

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université A. MIRA – BEJAIA**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de master

En Génie des procédés pharmaceutiques

**Thème**

**Etude comparative de différents procédés d'encapsulation de la  
vitamine E et du cholestérol et leur impact sur la conservation  
spermatique**

**Réalisé par :**

OULDJI Kahina

OUERDANI Mélissa Kenza

**Encadrant : FATMI Sofiane**

**Co-encadrant : TAOUZINET Lamia**

**Membres du jury :**

**Président : AZZOUG Moufok**

**Examineur : REZGUI Farouk**

**Promotion 2020/2021**

## ***Remerciements***

On remercie ***dieu***, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et terminer ce mémoire.

En guise de reconnaissance, on tient à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions particulièrement ***Mr.FATMI Sofiane*** notre cher professeur et encadrant, pour son encadrement, ses conseils et orientations.

Nous remercions aussi ***Mme.TAOUZINET***, pour le temps qu'elle nous a prodigué, nous sommes très reconnaissantes de sa grande contribution et témoins de ses remarquables compétences. Son encouragement permanent et son dynamisme organisateur nous ont énormément facilité la tâche. Soyez assurées, de toute notre estime et notre profond respect.

En espérant être à la hauteur de vos attentes.

Nos sincères remerciements s'adressent aussi à ***Mme.AMRANI***, pour son aide, sa disponibilité et son soutien moral, madame, veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

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

Enfin, nos vifs remerciements vont également à tout ***nos professeurs***, pour leur aide tout au long de notre cursus universitaire.

Une mention très spéciale et particulière à ***nos familles*** qui nous ont toujours soutenus.

## ***Dédicaces***

Je dédie cet humble ouvrage à celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, celle qui m'a donné du courage et qui m'a accompagné durant ce long voyage :

***Ma maman*** que j'aime tant.

Je dédie cet humble ouvrage à celui qui m'a soutenue, celui qui m'a tout donné, celui qui m'a permis de devenir la femme que je suis aujourd'hui :

***Mon papa*** que je chéris.

Je dédie cet humble ouvrage à ceux qui partagent ma cage :

***Mes frères, mes sœurs et mes belles sœurs*** à qui je passe ce message.

Je dédie cet humble ouvrage à ***mon support dans la vie***, qui m'a appris, supporté et dirigé.

Je dédie cet humble ouvrage à mes copines de cœur que j'aime :

***Taous, Sophia, Yasmine M et Zahoua*** pour leur soutien, amour et encouragement.

***Yasmine K et Kenza***, loin des yeux mais toujours près du cœur.

Je dédie cet humble ouvrage à toute ma ***famille***.

Sans oublier, mon binôme et ma copine ***Mélissa*** pour son soutien moral, sa patience et son encouragement tout au long de ce projet.

***Kahina***

## *Dédicaces*

Louanges à dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu .

Je dédie ce modeste travail:

A ma très chère *maman* que j'aime tant, celle qui a toujours été là pour moi, qui m'a arrosé d'amour et de tendresse. Merci pour ta bienveillance, merci pour ton soutien indéfectible et surtout pour tes conseils qui m'ont accompagné tout au long de ces années et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon très cher *papa* que j'aime, qui a tout donné pour que je puisse en arriver là, Ton soutien fut une lumière dans mon parcours. Merci de m'avoir tout appris et de m'avoir poussé vers le haut.

A *mon frère* et à *ma sœur*, a tous les moments passés avec vous, à toutes les blagues que vous m'avez faites...En gage de mon amour éternel pour vous. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

A mon pilier dans la vie, qui m'a appris, m'a supporté et m'a dirigé.

A toute *ma famille, mes cousines, mes tantes et mon tonton Ahmed* que je chéris.

A mes amies, *Laetitia F et Leaticia D*, je vous aime les filles.

Sans oublier mon binôme, sans laquelle ce travail ne serait pas le même, ma copine de cœur *Kahina*.

*Mélissa*

# Sommaire

## Table des matières

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Liste d'abréviations

## Table des matières :

Introduction Générale.....	1
I CRYOPROTECTEURS .....	3
1.1 CHOLESTEROL.....	4
I.1.1 Introduction .....	4
I.1.2 Historique.....	4
I.1.3 Description du cholestérol .....	5
I.1.4 Structure du cholestérol .....	6
I.1.5 Propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	6
I.1.6 Source du cholestérol.....	7
I.1.7 Rôles du cholestérol.....	7
I.1.8 Mécanisme de protection cellulaire .....	8
I.2 VITAMINE E.....	9
I.2.1 Introduction .....	9
I.2.2 Historique.....	9
I.2.3 Définition de la vitamine E .....	10
I.2.4 Structure chimique de la vitamine E.....	10
I.2.5 Propriétés physico-chimiques de la vitamine E .....	12
I.2.6 Solubilité de la vitamine E .....	13
I.2.7 Origines et sources de la vitamine .....	14
I.2.7.1 Origine naturelle.....	14
I.2.7.2 Origine synthétique .....	15
I.2.8 Rôles et actions de la vitamine E.....	15
I.2.9 Toxicité de la vitamine E .....	15
I.2.10 Effet de la vitamine E sur la cellule spermatique.....	16
I.2.11 Mécanisme antioxydant.....	16

II	SYSTEMES DE SOLUBILISATION ET DE VECTORISATION .....	17
II.1	LES CYCLODEXTRINES .....	17
II.1.1	Introduction .....	17
II.1.2	Description des cyclodextrines .....	17
II.1.3	Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines .....	18
II.1.4	Les cyclodextrines naturelles .....	19
II.1.5	Les dérivés des cyclodextrines .....	20
II.1.6	Les complexes d'inclusion .....	20
II.1.7	Avantages des cyclodextrines .....	22
II.2	POLYETHYLENE GLYCOL.....	23
II.2.1	Introduction .....	23
II.2.2	Définition des PEGs .....	23
II.2.3	Structure des PEGs .....	23
II.2.4	Propriétés physico-chimiques des PEGs.....	24
II.2.5	Rôle des PEGs .....	25
II.2.6	Domaines d'application .....	26
II.2.7	Méthodes de préparation des complexes PEGs/PAs .....	26
II.3	LES LIPOSOMES .....	28
II.3.1	Introduction .....	28
II.3.2	Qu'est-ce qu'un liposome ?.....	28
II.3.3	Composition d'un liposome .....	29
II.3.4	Température de transition de phase des liposomes .....	31
II.3.5	Classification des liposomes .....	33
II.3.6	Stabilité des liposomes.....	34
II.3.6.1	Stabilité physique (Agrégation des liposomes).....	35
II.3.6.2	Stabilité chimique (Dégradation des liposomes).....	35
II.3.7	Méthode de préparation des liposomes.....	35
II.3.8	Avantages et inconvénients des liposomes .....	36
II.3.8.1	Avantages des liposomes .....	36
II.3.8.2	Inconvénients des liposomes.....	36
II.3.9	Encapsulation des substances dans les liposomes .....	36
II.3.10	Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes .....	37
III.	Etude <i>In situ</i> .....	39
IV.	TRAVAUX ANTERIEURS .....	43

V	MATERIELS ET METHODES .....	45
V.1	MATERIELS, APAREILLAGES ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES	45
V.1.1	PRODUITS CHIMIQUES .....	45
V.1.2	MATERIELS .....	45
V.1.3	APPAREILLAGES .....	45
V.1.4	PREPARATION DES COMPLEXES (PROCEDE).....	45
V.1.4.1	Vitamine E .....	45
V.1.4.2	Cholestérol : .....	46
V.1.5	PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON A UN pH DE 7.4 .....	46
V.2	TEST DE DISSOLUTION .....	46
V.2.1	PROTOCOLE OPERATOIRE.....	46
V.2.1.1	Procédé classique d'encapsulation .....	46
V.2.1.2	In situ .....	48
V.2.1.2	Vitamine E .....	48
V.2.1.2	Cholestérol.....	48
V.3	MODELES SEMI-EMPIRIQUES .....	51
V.4	TEST DE MOTILITE (TEST SPERMATIQUE).....	53
V.4.1	MATIERES ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES .....	53
V.4.2	MATERIELS .....	53
V.4.3	APPAREILLAGES .....	53
V.4.4	PREPARATION DU TRIS .....	53
V.4.5	PREPARATION DES TRAITEMENTS .....	53
V.4.5.1	Vitamine E .....	53
V.4.5.2	Cholestérol .....	53
V.4.6	RECOLTE DU SPERME EPIDIDYMAIRE .....	55
V.4.7	REFRIGERATION DU SPERME .....	55
VI.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	56
VI.1	COURBE D'ETALONNAGE .....	56
VI.2	CINETIQUE DE LA DISSOLUTION.....	57
VI.2.1	CINETIQUE DE LA DISSOLUTION DE LA VITAMINE E .....	57
VI.2.2	Cinétique de la dissolution du cholestérol.....	59
VI.2.3	Cinétique de dissolution de la Vit.E et du Chol en association.....	60
VI.3	MODELISATION MATHEMATIQUE.....	62

VI.3.1 Procédé classique d'encapsulation :.....	62
VI.3.2 Encapsulation in situ : .....	65
VI.4 TEST BIOLOGIQUE.....	67
Conclusion générale.....	71
Références bibliographiques.....	73
Annexes .....	78

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : structure chimique du cholestérol.....	6
<b>Figure 2</b> : Structure et dénomination du tocophérol.....	11
<b>Figure 3</b> : Structure et dénomination du tocotriénol.....	11
<b>Figure 4</b> : Mécanisme antioxydant de la vitamine E.....	16
<b>Figure 5</b> : Représentations schématiques de la structure chimique générale et tridimensionnelle des cyclodextrines, pour les $\alpha$ -, $\beta$ - et $\gamma$ -cyclodextrines (n=6, 7 et 8, respectivement).....	17
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique du phénomène d'inclusion entre une molécule de cyclodextrine (l'hôte) et un soluté (l'invité) pour former des complexes solutés-cyclodextrines.....	21
<b>Figure 7</b> : structure chimique générale des PEGs.....	23
<b>Figure 8</b> : Structure d'un liposome.....	27
<b>Figure 9</b> : Représentation d'un phospholipide.....	30
<b>Figure 10</b> : Différentes phases de liposomes suivant la température de transition de phase...32	
<b>Figure 11</b> : Représentation des liposomes multi lamellaires et unies lamellaires.....	34
<b>Figure 12</b> : Schéma d'un liposome uni lamellaire avec localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité.....	38
<b>Figure 13</b> : Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	56
<b>Figure 14</b> : Courbe d'étalonnage du cholestérol.....	56
<b>Figure 15</b> : Profil de dissolution de la vitamine E encapsulée dans les CDs, PEG et liposomes par procédé d'encapsulation classique et par in situ.....	58
<b>Figure 16</b> : Profil de dissolution du cholestérol encapsulé dans les CDs, PEG et liposomes par procédé d'encapsulation classique et par in situ.....	59
<b>Figure 17</b> : Cinétique de dissolution de la vitamine E et du cholestérol en association par procédé classique d'encapsulation et par in situ.....	60
<b>Figure 18</b> : Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire curvilignes des SPZs en fonction des traitements.....	67
<b>Figure 19</b> : Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire en lignes droites des SPZs en fonction des traitements.....	68
<b>Figure 20</b> : Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire moyenne des SPZs en fonction des traitements.....	69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	7
<b>Tableau 2</b> : Propriétés physico-chimiques de la vitamine E.....	13
<b>Tableau 3</b> : principales sources de la vitamine E.....	14
<b>Tableau 4</b> : propriétés physico-chimiques des CDs natives les plus courantes.....	19
<b>Tableau 5</b> : Propriétés physiques des PEGs.....	24
<b>Tableau 7</b> : Températures de transition de phases de certains phospholipides.....	32
<b>Tableau 8</b> : Classification des liposomes.....	34
<b>Tableau 9</b> : Masses des différents complexes utilisés obtenues par procédé classique d'encapsulation.....	47
<b>Tableau 10</b> : tableau récapitulatif des masses utilisées lors de la complexation in situ de la vitamine E.....	48
<b>Tableau 11</b> : tableau récapitulatif des masses utilisées lors de la complexation in situ du cholestérol.....	49
<b>Tableau 12</b> : préparation des solutions de la courbe d'étalonnage.....	50
<b>Tableau 13</b> : Les modèles mathématiques régissant les mécanismes de libération.....	51
<b>Tableau 14</b> : Masses de vitamine E et des différents systèmes d'encapsulation.....	54
<b>Tableau 15</b> : Masses du cholestérol et des différents systèmes d'encapsulation.....	54
<b>Tableau 16</b> : Modélisation des données de dissolution de la vitamine E par procédé d'encapsulation classique.....	62
<b>Tableau 17</b> : Modélisation des données de dissolution du cholestérol par procédé d'encapsulation classique.....	63
<b>Tableau 18</b> : Modélisation des données de dissolution en associant le cholestérol et la vitamine E, par procédé d'encapsulation classique.....	64
<b>Tableau 19</b> : Modélisation des données de dissolution de la vitamine E par in situ.....	65

## Liste d'abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**CASA** : Computer assisted sperm analyser.

**CD(s)** : Cyclodextrines.

**Chol** : Cholestérol.

**HDL** : Lipoprotéine de haute densité.

**HPLC** : High performance liquid chromatography.

**IR** : Infrarouge.

**LDL** : Lipoprotéine de basse densité.

**LIPO** : Liposomes.

**LUV** : Large uni lamellar vesicles (Les vésicules unies lamellaires de grande taille).

**MLV** : Les vésicules multilamellaires.

**MVV** : Multivesicular vesicles.

**M $\beta$ -CD** : Méthyl- $\beta$ -Cyclodextrine.

**PA** : Principe actif.

**PEG** : Polyéthylène glycol.

**PLs** : Phospholipides.

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire.

**SPZs** : Spermatozoïdes.

**SUV** : Small unilamellar vesicles (Les vésicules unies lamellaires de petite taille).

**TRABS** : Marqueurs de la peroxydation des lipides.

**UV** : Ultraviolet.

**VAP** : Average path velocity (vitesse de trajectoire moyenne).

**VCL** : Curvilinear velocity (vitesse de trajectoire curviligne).

**Vit E** : Vitamine E.

**VSL** : Straight line velocity (vitesse en ligne droite).

# **Introduction**

## Introduction générale

Pendant des décennies, des composés pharmacologiques actifs ont été découverts, isolés et synthétisés. Par conséquent, ces mélanges prometteurs ne sont pas allés plus loin que la table de laboratoire, à cause des difficultés liées au mode d'administration approprié. Ce qui est le cas des composés hautement lipophiles tels que le cholestérol et la vitamine E.

Au cours des dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement des systèmes de vecteurs pour faire face aux défis associés aux propriétés physico-chimiques uniques de différents agents pharmacologiques. De nouveaux vecteurs colloïdaux (liposomes et nanoparticules) ainsi que des cyclodextrines (CDs) et des polyéthylènes glycols (PEGs) ont été utilisés pour modifier le transport de grosses molécules ou de molécules dotées de lipophilie exceptionnelle. En effet, grâce à ces progrès il sera possible de modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacologiques des médicaments existants, en manipulant différents systèmes de vecteurs au lieu de chercher de nouvelles molécules [1].

La cryoconservation des spermatozoïdes favorise le stockage et le transport du matériel génétique en vue de son utilisation dans l'insémination artificielle (IA). Pendant la cryoconservation, les spermatozoïdes subissent deux impacts délétères majeurs : le stress oxydatif et le choc thermique, réduisant ainsi la qualité du sperme. La supplémentation des milieux cryoprotecteurs et antioxydants a été signalée comme étant positive chez différentes espèces. En effet, il a été largement suggéré d'associer les antioxydants à la nanotechnologie, afin de maximiser l'activité thérapeutique, de minimiser les effets secondaires indésirables et de pallier au problème de l'insolubilité en milieu aqueux [2,3].

L'objectif de ce travail est de mettre en avant une nouvelle méthode d'encapsulation ou pseudo-encapsulation, qui est l'encapsulation in situ. Cette dernière, serait moins contraignante, plus pratique et très facilement transposable à l'échelle industrielle.

Nous nous sommes fixés comme objectif lors cette étude :

- Etudier la cinétique des molécules d'intérêt (Vitamine E et cholestérol), et voir l'amélioration de leur solubilité ;
- Effectuer une comparaison entre le procédé classique d'encapsulation et la complexation in situ ;
- Améliorer la conservation de la cellule spermatique, en essayant de trouver une solution pour pallier au problème du stress oxydatif et du choc thermique.

## Introduction générale

---

La première partie de ce manuscrit, qui est la partie bibliographique, est basée sur les axes principaux, c'est-à-dire : les agents cryprotecteurs (vitamine E et cholestérol) ainsi que les systèmes d'encapsulation (CDs, PEGs et liposomes).

La seconde partie quant à elle, détaille la méthode de travail, expose l'essentiel des résultats obtenus et leur interprétation.

Nous finalisons ce travail par une conclusion générale, qui englobera les résultats les plus marquants ainsi que les perspectives qui pourront les optimiser ou les enrichir dans le futur.

# **Cryoprotecteurs**

### I. Cryoprotecteurs

La cryoconservation se définit comme l'utilisation de très basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intact leur structures et leur fonctions. La cryoconservation du sperme joue un rôle clé dans la propagation de l'insémination artificielle (IA), car elle permet de préserver à long terme la fertilité du sperme [4,5].

Pendant la cryoconservation, les spermatozoïdes sont exposés à plusieurs effets néfastes qui réduisent leur survie et altèrent les résultats en matière de fertilité, essentiellement en relation avec les lésions de la membrane cellulaire.

En raison du cytoplasme limité des spermatozoïdes, la formation de glace intracellulaire a peu d'impact sur la membrane plasmique, mais le choc thermique et le stress oxydatif sont connus comme les facteurs d'endommagement majeurs (ce qui a un impact sur la qualité et la fertilité des spermatozoïdes). La susceptibilité au choc thermique dépend du rapport cholestérol/phospholipides. En effet, les espèces qui possèdent des rapports cholestérol/phospholipides (Chol/PLs) élevés (par exemple : le lapin et l'homme) sont plus résistantes aux chocs thermiques que les espèces à faible rapports Chol/PLs (par exemple : le bélier et le taureau) [2].

Cependant, les progrès de la nanotechnologie d'encapsulation ont contribué à la conception de nouveaux composés nanoantioxydants qui possèdent des propriétés protectrices dans la cryoconservation du sperme [3].

En d'autre terme, la supplémentation en vitamine E encapsulée dans les spermatozoïdes pourrait avoir un impact bénéfique contre le stress oxydatif qui se produit pendant la cryoconservation, qui est défini comme la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) accompagnée d'une défaillance du système antioxydant. Cependant, une fois que la vitamine E est épuisée, les spermatozoïdes deviennent vulnérables aux attaques des ROS.

Néanmoins, la supplémentation directe en cholestérol dans les milieux de congélation n'a que peu d'effet positif sur la qualité du sperme en raison de son caractère hydrophobe.

Afin de remédier au problème de solubilité, une combinaison avec des CDs, liposomes et PEG est envisageable, dans ce cas la qualité du sperme se trouve améliorée chez plusieurs espèces [2,6].

### 1.1 Cholestérol

#### I.1.1 Introduction

Le cholestérol est la substance lipidique la plus abondante du monde animal et la plus importante d'un point de vue métabolique notamment en tant que précurseur des hormones stéroïdes. C'est une molécule hydrophobe dérivée de triterpène, comportant 27 carbones [7,8].

