liposomiale de vitamine E : Cinétique de libération, stabilité et protection spermatique lors de la cryoconservation.**

#### **Résumé**

Les liposomes sont des vésicules lipidiques auto-assemblées dont le diamètre varie de 50 à 250 nm et qui peuvent être formées à partir d'une large gamme de composés amphiphiles (les phospholipides, ayant une importance capitale en raison de leur biocompatibilité). Les attributs des liposomes sont influencés par leur taille, les propriétés de la phase aqueuse et la composition moléculaire, qui comprend l'organisation moléculaire latérale et transmembranaire, la perméabilité, la résistance mécanique et les propriétés de surface. Par conséquent, une large gamme de liposomes peut être formulée pour la recherche cela à de multiples applications. Les vésicules dont le diamètre est supérieur à 1  $\mu\text{m}$  sont utilisées comme un modèle pratique de membrane biologique pour déterminer les propriétés mécaniques ou topologiques [8]. Les liposomes d'un diamètre de 100 à 1000 nm ont une gamme d'applications beaucoup plus large. Les liposomes ont été largement considérés comme des mécanismes possibles d'administration de médicaments depuis que Bangham et ses collègues ont fait part de leurs découvertes.

Les liposomes ont suscité l'intérêt des chercheurs en tant que vecteurs de médicaments en raison de leur capacité à encapsuler des PAs hydrophiles dans leur compartiment aqueux intérieur et à incorporer des PAs hydrophobes dans la région hydrophobe de la bicouche (Kim et al., 2017). L'intégration de médicaments dans des liposomes améliorera leur faible solubilité aqueuse, leur entrée cellulaire restreinte, leur pharmacocinétique *in vivo* et leur diffusion tissulaire. Ces propriétés bénéfiques, associées à la biocompatibilité des phospholipides, font de la formulation à base de liposomes une méthode prometteuse pour disposer d'un type de dosage administrable qui augmente l'efficacité clinique des médicaments (Park et al., 2016). Cependant, la stabilité physique et chimique du liposome constitue la principale étape limitant l'utilisation de ce système polyvalent.

Dans les bicouches phospholipidiques, deux types de réactions de dégradation chimique peuvent affecter les performances des liposomes, l'hydrolyse des liaisons ester reliant les acides gras au squelette de glycérol et la peroxydation des chaînes acyles insaturées (si elles sont présentes). En outre, les processus physiques tels que l'agrégation/floculation et la

## **Etude expérimentale**

---

fusion/coalescence peuvent affecter la durée de conservation des liposomes en raison de la perte du médicament associé aux liposomes et des changements de taille. Par conséquent, le contrôle de leur stabilité physique et chimique devient une condition préalable importante pour l'utilisation efficace des liposomes comme vecteur de PAs médicamenteux.

Depuis la découverte des liposomes en 1964, la capacité des liposomes à servir de vecteurs d'administration de médicaments a été largement étudiée par diverses voies d'administration telles que la voie parentérale, orale, pulmonaire, nasale, oculaire et transdermique. Cependant, certains travaux dénotent l'intérêt des liposomes dans la défense des spermatozoïdes pendant le processus de cryoconservation.

En effet, la cryoconservation des spermatozoïdes peut entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Swami et al., 2017), qui sont une cause majeure de dommages des spermatozoïdes pendant la congélation et la décongélation et/ou la réfrigération (Zheng et al., 2017). Les ROS sont continuellement formées pendant la cryoconservation des spermatozoïdes à la suite du métabolisme aérobie et de la peroxydation lipidique (LPO), provoquant la mort des spermatozoïdes et des dommages sublétaux et affectant l'utilisation des spermatozoïdes après cryoconservation (Chatterjee et al., 2001). C'est ainsi, qu'il est recommandé d'ajouter aux milieux de conservation dit 'classiques' des antioxydants tels que la vitamine E afin d'atténuer les dommages causés par le mécanisme de congélation-décongélation. La vitamine E (Vit E) est un agent antioxydant liposoluble dont la principale activité biologique dans les membranes cellulaires est d'interrompre les réactions en chaîne de peroxydation des lipides. L'alpha-tocophérol est un antioxydant puissant; elle élimine les radicaux pyroxylés lipidiques en donnant de l'hydrogène à partir de leur groupe phénolique et est généralement considérée comme l'antioxydant liposoluble le plus efficace chez l'homme.

Cependant, à notre connaissance aucune étude ne rapporte :

- L'efficacité de la vitamine E piégée dans les liposomes associés aux milieux de cryoconservation spermatique,
- La cinétique de libération et la stabilité des liposome/VitE dans ce milieu.

Ainsi, le premier objectif fut d'étudier la libération de la vitamine E à partir de vésicules lipidiques, et le second d'étudier la stabilité de la préparation de liposomes. Et enfin, l'étude de l'impact des liposomes de vitamine E sur la cryoconservation du sperme animal.



## **Etude expérimentale**

---

Les liposomes préparés par la méthode d'injection d'éthanol ont été caractérisés pour des tests de stabilité de taille, de libération d'alpha tocophérol et de motilité des spermatozoïdes.

Le test de dissolution a montré que le liposome retient la vitamine E durant 24H probablement du fait de la rigidité de la paroi liposomiale qui a été renforcée par l'ajout de cholestérol, par suite il libère la totalité du PA retenu en 24h par diffusion fickienne probablement par création de mini-canaux du à l'agitation et la forte hydratation de la paroi. Aussi, les résultats ont démontré une stabilité physique et chimique durant 12 mois de conservation à 4°C.

De plus, la motilité du sperme conservé et traité avec des préparations de liposomes de vitamine E a été significativement améliorée par rapport à tous les autres traitements (y compris les milieux de conservation spermatique couramment utilisés).

Au final, Ces liposomes stables de vitamine E sont une alternative prometteuse pour la protection du sperme lors de la cryoconservation.

Cette troisième partie sera valorisée par un projet d'article de Recherche soumis à publication dans un journal de renommé « **Cryo Letters** ».

### Références

A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids," *Journal of Molecular Biology*, 13: 238–252(1965).

Amokrane, A., Kaidi, R., & Iguer-Ouada, M. The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (peg) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters*, 41: 19–25(2020).

Briuglia, Maria Lucia and Rotella, Chiara and McFarlane, Amber and Lamprou, Dimitrios Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 2190-393X (2015).

C. Caddeo, L. Pucci, M. Gabriele, C. Carbone, X. Fernández-Busquets, D. Valenti, D. Van Swaay, A. Demello, *Lab Chip*, 13 752–767 (2013).

G. Gregoriadis, A.T. Florence Liposomes in drug delivery Clin, *Diagn Ophthalmic Potential Drugs*, 45: 15-28(1993).

G. Gregoriadis, C. Swain, E. Wills, A. Tavill Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy *Lancet*, 303 :1313-1316(1974).

Giuseppina Bozzuto and Agnese Molinari, Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10: 975–999 (2015).

H. Bouvrais, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 15: 1–75 (2012).

İlhami Gulcin, Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94:651–715 (2020).

J.C. Mathai, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, M.L. Zeidel, *J. Gen. Physiol.*:131 69–76 (2008).

K. Makino, A. Shibata, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 4: 49–77 (2006).

Khellouf, A., Benhenia, K., Fatmi, S., & Iguer-Ouada, M. The complementary effect of cholesterol and vitamin E preloaded in Cyclodextrins on frozen bovine semen: Motility parameters. *Membrane Integrity and Lipid Peroxidation. CryoLetters*, 39:113–120 (2018).

KrishnaMuppidi, Andrew S. Pumerantz, Jeffrey Wang, and Guru Betageri ,Development and Stability Studies of Novel Liposomal Vancomycin Formulations, *ISRN Pharmaceutics Volume*, 8 (2012).

## **Etude expérimentale**

---

M. Przybyło, T. Borowik, M. Langner, *Liposomes Anal. Methodol.* 345–383 (2016).

Melissa Cutini, Carmine Bruno, Antonio Mancini, Giancarlo Balercia, *Antioxidants and Male Infertility, Male Infertility*, 535-54 (2020).

Muhammet Rasit Ugur, Amal Saber Abdelrahman, Holly C. Evans, Alicia A. Gilmore, Mustafa Hitit, Raden Iis Arifiantini, Bambang Purwantara, Abdullah Kaya, and Erdogan Memili. *Front Vet Sci. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm*, 6: 268 (2019).

N. Shimokawa, M. Nagata, M. Takagi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17: 20882–20888 (2015).

R. Dimova, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 208: 225–234 (2014).

R. Pons, A. Vassallo, A.M. Fadda, M. Manconi, *Int. J. Pharm.*, 538 40–47(2018).

Suvro Chatterjee, Claude Gagnon. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular reproduction and development*, 59:451-458 (2001).

Swami D.S., Kumar P., Malik P.K., Saini M., Kumar D., Jan M.H. Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. *Anim. Reprod. Sci.* 177:56–64 (2017).

Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Skiba, M., & Iguer-ouada, M. Alpha tocopherol loaded in liposome: Preparation, optimization, characterization and sperm motility protection. *Drug Delivery Letters*, 10: 228–236 (2020).

V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat Rev Drug Discov.* 4:145-160(2005).

**A new system vitamin E loaded in liposome: Drug release, Stability and efficiency in sperm cryoprotection.**

**Lamia Taouzinet 1,2\*, Sofiane Fatmi 1,2,3, Allaeddine Khellouf 2, Mohamed Skiba 3 and Mokrane Iguer-Ouada2**

1Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Technology Pharmaceutical Laboratory, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria;

2Faculty of Nature and Life Sciences, Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria;

3Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Blvd. Gambetta, 76183, Rouen, France

**Submitted**

### **A new system vitamin E loaded in liposome: Drug release, stability and efficiency in sperm cryoprotection.**

Lamia Taouzinet<sup>1,2\*</sup>, Sofiane Fatmi<sup>1,2,3</sup>, Allaeddine Khellouf<sup>2</sup>, Mohamed Skiba<sup>3</sup> and Mokrane Iguer-Ouada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Processes Engineering, Faculty of Technology, Technology Pharmaceutical Laboratory, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria;

<sup>2</sup>Faculty of Nature and Life Sciences, Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria;

<sup>3</sup>Technology Pharmaceutical and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Blvd. Gambetta, 76183, Rouen, France

#### **Abstract:**

It is known that a considerable number of drugs in clinical use or under development are water-insoluble drugs with poor bioavailability. The liposomal delivery system has drawn attention as one of the noteworthy approaches to increase both dissolution and absorption because of its biocompatibility and ability to encapsulate hydrophobic molecules in the lipid domain. However, several drawbacks have been reported, the most common is liposome structural instability. This study, aimed to encapsulate the alpha tocopherol into liposome and determine the new formulation stability and study drug-release of alpha tocopherol in sperm cryopreservation medium. The liposomes prepared by ethanol injection method were characterized for size stability, alpha tocopherol release and sperm motility tests. The results were appropriated for the preparation of unilamellar vesicles with both narrow size distribution (around 99 nm) and a good physical and chemical stability at 4 C° during 12 months. Also, drug-release study showed that liposome retains vitamin E for 24 hours, probably due to the rigidity of the liposomal fence which was reinforced by cholesterol addition. Then it releases all of the actives molecules in 48 hours by fickian diffusion probably by the creation of mini-ducts due to both agitation and fence hydration. Moreover, semen motility treated with vitamin E liposome preparations was significantly improved compared to all other treatments (including commonly used sperm conservation medium). Finally, stable vitamin E liposomes formulated in this work are a promising alternative for semen cryopreservation protection.

**Keywords:** liposome, sperm cryopreservation, alpha tocopherol, stability, drug release.

### **1. Introduction**

Liposomes are self-assembled lipid vesicles with diameters ranging from 50 nm to 250nm (1) that can be formed from a wide range of amphiphilic compounds, phospholipids in particular having a special position due to their biocompatibility (2). Liposomes attributes are influenced by their size, aqueous phase properties, and molecular composition, which include lateral and trans membrane molecular organization, permeability and mechanical toughness (3–6). As a result, a wide range of liposomes can be generated for researches with a wide range of applications (7). Vesicles with diameters greater than 1µm are used as a convenient model of biological membrane for determining mechanical or topological properties (8). Also, liposomes with a diameter of 100 to 1000 nm have a much wider range of applications. liposomes have been widely regarded as possible drug delivery mechanisms since Bangham and colleagues reported their findings (9).

Liposomes have piqued the interest of researchers as drug carriers due to their ability in encapsulating hydrophilic drugs within their interior aqueous compartment and incorporating hydrophobic drugs within the bilayer's hydrophobic region (10). Drug integration into liposomes will enhance their aqueous solubility, cellular entry and/or in vivo pharmacokinetics. These beneficial properties, together with the biocompatibility of phospholipids, render liposomal entrapment a promising method to drug clinical efficiency (11). However, the major rate-limiting step in the use of this versatile drug delivery system is its physical and chemical instability (1). In phospholipid bilayers two types of chemical degradation reactions can affect the performance of the liposomes, hydrolysis of the ester bonds linking the fatty acids to the glycerol backbone and the peroxidation of unsaturated acyl chains. Moreover, physical processes such as aggregation/flocculation and fusion/coalescence can affect the shelf life of liposomes due to both loss of liposome associated drug and change in size. Therefore, the control over their physical and chemical stability becomes an important prerequisite for the effective use of this drug carrier (12).