#### I.1.2 Historique

En 1758, un juriste français passionné de médecine, François-Paul Poulletier de la Salle, découvrit en étudiant des calculs biliaires une substance « d'apparence lamelleuse, brillante feuilletée et cristalline », que ses contemporains classèrent dans la même catégorie des sels avec le sel sédatif (acide borique) et le sel de Benjoin (acide benzoïque). Loin de se douter de l'importance future de sa découverte, et malgré la curiosité de ses confrères, il ne publia aucun article à ce sujet. Antoine-François de Fourcroy, l'un des ses élèves et collaborateurs, mena ses travaux à terme, enseigna et publia de nombreux articles sur les détails concernant cette nouvelle molécule. Il la nomma « adipocire », en raison de son aspect gras et blanchâtre. Par la suite, cette substance sera retrouvée en divers sites de l'organisme dont le cerveau, et sera comparée au « blanc de baleine » et considérée comme une « altération contre nature » [9,10].

Michel-Eugène Chevreul, grand chimiste du XIXe siècle, reconnu pour son travail sur les acides gras et la saponification, reprit les travaux de Poulletier et de Fourcroy. En 1816, il redéfini ces caractéristiques physico-chimiques en un corps gras insaponifiable, et la renomma « cholestérine » (du grec chole = bile et stereos = solide). Il ne parvint cependant pas à préciser son rôle, ni s'il s'agit d'une substance physiologique ou d'un produit morbide. Sa présence dans le cerveau humain mais aussi dans le jaune d'œuf fit abandonner l'idée que celle-ci n'était qu'un déchet.

Un pharmacien français, Henri-Félix Boudet retrouva le cholestérol en 1833 dans le sang de sujets sains et ictériques soumis à la saignée. Louis-René Lecanu, un autre pharmacien français, prouva que le cholestérol circule dans le sang en 1841. Golbey montra, en 1846, que les œufs et la bile contiennent le même cholestérol.

Marcellin Berthelot, en 1859, donna à cette substance son nom définitif : le cholestérol. Il montra en effet que la cholestérine était un alcool ayant la propriété de former des esters et lui adjoint donc le suffixe approprié « -ol ». L'Américain Austin Flint, montra lui que la cholestérine était produite dans les tissus nerveux, qu'elle diffusait dans le sang et découvrit au foie une nouvelle fonction : la séparation de la cholestérine du sang et son

élimination sous forme de stercorine qu'il détaillait dans son ouvrage *Experiments Regarding a New Function of the Liver, Separating the Cholesterin of the Blood and Eliminating it as Stercorin* (1862).

Ce sont Georges Lemoine et son collaborateur Ernest Gérard, professeurs de clinique médicale à Lille, qui furent les premiers à suspecter une fonction délétère du cholestérol en 1908, en le considérant comme un agent actif de la constitution de la « bouillie athéromateuse » décrite dans les lésions d'athérome [10].

Alfred Becquerel fixa par la suite la valeur de normale de la cholestérolémie entre 32 et 175 mg/kg de sang et remarqua son augmentation en cas d'ictère. Par la suite, les travaux sur l'extraction et les méthodes de dosage du cholestérol ainsi que les recherches pour mieux comprendre le rôle de celui-ci se multiplièrent jusqu'au début du XXe siècle. Des propriétés anti-toxiques et anti-hémolytiques lui ont été attribuées, et on le disait indispensable aux défenses de l'organisme. Il fut utilisé dans le traitement de la tuberculose, du tétanos ou des anémies.

Adrien Grigaut comprit que le cholestérol était transporté dans le sang par les lipoprotéines. John W. Gofman, physicien américain, découvrit par la suite qu'il existe plusieurs sortes de ces lipoprotéines en les séparant par ultra-centrifugation analytique. C'est lui qui donna leur composition, mais aussi leurs rôles dans l'organisme, dans une série d'articles publiés entre 1949 et 1956. Lui et son équipe parvinrent à définir le rôle protecteur des HDL (High Density Lipoprotein) et le danger lié au LDL (Low Density Lipoprotein) et IDL (Intermediate Density Lipoprotein) dans la maladie coronaire [11].

### **I.1.3 Description du cholestérol**

Le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols, qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Il tire son nom du grec ancien «chole» (bile) et «stéréos» (solide), car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires [12].

Le cholestérol est une substance cireuse molle, présente dans l'organisme au niveau du foie, du cerveau et de la moelle épinière. Bien qu'il ait mauvaise presse ces dernières années, le cholestérol est un nutriment indispensable au bon fonctionnement de l'organisme : c'est un composant principal de la membrane qui entoure chaque cellule, et c'est la matière de départ ou le composé intermédiaire à partir duquel le corps synthétise les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D [13].

## Partie I : Cryoprotecteurs

### I.1.4 Structure du cholestérol

La structure admise actuellement du cholestérol a été établie dès 1932, et ce grâce aux travaux de nombreux chercheurs.

Le cholestérol comprend quatre cycles carbonés, dont trois pyraniques A, B et C (à 6 carbones) et un furanique D (à 5 carbones). Sur le carbone 3 se fixe le groupement hydroxyle-OH qui constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras, ce qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau, on parle donc d'ester de cholestérol ;

Présence d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe sur le carbone 17 (la queue aliphatique apolaire) ;

Présence d'une double liaison en position 5-6 [14,15].

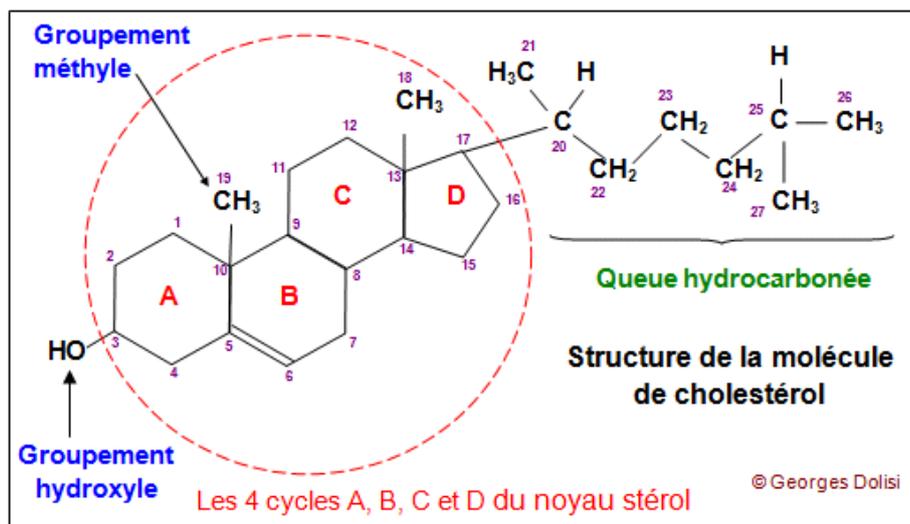


Figure 1 : structure chimique du cholestérol

### I.1.5 Propriétés physico-chimiques du cholestérol

Le cholestérol est un solide blanc, cristallin, insoluble en milieu physiologique et soluble dans les liquides organiques (dans l'alcool bouillant, l'éther, le chloroforme et le benzène). Il est sensible à l'action de la lumière. Le tableau ci-dessous récapitule les paramètres physico-chimiques les plus importants du cholestérol [15].

**Tableau 1** : propriétés physico-chimiques du cholestérol

<b>Nom chimique (IUPAC)</b>	Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol
<b>Formule brute</b>	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
<b>Masse molaire</b>	386.7 g/mol
<b>T° de fusion</b>	147 à 150°C
<b>T° d'ébullition</b>	360°C (décomposition)
<b>Solubilité</b>	Pratiquement insoluble dans l'eau
<b>Masse volumique</b>	1.07 g/cm <sup>-3</sup> 20°C
<b>Point d'éclair</b>	250°C

### I.1.6 Source du cholestérol

Le cholestérol est fabriqué par l'organisme à près de 70%. La synthèse du cholestérol peut avoir lieu dans de nombreuses cellules, mais la grande proportion du cholestérol endogène se fait dans le cytoplasme des cellules du foie, qui s'effectue par l'enzyme HMG-Co A synthase (hydroxymethylglutaryl-coenzyme A synthase).

Le reste est apporté par l'alimentation, on le retrouve alors dans de nombreux aliments d'origine animale à des taux très variables : viandes, abats, produits laitiers, crustacés, coquillages, poissons, œufs... [13].

### I.1.7 Rôles du cholestérol

- Le cholestérol est un composant majeur de la membrane cellulaire ;
- Il régule la répartition des protéines membranaires ;
- Il intervient dans la fluidité des membranes (la fluidité des membranes diminue quand la quantité du cholestérol membranaire augmente).
- Dans l'organisme humain, le cholestérol est le précurseur des :
  - Hormones stéroïdiennes tel que les progestérones, testostérones et œstrogènes ;
  - Sels biliaires, qui sont essentiels pour décomposer les aliments et en assimiler les nutriments.

- Il est indispensable pour la synthèse de la vitamine D : rôle dans l'homéostasie calcique [15,17].

### **I.1.8 Mécanisme de protection cellulaire**

La membrane spermatique est constituée de protéines et de lipides organisés en bicouches, ces derniers ont une extrémité hydrophile orientée vers l'extérieur et une extrémité hydrophobe orientée vers l'intérieur de la membrane. Les lipides les plus représentés sont les phospholipides et le cholestérol, qui peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique. A basse température, les phospholipides subissent une transition de phases, tandis que les autres constituants de la membrane spermatique ne subissent pas la transition de phases au même moment, ce qui conduit à l'instabilité de la membrane [14].

Selon certaines études, le cholestérol joue un rôle crucial et essentiel dans la cryoprotection des semences animales. Le ratio cholestérol/phospholipides (Chol/PLs) élevé des membranes spermatiques de certaines espèces, permettait leur résistance aux chocs dû au froid. Ceci s'explique par le fait que le cholestérol qui ne subissant pas de transition de phase, interagit avec les phospholipides membranaires et maintient la stabilité ainsi que la fluidité membranaire à basses températures.

Le cholestérol a un rôle important dans la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques, ce qui implique la diminution des transferts d'eau, maintenant intact la structure membranaire des cellules lors des variations osmotiques au moment de la cryoconservation [13].

### I.2 Vitamine E

#### I.2.1 Introduction

Les vitamines sont des substances organiques indispensables à la vie, qui jouent même à de très faibles doses, de grands rôles dans l'assimilation et l'utilisation des nutriments qui sont source d'énergie, en effet, en leur absence ; les glucides, les lipides et les protéines seraient inutilisables.

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser à la vitamine E qui désigne une famille de substances englobant un grand nombre de molécules de structures chimiques assez proches [16].

#### I.2.2 Historique

En 1922, Herbert Evans et Katharine Bishop, chercheurs et embryologistes de l'Université de Californie à Berkeley, constatèrent en effectuant des expériences sur des rats soumis à un régime appauvri en lipides, que ces derniers ont des troubles de la reproduction (dégénérescence des spermatozoïdes) et de la gestation (disparition du fœtus). Cependant les grossesses arrivèrent à termes lorsque le régime fut supplémenté avec des feuilles de laitue ou du germe de blé. Les deux scientifiques soupçonnèrent alors, l'existence d'un composé lipophile, qu'ils nommèrent Facteur X, indispensable au bon développement du fœtus [25].

En 1924, indépendamment des recherches de H Evans et K bishop, Bennett Sure, de l'Université de l'Arkansas, montra qu'un composé retiré d'un régime alimentaire induit la stérilité chez les rats mâles. Convaincu qu'il s'agit d'une nouvelle vitamine, elle donna à cette substance détectée par les précédents chercheurs le nom de vitamine E, ou tocophérol, du grec « tocos » qui signifie descendance et « pherein » qui signifie porte [26].

Par la suite Evans et Emerson réussirent à isoler la Vitamine E à partir d'huile de germe de blé en 1936. Erhard Fernholz en détermina la structure et la formule chimique en 1938 et Paul Karrer réussit à synthétiser  $\alpha$ -tocophérol.

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

Il fallut attendre 1968 pour que le Food and Nutrition Board du National Research Council des Etats Unis reconnaisse que la vitamine E est un élément nutritif essentiel pour l'homme, puis 2000 pour que les autorités américaines et canadiennes augmentent les apports nutritionnels recommandés (ANR) en vitamine E, le faisant passer de 10mg à 15mg par jour pour les personnes de plus de 14ans.

Les circonstances de la découverte de la vitamine E valut dans le grand public une réputation de vitamine de la fertilité, voire de la puissance sexuelle.

Séduisant, mais pas vraiment étayé par la connaissance accumulée depuis. Il n'empêche que la vitamine E a des propriétés remarquables, dont on commence à peine à entrevoir les effets sur la santé [27, 28, 16, 29].

### **I.2.3 Définition de la vitamine E**

La vitamine E est une vitamine liposoluble (soluble dans les graisses) et insoluble dans l'eau, résistante à la chaleur, à la lumière, mais instable en présence d'oxygène et détruite par les rayons UV.

D'un point de vue biochimique, cette substance existe sous huit formes différentes, quatre tocophérols, distingués les uns des autres par une lettre de l'alphabet grec : ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ ) et quatre tocotriénols ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ ).

Les tocophérols ont une structure chimique semblable à celle des hormones sexuelles. Le plus connu, le plus utilisé et le plus actif est l'alpha-tocophérol.

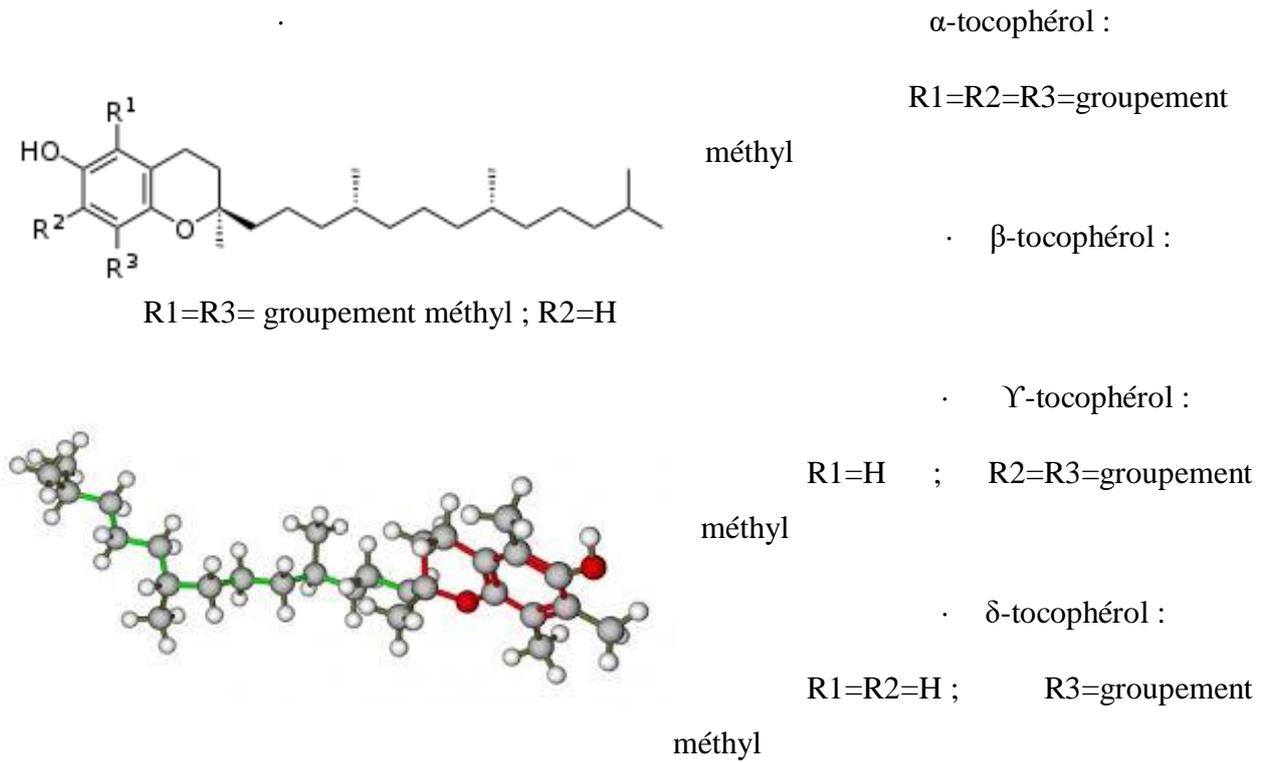
Les tocotriénols sont une forme rare de vitamine E à des doses infinitésimales [29].

### **I.2.4 Structure chimique de la vitamine E**

La vitamine E existe sous huit formes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Les Tocophérols sont des substances constituées par un noyau hydroxychromane et une chaîne latérale saturée phytyle à 16 carbones. Le nombre et la position du groupement méthyle sur le noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et tocotriénols.

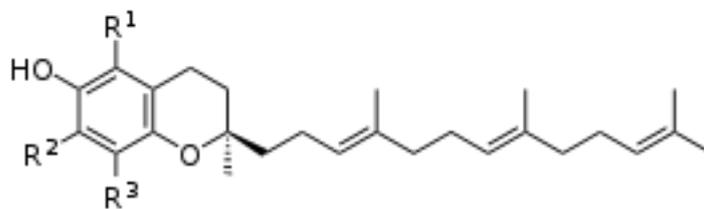
La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les  $\beta$  et  $\gamma$ -tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % environ de l'activité de la forme  $\alpha$ , alors que le  $\delta$  est pratiquement inactif) [30,31].

## Partie I : Cryoprotecteurs



**Figure 2 :** Structure et dénomination du tocophérol

Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale en position 3, 7 et 11. Naturellement présents dans la nature, les α- et β- tocotriénols possèdent une activité vitaminique (environ 20% pour l'α-tocotriénol et 5% pour le β-tocotriénol) alors que les formes γ et δ sont inactives [16].



**Figure 3 :** Structure et dénomination du tocotriénol

### I.2.5 Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

Les tocophérols sont des liquides visqueux, huileux et de couleur jaunâtre a la température ambiante, ils sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les graisses, huiles et solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, alcool éthylique et méthylique).

La vitamine E est oxydable surtout en milieu basique, à la lumière et à la température élevée. C'est une substance stable en absence d'oxygène et en milieu acide, elle est très sensible aux rayons UV avec une stabilité élevée en milieu alcalin. Le tableau ci-dessous énumère et récapitule les paramètres physico-chimiques de la vitamine E [32,33].

**Tableau 2 :** Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

<b>Nom chimique</b>	2, 5, 7,8-tetraméthyl-2-(4, 8,12-triméthyltridécyloxy)acétate
<b>Formule brute</b>	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
<b>Masse molaire</b>	430.7061 g/mol
<b>Masse volumique</b>	0.947-0.951 g/cm <sup>3</sup>
<b>Densité</b>	0.950 g/cm <sup>3</sup>
<b>Viscosité</b>	26600 mPa a 0°C 2120 mPa a 20°C 161 mPa a 60°C
<b>Température d'ébullition</b>	235°C
<b>Température de fusion</b>	3°C
<b>Point éclair</b>	240°C
<b>Indice de réfraction</b>	1.5045 (25°C)
<b>pKa/pKb</b>	11.40 (pKa)
<b>Solubilité dans l'eau</b>	<0.1 g/100 ml a 17°C
<b>Chaleur de vaporisation</b>	83.5 KJ/mol

### I.2.6 Solubilité de la vitamine E

La solubilité de la vitamine E dans un solvant dépend de manière générale des interactions qu'elle peut avoir. Entre autre, elle ne peut pas interagir physiquement avec l'eau ou toute autre phase polaire, cela dit elle est soluble dans les solvants organiques [30].

Le caractère lipophile de cette vitamine est caractérisé par la présence de groupement CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-, =CH-, et de noyaux aromatiques [34].

### I.2.7 Origines et sources de la vitamine

La vitamine E est très répandue dans la nature, elle existe sous forme naturelle ou synthétique, on la trouve aussi bien dans les aliments d'origines animales que dans les aliments d'origines végétales [35,37].

#### I.2.7.1 Origine naturelle

- Animale : Elle est présente dans les viandes, les œufs, le foie, le lait et ses dérivés. ;
- Végétale : Elle est présente en abondance dans les huiles d'origines végétales ainsi que dans les fruits secs tels que les noisettes, les arachides et les amandes [36].

**Tableau 3** : principales sources de la vitamine E

<b>Sources naturelles de vitamine E</b>	<b>Teneur en mg pour 100g</b>
<b>Huile de germe de blé</b>	150 à 500
<b>Huile de soja</b>	140
<b>Huile d'arachide</b>	15 à 30
<b>Amandes, Noisettes</b>	15 à 20
<b>Germes de céréales</b>	14 à 20
<b>Œuf, foie, maquereau</b>	1 à 2
<b>Lait maternel</b>	0.7
<b>Filet de bœuf, laitue</b>	0.6
<b>Banane, Carotte</b>	0.5
<b>Gruyère</b>	0.3
<b>Tomate, Orange</b>	0.2
<b>Lait de vache</b>	0.06
<b>Huile d'olive</b>	8 à 20

### I.2.7.2 Origine synthétique

On trouve la vitamine E synthétique sous forme de « dl-alpha tocophérol » un stéréo-isomère naturel, dans les suppléments alimentaires en vitamine E. Elle existe aussi sous forme d'acétate ou de succinate de tocophérol.

Bien que cette forme soit bénéfique, la forme naturelle reste la meilleure en guise de recommandation [38].

### I.2.8 Rôles et actions de la vitamine E

- La vitamine E est un puissant antioxydant qui neutralise les radicaux libres (dérivés réactifs de l'oxygène) cause d'agression des cellules appelés « stress oxydatif », protégeant ainsi les structures membranaires des cellules de l'organisme, ralentissant leur vieillissement prématuré et prévenant leur durcissement. Ce qui a pour conséquence le ralentissement du vieillissement oculaire, de la peau, de la prostate et le retard de l'usure des cartilages ;
- Elle est nécessaire au développement des cellules sexuelles, donc indispensable durant la grossesse, car sans elle les tissus générateurs du sang ne se développent pas de manière convenable. Elle est donc stimulante à la fertilité et à la fécondité ;
- Elle protège contre les maladies cardiovasculaires, en diminuant le taux du mauvais cholestérol (LDL) ;
- Elle renforce les défenses immunitaires, par son action anti-infectieuse.
- C'est un anti-cancer : en association avec la vitamine C, la vitamine E intervient comme un facteur de prévention retardant l'apparition de certains cancers [39, 40, 41].

### I.2.9 Toxicité de la vitamine E

La vitamine E ne semble pas avoir de toxicité même à des doses allant jusqu'à 1000mg par jour. Néanmoins, une consommation régulière et élevée d'alpha-tocophérol est susceptible d'augmenter le risque de saignement chez certaines personnes. C'est pour cela que certains spécialistes recommandent fortement d'arrêter une supplémentation en vitamine E, au moins un mois avant une intervention chirurgicale non urgente afin de réduire le risque de saignement [42].

Certaines études montrent qu'à des doses très élevées de 2000UI/jour, ce qui dépasse largement la quantité recommandée, la vitamine E peut être mortel [43].

### I.2.10 Effet de la vitamine E sur la cellule spermatique

Due à ses propriétés anti oxydantes l' $\alpha$ -tocophérol agit sur la membrane spermatique par neutralisation d' $H_2O_2$  et prévient dans la dégradation des radicaux libres. Une carence en vitamine E entraîne une altération de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes, une diminution et une dégénérescence de la spermatogenèse.

Après avoir effectué des tests de supplémentation en vitamine E sur la qualité du sperme chez l'animal et chez l'homme infertile, on constate une diminution de la quantité des TRABS (marqueurs de la peroxydation des lipides) dans le plasma séminal avec amélioration de la mobilité et la rapidité des spermatozoïdes, et une augmentation de leur concentration avec diminution des spermatozoïdes anormaux. Il a aussi été prouvé que la vitamine E a un effet positif sur la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte [44].

### I.2.11 Mécanisme antioxydant

*In vivo*, la vitamine E intervient dans la protection des structures sensibles à l'oxydation : les lipides, les bases nucléotides des brins d'ADN et des protéines. Dans ce mécanisme, la vitamine E est oxydée par les molécules préalablement oxydées (radicaux libres), sous la forme régénérable (chrome-6-oxyle  $\alpha$  tocophérol).

Pour sa régénération, ce dernier entre dans plusieurs réactions de l'organisme, ce qui nécessite la présence d'une autre vitamine (vitamine C) [45].

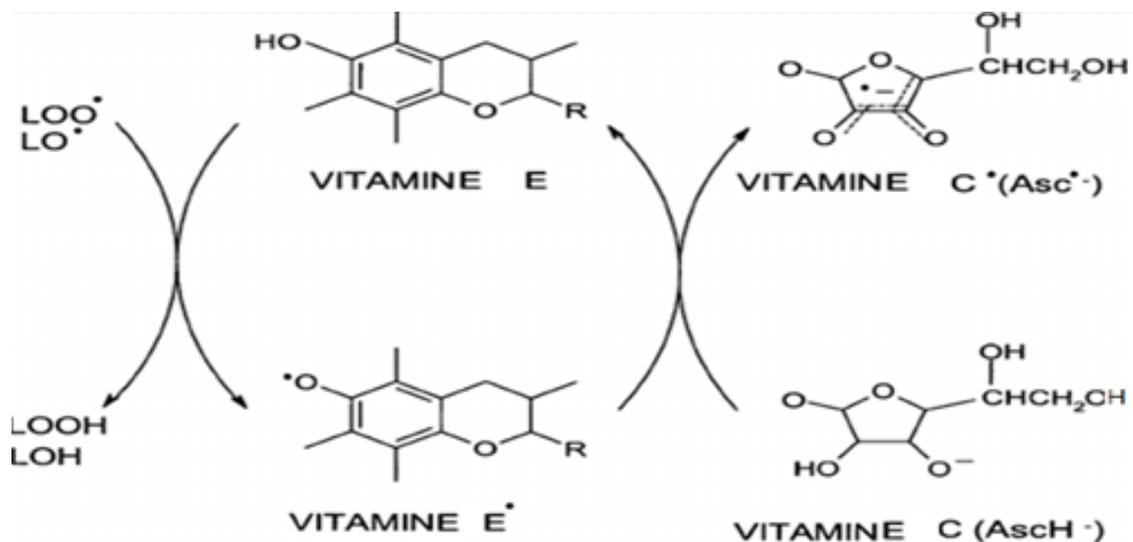


Figure 4 : Mécanisme antioxydant de la vitamine E

**Systemes de  
solubilisation et de  
vectorisation**

## II Systèmes de solubilisation et de vectorisation

### II.1 Les cyclodextrines

#### II.1.1 Introduction

Depuis leur découverte, il y a plus de 100 ans, les cyclodextrines (CDs) ont fait l'objet de nombreuses publications scientifiques. Rien qu'en 2016, plus de 2200 articles de recherche ont publiés dans des revues à comité de lecture et ont été mentionnées dans plus de 2300 brevets et demandes de brevets, dont beaucoup portaient sur des applications pharmaceutiques.

Les cyclodextrines sont parmi les molécules macrocycliques les plus remarquables, avec des impacts théoriques et pratiques importants en chimie et en biologie. Elles appartiennent à la famille des molécules-cages en raison de leur structure, qui est composée d'une cavité hydrophobe pouvant encapsuler d'autres molécules (complexe d'inclusion avec les fragments lipophiles des médicaments hydrophobes). Les CDs naturelles et leurs dérivés sont utilisés comme excipients pharmaceutiques habilitants, qui renforcent la solubilité aqueuse des médicaments peu solubles, augmentent leur perméabilité à travers les membranes biologiques et améliorent leur biodisponibilité. Par ailleurs, elles font l'objet de monographies dans les pharmacopées et sont couramment utilisées comme additifs alimentaires, incluant une grande variété d'applications pratiques telle que la pharmacie, la médecine, les cosmétiques, la catalyse, la chromatographie, la biotechnologie et la nanotechnologie qui fera l'objet de notre étude [18,19].

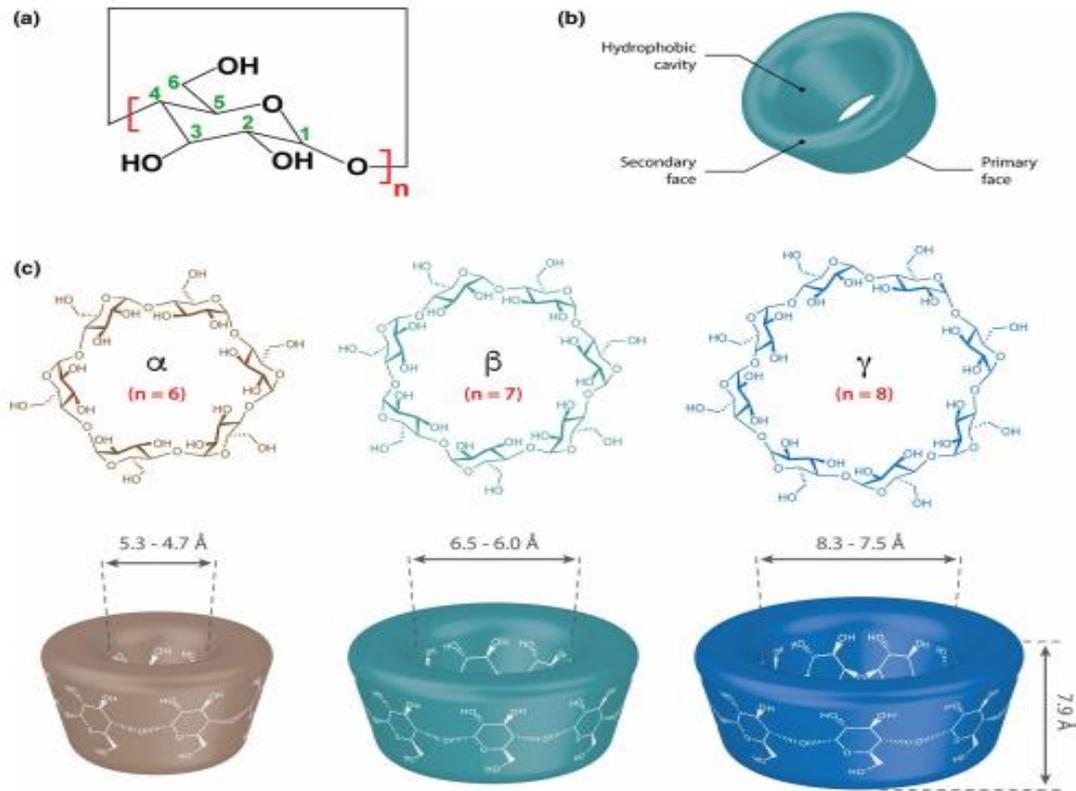
#### II.1.2 Description des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques obtenus à partir de la dégradation enzymatique de l'amidon, l'un des polysaccharides les plus essentiels de la nature. Les CDs natives typiques contiennent six, sept ou huit unités de glucose liées entre elles de manière covalente et sont  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -cyclodextrines, respectivement, ce sont les plus importantes et les plus stables à l'heure actuelle dans l'industrie (Fig. 5).

Les CDs sont des molécules creuses, en forme de cône tronqué, constituées de plusieurs unités de glucose, reliées par des atomes d'oxygène et maintenues en forme par la liaison hydrogène entre les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3, sur le bord le plus large de la cavité, ce qui fait que la partie extérieure de cette dernière est hydrophile, tandis que l'intérieur du tore présente un environnement carboné, apolaire et plutôt hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther).

## Partie II : Systèmes de solubilisation et de vectorisation

Dans les solutions aqueuses, les CDs sont capables de former des complexes d'inclusion (avec un large éventail de substances par le biais d'une relation hôte-invité) hydrosolubles de médicaments lipophiles peu solubles, en absorbant une partie de la fraction lipophile des médicaments dans la cavité centrale [13, 16, 18].



**Figure 5 :** Représentations schématiques de la structure chimique générale et tridimensionnelle des cyclodextrines, pour les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines (n=6, 7 et 8, respectivement)

### II.1.3 Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Dans le tableau ci-dessous, nous rassemblons leurs principales caractéristiques physico-chimiques.

## Partie II : Systèmes de solubilisation et de vectorisation

Tableau 1 : propriétés physico-chimiques des CDs natives les plus courantes

Cyclodextrines	$\alpha$	$\beta$	$\Gamma$
Nombre d'unités de glucose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse atomique (anhydre)	972.85	1134.99	1294.14
Longueur de la cavité, Å	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1
Diamètre de la cavité, Å	4.7-5.3	6.0-6.6	7.5-8.4
Diamètre extérieur, Å	14.6 $\pm$ 0.4	15.4 $\pm$ 0.4	17.5 $\pm$ 0.4
Volume de la cavité, Å <sup>3</sup>	174	262	427
pKa à 25°C	12.33	12.20	12.08
Solubilité dans l'eau à 25°C, g/l	14.5	1.85	23.2
Solubilité dans l'eau à 25°C, mol/l	0.1211	0.0163	0.168
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité (nH <sub>2</sub> O)	6-7	11-12	7-13

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' $\alpha$ -CD à la  $\gamma$ -CD. Mise à part la taille de sa cavité, la  $\beta$ -CD est celle qui complexe le plus grand nombre des composés et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CDs [15].

### II.1.4 Les cyclodextrines naturelles

Les CDs natives ont une solubilité qui varie de façon inattendue. En effet, la  $\beta$ -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' $\alpha$ -CD et la

$\gamma$ -CD, possède la solubilité la plus faible, ceci peut s'expliquer par la formation de liaison hydrogène entre les groupes hydroxyles situés sur les carbones C2 et C3 de deux unités adjacentes et qui rend la molécule de  $\beta$ -CD plus rigide que celle de  $\alpha$ -CD et  $\gamma$ -CD [15].

La  $\beta$ -Cyclodextrine ( $\beta$ -CD) est la plus étudiée et la plus utilisée, en raison de son faible coût et de sa disponibilité. Sa cavité centrale, qui est composée de sept unités de glucose est hydrophobe alors que la partie externe est hydrophile en raison de la présence de 21 groupes hydroxyles. Le site cœur de sa structure peut piéger ou encapsuler d'autres substances, c'est ce qui lui donne donc la capacité à former des complexes d'inclusions avec ces dernières [18].

### II.1.5 Les dérivés des cyclodextrines

Les CDs naturelles présentent en réalité plusieurs inconvénients. Des trois types de CDs, seules la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD ont une cavité de diamètre adéquat pour renfermer des molécules thérapeutiques. L' $\alpha$ -CD ne permet que de retenir des molécules de faible poids moléculaire par ailleurs les gaz. La  $\beta$ -CD est de loin la moins soluble des trois cyclodextrines natives, ce qui limite l'intérêt de son utilisation. Par conséquent, les CDs peuvent être mis en réaction avec une grande variété de réactifs pour obtenir des dérivés de CDs solubles dans l'eau, Par exemple :

- les dérivés de CDs hydroxypropylés ( HP - $\beta$ CD et HP  $\gamma$ -CD) sont obtenus en traitant les CDs naturelles avec de l'oxyde de propylène ;
- Les CDscarboxyméthylés (CM  $\beta$ -CD) en traitant les CDs naturelles avec de l'oxyde de monochrome ;
- Les CDsméthylées de façon aléatoire (par exemple RM  $\beta$ -CD) par traitement des CDs naturelles avec de l'iodure de méthyle et du sulfobutyle [19].

### II.1.6 Les complexes d'inclusion

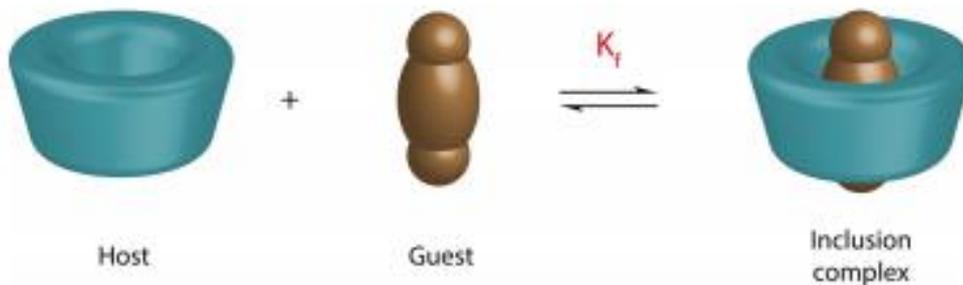
Un complexe d'inclusion est une espèce chimique constituée par l'association de deux ou plusieurs molécules [15].

En raison de leur capacité à modifier les propriétés physico-chimiques des médicaments et d'autres composés, les CDs permettent l'administration de médicaments peu solubles dans l'eau et chimiquement instables dans l'organisme, et ce par formation de complexes d'inclusion.

La molécule hôte est capable d'inclure la molécule invitée dans sa cavité centrale, et ce en absorbant une partie de la molécule du médicament dans cette dernière par la plus grande ouverture de la CD, la molécule invitée est incluse d'une manière à éloigner sa portion

## Partie II : Systèmes de solubilisation et de vectorisation

polaire afin d'avoir un maximum de contact avec la cavité hydrophobe et sa partie polaire interagit avec la surface hydrophile, ce qui donne une encapsulation stable sans formation de liaison covalente, et ce dans le but de solubiliser les médicaments hydrophobes, de les stabiliser et d'augmenter leur biodisponibilité. Dans les solutions aqueuses, les molécules de médicament liées au complexe d'inclusion CD sont en équilibre dynamique avec les molécules de médicament libres. Les molécules de médicament sont facilement libérées du complexe lors de la dilution du milieu ou par complexation compétitive [20].



**Figure 6 :** Représentation schématique du phénomène d'inclusion entre une molécule de cyclodextrine (l'hôte) et un soluté (l'invité) pour former des complexes soluté-cyclodextrine

La détection de la formation des complexes d'inclusion a été étudiée par de nombreuses méthodes physico-chimiques :

- Dans les solutions aqueuses, des études de solubilité (Higuchi et Connors, 1965) ;
- Les méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie UV/visible ;
- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ;
- Spectroscopie infrarouge (IR) ;
- Analyses calorimétriques différentielles (DSC) [15,19].

Afin de former ces complexes d'inclusion, plusieurs méthodes peuvent être utilisées, telles que :

- Co-évaporation ;
- Co-mélange ;
- Pétrissage ;
- Extrusion ;
- Neutralisation ;

- Co-précipitation ;
- Lyophilisation, atomisation ou pulvérisation ;
- Inclusion à sec ;
- Inclusion en suspension ;
- Inclusion en méthode humide ;
- Inclusion par micro-ondes ;
- Inclusion au CO<sub>2</sub> supercritique [15].