Since liposomes discovery in 1964 (9), the use of liposomes as drug delivery carriers has been extensively investigated through diverse administrative routes such as parenteral, oral, pulmonary, nasal, ocular, and transdermal (13–15). Also, some experiments indicate liposome use interest in sperm protection during the cryopreservation process.

Sperm cryopreservation can result in the production of reactive oxygen species (ROS) (16), which are a major cause of sperm damage during freezing and thawing process (17). ROS are

## **Etude expérimentale**

---

continuously formed during sperm cryopreservation resulting from aerobic metabolism and lipid peroxidation (LPO), causing sperm death and sublethal damage and affecting the usability of the thawed spermatozoa (18). As a result, supplementing extenders with antioxidants such as vitamin E has been suggested as a method of mitigating the harm caused by the freezing-thawing mechanism (19-21). Vitamin E (Vit E) is a fat-soluble antioxidant agent whose primary biological activity in cell membranes is to interrupt lipid peroxidation chain reactions (22). The Vit E scavenges lipid peroxy radicals by donating hydrogen from their phenolic group and is commonly regarded as one of the most effective lipid-soluble antioxidant in humans (23) .

However, to our knowledge there is no work reported in relation to both solubility and stability of vitamin E entrapped in liposomes in sperm cryopreservation media. We aimed in this work to both investigate vitamin E release from lipid vesicles, and to study the liposome preparation stability (physical and chemical) in sperm cryopreservation media. In addition, the effectiveness of vitamin E filled liposomes on sperm cryopreservation was investigated.

## **2. Materiel and method**

### **2.1. Material**

Alpha-tocopherol (vitamin E) was purchased from SIGMA-ALDRICH, T3634, lot#SLBJ1634,PCODE: 1002263195, CAS: 59-02-9.

Cholesterol was purchased from SIGMA-ALDRICH, C8503, lot #SLBR0583V. PCODE: 1002334996.CAS: 57-88-5.

Saturated phospholipids were purchased from RHONE POULENC (Phospholipon 90H lot: 90060).

Fructose was purchased from SIGMA-ALDRICH, F0127, lot#SLBM7710V, PCODE: 101675782, CAS: 57-48-7.

TRIS (hydroxymethyl) aminomethane, SIGMA ALDRICH, T6066, lot #SLBS9646, PCODE: 101860987, CAS: 77-86-1.

Ethanol and methanol HPLC grade was purchased from Biochem, PCode: 205042500, 64-17-5.

Polyethylene glycol 6000 was purchased from Biochem.

Permethyl beta Cyclodextrin, SIGMA ALDRICH, Germany

## **Etude expérimentale**

---

### **2.2. Method**

#### **2.2.1. Buffer TRIS preparation**

Buffer TRIS solution was prepared by dissolving 2.5 g acetic acid, 1.8 g fructose, 4.35 g TRIS and 0.2 g penicillin in 180 ml of distilled water.

#### **2.2.2. Nano systems preparation**

**Cyclodextrin/ Vitamin E and Cyclodextrin/ Cholesterol:** Cyclodextrin with cholesterol or vitamin E were dissolved in 75 ml of ethanol. The resultant mixture was maintained under stirring for 24 h at room temperature and shielded from light. The solvent was then evaporated under vacuum at 40°C by rotary evaporation and the residue was kept in a desiccator until used (24).

**PEG 6000/ Vitamin E dispersion :** Polyethylene glycol 6000 and vitamin E were dissolved in ethanol by agitation, the solvent was then evaporated under vacuum at 40°C by rotary evaporation and the residue was kept in a desiccator until used (24).

**Liposome/ Vitamin E:** Liposomes were prepared by ethanol-injection method (25). 10.9 mg/ml of Phospholipid 90H, 1.6 mg/ml cholesterol and 2mg/ml vitamin E were dissolved in 15ml of absolute ethanol. The resulting organic phase was injected into 40 ml of aqueous phase under magnetic. Then, ethanol was removed by rotary evaporation under reduced pressure and spontaneous liposomes were formed (21).

#### **2.2.3. In Vitro Release Studies**

In vitro release tests of liposome Vit E were carried out by the dialysis method. In this study, 1 ml of liposome solution was placed in a dialysis bag (Spectra/Por 4, molecular cut-off 12–14 kD, California, CA, USA), which was previously rinsed and soaked for 30 min. Both borders were sealed with a dialysis clip. The device was then incubated in 50 ml of dialysis solution. This solution was composed by 25% ethanol and 0.5% Tween80 (v/v) in a phosphate buffer pH 7.4. The dialysis bags were stirred. At predetermined intervals of 0 h, 1 h, 2 h, 24 h, and 48 h, 500 µl was taken. Quantification was performed with a HPLC at 208 nm. The results were expressed as the percentage of VitE released from liposomes using the following equation:

$$\% \text{ Vit E released} = ([\text{VitE}]_i - [\text{VitE}]_t) / [\text{VitE}]_i * 100$$

Where: VitE<sub>i</sub> is the initial concentration of Vit E in the dialysis bag, and Vit E<sub>t</sub> is the concentration of Vit E in the dialysis bag at time t. From the experimental data, four model-dependent approaches were used to compare the Vit E dissolution profiles. The model-



## **Etude expérimentale**

---

dependent approaches included the zero-order, the first-order, the Higuchi, and the Korsmeyer-Peppas models.

### **2.2.4 Stability Study**

Both liposome and Vit E stability (into the lipid bilayer) were studied. The physicochemical parameters that were evaluated included the vesicle size and encapsulation efficiency. The study was carried out for 12 months. The vesicle size and loaded efficiency were evaluated using a granulometre laser and HPLC, respectively.

**Loading efficiency determination:** Vitamin E concentration in liposome formulations was determined by HPLC system, which consisted of LPG 3400 pumps, ACC 3000 auto sampler and VWD 3400 RS variable wavelength detectors. Chromatographic separation was achieved on a C-18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) HPLC column. Methanol grade HPLC acetonitrile water (68:28:4) (v:v:v) was used as mobile phase at isocratic flow-rate of 1.5 ml/min.

Standard preparation: Standard solution was prepared by dissolving vit E in methanol.

Samples preparation: Liposomal solutions aliquots were centrifuged at 15.000 rpm for 2 h at 4 C°. The aliquots were filtered through 0.45µm membrane and quantified by HPLC. Loaded ratio was calculated using equation 1 (21).

$$\text{Loaded efficiency} = (\text{Entrapped drug} / \text{Total added drug}) * 100$$

### **2.2.5 Epididymal semen collection**

The sperm collection was performed by the retrograde flushing method as previously described by Martinez-Pastor F et al., (2006) (26). Briefly, the epididymis were separated from the testis and cleaned. Both cauda and vas deferens were isolated from the whole epididymis. Cauda epididymis blood vessels were cut and the surface area of the cauda was rinsed and wiped. Sperm was recovered by applying pressure from the vas deferens generated manually from a syringe containing air and 1 ml of extender. Sperm emerged from a cut made in the distal cauda near the junction with the corpus.

### **2.2.6 Motility analysis**

A Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain) was used to evaluate sperm motility parameters. To facilitate image capture and avoid overlapping of spermatozoa cells, the sperm were diluted to achieve a concentration less than  $40 \times 10^6$  Spz/ml. Five (5) µl of each sperm samples were examined with a phase-contrast microscope (Nikon E200®-LED microscope, Japan). Images were captured

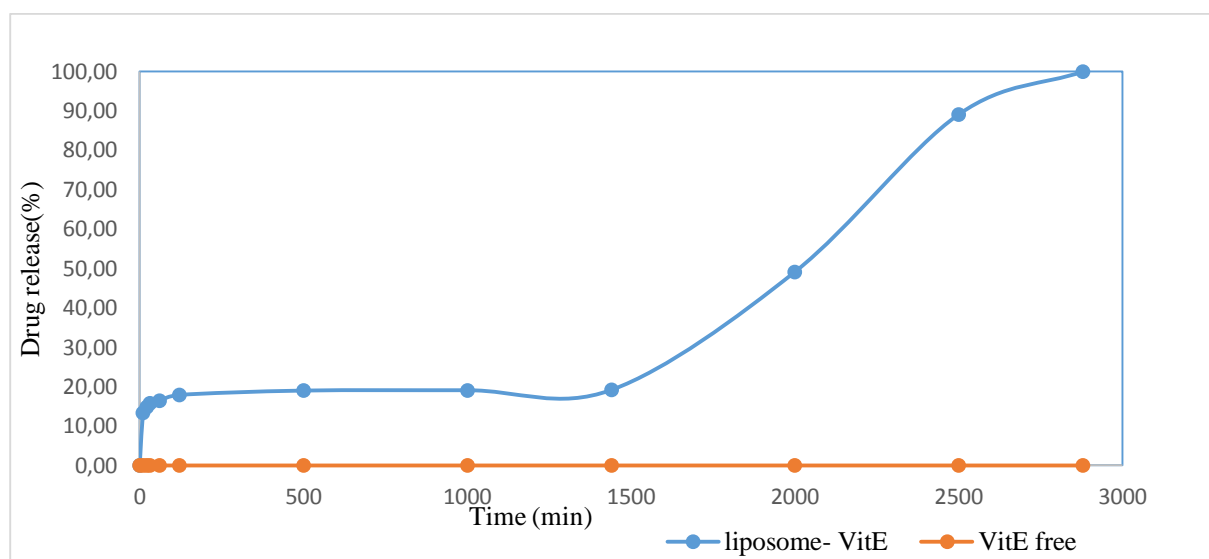
## Etude expérimentale

using a video camera (Caméra Digital Basler A312fc, Germany) at magnification x10 (negative phase contrast). The sperm motility parameters measured by CASA were total motility (%), progressive motility (%), curvilinear velocity (VCL  $\mu\text{m/s}$ ), straight linear velocity (VSL  $\mu\text{m/s}$ ) and average path velocity (VAP  $\mu\text{m/s}$ ) (27).

### 3. Results and discussion

#### 3.1 In Vitro Release Studies

Lipid composition of liposome bilayer is known to be a key factor in its permeability. When loaded, this parameter is directly related with drug release. VitE release profiles in cryopreservation medium (vit E alone and loaded in liposome) are presented in Figures 1.



**Figure 1:** Release profiles of Vit E alone and Vit E loaded in liposome.

Vitamin E alone presents limited dissolution (no solubility in cryopreservation medium). The liposome sample showed a biphasic release profile.

In the first part: 0 to 24 H, a fast release of the vitamin E was obtained, stabilizing over time (for 24 hours) at around of 19 %. This may be due to the release of only free drug and the drug that was adsorbed on the surface of liposome (by weak binding force), this is known as burst effect (28). Miao et al reported in their study preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin that the release of rapamycin encapsulated in liposomes is discrete by two phases one due to the burst effect (presence of active ingredient on the liposome surface) (28).

## Etude expérimentale

---

In the second part: 24-48 H, the dissolution of Vit E improved considerably to reach 99% at 48 hours, this is probably due to the trapping of Vit E in the liposomal bilayer and its release by diffusion to the outside the liposome first, then outside the dialysis bag. Indeed, in the literature several works refer to the controlled release of drugs by trapping in liposomes (29,30). Xing et al. (2016) in his work Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications have also described this phenomenon (31). In addition, the rigidity of the membrane due to the presence of cholesterol surely participated in slowing the release of Vit E (32).

Moreover, the drug release kinetic was studied. Many different models exist for describing drug release, some of them can be applied to nano formulations, such as Korsmeyer-Peppas and Higuchi, etc (33,34). In our case, four different fitting models were performed: the Korsmeyer-Peppas model, Higuchi model, first-order kinetic model, and zero order. From the R<sup>2</sup> values presented in Table 1, it can be deduced that the Korsmeyer-Peppas model was the most accurate one. This model was already described for nanoparticles (35-37). In addition, kinetic parameters corresponding to this model were extracted, specifically the release rate constant (K) and the release exponent (n). The n values that were obtained corresponded to a Fickian diffusion behavior. This result confirms that the release of vit E through the bilayer and the dialysis bag follows release by diffusion, commended by the concentration gradient.

**Table 1:** Drug release kinetic data obtained from fitting drug release experimental data by various mathematical models (liposome/VitE).

Model	Zero order	First order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
<b>k</b>	0,002	0,002	0,014	0,029
<b>Parameters</b>				
<b>n</b>				0,4
<b>R<sup>2</sup></b>	0,782	0,718	0,598	0,791

### 3.2 Stability study

#### 3.2.1. Physical stability

During the formulation design and development process, stability is a critical factor to consider. The aggregation or fusion of unstable liposomes during formulation processing and/or long-term storage can cause physical instability of liposomal formulations. As a result,

## **Etude expérimentale**

---

the most important part of producing pharmaceutical drugs is preparing liposomes in small and uniform sizes.