### II.1.7 Avantages des cyclodextrines

Les CDs présentent les avantages suivants :

- Stabilité dans une large gamme de pH ;
- Augmentation de la stabilité chimique, physique et thermique de la molécule encapsulée ;
- Biocompatibilité, biodégradabilité et non-toxicité (le glucose est un produit qui se dégrade facilement) ;
- Protection des globules rouges contre l'hémolyse ;
- Non volatilité et non inflammabilité ;
- Faible activité pharmacologique ;
- Absence d'absorption dans la gamme d'UV utilisée pour la détection des solutés [15,16].

## II.2 Polyéthylène glycol

### II.2.1 Introduction

Le polyéthylèneglycol (PEG) est un polymère qui désigne une très large famille de composés chimiques, comprenant à la fois les polymères d'éthylène glycol mais également l'ensemble des ingrédients qui en sont dérivés. Les polymères ont été classés en fonction de leur poids moléculaire et présentent des propriétés uniques (par exemple, point de congélation/fusion, solubilité), et de leur structure (par exemple, linéaire ou ramifiée). La modification d'un médicament avec du PEG est une technologie bien connue pour améliorer les propriétés physicochimiques et les réponses biologiques d'un médicament, c'est pourquoi, les PEGs sont largement utilisés comme ingrédients pharmaceutiques dans les pommades, les suppositoires, les crèmes, les lotions, les lubrifiants, les enrobages de comprimés et les solubilisants pour injection [21,22].

### II.2.2 Définition des PEGs

On appelle PEG, Polyéthylène Glycol des polyéthers linéaires de masse moléculaire <20000 g/mol synthétisés à partir de monomère d'oxyde d'éthylène. Ces polymères (PEGs) sont appelés « Macrogol » dans le domaine pharmaceutique et médical [21].

Les PEGs sont biocompatibles, flexibles, solubles dans l'eau et présentent une faible toxicité car ils sont éliminés par les voies rénales et hépatiques si leur masse molaire est <30000 g/mol, cependant les PEGs ayant une masse molaire <400 g/mol présentent une certaine toxicité [23].

### II.2.3 Structure des PEGs

Les PEGs sont de formule chimique générale  $H-(CH_2-CH_2-O)_n-OH$  et de structure :

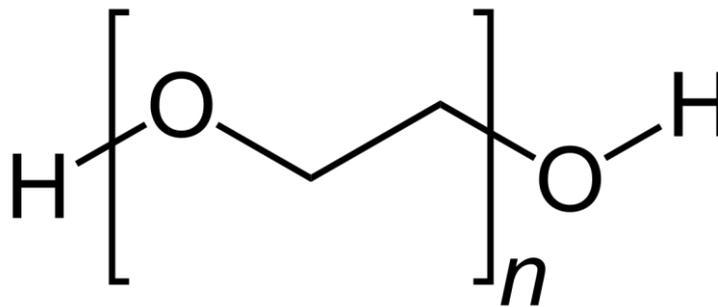


Figure 7 : structure chimique générale des PEGs

Ce sont des polymères où  $n$  représente le nombre moyen de groupes oxyéthyléniques ( $n \geq 4$ ).

Remarque : lorsque la masse est  $> 20\ 000$  g/mol, ces polyéthers sont plus communément dénommés poly (oxyde d'éthylène) ou poly (oxyéthylène) c'est-à-dire PEO ou POE [21].

### II.2.4 Propriétés physico-chimiques des PEGs

Le PEG a plusieurs propriétés :

- Il est ni absorbé, ni fermenté ;
- Il est soluble dans l'eau et dans beaucoup de solvants organiques tels que : le toluène, le chlorure de méthylène, l'éthanol et l'acétone ;
- Il résiste à la reconnaissance du système immunitaire, ainsi qu'à l'adsorption des protéines et des cellules [23,24].

Les PEGs et dérivés ayant un poids moléculaire moyen ( $< 600$  g/mol), sont des liquides visqueux incolores à température ambiante, tandis que ceux de poids moléculaire plus élevé ( $> 600$ g/mol) sont des solides blancs cireux [13].

**Tableau 5 : Propriétés physiques des PEGs**

Spécifications	PEG 200	PEG 400	PEG600	PEG1500	PEG4000	PEG6000
	PEG-4	PEG-8	PEG-6	PEG-32	PEG-90	PEG-135
<b>Valeur moyenne du n</b>	4	8.2-9.1	12.5-13.9	29-36	68-84	158-204
<b>Valeur moyenne du poids moléculaire en g/mol</b>	190-210	380-420	570-630	1300-1600	3000-7000	7000-9000
<b>Température de fusion (°C)</b>	/	4-8	20-25	44-48	54-58	56-63
<b>Masse volumique à 25°C en g.cm3</b>	1.127	1.128	1.128	1.210	1.212	1.21
<b>Point d'éclair (°C)</b>	/	223-245	/	266	270	270

### II.2.5 Rôle des PEGs

- Il augmente l'activité enzymatique en raison des interactions favorables entre la coenzyme NADP et PEG ;
- Le PEG 400 permet une haute solubilité des sels et peut être utilisé dans des réactions d'oxydation et de substitution ;
- Le PEG augmente le volume et l'hydratation du contenu intestinal ;

- Le PEG enlève les cellules précancéreuses de la muqueuse et agit pratiquement comme anticancéreux cytotoxique classique, et n'est ni absorbé, ni toxique, ni coûteux;
- Le PEG protège les épithéliums contre les agressions physiques et chimiques du flux fécal ;
- De plus, le PEG par ces propriétés de polymère amphiphile favorise la restauration des membranes cellulaires lésées [23].

### II.2.6 Domaines d'application

Les macrogols sont utilisés sous formes liquides pour les préparations des produits pharmaceutiques tels que les parentérales pour des capsules de gélatines, on fait également appel au PEG dans le domaine cosmétique pour la préparation des crèmes où il agit comme agent de nettoyage mais aussi dans les déodorants et parfums.

Les PEGs sont appliqués dans de nombreux domaines tels que :

- Le secteur pharmaceutique et cosmétique (pommades, crèmes, parfums, lotions..) ;
- Le domaine médical où ils sont utilisés pour la cicatrisation des plaies et pour la régénération des tissus ;
- Les industries du textile et du cuir, comme plastifiants, agents antistatiques et agents émulsifiants ;
- L'industrie du caoutchouc, comme lubrifiants, agents de démoulage et accélérateurs de vulcanisation ;
- L'industrie céramique, comme plastifiants et agents liants ;
- Les PEGs200 à PEG600 sont utilisés comme composants des fluides de travail des métaux [13].

### II.2.7 Méthodes de préparation des complexes PEGs/PAs

Etant donné que le PEG est un polymère biocompatible, hydrophile et non toxique, il est utilisé dans le piégeage des molécules hydrophobes. Ceux de poids moléculaire entre 1500 et 20000, est utilisé dans la dispersion solide : la dispersion d'un ou plusieurs principes actifs dans une matrice solide inerte.

Il existe plusieurs méthodes de préparation des dispersions solides telles que :

- Le procédé de fusion ;
- La méthode d'évaporation de solvant ;
- L'atomisation (séchage par pulvérisation) ;
- La lyophilisation ;

## **Partie II : Systèmes de solubilisation et de vectorisation**

---

- La méthode de co-précipitation ;
- La méthode de pétrissage ;
- Le procédé d'émulsification [13].

### II.3 Les liposomes

#### II.3.1 Introduction

Le terme liposome ne s'applique qu'à l'entité comprenant une vésicule et une composition à base de phospholipides. C'est un terme qui dérive de deux mots d'origine grecque « lipos » qui signifie gras et « soma » qui signifie corps.

Elle a été découverte par Alec Bangham et ses confrères dans les années 60 suite à des travaux de microscopie électronique effectués sur une suspension de phospholipides d'origine cellulaire [46].

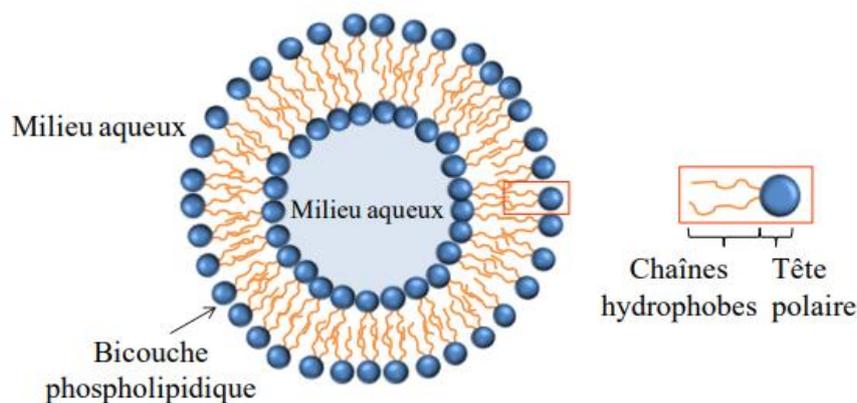
Les liposomes ont d'abord été un outil d'étude précieux pour les physiciens et les physico-chimistes dans la compréhension du comportement des composés amphiphiles en solution. Ils furent ensuite développés dans la recherche pharmaceutique en tant que vecteurs de médicaments car ils permettent d'encapsuler des principes actifs de solubilité différente, par la suite, traités par les biologistes comme modèle pour l'étude de perméabilité cellulaire.

Les applications des liposomes sont désormais très variées dans différents secteurs, tel que l'agroalimentaire, le cosmétique et la pharmacie.

Cette partie, va porter particulièrement sur la signification du terme « liposome », puis sur l'étude chimique de cette dernière (découverte, synthèse, caractérisation, propriétés...etc.) et enfin sur son étude biologique (application, stabilité ...etc) [47].

#### II.3.2 Qu'est-ce qu'un liposome ?

Les liposomes sont des systèmes d'encapsulation de structures sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux internes. Ils sont caractérisés par la courbure des bicouches lipidiques composées de phospholipides, entourant une partie du solvant environnant, mais aussi de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux ou d'autres composés. [47].



**Figure 8 :** Structure d'un liposome

La taille du liposome va dépendre de la technique utilisée pour le synthétiser, elle est environ 70fois plus petite qu'un globule rouge, de l'ordre de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètre de diamètre. Les liposomes peuvent encapsuler et délivrer efficacement à la fois des substances hydrophiles (dans le noyau central aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface membrane/eau) [47].

### II.3.3 Composition d'un liposome

Les phospholipides constituent l'élément principal des liposomes avec ou sans cholestérol. Ils sont non-toxiques non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables.

Les phospholipides (PLs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une zone polaire chargée à forte affinité pour l'eau, et d'une zone apolaire (hydrophobe) constituée de chaînes aliphatiques.

Ils sont formés d'un glycérol estérifié par deux acides gras (R1 et R2) et a un groupement phosphoryle. C'est ce groupement, qui donne le nom aux différents phospholipides [44].

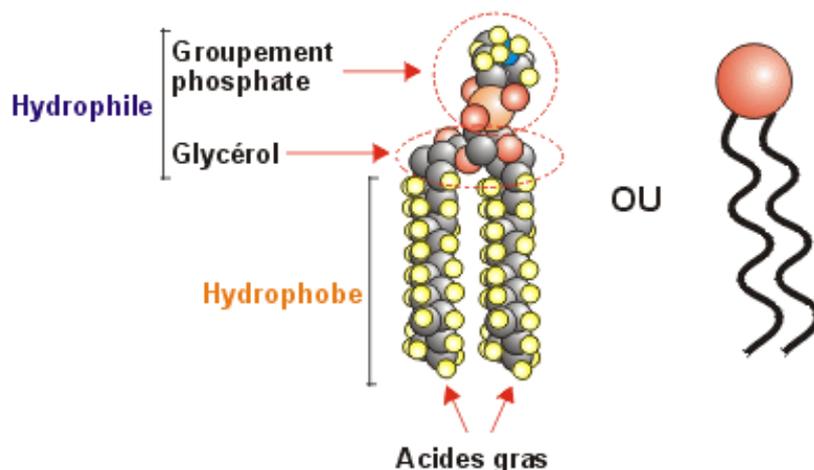


Figure 9 : Représentation d'un phospholipide

Tableau 6 : Exemple de groupement chimique associe au phosphate des phospholipides.

Nom classique	Abréviations	Formule chimique du groupement associe au phosphate des phospholipides
Acide phosphatidique	PA	-H
Phosphatidylcholine	PC	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$
Phosphatidyléthanolamine	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
Phosphatidylsérine	PS	$-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{COO})\text{NH}_3^+$
Phosphatidylglycérol	PG	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$

Les Phospholipides les plus utilisés sont les glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithine de soja ou jaune d'oeuf) ou synthétiques (phosphatidylcholines, phosphatidylglycérols et phosphatidylethanolamine) et des sphingolipides (sphingomyelins). Les phospholipides naturels sont disponibles à différents degrés de pureté. Ils sont hétérogènes (longueur de chaîne lipidique, degré d'insaturation) et leur utilisation peut être limitée par des problèmes de stabilité chimique (péroxydation, dégradation enzymatique). Les

dérivés synthétiques sont d'une grande pureté, stables et définis selon leur composition. Les phospholipides pouvant former des bicouches ont deux chaînes hydrocarbonées (généralement 14 à 18 atomes de carbone) qui peuvent être de même longueur ou, dans les phospholipides dit mixtes, de longueur différentes. [44].

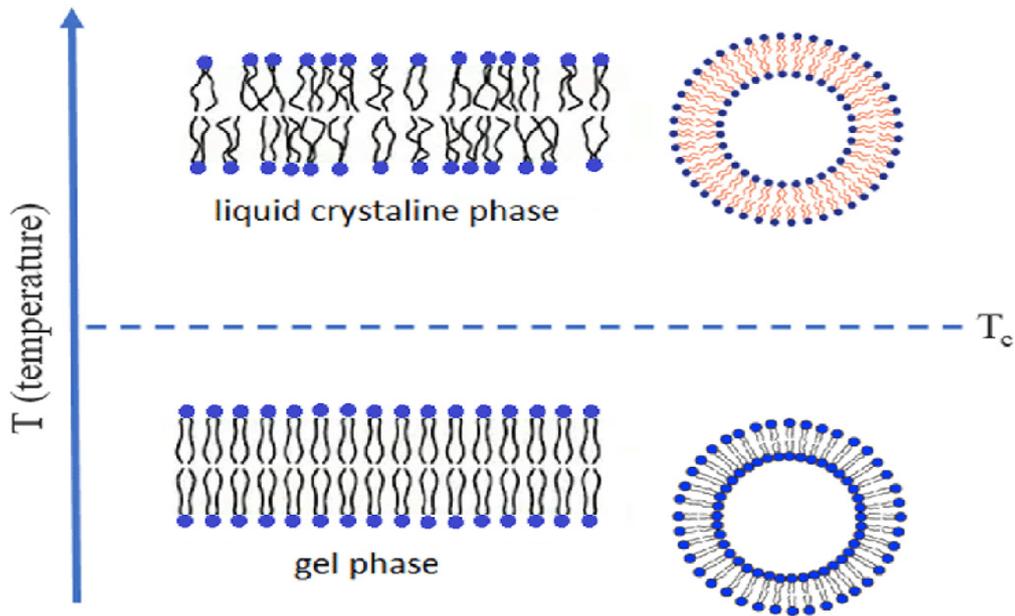
Les molécules de phospholipides ont tendance à s'auto organiser en solution, de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires qui se trouvent dans le milieu environnant. L'incorporation dans la bicouche lipidique de phospholipides chargés négativement comme le phosphatidylglycerol, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, ou l'acide phosphatidique ou des lipides chargés positivement comme le stéarylamine qui permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles. [44].

Des sphingolipides (sphingomyeline) peuvent entrer également dans la composition des liposomes. La sphingomyeline avec le cholestérol sont à l'origine de la formation de micro-domaines rigides dans les membranes [44].

### II.3.4 Température de transition de phase des liposomes

$T_m$  ( $T_m$ , melting température) est un paramètre thermodynamique généralement utilisé pour étudier la fluidité de la bicouche lipidique.

C'est une température de transition de phase qui caractérise les phospholipides et qui correspond au passage d'un état gel ordonné vers un état fluide désordonné via un état intermédiaire. Elle varie en fonction de la longueur et du degré de saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides. Ainsi, la  $T_m$  augmente proportionnellement avec la longueur des chaînes car les interactions de Van der Waals augmentent. Par contre, la  $T_m$  diminue avec le nombre d'insaturation qui défavorise les interactions entre les chaînes. Cette température doit être prise en considération lors de la préparation des liposomes. Ces derniers ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase [45,46].



**Figure 10 :** Différentes phases de liposomes suivant la température de transition de phase

Voici un tableau illustratif de quelques exemples de la température de transition de phase de certains phospholipides.

**Tableau 7 :** Températures de transition de phases de certains phospholipides

Phospholipides	T <sub>m</sub> (°C)
DMPC (14 :0)	23
DPPC (16 :0)	41
DSPC (18 :0)	55
DOPE (18 :1)	-16

Les liposomes ne se forment que si la proportion en eau est suffisante et si sa température est supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. Dans le cas de mélanges de phospholipides, la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la T<sub>m</sub> du phospholipide la plus élevée [45].

### Les stéroïdes

Le stérol le plus utilisé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30% dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur diminution) [46].

### **II.3.5 Classification des liposomes**

Il existe différentes classes de liposomes, le plus souvent classés selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais aussi classés selon des critères plus fonctionnels (application *in vivo*, composition ou même selon leur méthode de préparation) [47].

Classification des liposomes selon leurs critères morphologiques :

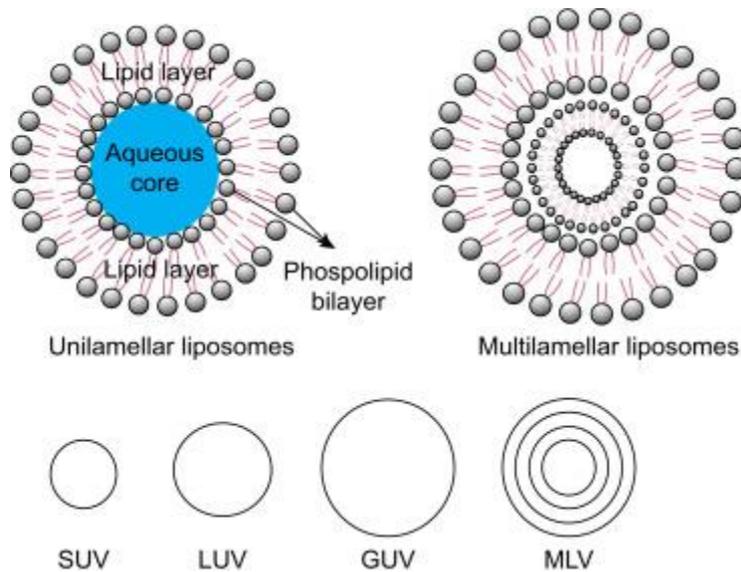
Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon le nombre de bicouches lipidique ou lamellarité. Entre autre, les liposomes peuvent avoir des membranes à une ou deux couches et une taille de vésicule qui varie de (0,025  $\mu\text{m}$ ) à (2,5  $\mu\text{m}$ ). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères :

- Les vésicules unies lamellaires sont constituées d'une seule bicouche concentrique. En fonction du diamètre des liposomes, on a deux types :
  - Les vésicules unies lamellaires de petite taille (small unilamellar vesicles ou SUV) ;
  - Les vésicules unies lamellaires de grande taille (large uni lamellar vesicles ou LUV) ;
- Les vésicules multilamellaires (MLV) sont constituées de plusieurs bicouches [48].