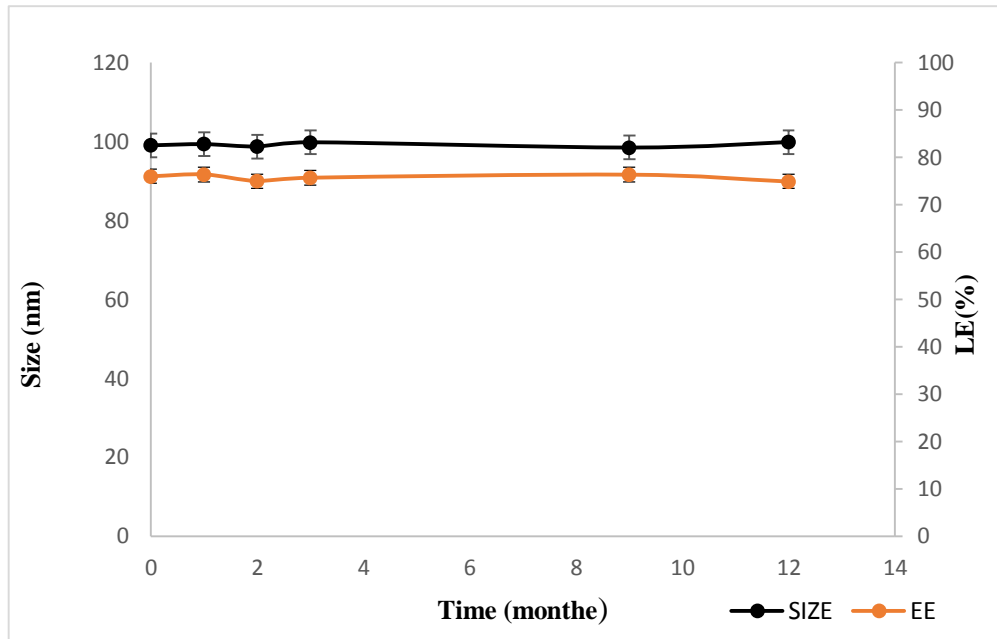
In this work, the liposome loaded Vit E was prepared with saturated phospholipids 90H and cholesterol and was kept at 4°C and shielded from direct lighting.

The particle size (Figure 1) was stable during 12 months of storage at 4°C (around 99 nm). In this duration, there was no noticeable difference in particle size, meaning that there was no aggregation or fusion. In general, liposomes containing saturated phospholipids showed increased stability and high transition temperature compared to liposomes composed of unsaturated phospholipids. In addition, numerous experiments on cholesterol use as a stabilizer have been performed, demonstrating that this steroid can increase phospholipid molecule packing (38), decrease bilayer permeability to non-electrolyte and electrolyte solutes (39), enhance vesicle resistance to aggregation (40) and adjust the fluidity of intravesicular connections to make them more rigid and maintain in severe lipid bilayer shear stress (41).

### **3.2.2. Chemical stability**

One of the main impediments to the widespread use of liposomes as a medicinal commodity is their chemical stability (42). Liposomes encapsulated medications have a number of storage issues, including phospholipids' hydrolysis and encapsulated drug decomposition (43). Hydrolysis of the ester bonds connecting the fatty acids to the glycerol backbone and peroxidation of unsaturated acyl chains maybe the cause of certain chemical degradation (44). Figure 2 depicts the chemical stability of Vit E loaded in liposomes over 12 month period at 4°C.

It was found that Vit E loaded in liposomes was stable with no degradation of vitamin E, suggesting effective protection of vitamin E by liposome bilayer. Similar findings were also recorded by Badenset al (45).



**Figure 2:** Physical (liposomes size) and chemical (LE %) stability of Vit E loaded in liposomes at 4 C° during 12 months.

### 3.3 Motility analysis

Sperm resistance to the cryodamages depends on the structure and the antioxidative power of its cell membrane. In order to improve post-thawed sperm quality, freezing extenders have been supplemented with different treatments including the addition of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol with different encapsulation systems (Cyclodextrin, polyethylene glycol (PEG 6000) or liposome).

In Figure 03 are mentioned the results for sperm motility parameters after cryopreservation. As can be seen, the VSL, VCL, and VAP were significantly increased by the different treatments in comparison with the control group ( $P < 0.05$ ). Liposome loaded vitamin E followed by PEG (Vit E-CHL) had the highest significant effect ( $P < 0.05$ ) on all the studied motility parameters after 48h of chilling. The supplementation of vitamin E or cholesterol, individually, show an improvement of motility parameters compared to control. However, their combination exhibited a more efficient performance, this result is in accordance with the previous studies reporting the same positive effects of cholesterol and  $\alpha$ -t ocopherol (association) appeared to be effective in preserving the post thawing motility(46,19).

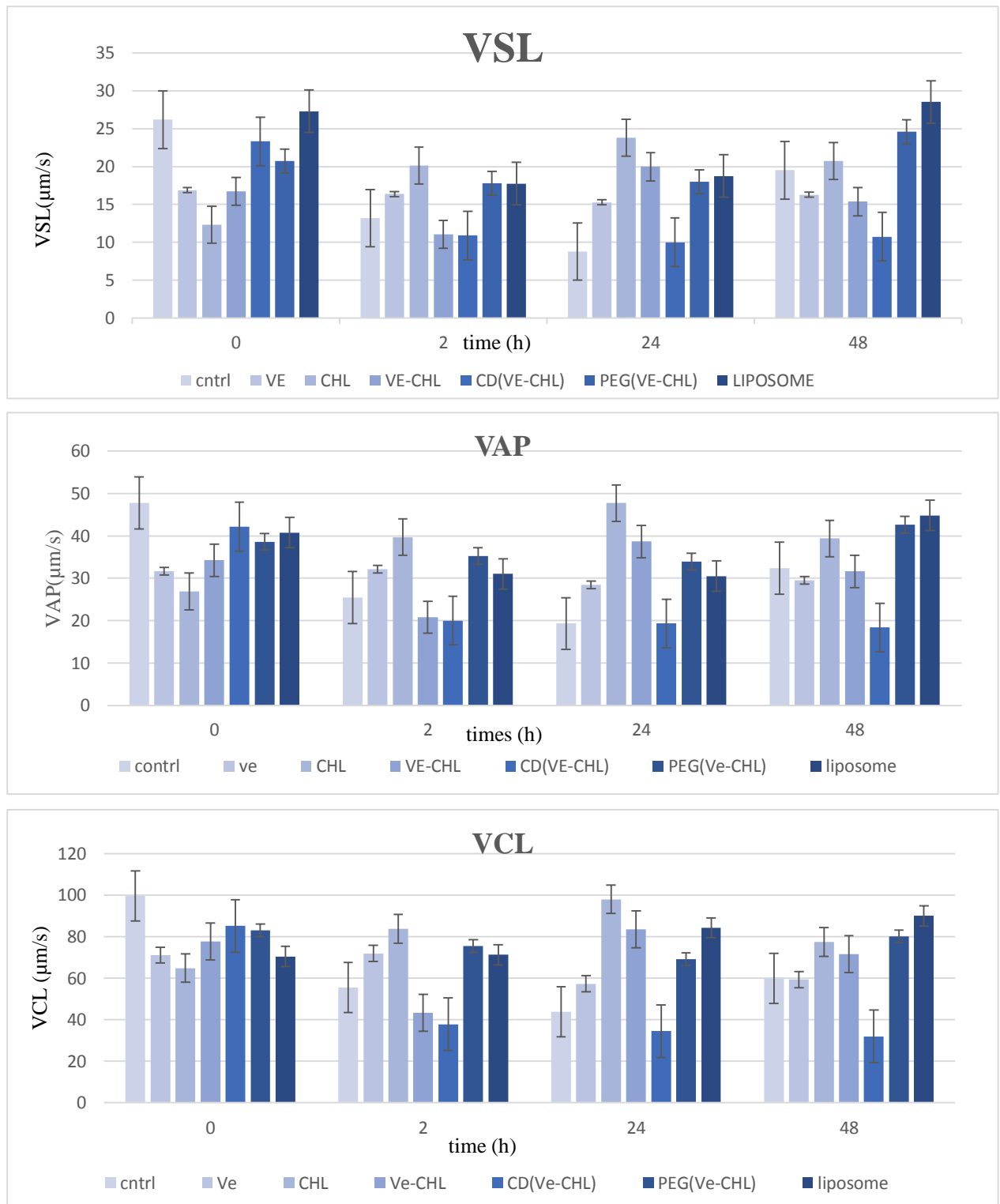
In this study, vitamin E loaded in liposome effect on spermatozoa survival after chilling has been investigated.

## **Etude expérimentale**

---

The results show that the best sperm protection effect is obtained when using liposome vitamin E during 48h of chilling, it is due to the simultaneous effect of vitamin E and cholesterol (antioxidants protection) and also to the interactions between liposomes and cells likely facilitate lipid and cholesterol transfer causing rearrangement of cell membrane components affecting cryostability of the cells. In addition, it was demonstrated that liposomes can be loaded with lipid-related content (such as lecithin or cholesterol) (47) to improve the plasma membrane regeneration efficacy during the freeze-thaw process of ram spermatozoa. Also, Liposomes were used as cryoprotectant additives in several animal species including equine (48,49), buffalo (50), ovine (51-53), porcine (54), and bovine (55) with reported improvement in fertility after artificial insemination (56). Finally, it has been reported that liposomes with their contents of phospholipids saturated and unsaturated fatty acids can fuse with the sperm plasma membrane and abate the damage to spermatozoa caused by the freeze–thaw process (57, 58).

## Etude expérimentale



**Figure 3:** Mean ( $\pm$ S.E.M) of curvilinear velocity (VCL), straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), after semen cryopreservation in the control group (Cntrl), free VitE, CHL, (CD- Vit E- CHL), (PEG 6000-Vit E-CHL), and VitE loaded in liposome.

### **4. Conclusion**

To our knowledge, there is no work reported in relation to both solubility and stability of vitamin E entrapped in liposomes in sperm cryopreservation media. This is why we aimed to both investigate vitamin E release from lipid vesicles and to study the liposome preparation stability (physical and chemical) in sperm cryopreservation media. In addition, the effectiveness of vitamin E filled liposomes on sperm cryopreservation was investigated.

The carried out liposomal formulation of vitamin E using ethanol injection technique presented stable particle size distribution during 12 months of storage at 4°C (around 99 nm) with effective protection of vitamin E from degradation or alteration.

The dissolution of Vit E improved considerably in aqueous cryopreservation media to reach 99 % at 48 hours. The study of release kinetic showed that dissolution of vitamin E from liposome was by Fickian diffusion.

Finally, vitamin E loaded in liposome was demonstrated to be effective in the cryopreservation sperm process.

These findings demonstrated that liposome is an interesting and promising approach to increase Vit E solubility and cell penetration into cryopreservation medium and enhancing sperm protection in the cryopreservation process.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank ‘Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Faculty of Nature and Life Sciences’ and ‘Technology Pharmaceutical Laboratory, Department of Processes Engineering, Faculty of Technology’ University of Bejaia and Bio pharmaceuticals Laboratory, UFR Medicine and Pharmacy, Rouen University’, for all the support provided. The authorsthan Direction Générale de la Recherche Scientifique et Développement Technologique, Algeria.



### Reference

1. Van Swaay D, Demello A, Lab Chip 13 (2013) 752–767.
2. Caddeo C, Pucci L, Gabriele M, Carbone C, Fernández-Busquets X, Valenti D, Pons R, Vassallo A, Fadda A.M, Manconi M, (2018) Int. J. Pharm 538, 40–47.
3. Shimokawa N, Nagata M, Takagi, M Phys, (2015) Chem. Chem. Phys 17, 20882–20888.
4. Mathai J.C, Tristram-Nagle S, Nagle J.F, Zeidel M.L (2008), J. Gen. Physiol 131 ,69–76.
5. Dimova R, (2014) Adv. Colloid Interf. Sci. 208 , 225–234.
6. Makino K, Shibata A, (2006) Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes 4,49–77.
7. Przybyło M, Borowik T, Langner M, (2016) Liposomes Anal. Methodol ,345–383.
8. Bouvrais H, (2012) Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes 15,1–75.
9. Bangham A. D, Standish M. M, and Watkins J. C , (1965) J of Molecular Biology 13, 238–252.
- 10 Krishna Muppidi, Andrew S. Pumerantz, Jeffrey Wang, and Guru Betageri , (2012) ISRN Pharmaceutics, 8
- 11 Giuseppina Bozzuto and Agnese Molinari, (2015) .Int J Nanomedicine. 10, 975–999
- 12 Briuglia, Maria Lucia and Rotella, Chiara and McFarlane, Amber and Lamprou, Dimitrios (2015). Drug Delivery and Translational Research, 2190-393X
13. Torchilin V.P, (2005) Nat Rev Drug Discov 4 ,145-160
14. Gregoriadis G, Swain C, Wills E, THE LANCET, (1974) 303 ,1313-1316.
15. Gregoriadis G, Florence A.T, (1993), Clin, Diagn Ophthalmic Potential Drugs 45, 15-28.
- 16 Swami D.S., Kumar P., Malik P.K., Saini M., Kumar D., Jan M.H, (2017) Anim. Reprod. Sci. 177, 56–64.
- 17 Muhammet Rasit Ugur, Amal Saber Abdelrahman, Holly C. Evans, Alicia A. Gilmore, Mustafa Hitit, Raden Iis Arifiantini, Bambang Purwantara, Abdullah Kaya, and Erdogan Memili , (2019) Front Vet Sci 6, 268.
- 18 Suvro Chatterjee, Claude Gagnon, (2001) Molecular reproduction and development 59,451-458
19. Khellouf A, Benhenia K, Fatmi S, & Iguer-Ouada M, (2018). CryoLetters 39, 113–120.
20. Amokrane A, Kaidi R, & Iguer-Ouada M. (2020) CryoLetters 41, 19–25.
21. Taouzinet L, Fatmi S, Khellouf A, Skiba M, & Iguer-ouada M, (2020), Drug Delivery Letters 10, 228–236.
22. Melissa Cutini, Carmine Bruno ,Antonio Mancini, Giancarlo Balercia, (2020) Male Infertility 535-54

## **Etude expérimentale**

---

23. İlhami Gulcin, (2020) *Archives of Toxicology* 94,651–715
24. Fatmi S, Bournine L, Iguer-Ouada M, Lahiani M, Bouchal F, Skiba M, (2015) *Acta Pol Pharm* 72, 179-92.
25. Sebaaly C, Jraij, H. Fessi A, Charcosset C, Greige-Gerges H (2015), *Food Chemistry* 178, 52-62.
26. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraiez P, de Paz P & Anel L (2006) *Theriogenology* 65, 471-485.
27. Mortimer ST (2000) *Journal of Andrology* 21, 515–524.
28. Zhi-Lin Miao, Ying-Jie Deng, Hong-Yang Du, Xu-Bin Suo, Xiao-Yu Wang, Xiao Wang, Li Wang, Li-Jie Cui and Na Duan, (2015) *Experimental and Therapeutic Medicine* 9, 941-946.
29. Xiaoming Xu Diane J. Burgess, (2011) *Long Acting Injections and Implants* 195-220.
30. Ana-María Fernández-Romero, Francesca Maestrelli, Paola Angela Mura, Antonio María Rabasco, and María Luisa González-Rodríguez, (2018), *Pharmaceutics* 10, 256.
31. Xing H, Hwang K, Lu Y, (2016), *Theranostics* 9, 1336-52.
32. Maria-Lucia Briuglia & Chiara Rotella & Amber McFarlane & Dimitrios A. Lamprou, (2015) *Drug Deliv. and Transl. Res* 5, 231–242.
33. Jain A, Jain S.K, (2016) *Chem. Phys. Lipids* 201, 28–40.
34. Costa P.; Lobo J.M.S, (2001) *Eur. J. Pharm. Sci* 13, 123–133.
35. Dhanasekaran S, Rameshthangam P, Venkatesan S, Singh S.K, Vijayan S.R, (2018) *J. Polym. Environ* 26, 4095–4113.
36. Singh R.P, Gangadharappa H.V, Mruthunjaya K, (2018) *European Eur. J. Pharm. Sci* 122, 214–229.
37. Petrović, S.; Tačić, A.; Savić, S.; Nikolić, V.; Nikolić, L.; Savić, S, (2017) *Saudi Pharm. J* 25, 1194–1200.
38. Demel RA, De Kruffyff B, (1976) *BiochimBiophysActa* 457, 109–132.
39. Papahadjopoulos D, Jacobson K, Nir S, Isac, (1973), *BiochimBiophys* 311,330–48.
40. Virden JW, Berg JC, (1992) *Langmuir* 8,1532-1537.
41. Liu DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP, (2000) *Colloids Surfaces* 172, 57-67.
42. Park SJ, Choi SG, Davaa E, Park JS, (2011) *Int J Pharm* 415, 267–272
43. Lee MK, Choi L, Kim MH, Kim CK, (1999) *Int J Pharm* 2, 87–93.
44. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, 2003, Benoit JP, *Biomaterials* 24,4283–4300.
45. Badens E, Magnan C, Charbit G, (2000) *Biotechnol Bioeng* 2, 194–204.
46. Belala R, Fatmi S, Kaidi R, Iguer-ouada M, (2016) *Revue Méd. Vét* 167, 22-27.

## **Etude expérimentale**

---

47. Mehdipour M, Daghigh Kia H, Nazari M, Najafi A, (2017) *Cryobiology* 78, 34–40
48. Medina-León A.Z, Domínguez-Mancera B, Cazalez-Penino N, Cervantes-Acosta P, Jácome-Sosa E, Romero-Salas D, Barrientos-Morales M. (2019) *Aust. J. Vet. Sci* 51, 119–123.
49. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, (2012) *Theriogenology* 77, 268–279.
50. Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara A.K, Yadav S.P, Singh P, Yadav P.S. (2015) *Anim. Reprod. Sci* 159, 38–45.
51. Mortazavi S.-H, Eslami M, Farrokhi-Ardabili F, (2020) *Anim. Reprod. Sci* 219, 106533.
52. Mafolo K.S, Pilane C.M, Chitura T, Nedambale T.L, (2020) *S. Afr. J. Anim. Sci* 50, 389–396.
53. Luna-Orozco J.R, Gonzalez-Ramos M.A, Calderon-Leyva G, Gaytan-Aleman L.R, Arellano-Rodriguez F, Angel-Garcia O, Veliz-Deras F.G, (2019) *Iran. J. Vet. Res* 20, 126–130.
54. He L, Bailey J.L, Buhr M.M. (2001) Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential. *Biol. Reprod.*, 64, 69–79.
55. Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers W.F, (2011) *Theriogenology* 76, 1465–1472.
56. Sullivan R, Saez F, (2013), *Reproduction* 146, R21–R35.
57. Köse G.T, Arica M.Y, Hasirci V, (1998) *Drug Deliv.* 5, 257–264.
58. Purdy P.H, Graham J.K, (2015) *Protoc* 1257, 337–342.

# **Discussion générale**

## Discussion générale

---

L'objectif de ce travail de recherche consiste à mettre au point un nouveau système de vecteur encapsulant la vitamine E destinée à une application en cryobiologie, particulièrement dans la cryoconservation des spermatozoïdes. La vitamine E est un antioxydant qui peut être utilisé pour lutter contre les effets secondaires de la cryoconservation du sperme tel que le stress oxydatif et le choc thermique. La vitamine E est connue par son caractère hydrophobe qui ne lui permet pas d'atteindre une concentration efficace au niveau des cellules. L'encapsulation de la vitamine E dans des vecteurs devrait donc permettre d'améliorer sa solubilité et même son efficacité thérapeutique.

### **1. Optimisation de la solution liposomiale chargée en vitamine E**

La préparation de liposome avec un taux d'encapsulation relativement élevée et une taille définie est un objectif important pour la poursuite du développement des liposomes en tant que systèmes de vectorisation.

Dans notre étude, la formulation des préparations liposomiales chargées en VitE a été optimisée en utilisant un plan factoriel complet, en considérant les quantités de cholestérol et de phospholipides comme facteurs et la taille des liposomes ainsi que le taux d'encapsulation comme réponses. C'est ainsi, que nous avons obtenu la matrice d'expérience à 12 essais (Tableau 1).