## Partie II : Systèmes de solubilisation et de vectorisation

**Tableau 8 : Classification des liposomes**

Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
<b>Représentation</b>				
<b>Taille</b>	20-100nm	100-1000nm	Taille très hétérogène	> 1µm
<b>% d'encapsulation</b>	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV	Peu utilisés
<b>Stabilité</b>	Plus le rayon de courbure est grand, plus la tension de surface est faible : MLV LUV SUV. La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm.			



**Figure 11 : Représentation des liposomes multi lamellaires et unies lamellaires**

### II.3.6 Stabilité des liposomes

Une suspension liposomiale peut être sujette à une forme d'instabilité physique et chimique.

La stabilité physique est reliée à la conservation de la taille des liposomes, par contre la stabilité chimique est en relation avec la conservation de la structure et de la composition moléculaire des constituants. Les principaux problèmes d'instabilité des liposomes et leurs solutions sont abordés ci-dessous [49].

### II.3.6.1 Stabilité physique (Agrégation des liposomes)

Les liposomes sont des vésicules à doubles couches qui se forment lorsque les phospholipides sont hydratés dans l'eau.

Des phénomènes de fusion ou coalescence peuvent se produire dans une suspension liposomiale aboutissant à des agrégats. Ainsi, l'incorporation dans la bicouche lipidique de lipides chargés négativement ou positivement réduit le phénomène d'agrégation grâce à l'augmentation des forces électrostatiques répulsives entre les liposomes. De plus, l'inclusion du cholestérol au sein des liposomes leur confère une meilleure stabilité. Le greffage des polymères comme le PEG à la surface des liposomes les stabilise. En effet, la PEGylation empêche les contacts inter-particulaires par répulsion stérique et l'adsorption des molécules de reconnaissance des systèmes immunitaires (les opsonines) ce qui augmente le temps de séjour de ces liposomes dans le système vasculaire [35, 40, 50, 51].

### II.3.6.2 Stabilité chimique (Dégradation des liposomes)

Les phospholipides assurent la stabilité de la membrane du liposome. Ces molécules sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leur fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles. Ceci altère l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut entraîner la libération des principes actifs encapsulés [34,52].

### II.3.7 Méthode de préparation des liposomes

Le choix de la méthode de préparation des liposomes dépend de plusieurs paramètres :

- Les propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée et celle des composants liposomiques.
- La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques sont dispersées.
- La concentration encapsulée et sa toxicité potentielle.

Par ailleurs, les méthodes de préparations des liposomes se divisent en quatre groupes principaux :

- Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides.
- Les méthodes basées sur l'élimination du détergent.

- Les méthodes basées sur la transformation des liposomes préformés : la congélation-décongélation (Freeze-thawmethod).
- Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique [40, 41, 53, 54].

### II.3.8 Avantages et inconvénients des liposomes

#### II.3.8.1 Avantages des liposomes

- Les liposomes augmentent l'efficacité et l'index thérapeutique du médicament (actinomycine-D) ;
- Les liposomes sont adaptés pour la livraison du PA hydrophobe et hydrophile.
- Les liposomes augmentent la stabilité via l'encapsulation ;
- Les liposomes réduisent l'exposition des tissus sensibles aux PAs toxiques.
- Les liposomes sont non toxiques, flexibles, biocompatibles, complètement biodégradables et non immunogènes ;
- Les liposomes réduisent la toxicité des agents encapsulés et augmentent l'effet des médicaments chimio-thérapeutiques ;
- Les liposomes modifient la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament ;
- Les liposomes peuvent être administrés par voies diverses [55].

#### II.3.8.2 Inconvénients des liposomes

- Faible solubilité.
- Courte demi-vie.
- Coût de production élevé.
- Fuites et fusions des PAs encapsulés.
- Le phospholipide subit parfois une réaction de type oxydation et hydrolyse [55].

### II.3.9 Encapsulation des substances dans les liposomes

L'encapsulation efficace et stable des substances médicamenteuses dans les liposomes est l'un des principaux challenges de l'industrie pharmaceutique depuis une dizaine d'années. L'encapsulation liposomique consiste en l'injection, active ou passive, du principe actif à l'intérieur du liposome et dépend pleinement de ses propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...) mais aussi fortement des caractéristiques du liposome lui-même (taille, type, composition et concentration en lipides). [56].

Les substances peuvent être incorporées dans la phase aqueuse ou dans la phase organique selon leur polarité et cela dans toutes les méthodes de préparation des liposomes ;

le principe actif est ajouté dans la phase aqueuse quand il est lipophile. Dans ce cas, on peut facilement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules :

- Dans le compartiment aqueux ou espace inter lamellaire, pour les substances hydrosolubles.
- Dans les bicouches lipidiques pour les substances liposolubles.

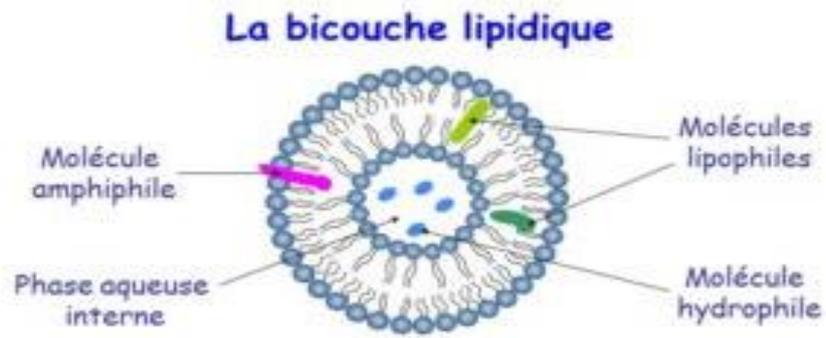
D'autre part, l'encapsulation peut se faire de deux façons : l'encapsulation active, et l'encapsulation passive. L'encapsulation passive signifie que le principe actif est injecté directement dans la préparation du liposome, soit du côté de la phase organique soit du côté de la phase aqueuse. L'encapsulation active correspond quant à elle, à l'injection des substances actives (médicaments) dans les liposomes déjà préformés. [56].

Plusieurs paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées, telles que : la mesure de l'efficacité et l'encapsulation par la mesure du taux d'encapsulation, l'encapsulation pondérée et le volume aqueux d'encapsulation [56].

### II.3.10 Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes

Le principal critère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé. Les molécules peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles.

- **Les substances hydrophiles** sont les plus faciles à encapsuler, on peut les dissoudre directement dans la phase aqueuse. Ce sont aussi les plus intéressantes du fait qu'elles pénètrent souvent mal dans les cellules d'où l'intérêt de leur encapsulation. Sans pour autant négliger la charge des composés hydrophiles qui peuvent influencer l'efficacité de l'encapsulation et sa stabilité dans le temps.
- **Les substances hydrophobes** sont plus difficiles à encapsuler et se comportent différemment, certains seront totalement ou partiellement fixés sur la membrane, suivant la concentration et certains, non.
- **Les substances amphiphiles** sont plus compliquées à encapsuler quel que soit le type de liposome. Ces composés peuvent passer à travers la membrane et se distribuer dans la bicouche lipidique et dans la phase aqueuse mais ils s'échappent rapidement des liposomes [56].



**Figure 12 :** Schéma d'un liposome uni lamellaire avec localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité

**Etude *in situ***

### III. Etude *In situ*

*In situ* est une locution latine qui signifie sur place, elle est utilisée en général pour désigner une opération ou un phénomène observé à l'endroit où il se déroule ; sans le prélever ni le déplacer, par opposition à *ex situ*. L'expression comporte des significations spécifiques dans des contextes très divers et dans différents domaines : la médecine, la biologie, l'environnementale, l'art...etc.

Sa signification est en général intermédiaire entre *in vivo* et *in vitro*, par exemple, examiner une cellule au sein d'un organe intact entier et sous perfusion peut signifier un examen *in situ*. Ceci n'est pas implicitement une expérience *in vivo* car l'animal est sacrifié, mais ce n'est pas exactement la même situation que de travailler avec la cellule isolée (ce qui pourrait être un parfait exemple d'expérience *in vitro*).

De nombreuses études ont été effectuées afin de démontrer l'évolution des études *in situ* et leur apport bénéfique au sein du monde de la science.

On citera quelques travaux :

- **En 2004**, Masakooda et al ont travaillé sur les  $\beta$ -cyclodextrine comme agent solubilisant approprié pour l'étude de l'absorption *in situ* de médicaments peu solubles dans l'eau. Cette étude a été entreprise pour trouver un agent possédant une grande capacité de solubilisation et présentant un impact modulateur minimal sur l'intégrité des membranes et l'absorption [59].
- **En 2005**, N.jessel et al ont effectué une étude approfondie sur la délivrance d'ADN *insitu*, multiple et programmée dans le temps, médiée par de la CD incorporée dans une multicouche de polyélectrolytes. Le principe de base de la thérapie génique est que les gènes peuvent être utilisés pour produire des protéines thérapeutiques *in situ*. L'administration contrôlée de complexes d'ADN à partir de biomatériaux offre la possibilité de renforcer le transfert de gènes en maintenant une concentration élevée d'ADN dans le microenvironnement cellulaire. Les activités biologiques de ces films de polyélectrolytes ont été testées en induisant par *in situ* la production d'une protéine spécifique dans le noyau ou dans la cellule.

Ces résultats ouvrent voie à de nombreuses applications potentielles, par exemple dans la vaccination [60].

- **En 2011**, Hitendra S. Mahajan et al ont réalisé une étude basée sur le gel nasal *in situ* contenant de l'hydroxypropyl- $\beta$ -CDs d'inclusion d'artéméter. L'objectif de la

présente étude était d'explorer la formulation et l'évaluation du gel *in situ* pour l'administration artéméther (ARM), un agent antipaludéen peu soluble dans l'eau, en utilisant une technique de gélification induite par la température en utilisant le polymère mucoadhésif Hydroxy PropylMethyl Cellulose (HPMC) K4M.

Les gels *in situ* ainsi préparés ont été caractérisés pour leurs propriétés de gélification, leur viscosité, leur force de gel, leur résistance à l'usure, leur mucoadhésion, la teneur en médicament et le taux de libération du médicament ainsi pour leurs études histopathologiques.

L'examen histologique des formulations n'a montré aucun dommage remarquable à la muqueuse nasale. La formulation a également conservé une bonne stabilité dans des conditions accélérées sur une période de 90 jours. Grâce à ces propriétés, elle peut être utilisée comme un système de livraison efficace pour la voie nasale. Ces systèmes gélifiants *in situ* seraient définitivement utiles pour le paludisme cérébral [61].

- **En 2012**, Yuan yuan et al ont travaillé sur le Gel *in situ* thermosensible et mucoadhésif à base de poloxamère comme nouveau support pour l'administration rectale de nimésulide. L'objectif principal de la présente étude était de développer des gels rectaux thermosensibles et mucoadhésifs de nimésulide (NM) par l'utilisation de polymères mucoadhésifs tels que l'alginate de sodium (Alg-Na) et HPMC. Ces gels ont été préparés par l'ajout de polymères mucoadhésifs (0,5 %) aux formulations d'une solution gélifiante thermosensible contenant du poloxamer 407 (18%) (étant lui-même un excellent gélifiant, néanmoins, ces gels possèdent une faible bioadhésivité et une perméabilité élevée à l'eau, ce qui a limité son application en tant que matrice thermosensible) et du nimésulide (2,0%). La température de gélification et la vitesse de libération du médicament des gels *in situ* préparés ont été évaluées en utilisant du (PEG).

La température de gélification a été significativement augmentée avec l'incorporation de nimésulide (2,0 %) dans la solution tandis que l'ajout des polymères mucoadhésifs a joué un rôle inverse sur la température de gélification. Parmi les formulations examinées, le poloxamère 407/nimesulide/alginate de sodium/PEG 4000 (18/2,0/0,5/1,2 %) a présenté la température de gélification appropriée, un taux de libération du médicament plus élevé et un taux de libération plus faible.

En outre, les résultats micrographiques ont montré que le gel *in situ*, administré à la dose de 20 mg/kg, était sûr et n'irritait pas les muqueuses [62].

- **En 2019**, Yongkang Xi et al de l'Université de Gothenburg ont effectué une étude sur l'émulsion sensible au pH avec des enveloppes assemblées de Cyclo dextrine/Vitamine E pour la délivrance contrôlée d'acides gras polyinsaturés.

Les systèmes d'administration à base de lipides (LBDS) sont largement appliqués dans le domaine pharmaceutique et soins de santé en raison de la biodisponibilité accrue des composants lipophiles, lorsqu'ils sont co-administrés avec des repas riches en graisses. Cependant, la manière de contrôler avec précision leur libération et leur stabilité *in vivo* reste un défi. Lors de cette étude, après avoir introduit l'estérification simple et la co-précipitation, ces professeurs ont créé un composite bi fonctionnel ODS- $\beta$ -CD-VE par le co-assemblage de  $\beta$ -CD, d'anhydride octadécényl succinique et de vitamine E.

En résumé, un système de délivrance à base de lipides avec une fonction antioxydante et une libération déclenchée par le pH a été construit en établissant une émulsion de Pickering stabilisée par ODS- $\beta$ -CD-VE. Cette stratégie a permis d'obtenir facilement une excellente stabilité oxydative. Un contenu à peine hexanal a été examiné pour un système d'administration lors d'une oxydation accélérée à 45 °C pendant 30 jours. Avec la protonation/déprotonation des groupes carboxyle à différents pH, l'émulsion stabilisée par l'ODS- $\beta$ -CD-VE est demeurée intacte pendant le traitement simulé de l'estomac et a montré un taux soutenu d'hydrolyse des lipides dans l'intestin grêle simulé.

Ce système d'administration pourrait être facilement étendu à l'administration d'autres substances *in vivo*, comme des compléments alimentaires et même des produits pharmaceutiques. Cette stratégie d'application et d'importance pratique peut susciter un grand intérêt chez les chercheurs [63].

La mise en place d'expérimentation *in situ* est une démarche récente (une vingtaine d'années) dont l'intérêt croissant s'explique en partie par la réalisation d'expositions réalistes sur le plan environnemental et par conséquent par sa pertinence pour limiter les erreurs ou les difficultés à extrapoler les données obtenues en laboratoire. Si l'intérêt des approches *in situ* dans les démarches d'évaluation des

risques est reconnu, leur utilisation reste anecdotique et demande encore de nombreux développements, notamment en ce qui concerne la standardisation [16].

# **Travaux antérieurs**

### IV. Travaux antérieurs

Pour être efficace et pertinent dans notre travail, nous avons recensé les études et travaux déjà effectués sur l'encapsulation par trois différents systèmes : Liposomes, CDs et PEG.

**En 2019**, Apratim Jash et al ont travaillé sur la solubilité de la phosphatidylcholine dans le dioxyde de carbone supercritique : Données expérimentales modélisation thermodynamique et application à la synthèse de liposomes bioactifs. La solubilité de la phosphatidylcholine (PC) dans le CO<sub>2</sub> supercritique (SC-CO<sub>2</sub>) a été mesurée expérimentalement en utilisant un système dynamique pour la gamme de pression et de température de 12,4-17,2 MPa et 313-353 K, respectivement. Trois bioactifs modèles ont été simultanément co-encapsulés dans les liposomes synthétisés : un bioactif lipophile, la vitamine E, et deux bioactifs hydrophiles, la vitamine C et la vitamine E.

La vitamine E, la vitamine C et le sulfate de fer ont montré une efficacité d'encapsulation moyenne de 95, 77,8 et 63,3 %, respectivement [64].

**En 2020**. L. TAOUZINET et al, ont cherché à améliorer la solubilité de l' $\alpha$ -tocophérol avec l'utilisation de liposomes. L'approche expérimentale de ce travail, était de charger la vitamine E dans les liposomes préparés par la méthode d'injection d'éthanol et l'optimisation a été réalisée par un plan d'expérience. La solution optimale a été caractérisée par HPLC et par microscope électronique à balayage. L'impact sur la motilité des spermatozoïdes aussi a été finement étudié par la technique de réfrigération du sperme bovin.

La solution optimale a été obtenue en utilisant 10.9mg/ml de phospholipides, 1.7mg/ml de cholestérol et 2mg/ml de vitamine E. La taille du liposome était de 99.86% en fournissant 78.74% d'efficacité chargée. Les résultats ont montré un impact positif et significatif sur la motilité des spermatozoïdes après plusieurs heures de conservation [65].

**En 2020**. Amokrane et al on étudié l'effet de l'association de la vitamine E et du polyéthylène glycol (PEG) sur le sperme de lapin réfrigéré : Impact sur la motilité des spermatozoïdes et le stress oxydatif. La présente recherche visait à déterminer si le microscope polyéthylène glycol 6000 (PEG) pouvait améliorer la solubilité de la vitamine E et contribuer à protéger la motilité des spermatozoïdes et leur état oxydatif. La motilité et l'état oxydatif de la perméabilité ont été significativement protégés lors de l'utilisation de PEG et de Vit E individuellement ; cependant, les effets les plus puissants ont été observés dans le traitement PEG/Vit E. Ce travail a démontré que le traitement du sperme de lapin avec de la

## Partie IV : Travaux antérieurs

---

vitamine E complexée au PEG 6000 (PEG/Vit E) est efficace pour protéger les spermatozoïdes pendant la réfrigération à 4°C.

La solution optimale a été obtenue en utilisant 10.9mg/ml de phospholipides, 1.7mg/ml de cholestérol et 2mg/ml de vitamine E. La taille du liposome était de 99.86% en fournissant 78.74% d'efficacité chargée. Les résultats ont montré un impact positif et significatif sur la motilité des spermatozoïdes après plusieurs heures de conservation [66].

**En 2021.**L.TAOUZINET et al, ont étudié le rôle de différents antioxydants dans la cryoconservation des spermatozoïdes et de leurs effets thérapeutiques améliorés par leur formulation à l'aide de la nanotechnologie.

Les résultats ont démontré que la supplémentation en antioxydants dans l'extenseur de sperme améliore sa qualité et sa fertilité après décongélation [3].

**En 2021.** Shigesaburo Ogawa et al ont travaillé sur le développement d'un véhicule insoluble dans l'eau comprenant un complexe naturel de CD et de vitamine E. Dans cette étude, un véhicule comprenant un composite naturel composé de vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et de CDs a été développé, en vue d'applications biologiques liées à l'eau. Un effet cryoprotecteur prédominant par le véhicule  $\gamma$ -CD-Toc dans des conditions de stress oxydatif a été confirmé. Ainsi, le nouveau véhicule de vitamine E utilisant le  $\gamma$ -CD comme stabilisateur a été proposé, élargissant l'utilisation du Toc pour des applications biologiques [67].