## Discussion générale

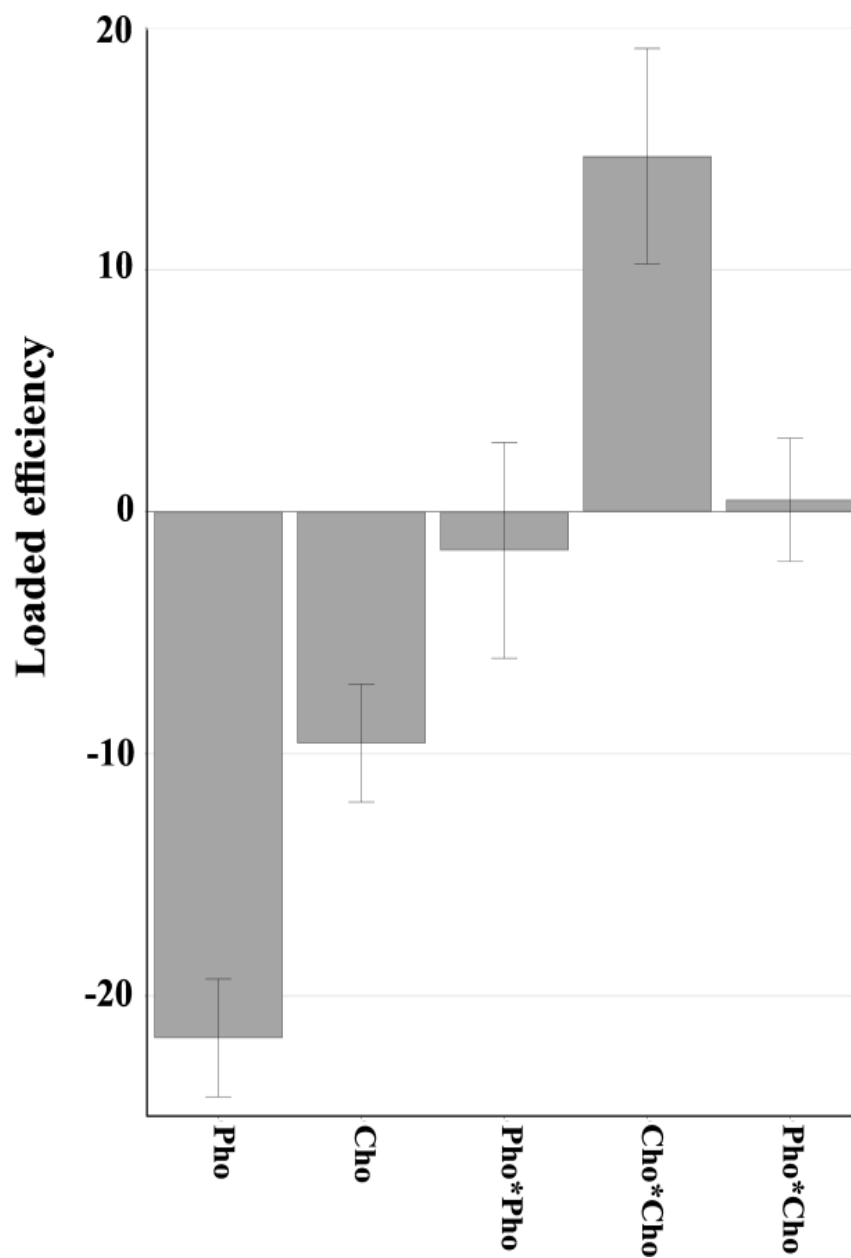
---

**Tableau 1:** Matrice d'essai.

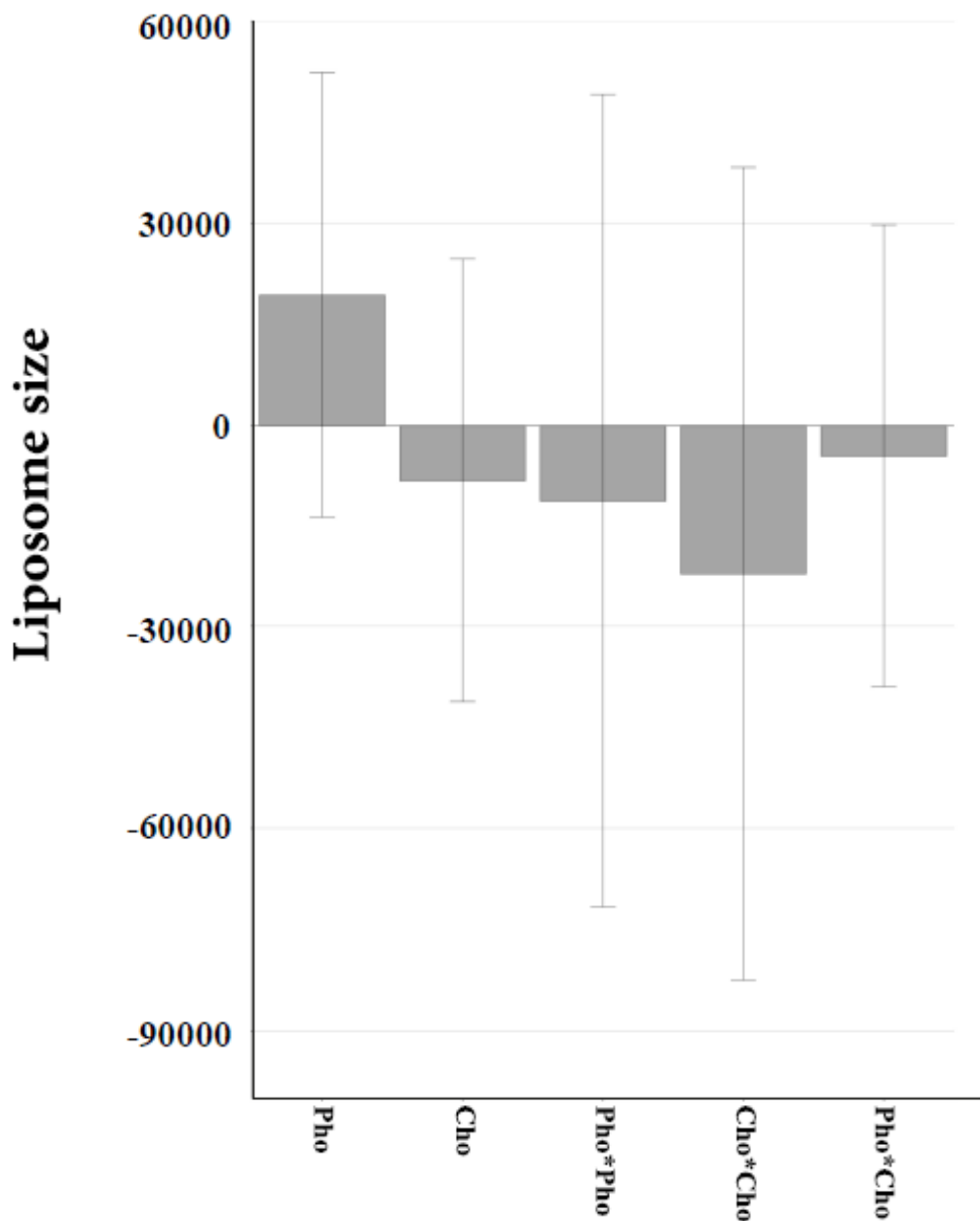
Essai	Phospholipids (mg/ml)	Cholestérol (mg/ml)
1	10,00	1,50
2	50,00	1,50
3	10,00	5,75
4	30,00	5,75
5	10,00	10,00
6	30,00	10,00
7	50,00	10,00
8	30,00	5,75
9	30,00	5,75
11	30,00	1,50
12	50,00	5,75

Les résultats obtenus montrent que le taux d'encapsulation de la vitamine E dépend de la composition des lipides, des phospholipides et de la quantité du cholestérol. De plus, les exigences de la stabilité mécanique et de rigidité des liposomes ont été remplies en ajoutant du cholestérol. (Deux tests (11 et 12) ont été exclus à cause des valeurs incohérentes avec les autres résultats, la suppression des tests n'a pas influencé la prédiction et l'optimisation).

Cependant, l'analyse des effets des facteurs renforce les résultats du polynôme factoriel (partie expérimentale<sup>1</sup>). Ceci est en accord avec l'observation de Baillie et al, qui ont rapporté qu'une quantité élevée de cholestérol diminue l'efficacité de la charge (ou de l'encapsulation) (Baillie et al, 1985). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la VitE a besoin d'espace au niveau de la bicouche des liposomes qui sera amoindrie par la présence excessive de cholestérol. De même, le cholestérol diminue la fluidité ou la micro-viscosité des bicouches en occupant les espaces vides des phospholipides (partie amphiphile), les ancrant plus fortement dans la structure (Monteiro et al, 2014).



**Figure1:** Les facteurs influencent le taux d'encapsulation.



**Figure 2:** Les facteurs influencent la taille des liposomes.

En effet, l'analyse statistique et l'analyse des effets des facteurs ont démontré un effet positif des phospholipides sur la taille des liposomes, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les phospholipides sont les composants de base des liposomes (Akbarzadeh et al, 2013 ; Li et al ,2015). En revanche, le cholestérol a présenté un effet négatif sur la taille des liposomes (figure 1 et 2), cet effet négatif pourrait être lié à l'augmentation de la rigidité de la membrane des liposomes, formant ainsi des liposomes plus grands (Patel et al ,2009). Nos résultats sont en



## Discussion générale

---

accord avec ceux rapportés dans la littérature, en effet, Princely et Dhanaraju ont rapporté que la présence de molécules lipidiques en grande quantité induit la formation de vésicules de plus grande taille (Princely and Dhanaraju ,2018).

Ainsi, la méthodologie des plans d'expériences à travers le plan factoriel complet, nous a permis de :

- Modéliser l'impact des facteurs choisis sur le taux d'encapsulation et la taille des liposomes de vitamine E

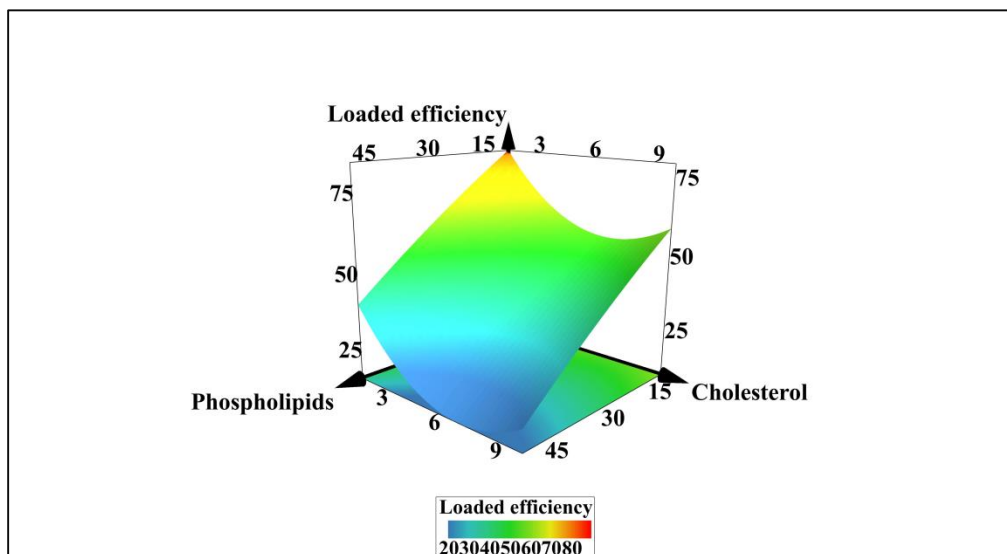
$$\text{Eq 1: Taux d'encapsulation} = 36.8338 - 21.0544 \text{ phospholipid} - 10.2564 \text{ cholesterol} - 0.255975 \text{ phospholipid} * \text{cholesterol} - 1.23604 \text{ phospholipid}^2 + 15.0527 \text{ cholesterol}^2$$

$$\text{Eq 2: Taille des liposome} = 45518.6 + 19390.6 \text{ phospholipids} - 8256.05 \text{ cholesterol} - 4605 \text{ phospholipid} * \text{cholesterol} - 11240.8 \text{ phospholipid}^2 - 22068.3 \text{ cholesterol}^2$$

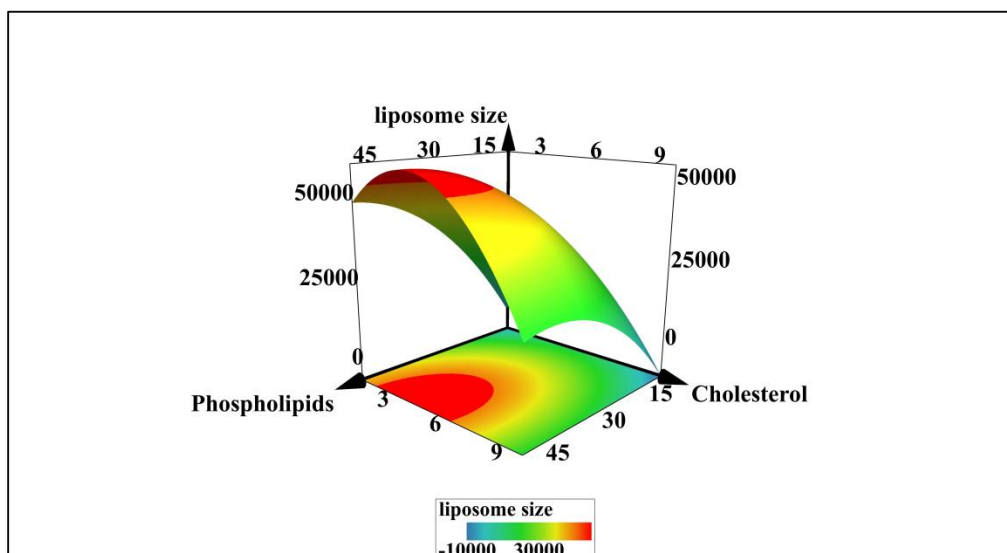
- Tracer les courbes iso-réponses qui serviront à déterminer des zones de formulation conformes à nos attentes et besoins.
- Détermination des conditions opératoires optimales pour la préparation de liposomes de vitamine E :

**Tableau 2:** Conditions optimales.

	Valeurs optimal
Taux d'encapsulation (%)	78.47 ± 0.9%
Taille des liposomes (nm)	99.86 ± 0.8%



**Figure 3:** courbe iso-réponse du taux d'encapsulation.



**Figure 4:** courbe iso-réponse de la taille des liposomes.

Vue la composition complexe du milieu de conservation spermatique, un développement et validation d'une méthode de dosage simultanée de la vitamine E et cholestérol par HPLC à été mis en œuvre, selon les critères des ICH (ICH,2005). La méthode HPLC a été développée et validée pour le dosage de l'alpha-tocophérol et du cholestérol dans les milieux de cryoconservation. Une séparation chromatographique a été effectuée sur un système isocratique, en utilisant une colonne C-18. La phase mobile était composée d'un mélange de méthanol: acétonitrile: eau 68:28:4 (v/v/v), avec un débit de 1,5 ml/min et 20  $\mu$ L volume

## Discussion générale

---

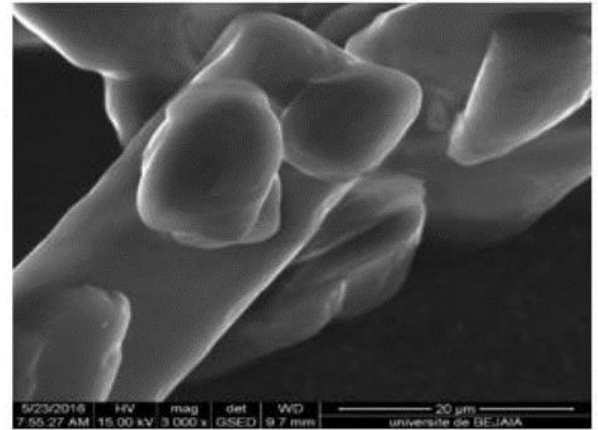
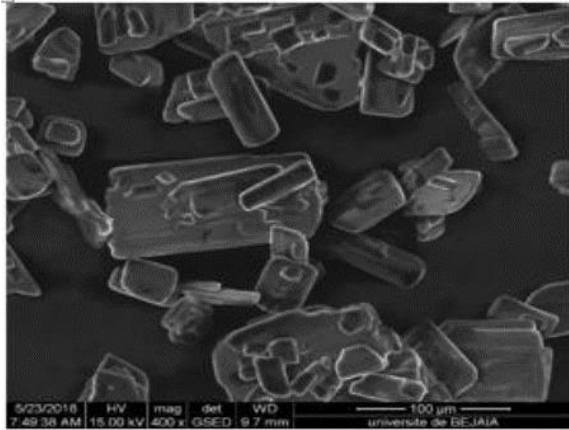
d'injection, à une longueur d'onde de 208 nm. La méthode a été validée selon les directives de la Conférence internationale sur l'harmonisation. La mise au point d'une méthode de dosage analytique simultané par HPLC de la Vit E et du CHL et validé de manière satisfaisante pour les différents paramètres : exactitude, fidélité, linéarité et spécificité selon les lignes directrices de la ICH. Cette méthode est simple et rapide, fait preuve d'une grande précision et d'une grande exactitude, et offre l'avantage du dosage simultané de la vitamine E et du cholestérol, (seul, complexés, ou chargés dans les liposomes), dans le milieu de la cryoconservation spermatozoaires. En outre, cette étude offre une excellente alternative aux méthodes classiques existantes pour la détermination de la Vit E et du CHL.

### **2. Etude physico-chimique du système liposomiale de vitamine E**

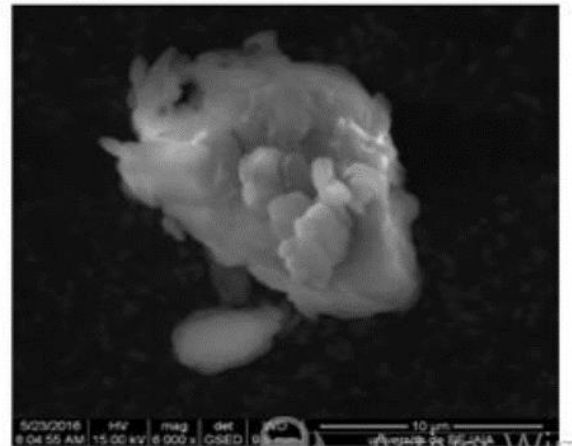
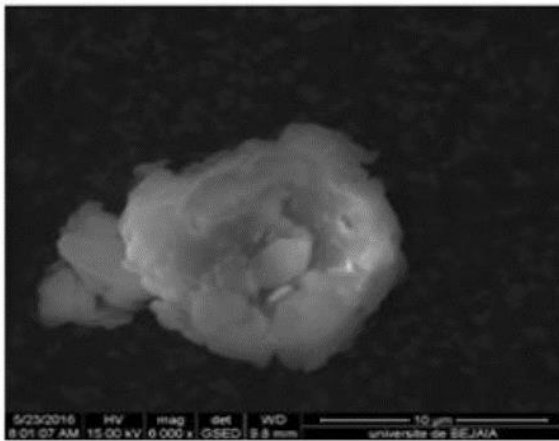
La vitamine E est quantitativement le principal antioxydant liposoluble dans les tissus et le sang. Elle fait partie des systèmes de défense non enzymatiques, qui protègent les phospholipides membranaires des réactions en chaîne de peroxydation «stress oxydatif» (Cutini et al, 2020). Elle inactive les formes réactives de l'oxygène par captation d'électrons non appariés (Gulcin, 2020). Aujourd'hui, la plupart des milieux de congélation contiennent des antioxydants (Swami et al ,2017 ; Ugur et al ,2019 ; Amokrane et al ,2020). Toutefois, en raison de leur faible solubilité dans l'eau et leur sensibilité à la lumière et l'oxydation limitant leur application, il nous ait apparu comme solution intéressante : la formulation de système d'encapsulation.

Après avoir trouvé les conditions optimales de préparation de la formulation liposomiale de VitE, (méthode simple, rapide, reproductible, peu coûteuse et transposable à grande échelle (Jaafar-Maalej et al,2010)). Une microscopie électronique à balayage (M.E.B) a été réalisée. Les micro-images obtenus sont présentés en figure 5. Les images de M.E.B obtenues pour les liposomes témoins constitués de Phospholipon 90H montrent la présence des vésicules sphériques, unilamellaires, et de taille nanométrique, ces observations rejoignent ceux obtenus lors de la mesure de la taille par la granulométrie laser (DLS). D'un point de vue morphologique, il n'y a une légère différence entre les liposomes placebo (sans principe actif) et ceux contenant de la vitamine E. Cela est probablement dû à la présence de la vitamine E insérée dans la bicouche lipidique du liposome, modifiant ainsi sa morphologie.

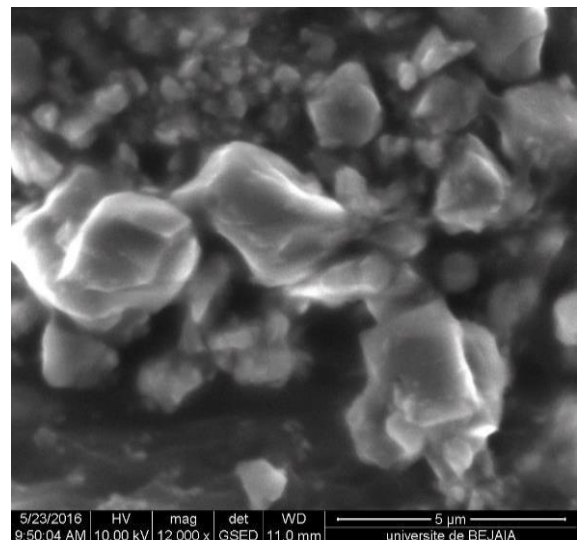
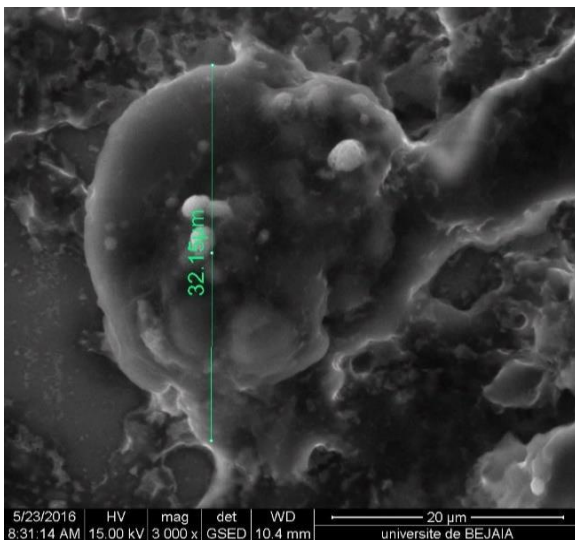
## Discussion générale



**-Cholestérol-**

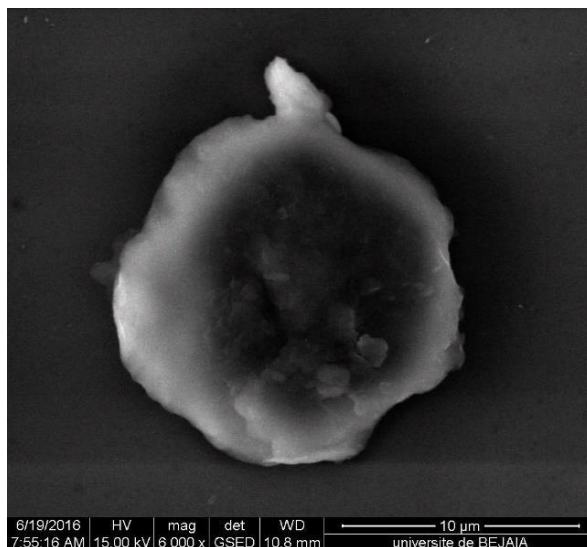


**-Phospholipide 90H -**



**- Placébo -**

**-Vitamine E-**



### -Liposome-VitE-

**Figure 5:** Micro-mage MEB des matières premières (Phospholipide 90H, VitE, CHL), liposome placebo et la solution liposomiale optimale.

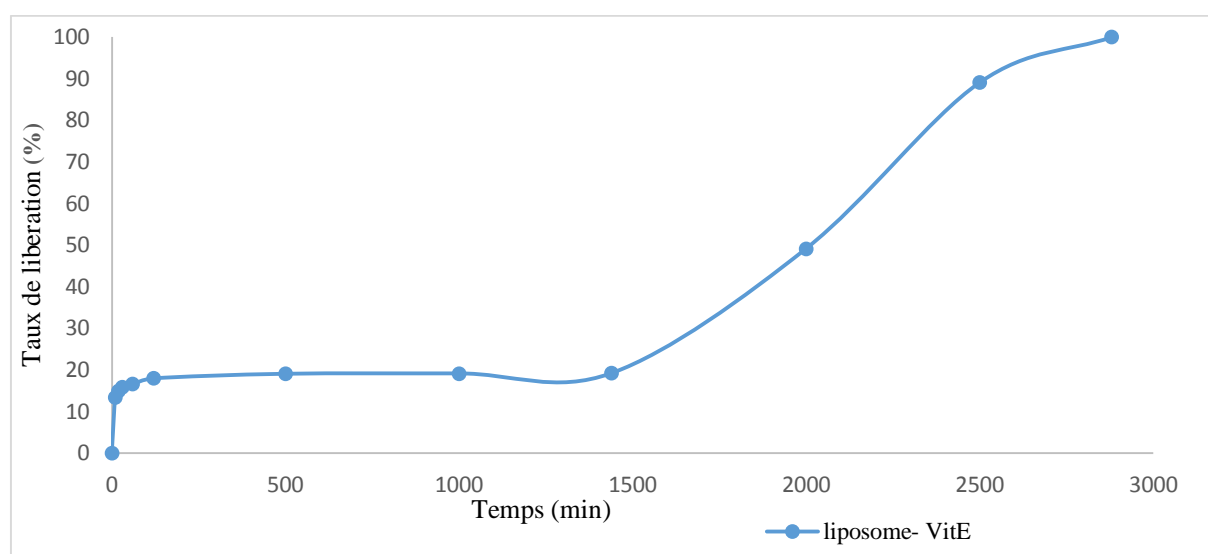
Une étude cinétique de libération de la vitamine E piégée dans les liposomes a été réalisée avec la méthode de dialyse. (Partie expérimentale 3). La composition lipidique de la bicouche des liposomes est connue pour être un facteur clé de sa perméabilité. Le profil de libération de la vitamine E liposomiale dans le milieu de cryoconservation est présenté dans la Figure 6.

La vitamine E seule présente une dissolution limitée (aucune solubilité dans le milieu de cryoconservation). La formulation Vit E/liposome présente un profil de libération biphasique. Dans la première partie, une libération rapide de la vitamine E a été obtenue, se stabilisant au cours du temps (pendant 24 heures) à environ 19 %. Cela peut être dû à la libération du médicament libre et du médicament adsorbé à la surface du liposome (par une faible force de liaison), c'est ce qu'on appelle l'effet d'éclatement (Miao et al, 2015) . Miao et al ont rapporté dans leur étude 'preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin' que la libération de la rapamycin encapsuler dans des liposomes est discret par deux phases une due à l'effet burst (présence de principe actif sur la surface du liposome) (Miao et al, 2015). Dans la deuxième partie, la dissolution de la Vit E s'est considérablement améliorée pour atteindre 99% à 48 heures, ceci est probablement dû au piégeage de la Vit E dans la bicouche

## Discussion générale

---

liposomiale et à sa libération par diffusion à l'extérieur du liposome d'abord, puis à l'extérieur du sac de dialyse. En effet, dans la littérature plusieurs travaux font référence à la libération contrôlée de médicaments par piégeage dans les liposomes (Xu and Burgess, 2011 ; Fernández-Romero et al ,2019). Xing et al. (2016) dans son ouvrage *Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications* ont également décrit ce phénomène (Xing et al,2016). De plus, la rigidité de la membrane due à la présence de cholestérol a sûrement participé au ralentissement de la libération de la Vit E (Briuglia et al,2015).



**Figure 6:** Cinétique de libération de la vit E liposomiale.

De plus, la cinétique de libération du médicament a été étudiée. De nombreux modèles existent pour décrire la libération des médicaments, certains d'entre eux peuvent être appliqués aux nano-formulations, tels que Korsmeyer-Peppas et Higuchi, etc (Jain et al,2016 ; Costa et al ;2001). Dans notre cas, quatre modèles d'ajustement différents ont été étudiés : le modèle de Korsmeyer-Peppas, le modèle de Higuchi, le modèle cinétique de premier ordre et l'ordre zéro. D'après les valeurs  $R^2$  présentées dans le tableau 1, on peut déduire que le modèle de Korsmeyer-Peppas était le plus précis. La littérature montre bien que ce modèle est très indiqué pour le relargage à partir des nanoparticules (Dhanasekaran et al,2018 ; Singh et al ,2018 ; Petrović et al ,2017). De plus, les paramètres cinétiques correspondant à ce modèle ont été extraits, notamment la constante de vitesse de libération (K) et l'exposant de libération (n). Les