# **Matériels et méthodes**

### V Matériels et méthodes

#### V.1 Matériels, appareillages et produits chimiques utilisés

##### V.1.1 Produits chimiques

Cholestérol,  $C_{27}H_{46}O$ , « 386.7 g/m » (Bio Chem) ; Vitamine E,  $C_{29}H_{50}O_2$ , « 430.7061g/mol » (Sigma Aldrich) ; Cyclodextrine méthylée ( $\beta$ M-CD), « 1331.4 g/mol » (Sigma Aldrich) ; Polyéthylène glycol 6000,  $H-(CH_2-CH_2-O)_n-OH$  (Bio Chem) ; Phospholipides (90H, saturés) ; Méthanol analytique  $CH_3OH$ , « 32,04 g/mol » (Honeywell, Riedel-de-Haen) ; Méthanol grade-HPLC  $CH_3OH$ , « 32,04 g/mol » (Bio Chem) ; Acétonitrile grade-HPLC,  $C_2H_3N$ , « 41,05 g/mol » (Bio Chem) ; Ethanol,  $C_2H_5OH$ , « 46,07 g/mol » (Bio Chem) ; Tris (Fructose  $C_6H_{12}O_6$  « 180.16g/mol », pénicilline « 334.39g/mol », acide citrique  $C_6H_8O_7$  « 192.1235g/mol », tris  $C_4H_{11}NO_3$  « 121.14g/mol »).

##### V.1.2 Matériels

Bécher, pipette, vials, barreaux magnétiques, filtre à seringue (45 $\mu$ l).

##### V.1.3 Appareillages

Balance analytique (Denver) ; Plaque multi postes agitatrice (Velp Scientifica) ; appareil de HPLC ; Rota vapeur (Buchi).

##### V.1.4 Préparation des complexes (procédé)

###### V.1.4.1 Vitamine E

###### Complexe CDs/Vit E, Co-évaporation [Ratio 1 :1] :

- Peser une masse équivalente à 275mg de vit E, et 725mg de  $\beta$ M-CD ;
- Dissoudre dans 50ml d'éthanol et laisser sous agitation pendant 24h ;
- Passer dans un ROTA vapeur (à 60°C) afin d'éliminer le solvant.

###### Complexe PEG/Vit E, dispersion solide [Rapport 90% 10%] :

- Peser 900mg de PEG ainsi que 100mg de vit E, les suspendre ensuite dans 50 ml d'éthanol ;
- Passer dans un ROTA vapeur pour éliminer le solvant.

###### Complexe Lipo/Vit E, injection éthanolique :

- Peser 162mg de phospholipides, 25.5mg de cholestérol et 80mg de vit E ;
- Dissoudre les masses dans 15ml d'éthanol, mettre sous agitation durant 30min à 40°C ;
- Injecter la phase organique résultante dans 40ml de phase aqueuse (TRIS) ;
- Passer dans un ROTA vapeur.

### V.1.4.2 Cholestérol :

#### Complexe CDs/Chol, Co-évaporation [Ratio 1 :1] :

- Peser une masse équivalente à 2541mg de cholestérol, et 7459mg de  $\beta$ M-CD ;
- Dissoudre dans 50ml d'éthanol et mettre sous agitation durant 24h ;
- Passer dans un ROTA vapeur pour éliminer le solvant.

#### Complexe PEG/Chol, dispersion solide [Rapport 90% 10%] :

- Peser 900mg de PEG ainsi que 100mg de cholestérol ;
- Dissoudre les masses dans 50ml d'éthanol et laisser sous agitation pendant 24h ;
- Passer dans un ROTA vapeur.

### V.1.5 Préparation de la solution tampon à un pH de 7.4

- Préparer un volume équivalent à 393.4ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0.1M ;
- Ajouter 250ml de phosphate mono potassique à 0.2M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ;
- Ajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

## V.2 Test de dissolution

### V.2.1 Protocole opératoire

#### V.2.1.1 Procédé classique d'encapsulation

- Peser des masses des différents complexes obtenues par Co-évaporation, injection éthanolique et dispersion (tableau 5) ;
- Dissoudre dans 50ml de tampon phosphate ;
- Laisser sous agitation pendant 48h, en effectuant des prélèvements à des t différents ;
- Filtrer et quantifier par HPLC.

## Partie V : Matériels et méthodes

---

**Tableau 9** : Masses des différents complexes utilisés obtenues par procédé classique d'encapsulation

<b>Complexe</b>	<b>Masse/Volume</b>
PEG/Chol	18.4mg
CDs/Chol	7.08mg
PEG/Vit.E	18.6mg
CDs/Vit.E	6.55mg
Lipo/Vit.E	1ml

### V.2.1.2 In situ

#### V.2.1.2.1 Vitamine E

- Peser une masse équivalente à 2 mg de vitamine E, associée aux différents systèmes d'encapsulation (CDs, PEG et liposomes)
- Introduire les masses dans 50ml de solution tampon préalablement préparée ;
- Mettre sous agitation pendant 48h et prélever des volumes à différents t dans des vials HPLC ;
- Filtrer et quantifier par HPLC.

#### V.2.1.2.2 Cholestérol

- Peser une masse équivalente à 2mg de cholestérol, associée aux différents systèmes d'encapsulation (CDs, PEG) ;
- Introduire les masses dans 50ml de tampon phosphate ;
- Mettre sous agitation pendant 48h en effectuant des prélèvements dans des vials HPLC à différents t ;
- Filtrer et quantifier par HPLC.

On trouve dans le tableau ci-dessous, les différentes masses utilisées :

**Tableau 10** : tableau récapitulatif des masses utilisées lors de la complexation in situ de la vitamine E

Complexe	Vit.E/CDs		Vit.E/PEG		Vit.E/composants de liposomes		
	Vit.E	$\beta$ M-CD	Vit.E	PEG	Vit.E	Chol	PLs
Masse (mg)	2	6.18	2	18	80	25.5	162

## Partie V : Matériels et méthodes

---

**Tableau 11** : tableau récapitulatif des masses utilisées lors de la complexation in situ du cholestérol

<b>Complexe</b>	<b>Chol/CDs</b>		<b>Chol/PEG</b>	
<b>Substance</b>	Chol	$\beta$ M-CD	Chol	PEG
<b>Masse (mg)</b>	2	6.88	2	18

### V.2.1.2.3 Association Vit.E+Chol/CDs :

- Peser une masse de 2mg en vitamine E et en Cholestérol ;
- Les dissoudre dans 50ml de tampon phosphate ;
- Laisser sous agitation durant 48h ;
- Prélever à des t différents ;
- Filtrer et quantifier par HPLC.

### V.2.2 Courbe d'étalonnage

Préparation de six concentrations différentes de cholestérol et de vitamine E, qu'on retrouve ci-dessous :

**Tableau 12** : préparation des solutions de la courbe d'étalonnage

Concentration (mg/ml)	Volume du méthanol (ml)
0.06	25
0.04	25
0.032	25
0.02	25
0.01	25
0.005	25

- Agitation 10min ;
- Filtrer et remplir les vials HPLC ;
- Injecter dans l'HPLC.
- ❖ Les conditions opératoires selon lesquelles les solutions obtenues sont quantifiées par HPLC :
  - Mode : isocratique ;
  - Phase mobile : 68% méthanol, 28% acétonitrile, 4% eau pure ;
  - Colonne : C18 ;
  - Longueur d'onde : 208 nm ;
  - Volume d'injection : 20  $\mu$ l ;
  - Temps de rétention : 10 min ;
  - Débit : 1.5 ml/min ;
  - Température : 36°C.

### V.3 Modèles semi-empiriques

Un grand nombre de modèles mathématiques empiriques et mécanistiques sont proposés pour décrire la cinétique de libération de molécules actives à partir de systèmes

## Partie V : Matériels et méthodes

---

générés par des procédés d'encapsulation (matriciels, réservoir) obtenus généralement à partir de polymères.

Le Tableau 13 récapitule les équations des modèles les plus utilisés et la nature des mécanismes qui contrôlent la libération :

**Tableau 13** : Les modèles mathématiques régissant les mécanismes de libération

<b>Modèles mathématique</b>	<b>Equation</b>	<b>Nature du mécanisme</b>
<b>Ordre zéro</b>	$Mt = M_0 + K_0t$	Vitesse de libération indépendante de la concentration du principe actif dissous
<b>Premier ordre</b>	$dC/dt = -K_1$	Vitesse de libération dépendante de la concentration du principe actif dissous
<b>Higuchi</b>	$Mt = K_{Hi} \cdot t^{0.5}$	Libération par diffusion
<b>Korsmeyer Peppas</b>	$Mt / M_{\infty} = K_{KP} \cdot t^n$	La magnitude de l'exposant n indique le mécanisme de libération (transport Fickien, transport non-Fickien)

**Mt**: quantité du principe actif libéré dans le temps t ;

**M<sub>∞</sub>**: quantité total du principe actif libéré lorsque la forme posologique est épuisée ;

**M<sub>0</sub>**: quantité initiale du principe actif dans la forme posologique ;

**K<sub>0</sub>** : constante du modèle d'Ordre Zéro ;

**K<sub>1</sub>** : constante du modèle de Première ordre ;

$K_{Hi}$  : constante dans le modèle de Higuchi (Higuchi, 1963) ;

$K_{KP}$  est la constante de libération incorporant les caractéristiques structurelles et géométriques de la forme posologique ; tel que  $n$  exposant diffusionnel indiquant le mécanisme de libération du principe actif (Korsmeyer et al, 1983).

### V.4 Test de motilité (test spermatique)

#### V.4.1 Matières et produits chimiques utilisés

Tris, fructose, acide acétique, pénicilline, vitamine E, Cholestérol, phospholipides, CDs, PEG.

Gonades.

#### V.4.2 Matériels

Micropipette (5 à 10 $\mu$ l et 1000 $\mu$ l) ;

Eppendorf ;

Vials ;

Chambre MACLER.

#### V.4.3 Appareillages

Balance analytique (DENVER) ;

Réfrigérateur biologique (LG) ;

Microscope CASA (MiKoneclipse E200).

#### V.4.4 Préparation du TRIS

Peser 2420mg de tris, le mettre ensuite dans une fiole de 100ml ;

Rajouter 1380mg d'acide acétique, 2420mg de tris, 1000mg de fructose ainsi que 100mg de pénicilline ;

Ajuster la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### V.4.5 Préparation des traitements

##### V.4.5.1 Vitamine E

Peser directement dans un vial une masse équivalente (voir le tableau 14) de vitamine E associée aux différents systèmes de vectorisation (CDs, PEG et liposomes) ;

Y ajouter 5ml de tampon Tris à chaque traitement.

##### V.4.5.2 Cholestérol

Peser directement dans un vial une masse équivalente (voir le tableau 15) de cholestérol, associée aux différents systèmes de vectorisation (CDs, PEG) ;

Y ajouter 5ml de tampon Tris à chaque traitement.

Préparer aussi des solutions à base des complexes obtenues par procédé classique (Co-évaporation, injection éthanolique et dispersion) et du tampon Tris.

## Partie V : Matériels et méthodes

---

**Tableau 14 :** Masses de vitamine E et des différents systèmes d'encapsulation

Vitamine E/CDs		Vitamine E/PEG		Vitamine E/lipo		
Vit.E (mg)	$\beta$ M-CD (mg)	Vit.E (mg)	PEG (mg)	Vit.E (mg)	Chol (mg)	PLs (mg)
10	30.35	10	90	10	3.16	20.25

**Tableau 15 :** Masses du cholestérol et des différents systèmes d'encapsulation

Chol/CDs		Chol/PEG	
Chol (mg)	$\beta$ M-CD (mg)	Chol (mg)	PEG (mg)
10	34.42	10	90

### V.4.6 Récolte du sperme épидидymaire

- Après abattage, les gonades sont transportées dans une glacière au laboratoire dans les plus courts délais.
- Après nettoyage de la matrice, on commence par isoler l'épididyme et le canal déférant du testicule ;
- Le tissu conjonctif est soigneusement séparé de l'épididyme ;
- L'épididyme est ponctionné puis rincé avec une solution physiologique pour éviter toute contamination de la semence ;
- Récupération du sperme par la méthode de pression à l'aide d'une seringue introduite dans le canal déférant et qui va pousser le sperme vers la sortie (incision) déjà faite au niveau de la queue épидидymaire ;
- Les spermatozoïdes récupérés seront placés dans un eppendorf, en essayant de ne pas avoir de pertes

### V.4.7 Réfrigération du sperme

- Juste après la récolte de la semence, le volume et la motilité massale sont évalués (avec 5 $\mu$ l de semence et 1ml de sérum physiologique) ;
- On dilue la semence à 1/200 afin de déterminer la concentration (nombres des spermatozoïdes) ;
- Ensuite on dilue le sperme dans 900  $\mu$ L de traitement (contrôle) pour avoir une concentration finale de 10<sup>8</sup> spz/mL ;
- L'analyse s'effectue à l'aide du CASA, à des temps différents, 15 min, 2 heures, 4 heures et à 24 heures de réfrigération à T= 4°C.

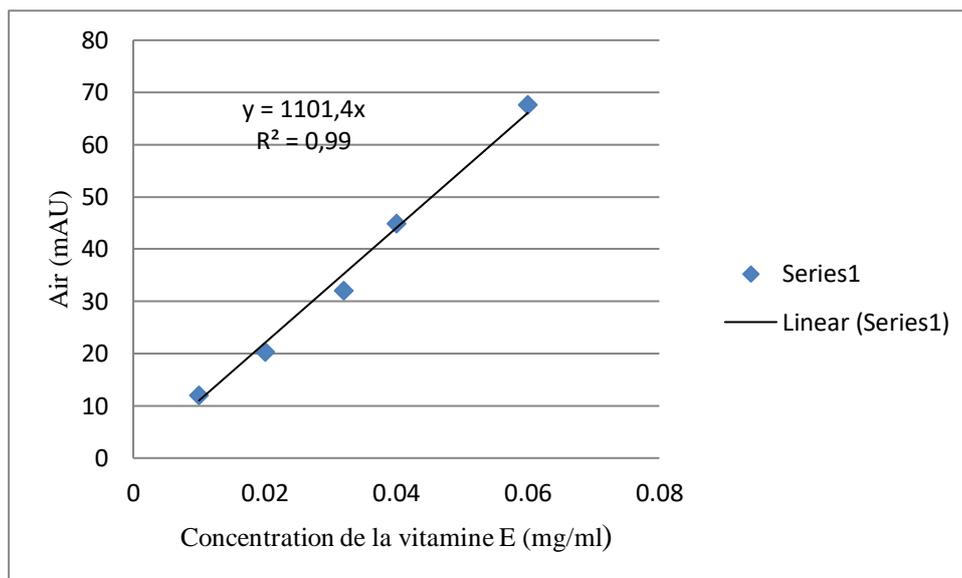
# **Résultats et discussions**

### VI. Résultats et discussions

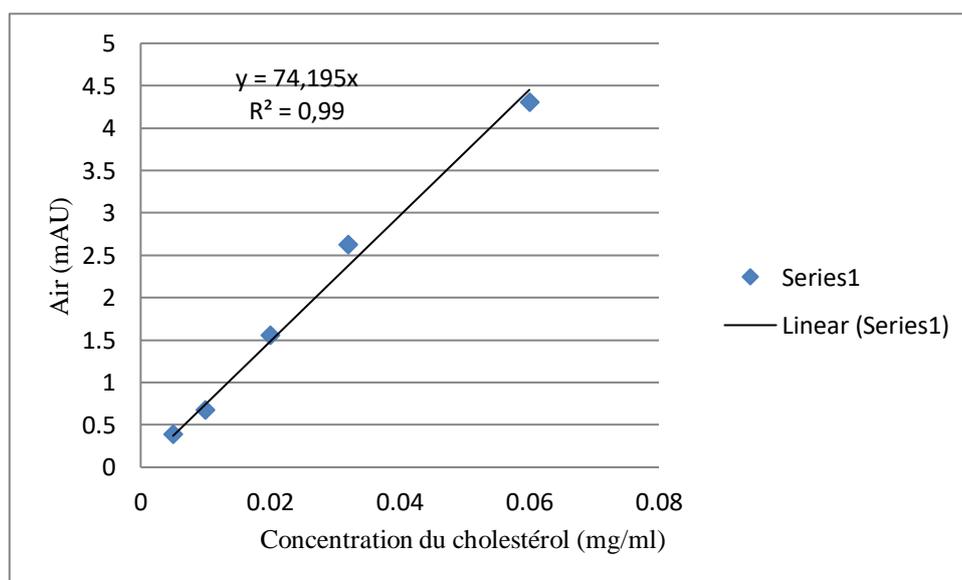
#### VI.1 Courbe d'étalonnage

##### Résultats

Les courbes d'étalonnage obtenues de la vitamine E et du cholestérol sont présentées respectivement dans les figures ci-dessous :



**Figure 13** : Courbe d'étalonnage de la vitamine E



**Figure 14** : Courbe d'étalonnage du cholestérol

### Observation

Nous remarquons que les deux droites d'étalonnage, passent par l'origine, celles-ci nous fournit des droites dont l'équation est du type  $y=a*x$  ; avec  $y$ =Air du pic,  $a$ = pente,  $x$ = concentration de l'élément actif.

Tel que :  $Y(\text{vit.E})=1101x$  ;

$Y(\text{chol})=74.19x$ .

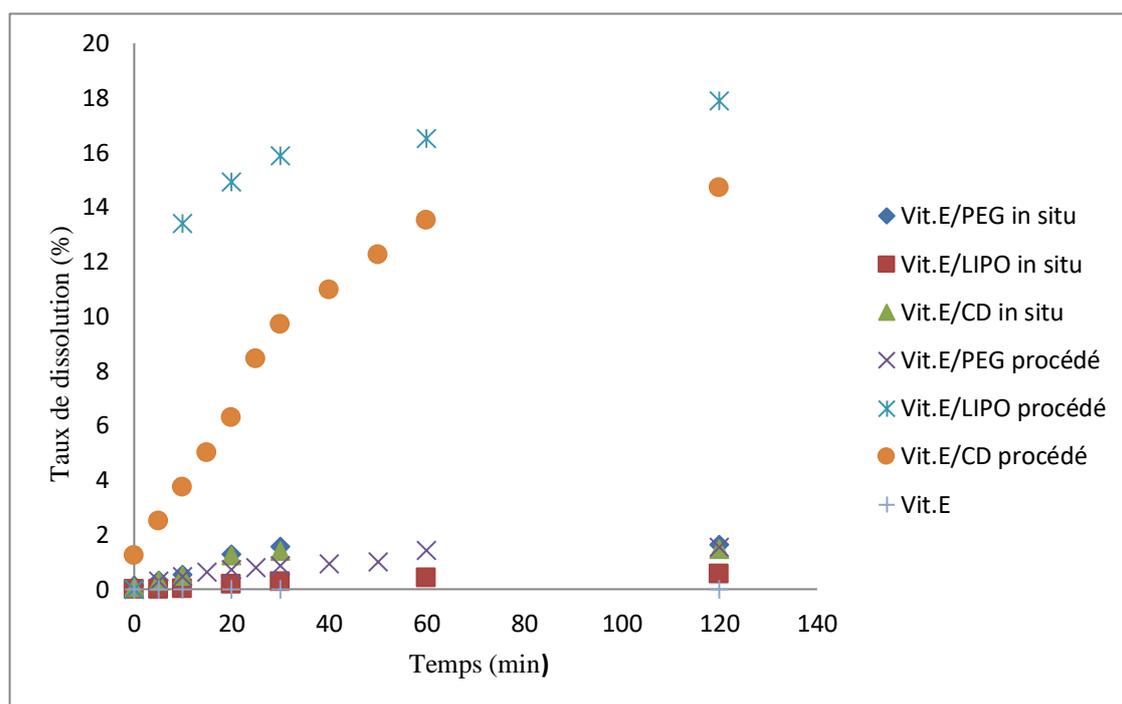
### Interprétation

La courbe  $\text{air}=f(t)$  montre qu'il y a une relation directement proportionnelle entre les airs et les concentrations de la Vit.E et du Chol. Ceci est justifié par le coefficient de corrélation  $R^2$  qui est proche de 1, tel que  $R^2(\text{vit.E})= 0.99$  et  $R^2(\text{Chol})=0.99$ . Ainsi la linéarité est vérifiée.