## Discussion générale

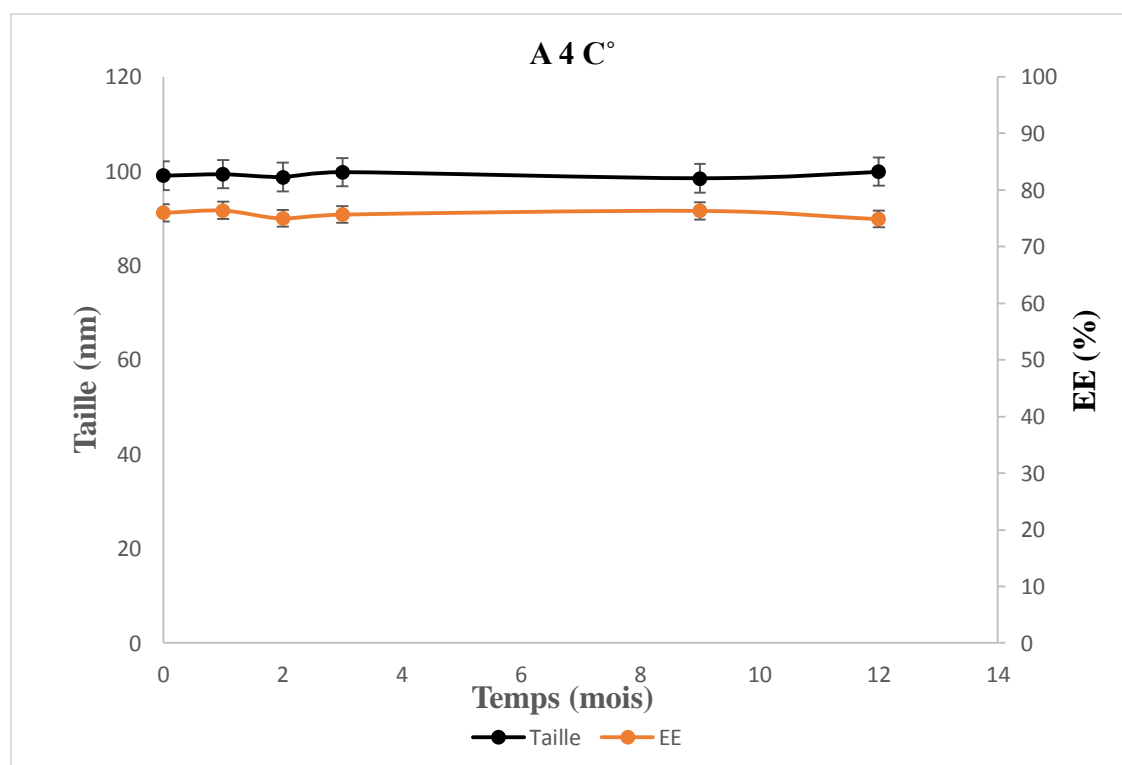
---

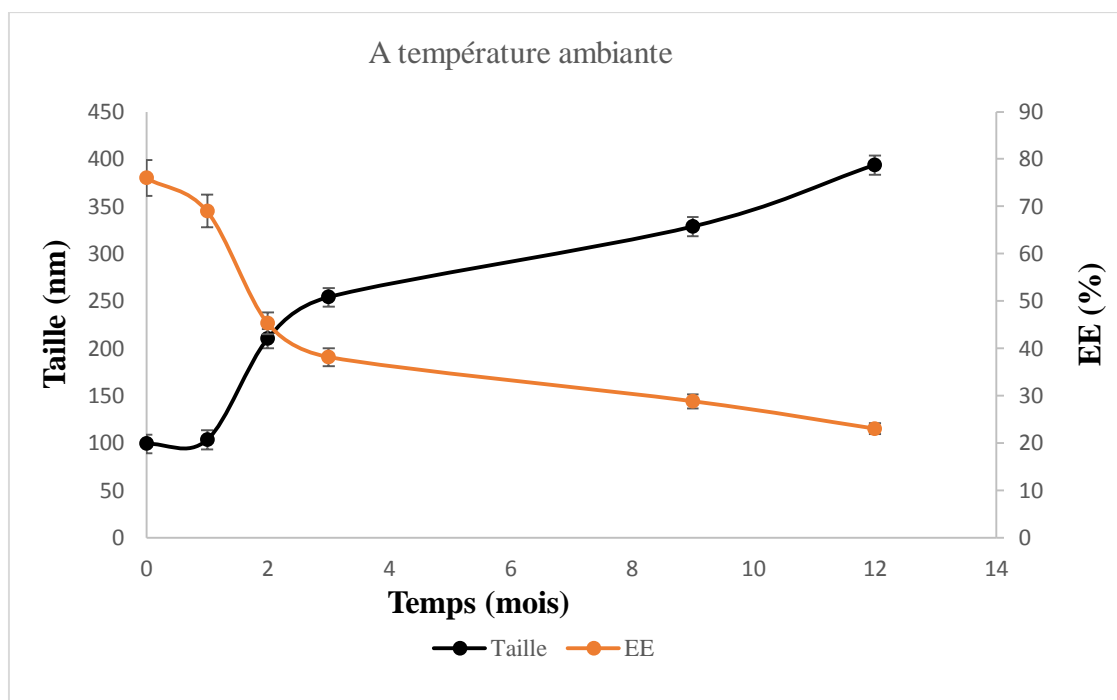
valeurs de  $n$  qui ont été obtenus correspondent à un comportement de diffusion Fickien. Ce résultat confirme que la libération de la vit E à travers la bicouche et le sac de dialyse suit une libération par diffusion, favorisée par le gradient de concentration.

En dernier, Il est nécessaire d'étudier la stabilité des liposomes contenant la vitamine E à long terme. La stabilité des liposomes témoins et contenant la vitamine E préparés par la méthode d'injection éthanolique a été étudiée en déterminant la taille et l'efficacité d'encapsulation de la vitamine E après 12 mois de stockage à 4 °C.

Les liposomes témoins sont restés stables et ont conservé leur taille seulement pendant 1 mois. Tandis que les liposomes conservés à 4 °C sont restés stables (taille et taux d'encapsulation non changée) durant 12 mois. Ceci montre que le piégeage par liposomes protège la vitamine E durant leur stockage, et que la formulation optimale mise en œuvre est une alternative même à l'échelle industrielle (stabilité de la préparation).

D'après la littérature, les phospholipides saturés rendent la bicouche plus dense et plus rigide avec une faible possibilité de formation de pores au niveau de la membrane. Cela réduit la fuite du principe actif contenu dans les liposomes, limite la fusion liposomiale et par conséquent augmente la stabilité des liposomes (Papahadjopoulos et al, 1973 ; Demel and Kruffy, 1976 ; Virden et al, 1992 ; Liu et al, 2000 ).





**Figure 7:** Stabilité physique et chimique du liposome –Vit E à 4 °C et à température ambiante.

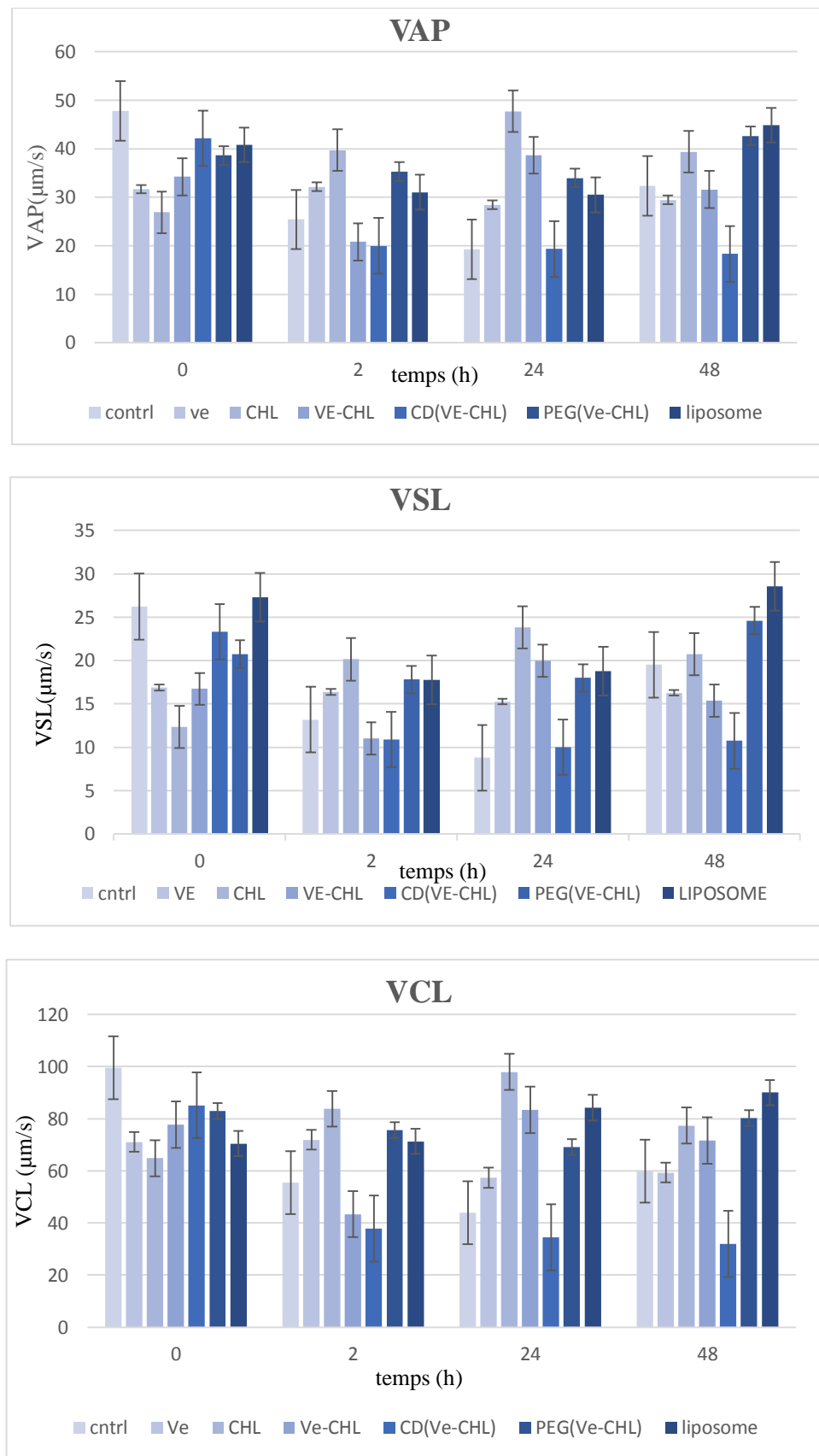
### 3. Efficacité du système liposomiale chargé en vitamine E dans la cryoconservation spermatique

L'addition des antioxydants tels que la vitamine E dans les milieux d'incubation ou de conservation protège significativement les spermatozoïdes de la fragmentation de l'ADN, de la peroxydation lipidique et de la perte de motilité .

Afin d'étudier l'impact des liposomes de VitE durant la cryoconservation spermatique, la motilité après cryoconservation du sperme a été évaluée (avec et sans solution liposomiale). Les traitements à base des complexes d'inclusion VitE /Cyclodextrine, CHL/Cyclodextrine et dispersions solides PEG 6000/VitE, PEG 6000/CHL, se sont avérés efficaces sur les paramètres de la motilité du sperme après cryoconservation. En effet, plusieurs études avaient déjà relevé l'effet cryoprotecteur des complexes de cyclodextrines/vitamine E et de cyclodextrines/cholestérol et/ou des dispersions solides des deux principes actifs dans le PEG6000 chez différentes espèces animales (khellouf et al,2018 ; Amokran et al , 2020 ). Cela dit, comme on peut le voir sur la figure 6, l'effet le plus significatif sur la motilité spermatique a été retrouvé lors de l'utilisation de la formulation liposomiale de vitamine E optimale.



## Discussion générale



**Figure 8:** Effets des différents traitements sur les paramètres de mobilité spermatisques.

## Discussion générale

---

Cela est probablement dû à l'effet synergique et simultané de la VitE et du CHL (protégés et à solubilité augmentée) contre la peroxydation et le choc thermique des cellules spermatiques. Cet effet simultané est en accord avec les résultats de Khellouf et al, qui ont rapporté qu'une protection maximale du sperme bovin est obtenue lors de l'association des complexes vitamine E /Cyclodextrine et cholestérol/Cyclodextrine (khellouf et al ,2018). De plus, la littérature dénote que la structure des liposomes (présence de lécithine) sans aucune molécule active peut protéger les spermatozoïdes contre l'oxydation (León et al ,2019 ; Köse et al ,1998 ; Purdy and Graham ,2015).

### Références

A. J. Baillie ,A. T. Florence ,L. R. Hume , G. T. Muirhead . The preparation and properties of niosomes—non-ionic surfactant vesicles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37 863-868 (1985).

Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R-L.; and Neves, N- M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *J. R So*, 18 (2014).

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M. Kouhi , M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: classification, preparation, and applications, *.nanoscalereslett.*, 8, 102 (2013).

Patel, R.; Patel, H.; Baria, A. Formulation and Evaluation of Liposomes of Ketoconazole, *Int. J. Drug Deliv. Technol.* 1(2009).

Li, J.; Wang, X.; Zhang, T.; Wang, C.; Huang, Z.; Luo, X.; Deng, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci* , 10, 81–98 (2015).

Princely, S.; and Dhanaraju, Md. Design, formulation, and characterization of liposomal-encapsulated gel for transdermal delivery of fluconazole, *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 11, 417 (2018) .

International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, (2005).

Melissa Cutini, Carmine Bruno ,Antonio Mancini, Giancarlo Balercia, *Antioxidants and Male Infertility, Male Infertility* , 535-54 (2020)

İlhami Gulcin, *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Archives of Toxicology* 94:651–715(2020).

Swami D.S., Kumar P., Malik P.K., Saini M., Kumar D., Jan M.H. Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. *Anim. Reprod. Sci.* 177:56–64 (2017).

## Discussion générale

---

Muhammet Rasit Ugur, Amal Saber Abdelrahman, Holly C. Evans, Alicia A. Gilmore, Mustafa Hitit, Raden Iis Arifiantini, Bambang Purwantara, Abdullah Kaya, and Erdogan Memili. *Front Vet Sci. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm*, 6: 268 (2019).

Zhi-Lin Miao, Ying-Jie Deng, Hong-Yang Du, Xu-Bin Suo, Xiao-Yu Wang, Xiao Wang, Li Wang, Li-Jie Cui and Na Duan. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9: 941-946, (2015).