## VI.2 Cinétique de la dissolution

### VI.2.1 Cinétique de la dissolution de la vitamine E

Les profils de dissolution des complexes de la vitamine E sont présentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 15 :** Profil de dissolution de la vitamine E encapsulée dans les CDs, PEG et liposomes par procédé d'encapsulation classique et par in situ

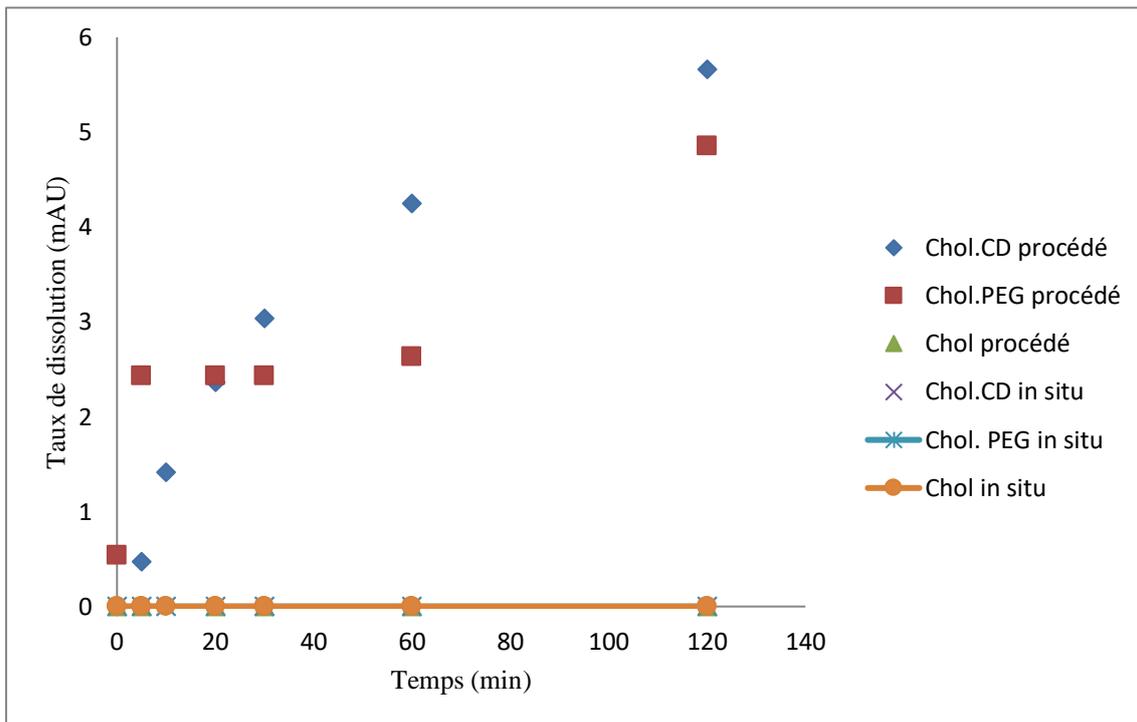
### Observation

Les complexes VitE/CDs, VitE/PEG et VitE/LIPO obtenues par la méthode *in situ*, n'ont pas amélioré la solubilité de la VitE, car d'après le graphe on remarque que les profils de dissolution de la VitE seule ou encapsulées sont quasiment identiques.

Les complexes VitE/CD et VitE/LIPO obtenue par procédé classique d'encapsulation, respectivement, Co évaporation et injection éthanolique, montrent de bons résultats lors du test de dissolution, ce qui indique une amélioration de la solubilité de la VitE puisque leur taux de dissolution est de 14% pour le complexe Vit.E/CD et 18% pour la vitamine liposomiale, contrairement au complexe Vit.E/PEG qui ne montre aucune amélioration de la solubilité de la VitE.

### VI.2.2 Cinétique de la dissolution du cholestérol

Les profils de dissolution des complexes du cholestérol sont présentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 16 :** Profil de dissolution du cholestérol encapsulé dans les CDs, PEG et liposomes par procédé d'encapsulation classique et par in situ.

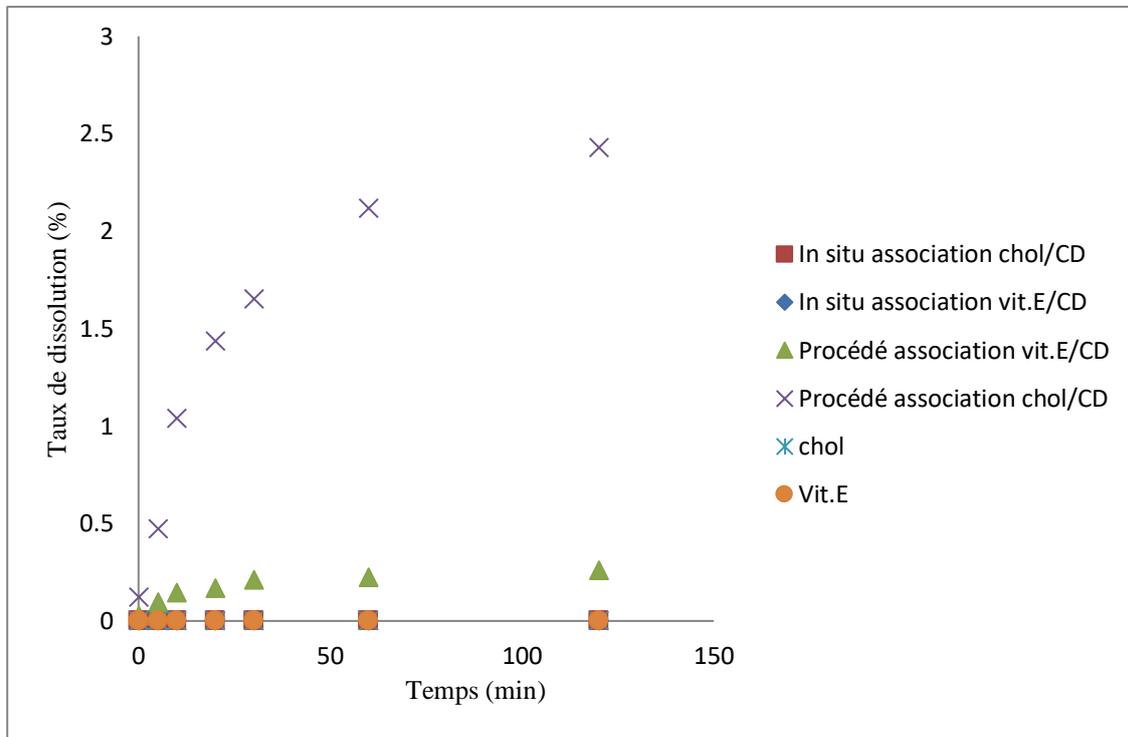
#### Observation

Les complexes Chol/CD et Chol/PEG obtenus par in situ n'ont pas amélioré la solubilité du cholestérol, car les profils de dissolution du cholestérol seul ou encapsulé sont identiques et ne présentent aucun profil de libération.

Les complexes Chol/PEG et Chol/CD obtenus par procédé classique d'encapsulation ont donné de meilleurs résultats, mais toujours avec une faible amélioration de la solubilité.

### VI.2.3 Cinétique de dissolution de la vitamine E et du cholestérol en association

Les profils de dissolution des complexes de la vitamine E et du cholestérol sont présentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 17 :** Cinétique de dissolution de la vitamine E et du cholestérol en association par procédé classique d'encapsulation et par in situ.

#### Observation

Lors de l'association in situ du Chol et de la Vit.E par les CDs, Ces derniers ne se solubilisent pas, car les profils de dissolution des PAs seuls ou encapsulés sont presque identiques et ne présentent aucun profil de libération.

Lors de l'association par le procédé d'encapsulation, on voit une meilleure solubilité pour le Chol avec un taux de 2.4% comparé à la Vit.E qui est très faible (0.3%).

On en conclue que le cholestérol se solubilise mieux en association et a une meilleure affinité avec les CDs. Cette observation correspond à ce que Shigesabu Ogawa et al ont trouvé lors de la rédaction de leur article en 2021, qui porte sur le développement d'un véhicule insoluble dans l'eau comprenant un complexe naturel de CD et de vitamine E.

### Interprétation des résultats

Le faible taux de dissolution des complexes obtenus par *in situ* (Ajout instantané de la substance active et du système d'encapsulation dans le milieu traitant) peut être expliqué par la faible solubilité aqueuse des molécules actives, qui est dû à une non formation de complexes. Par contre, lors du procédé d'encapsulation on obtient nettement de meilleurs résultats.

L'explication que nous avançons est que lors du procédé, les étapes nécessaires pour l'encapsulation et piégeage sont maintenues, (solubilisation du principe actif en utilisant des solvants organiques, chaleur, pression, agitation) comme l'ont démontré Shigesu et Ogawa et al lors de la rédaction de leur article en 2021, qui porte sur le développement d'un véhicule insoluble dans l'eau comprenant un complexe naturel de CD et de vitamine E.

## Partie VI : Résultats et discussions

### VI.3 Modélisation mathématique

Un grand nombre de modèles mathématiques empiriques et mécanistiques sont proposés pour décrire la cinétique de libération de molécules actives à partir de systèmes générés par des procédés d'encapsulation (matriciels, réservoir) obtenus généralement à partir de polymères.

Les résultats bruts obtenus se trouvent dans l'annexe 2.

#### Observation

Grâce aux graphes obtenus lors de la modélisation, nous avons obtenues les résultats ci-dessous.

#### VI.3.1 Procédé classique d'encapsulation :

**Tableau 16** : Modélisation des données de dissolution de la vitamine E par procédé d'encapsulation classique

Modèle mathématique		Cyclodextrines	Polyéthylène glycol	Liposomes
<b>0 ORDER</b>	<b>K</b>	0.001	000	000
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.42	0.45	0.797
<b>1st ORDER</b>	<b>K</b>	-0.001	000	-0.001
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.484	0.456	0.547
<b>Higuchi</b>	<b>K</b>	0.014	0.001	0.013
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.923	0.958	0.693
<b>Korsmeyer Peppas</b>	<b>K</b>	0.4	0.4	0.4
	<b>N</b>	0.4	0.4	0.4
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9528	0.9785	0.8112

## Partie VI : Résultats et discussions

---

**Tableau 17** : Modélisation des données de dissolution du cholestérol par procédé d'encapsulation classique

Modèles mathématique		Cyclodextrines	Polyéthylène glycol
<b>0 ORDER</b>	<b>K</b>	000	000
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.757	0.049
<b>1st ORDER</b>	<b>K</b>	000	000
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.769	0.087
<b>Higuchi</b>	<b>K</b>	0.005	0.004
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.975	0.660
<b>Korsmeyer Peppas</b>	<b>K</b>	0.4	0.4
	<b>N</b>	0.4	0.4
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.938	0.9109

## Partie VI : Résultats et discussions

---

**Tableau 18** : Modélisation des données de dissolution en associant le cholestérol et la vitamine E, par procédé d'encapsulation classique

Modèle mathématique		Cyclodextrines	
		Vitamine E	Cholestérol
<b>0 ORDER</b>	<b>K</b>	000	$3 \cdot 10^{-5}$
	<b>R2</b>	0.748	0.52
<b>1st ORDER</b>	<b>K</b>	000	$-3 \cdot 10^{-5}$
	<b>R2</b>	0.751	0.52
<b>Higuchi</b>	<b>K</b>	0.002	000
	<b>R2</b>	0.939	0.685
<b>Korsmeyer Peppas</b>	<b>K</b>	0.4	0.4
	<b>N</b>	0.4	0.4
	<b>R2</b>	0.9787	0.9723

## Partie VI : Résultats et discussions

---

### VI.3.2 Encapsulation in situ :

**Tableau 19** : Modélisation des données de dissolution de la vitamine E par in situ

Modèles mathématique		Cyclodextrines	Polyéthylène glycol	Liposomes
<b>0 ORDER</b>	<b>K</b>	000	1*10-5	8*10-7
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.06	0.03	0.411
<b>1st ORDER</b>	<b>K</b>	000	1*10-5	-8*10-7
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.05	0.01	0.412
<b>Higuchi</b>	<b>K</b>	0.0006	000	4*10-5
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.446	0.482	0.64
<b>Korsmeyer Peppas</b>	<b>K</b>	0.004	0.058	0.4
	<b>N</b>	0.2445	0.2	0.4
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.951	0.960	0.6

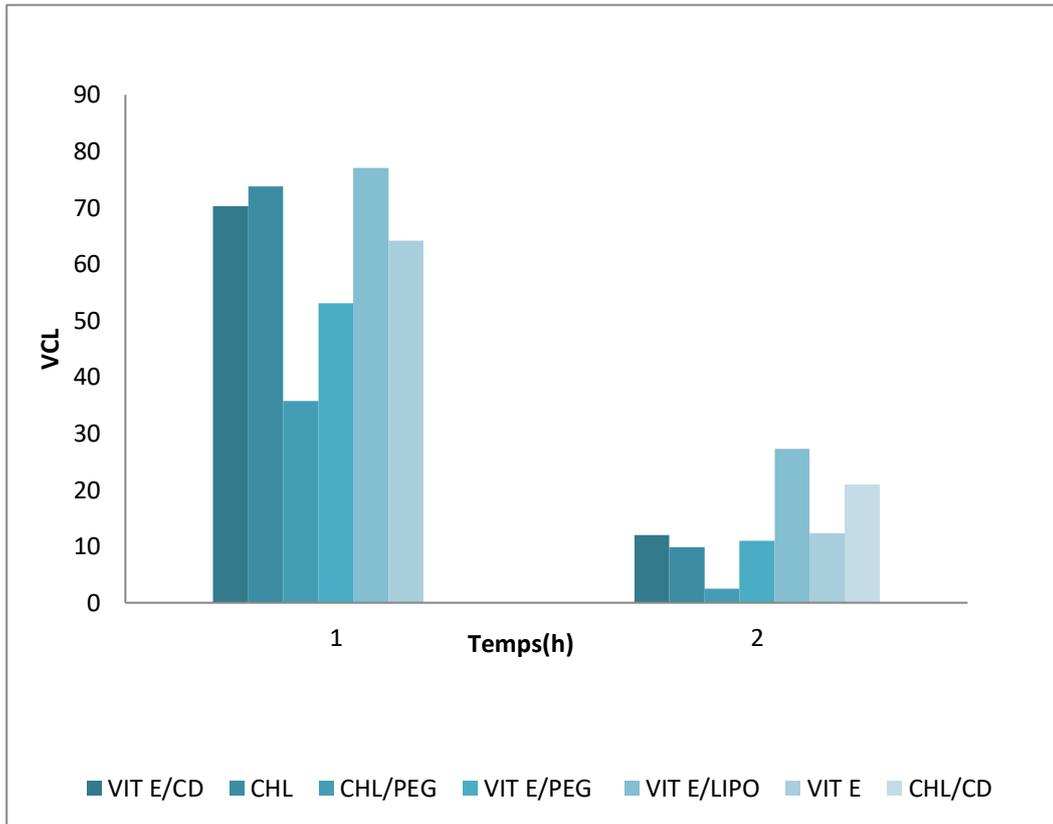
Remarque : En ce qui concerne les complexes Chol/CD, Chol/PEG ainsi que l'association dans l'in situ, nous avons trouvé des résultats quasi nuls, ce qui fait que nous n'allons pas les prendre en considération.

### **Interprétation des résultats**

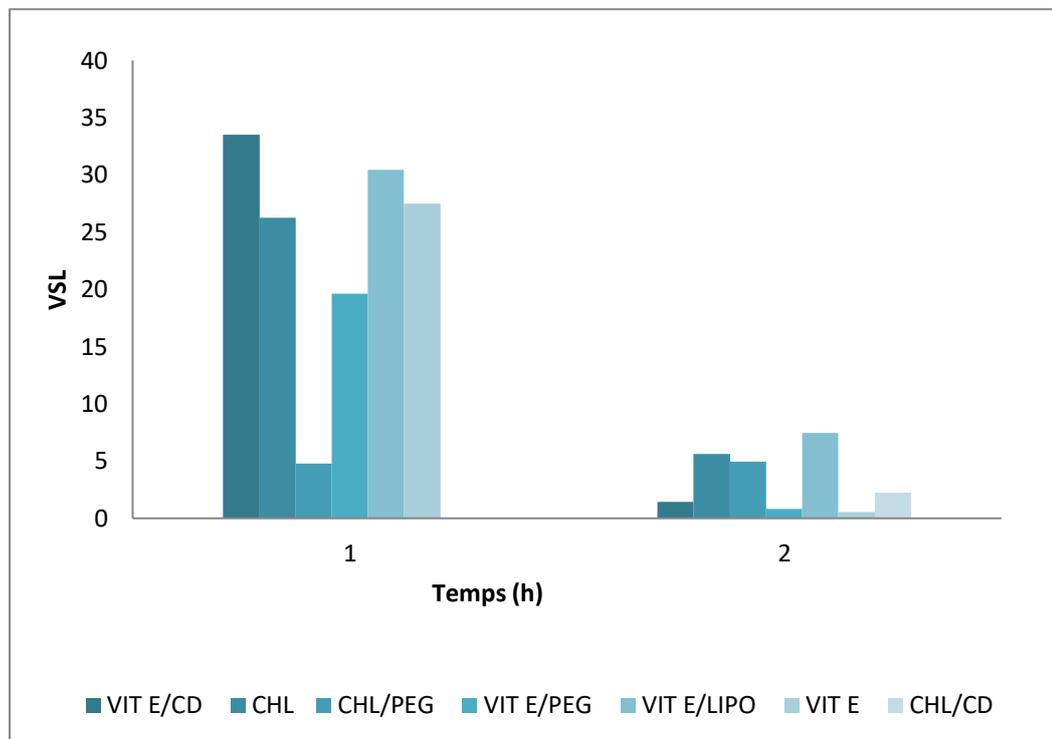
On remarque que Korsmeyer Peppas est le modèle qui convient le mieux à notre étude de cinétique, car il donne les meilleures valeurs de coefficients en comparaison avec les autres modèles, ce qui indique que le relargage de la vitamine E et du cholestérol suit un mécanisme de diffusion Fickien régit par le gradient de concentration.