Xiaoming Xu Diane J. Burgess, *Liposomes as Carriers for Controlled Drug Delivery, Long Acting Injections and Implants* 195-220, (2011)

Ana-María Fernández-Romero , Francesca Maestrelli, Paola Angela Mura, Antonio María Rabasco, and María Luisa González-Rodríguez, Novel Findings about Double-Loaded Curcumin-in-HPcyclodextrin-in Liposomes: Effects on the Lipid Bilayer and Drug Release. *Pharmaceutics*, 10, 256 (2018).

Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics*. 15;6 (9):1336-52 (2016).

Maria-Lucia Briuglia & Chiara Rotella & Amber McFarlane & Dimitrios A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv. and Transl. Res*, 5:231–242 (2015).

Jain, A.; Jain, S.K. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chem. Phys. Lipids*, 201, 28–40 (2016).

Costa, P.; Lobo, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133 (2001).

Dhanasekaran, S.; Rameshthangam, P.; Venkatesan, S.; Singh, S.K.; Vijayan, S.R. In Vitro and In Silico Studies of Chitin and Chitosan Based Nanocarriers for Curcumin and Insulin Delivery. *J. Polym. Environ.* 26, 4095–4113 (2018).

Singh, R.P.; Gangadharappa, H.V.; Mruthunjaya, K. Phytosome complexed with chitosan for gingerol delivery in the treatment of respiratory infection: In vitro and in vivo evaluation. *European Eur. J. Pharm. Sci*, 122, 214–229, (2018).

## Discussion générale

---

Petrović, S.; Tačić, A.; Savić, S.; Nikolić, V.; Nikolić, L.; Savić, S. Sulfanilamide in solution and liposome vesicles; in vitro release and UV-stability studies. *Saudi Pharm. J.* 25, 1194–1200 (2017).

Demel RA, De Kruijff B. The function of sterols in membranes. *BiochimBiophysActa*, 457: 109–132 (1976).

Papahadjopoulos D, Jacobson K, Nir S, Isac T. Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *BiochimBiophys.*, 311:330–48 (1973).

Virden JW, Berg JC. NaCl-induced aggregation of dipalmitoylphosphatylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir.* 8: 1532-1537 (1992).

Liu DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids Surfaces.*, 172: 57-67 (2000).

Chiraz Jaafar-Maalej, Roudayna Diab, Véronique Andrieu, Abdelhamid Elaissari & Hatem Fessi. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. 228-243 (2009)

Khellouf, A., Benhenia, K., Fatmi, S., & Iguer-Ouada, M.. The complementary effect of cholesterol and vitamin E preloaded in Cyclodextrins on frozen bovine semen: Motility parameters. *Membrane Integrity and Lipid Peroxidation. CryoLetters*, 39, 113–120 (2018).

Amokrane, A., Kaidi, R., & Iguer-Ouada, M. The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (peg) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters*, 41, 19–25 (2020).

Medina-León, A.Z.; Domínguez-Mancera, B.; Cazalez-Penino, N.; Cervantes-Acosta, P.; Jácome-Sosa, E.; Romero-Salas, D.; Barrientos-Morales, M. Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Aust. J. Vet. Sci.*, 51, 119–123 (2019).

Köse, G.T.; Arica, M.Y.; Hasirci, V. Low-Molecular-Weight Heparin-Conjugated Liposomes with Improved Stability and Hemocompatibility. *Drug Deliv.* 5, 257–264 (1998).

## Discussion générale

---

Purdy, P.H.; Graham, J.K. Membrane Modification Strategies for Cryopreservation. *Cryopreserv. Freeze.Dry. Protoc.*1257, 337–342 (2015).

# **Conclusion et Perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

---

L'objectif de ce travail de recherche consiste à mettre au point un système de vecteur encapsulant la vitamine E (seule ou encapsulée) destinée à la supplémentation de milieu de conservation spermatique. La vitamine E étant un antioxydant qui peut être utilisé pour lutter contre les effets du stress oxydatif en particulier celui observé au niveau des cellules spermatiques lors de la cryoconservation. Dans cette thèse, notre choix c'est porté sur un système de vectorisation innovant : Le liposome, offrant ainsi un double intérêt à savoir l'amélioration de la solubilité et de la stabilité de la vitamine E.

La première partie de notre travail a porté sur la formulation et l'optimisation des liposomes par la méthode d'injection d'éthanol. Les résultats ont montré que le cholestérol est essentiel pour assurer la formation des liposomes. Par ailleurs, la taille des liposomes augmente avec l'augmentation de la concentration en phospholipides.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons démontré l'intérêt de la solution liposomiale chargée en vitamine E. En effet, L'étude de cinétique de libération des liposomes a montrée une amélioration significative de la solubilité de la vitamine E atteignant les 99% après 48H. De plus, les mêmes solutions liposomiales, ont montré une stabilité physique et chimique s'étalant sur 12 mois, résultat très intéressant dans l'optique d'une transposition à l'échelle industrielle.

Dans notre étude, nous avons choisi de démontrer l'efficacité de notre système innovant (solution liposomiale optimale) à l'aide d'un test de motilité spermatique après cryoconservation (sur sperme animal). Les résultats obtenus montrent une meilleure viabilité et vitesse de déplacement du sperme réfrigéré à 4 °C durant 48H dans un milieu contenant nos solutions liposomiales. Cela s'explique par la présence simultanée de la vitamine E et du Cholestérol et leur solubilisation et stabilisation accentuée.

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

- De connaître la charge (potentiel zêta) et l'indice de disparité du système liposome chargé en vitamine E.
- D'étudier l'influence des phospholipides sur la efficacité et stabilité de nos liposomes, on variant la nature des phospholipides ou faire des combinaisons entre les différents phospholipides.



## **Conclusion et perspectives**

---

- Afin d'améliorer la solubilité de la vitamine E et de contrôler sa libération dans le milieu de conservation spermatique, une association entre les systèmes d'encapsulation conventionnelle est envisageable (drug in cyclodextrine in liposome et les liposomes furtifs).
- La détermination de la nature de l'interaction entre le liposome et la cellule spermatique pourraient être envisagée afin de vérifier l'efficacité thérapeutique des préparations dans le traitement du stress oxydatif au niveau de la cellule spermatique.

# **ANNEXES**

# **Annexe 1**

## **Communications nationales et internationales**

- 1. Vitamine E encapsulée dans les cyclodextrines ou liposomes : préparation, caractérisation, test spermatique**

Lamia TAOUZINET, Sofiane FATMI, Allaeddine KHELLOUF, Mokrane IGUER-OUADA.

**Séminaire national de la Biodiversité, biologie médicale et écotoxicologie environnementale (SNBBMEE-2019). Skikda – Algérie**

- 2. Développement, Optimisation et Caractérisation par les plans d'expérience d'un système liposomal chargé en Alpha-Tocophérol.**

Lamia TAOUZINET, Sofiane FATMI et Mokrane IGUER-OUADA .

**1<sup>er</sup> Biopharm Scientific Annual Meeting BSAM1, Alger, 12 Mars 2020**

- 3. Alpha tocopherol loaded in liposome as a new approach of sperm motility protection.**

TAOUZINET Lamia, FATMI Sofiane, and IGUER-OUADA Mokrane

**Séminaire international sur les sciences naturelles et de la vie En ligne à travers Google Meet le 19 et 20 Février 2021 (Webinaire).**

## Annexe 2

### Publications internationales

- **Alpha Tocopherol loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection.**

Lamia Taouzinet, Sofiane Fatmi, Allaeddine Khellouf, Mohamed Skiba and Mokrane Iguer-Ouada

**Drug Delivery Letters, 2020, 10, 228-236.** <https://doi.org/10.2174/2210303110666200302113209>

- **Development and validation of hplc method for simultaneous quantification of alpha-tocopherol (free or encapsulated) and cholesterol in semen cryopreservation media.**

Lamia Taouzinet ,Sofiane Fatmi ,Yasmina Salhi-Amrani , Malika Lahiani-Skiba, Mohamed Skiba, Mokrane Iguer-Ouada.

**Biomedical Chromatography.2020;e5018.** <https://doi.org/10.1002/bmc.5018>

- **The use of cyclodextrin or its complexes as a potential treatment against the 2019 novel coronavirus. A mini-review**

Fatmi Sofiane, Taouzinet Lamia, Skiba Mohamed and Iguer-Ouada Mokrane.

**Current Drug Delivery 2020.** doi: [10.2174/1567201817666200917124241](https://doi.org/10.2174/1567201817666200917124241)

- **New formulation and evaluation of camptothecin encapsulated and/or dispersed suppository.**

Fatmi Sofiane , Taouzinet Lamia, Skiba Mohamed and Iguer-Ouada Mokrane

**Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2021;21 (9):1183-1190.**

doi: [10.2174/1871520620666200903150635](https://doi.org/10.2174/1871520620666200903150635).

- **Encapsulation nanotechnology in sperm cryopreservation: systems preparation methods and antioxidants enhanced delivery**

Lamia Taouzinet, Sofiane Fatmi, Malika Lahiani-Skiba, Mohamed Skiba and Mokrane Iguer-Ouada.

**CryoLetters 42 (1), 1 - 12 (2021) PMID: 33973986**

## Résumé

La vitamine E est un agent antioxydant liposoluble dont la principale activité biologique dans les membranes cellulaires est d'interrompre les réactions de peroxydation des lipides. Cependant, sa faible solubilité et son instabilité en milieux physiologiques ont limité son plein essor. L'objectif de ce travail de recherche consiste à mettre au point un nouveau système de vecteur (liposomes) encapsulant la vitamine E destinée à améliorer la cryoconservation des spermatozoïdes. La préparation des liposomes a été effectuée par la méthode d'injection d'éthanol. Les conditions opératoires optimales ont été déterminées par la méthodologie des plans d'expériences. Les résultats ont démontré que le cholestérol est essentiel pour assurer la formation des liposomes. Il a été aussi trouvé que la taille des liposomes augmente avec l'augmentation de la concentration en phospholipides. Les solutions liposomiales, préparées dans les conditions optimales, ont montré une stabilité physique et chimique très intéressante durant 12 mois à 4 °C. De même, l'efficacité des solutions liposomiales évaluée sur du sperme conservé a été très satisfaisante. Cela s'explique par la présence simultanée de la vitamine E et du Cholestérol. De plus, l'étude effectuée montre que la solution liposomiales a le meilleur effet en termes de protection spermatique lors de la cryoconservation.

## Abstract

Vitamin E is a fat-soluble antioxidant whose main biological activity in cell membranes is to interrupt lipid peroxidation reactions. However, its low solubility and its instability in physiological environments have limited its full development. The objective of this research work is to develop a new vector system (liposomes) encapsulating vitamin E to improve the spermatozoa cryopreservation. Liposomes preparation was carried out by ethanol injection method. The optimal operating conditions were determined by experiments design methodology. Results demonstrated that cholesterol is essential for liposomes formation. It was also found that the liposomes size increased with the phospholipids concentration increase. Liposomal solutions, prepared under optimal conditions, showed very interesting physical and chemical stability for 12 months at 4 °C. Likewise, liposomal solutions efficacy evaluated on preserved sperm was very satisfactory. This is explained by simultaneous presence of vitamin E and cholesterol. In addition, the study carried out shows that the liposomal solution has the best effect in terms of sperm protection during cryopreservation.

## المخلص

فيتامين (هـ) هو أحد مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الدهون والتي يتمثل نشاطها البيولوجي الرئيسي في أغشية الخلايا في مقاطعة تفاعلات بيروكسيد الدهون. ومع ذلك، فإن انخفاض قابليته للذوبان وعدم استقراره في البيئات الفسيولوجية قد حد من تطوره الكامل. الهدف من هذا البحث هو تطوير نظام ناقل جديد (الجسيمات الشحمية) يغلف فيتامين(هـ) لتحسين حفظ الحيوانات المنوية بالتبريد. تم تحضير الجسيمات الشحمية بطريقة حقن الإيثانول. تم تحديد ظروف التشغيل المثلى من خلال منهجية تصميم التجارب. أظهرت النتائج أن الكوليسترول ضروري لتكوين الجسيمات الشحمية. كما وجد أن حجم الجسيمات الشحمية يزداد مع زيادة تركيز الدهون الفوسفورية. أظهرت المحاليل الدهنية، المحضرة في ظل ظروف مثالية، ثباتاً فيزيائياً وكيميائياً مثيراً للاهتمام لمدة 12 شهراً عند 4 درجات مئوية، وبالمثل، كانت فعالية المحاليل الدهنية التي تم تقييمها على الحيوانات المنوية المحفوظة. ويفسر ذلك من خلال الوجود المتزامن والكوليسترول لفيتامين(هـ) بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسة التي تم إجراؤها أن المحلول الدهني له أفضل تأثير من حيث حماية الحيوانات المنوية أثناء الحفظ بالتبريد.