### VI.4 Test biologique

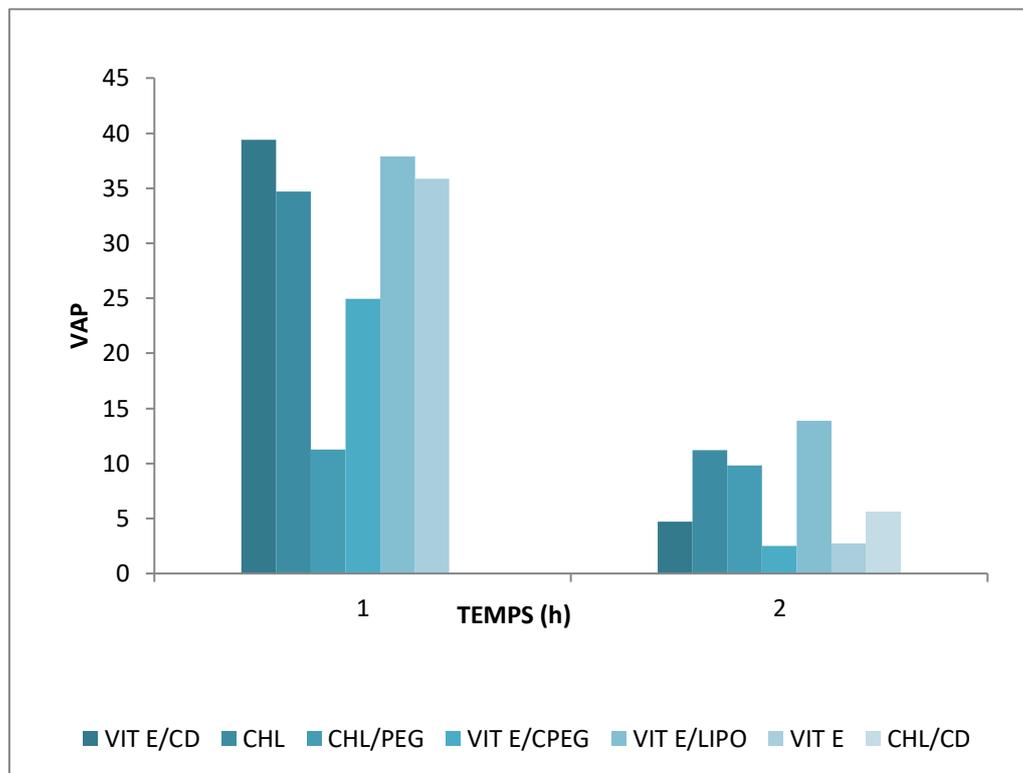
Les figures 18, 19 et 20 regroupent les vitesses linéaires VCL, VSL et VAP des spermatozoïdes ovins traités en fonction du temps (réfrigération).



**Figure 18** : Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire curvilignes des SPZs en fonction des traitements



**Figure 19 :** Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire en lignes droites des SPZs en fonction des traitements



**Figure 20 :** Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire moyenne des SPZs en fonction des traitements

### Observation

Les valeurs de VCL, VSL et VAP ont été améliorées lors de l'utilisation des différents traitements (VitE,CHL,CD /VitE, CD /CHL,phospholipides/VitE, PEG /VitE)et cela au bout d'une heure de conservation (réfrigération). Le CD /VitE et phospholipides/VitE ont représenté le meilleur effet. Néanmoins, au bout de 2h on observe une diminution de la motilité des SPZs traités.

### Interprétation

La présence de la Vit.E et du Chol favorise la conservation des SPZs, cela est probablement dû à l'effet synergique et simultané des deux principes actifs. Ceci correspond à ce que TAOUZINET, 2021 a démontré lors des tests de motilité spermatique, effectués sur le bovin [68].

L'encapsulation par les CDs et les LIPO d'une manière générale a amélioré l'effet de ces deux molécules pendant un laps de temps, plusieurs études ont démontré l'effet des CDs et LIPO sur la solubilité de l' $\alpha$ -tocophérol et il s'est avéré qu'il y a eu un impact positif et significatif sur la motilité des spermatozoïdes [2, 65].

Par contre, au bout de 2h, la peroxydation et le choc thermique ont pris le dessus sur les cellules spermatiques, ce qui a engendré une baisse de motilité. Cela est probablement due à la faible quantité solubilisée de vitamine E et du cholestérol en utilisant le système *in situ*, qui induit à une faible biodisponibilité dans la cellule.

# Conclusion

## Conclusion générale

---

### Conclusion générale

Au cours de cette étude, nous nous sommes fixés comme objectif l'amélioration de la solubilité de la vitamine E en milieu aqueux et cela en préparant et en caractérisant des complexes d'inclusion (CDs, PEG, liposomes) par *in situ* et par procédé, afin d'étudier l'impact de ces derniers sur la conservation (réfrigération) pendant 2h à 4°C de la semence ovine.

Pour atteindre le but fixé, une démarche méthodologique fut adoptée, nécessitant le passage par un enchaînement d'étapes aussi importantes les unes que les autres :

- Les solutions obtenues ont été préparés selon deux méthodes, la Co-évaporation en ce qui concerne le procédé et l'ajout de la molécule active ainsi que les systèmes d'encapsulations instantanément au tampon phosphate en ce qui concerne l'*in situ* et cela dans les deux cas : vitamine E et Cholestérol.
- L'étape suivante fut la caractérisation des complexes par HPLC. Ces caractérisations, nous ont permis de démontrer l'inclusion de la vitamine E et/ou Cholestérol ou au moins une partie d'eux à l'intérieur de la cavité des cyclodextrines et de même pour le PEG et les liposomes.

En vue des résultats obtenus, on peut déduire que :

- Il n'y a pas eu formation de complexes en ce qui concerne l'*in situ* donc pas de solubilité en ce qui concerne les P.A.
- Il y a eu solubilité en ce qui concerne les P.A, lors du procédé. Il en est sorti que les valeurs optimales ont été atteintes par les liposomes et les CDs.
- L'association des deux molécules à engendrer un phénomène de compétition qui empêche la formation de complexe d'inclusion stable en milieu aqueux.
- Entre autre , grâce à l'étude de l'impact des complexes sur une semence animale (ovin), nous avons pu démontrer que la présence de la vitamine E et du cholestérol favorise la conservation des SPZs, cela est probablement dû à l'effet synergique et simultanée des P.A pendant un laps de temps (1h), par contre au-delà, le stress oxydatif et le choc thermique ont pris le dessus sur les cellules spermatiques, ce qui engendre une baisse de motilité. Cela est probablement dû à la faible quantité solubilisée des molécules actives en utilisant le système *in situ*.

Au final, on en conclut que le procédé reste le meilleur moyen d'encapsulation ; car il permet une meilleure solubilisation des P.A hydrophobes.

## Conclusion générale

---

Il serait très intéressant d'enrichir ce travail dans un futur proche:

- Etudier l'impact des solutions obtenues sur l'humain ;
- Utiliser d'autres dérivés des cyclodextrines ;
- Varier la vitesse d'agitation ;
- Utiliser d'autres méthodes (mode) d'agitation comme (l'ultrason, l'homogénéisateur, l'ultrason, l'ultrason), afin d'améliorer les interactions entre le PA et les CDs, PEGs et LIPO ;
- Effectuer des tests d'activité antioxydante tels que le TBRS, BTS ....

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- [1] Orlando Hung. Drug transformation: Advances in drug delivery systems. CANADIAN JOURNAL OF ANESTHESIA. 2006.
- [2] A Khellouf, K. Benhenia, S. Fatmi and M. Iguer-Ouada. The complementary effect of cholesterol and vitamin E preloaded in cyclodextrin on frozen bovine semen: motility parameters, membrane integrity and lipid peroxidation. CryoLetters. 2018.
- [3] Lamia TAOUZINET, Sofiane FATMI, Mohamed SKIBA, Mokrane IGUER-OUADA. Encapsulation nanotechnology in sperm conservation: system preparation methods and antioxidants enhanced delivery. CryoLetters. 2021.
- [4] Abouzar Najafia,b, Ramezan Ali Taheria\*, Mahdieh Mehdipourb, Gholamreza Farnooshc, Felipe Martínez-Pastor. Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender for the cryopreservation of semen from broiler breeder roosters. Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- [5] Mahutin Vianney Salmon. Le cholestérol comme agent cryoprotecteur pour la congélation des semences animales. Université LAVAL. 2015.
- [6] Muhammad Sajjad ANSARI, Nemat ULLAH, S Murtaza Hassan ANDRABI. Effect of alpha-tocopherol acetate and ascorbic acid in extender on quality of zebu bull spermatozoa. Pakistan journal of zoologie. 2012.
- [7] E.Faure. Le cholestérol. caducee.net. Janvier 2013.
- [8] ATROUNE Chaima, NEDJMA Lydia. Formulation et caractérisation des complexes et liposomes de vitamine E et étude de leurs impacts sur la conservation de la semence spermatique. Mémoire en génie des procédés. Université A.Mira de Bejaia. 2019.
- [9] Elsevier Masson. EM consulte. L'édifiante histoire du cholestérol: de la pierre de fiel au récepteur aux LDL., 2012.
- [10] M Antoine DUCHAUD. LE ROLE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS L'ACCOMPAGNEMENT DES HYPERCHOLESTEROLEMIES. Thèse de doctorat. Université d'Aix-Marseille, 19 mai 2017.
- [11] J. Pearce. John W. Gofman, 88, Scientist and Advocate for Nuclear Safety, Dies. The New York Times, 2007.
- [12] Aime Mawisa. Synthèse, transport et excrétion du cholestérol dans l'organisme. Gradué en médecine vétérinaire. Université de Lubumbashi, 2015.
- [13] AGSOUS Maissa, SMAIL Nesrine. Utilisation des cyclodextrines, liposomes et PEG pour améliorer la solubilité des principes actifs hydrophobes. Mémoire de fin de cycle en génie pharmaceutique. Université A.Mira Bejaia. 2019/2020.

## Références bibliographiques

---

- [14] DAOUD Lynda, OUYAHIA El djida. Préparation, optimisation et caractérisation des liposomes de vitamine E. Université A.Mira Bejaia. 2016.
- [15] MEZNAD Meriem, M'HAMDI Imane. optimisation et caractérisation des complexes d'inclusion vitamine E/cyclodextrine et cholestérol/cyclodextrine. Mémoire de fin de cycle. Université A.Mira Bejaia. 2016.
- [16] Wikipédia
- [17] Léa Zubiria. Cholestérol : un lipide essentiel à l'organisme. passeportsante.net. Juin 2018.
- [18] Grégorio Crini<sup>1</sup>, Sophie Fourmentin<sup>2</sup>, Éva Fenyvesi<sup>3</sup>, Giangiacomo Torri<sup>4</sup>, Marc Fourmentin<sup>5</sup>, Nadia Morin-Crini<sup>1</sup>. Cyclodextrins, from molecules to applications. Environmental Chemistry Letters. 2018.
- [19] Phatsawee Jansooka , Noriko Ogawab , Thorsteinn Loftssonc. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics. 2018.
- [20] Phennapha Saokham, Chutimon Muankaew, Phatsawee Jansook, ID and Thorsteinn Loftsson. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. By the authors. Licensee MDPI. 2018.
- [21] Nina Balès. LES PEGS. MONOGRAPHIE, université du Québec à Chicoutimi. 2014.
- [22] Hiroshi Ishihara. Polyethyleneglycol: A Classical but Innovative Material, Current Status and Prospects of Polyethyleneglycol-Modified Medicines. Biol. Pharm. Bull. 2013.
- [23] Zohra DRAOUA. Synthèse de copolymères biodégradables tri-blocs poly ( $\epsilon$ -caprolactone) –polyéthylène glycol –poly ( $\epsilon$ -caprolactone) catalysée par la magnite  $H^+$ . Mémoire, université d'Oran. 2011.
- [24] Kelley Britton Keys, Fotios M. Andreopoulos, Nikolaos A. Peppas. Poly(ethylene glycol) Star Polymer Hydrogels. Macromolecules. 1998.
- [25] Warner M. Pharmacytoday V126, (avril 2020) p16.
- [26] H.Evans, K.bishop : on the relation between fertility and nutrition
- [27] The evolution rhythm in the rat on a standard nutritional regime –J.Metabres (1999) ,1-319.
- [28] Anders Bjorneboe, Gaoenn-Elena and Christina Drevoh, Transport and distribution of vitamin E, Critical review, journal of nutrition, National institut of Forensic Toxicology and institut for nutrition research, University of Oslo, Norway, 2012.

## Références bibliographiques

---

- [16] wikipedia .
- [29] Florence campagne, Vitamine E, Caducee. Net, Juin 2000.
- [30] Sarah Regina Pereira Camelo : Encapsulation de molécules hydrophobes par des structures bi-gel générés par prilling : Relation structure-propriétés.
- [31] Jean Texier, les vitamines, juillet 1989, éditions JIBENA, page 99 à 106.
- [32] C.Cuvelier, O.Dotroppe et L.Istoss : Sources alimentaires et dosages de la vitamine E pdf.
- [33] Claude Fernand Bourgeais : Les vitamines dans l'industrie agroalimentaires. ISSN : 0243-5624. ISBN : 2.7430.0524-6. Editions Tec.doc (2003).
- [34] Absorption distribution métabolisme élimination du médicament.
- [35] Vincent Gembus, sur quelques utilisations d'époxydes en synthèse organique, nouvelles voies d'accès au tocophérol et synthèse formelle de la borrelidine, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, 2006.
- [36] MickleAke, Vitamines A, E et fer, statut de l'enfant d'âge préscolaire en cote d'ivoire. Apports en nutriments de l'alimentation traditionnelle, thèse de doctorat, Université Montpellier-I, 1999.
- [37] Jennifer Hillan, facts about vitamine E, IFAS extension. FCS8641. Université de Florida, 2006.
- [38] ADM Natural Health and Nutrition P.O box2. 1540 AA Koogaan de Zaan. The Netherlands.
- [39] Djamia Wessem : Détermination de la capacité antioxydant des huiles végétales : Huile d'olive et de la wilaya de Tlemcen.
- [40] C.Cuvelier, O. Dotroppe et L.Istasse : Département des productions animales, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège B43, Sart-Tilman 4000 Liège, Belgique.
- [41] DL-alpha-Tocopheril, Products for the dietary supplement, beverage and food industries-technical information, May (2005).
- [42] J.Pincemail, Jo Defraigne, M meurisse, R limet, antioxydants et prevention des maladies cardiovasculaire.
- [43] La vitamine E, Medi-sphere. MS90. Decembre 1998.
- [44] M.C. Erickson, Chemistry and Function of Phospholipides, in: Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology - 2nd edition, D.B.M. Casimir C. Akoh, Ed., Marcel Dekker: New York, 2004.

## Références bibliographiques

---

- [45] Bedu-Addo F.K, Huang L. Interaction of PEG phospholipid conjugates with phospholipid: implications in liposomal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:235-247, 1995.
- [46] Koynova R, Caffrey M. 2002. An index of lipid phase diagrams. *Chemistry and physics of lipids*, Vol. 115, P:107-219, 2002.
- [47] Marie-Céline Kibangadi: Beta-carotène et vitamines A et E chez l'enfant. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie ; 7 janvier 1998.
- [48] Cristina M. Sabliov C. Fronczek C. E. Astete M. Khachatryan L. Khachatryan C. Leonard Effects of Temperature and UV Light on Degradation of  $\alpha$ -Tocopherol in Free and Dissolved Form. *J Am Oil Chem Soc* 86:895–902. DOI 10.1007/s11746-009-1411-6, 2009.
- [49] Weiner, N., et al., Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. *Antimicrob. Agents Chemother*, 33(8), p: 1217-1221, 1989.
- [50] Mayer L.D. Bally M.B, Cullis P.R. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient, *Biochimica and Biophysica Acta* 857, P: 123-126, 1986.
- [51] Pauline Elisabeth Pidou : La vitamine E chez le cheval : Synthèse bibliographique. Thèse Doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. 2010.
- [52] Hedhil Lassaad : Les antioxydants dans les aliments. Agence Universitaire de francophonie ; IPEIN de Nabeu TINISIE.
- [53] J.-D. Nadeau : La relation des vitamines a la nutrition animale. *Canadian journal of comparative Médecine*. Vol, 1943.
- [54] Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A. and Yurdugul, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, P: 833–844, 2008.
- [55] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (1978) Nomenclature of lipids *Biochem. J.*, 171:21-35, 1976.
- [56] Marie Mouglin-Degraef, Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie, thèse de doctorat, Avril 2004.
- [57] S.Fatmi et al: Amorphous solid dispersion studies of cimetidine-CD inclusion complexes in PEG6000 : *Acta poloniae pharmaceutica*. April 2015.
- [58] L.Taouzinet, S.Fatmi et al: Alpha tocopherol loaded in liposome optimization, characterization and sperm motility protection. *Drug delivery letters* 2020, 10, 228-236.

## Références bibliographiques

---

- [59] Masako.oda et al :  $\beta$ -Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs : Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, 1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu Hokkaido 061-0293, Japan Quest Pharmaceutical Services, Newark, DE 19702, USA. 2004.
- [60] N. jessel et al : Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by  $\beta$ -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France, and approved March 17, 2006.
- [61] Hitendra S. Mahajan et al : Nasal in situ gel containing hydroxy propyl  $\beta$ -CDs inclusion complex of artemether development and in vitro evaluation : J Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chem (2011) 70 :49-58.
- [62] Yuan Yuan et al : Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide : International journal of Pharmaceutics 430 114-119. 2012.
- [63] Yongkang Xi et al : pH-Responsive Emulsions with Cyclodextrin/Vitamin E Assembled Shells for Controlled Delivery of Polyunsaturated Fatty Acids : Downloaded from pubs.acs.org on October 14, 2019.
- [64] Apratim Jash et al. Phosphatidylcholine solubility in supercritical carbon dioxide : experimental data, thermodynamic modeling, and application in bioactive-encapsulated liposome synthesis. Elsevier. 2019.
- [65] TAOUZINET Lamia et al, amélioration de la solubilité de l' $\alpha$ -tocophérol avec l'utilisation de liposomes. 2020.
- [66] Amokrane et al, étude de l'effet de l'association de la vitamine E et du polyéthylène glycol (PEG) sur le sperme de lapin réfrigéré : Impact sur la motilité des spermatozoïdes et le stress oxydatif. Université A-Mira Bejaia. 2020.
- [67] Shigesaburo Ogawa et al, clarification of the complexation behaviour of 2,6-di-O-méthylated  $\beta$ -cyclodextrin and vitamin E and radical scavenging ability of the complex in aqueous solution. Journal of Oleo science by Japan oil chemists' society. 2021.
- [68] Taouzinet Lamia, encapsulation de la vitamine E par des cyclodextrines, liposomes et PEG. Application dans la cryoconservation spermatique animale. Université de BEJAIA. 2021.

# **Annexes**

### Annexe 1 : Modélisation mathématique

Un grand nombre de modèles mathématiques empiriques et mécanistiques sont proposés pour décrire la cinétique de libération de molécules actives à partir de systèmes générés par des procédés d'encapsulation (matriciels, réservoir) obtenus généralement à partir de polymères.

- **Ordre zéro**

Quand un principe actif suit une cinétique d'ordre zéro, c'est-à-dire qu'il est libéré de façon constante au cours du temps. Il s'agit véritablement d'un système à libération contrôlée. Pour étudier cette cinétique de libération, les données obtenues à partir des études de libération in vitro sont tracées en tant que montant cumulé de P.A libérée en fonction du temps. Cette relation peut être utilisée pour décrire la dissolution du P.A de plusieurs types de formes de dosage pharmaceutique à libération modifiée.

- **Premier ordre**

La cinétique de premier ordre correspond à la majorité des profils observés lors de la libération de principes actifs encapsulés dans les nano/microparticules. Les données obtenues sont tracées en tant que log du pourcentage cumulé de P.A restant en fonction du temps, ceci donnerait une ligne droite avec une pente qui représente le  $-K_1$ . Cette relation peut être utilisée pour décrire la dissolution de P.A dans des formes pharmaceutiques qui contiennent des P.A solubles dans l'eau dans des matrices poreuses.

- **Higuchi**

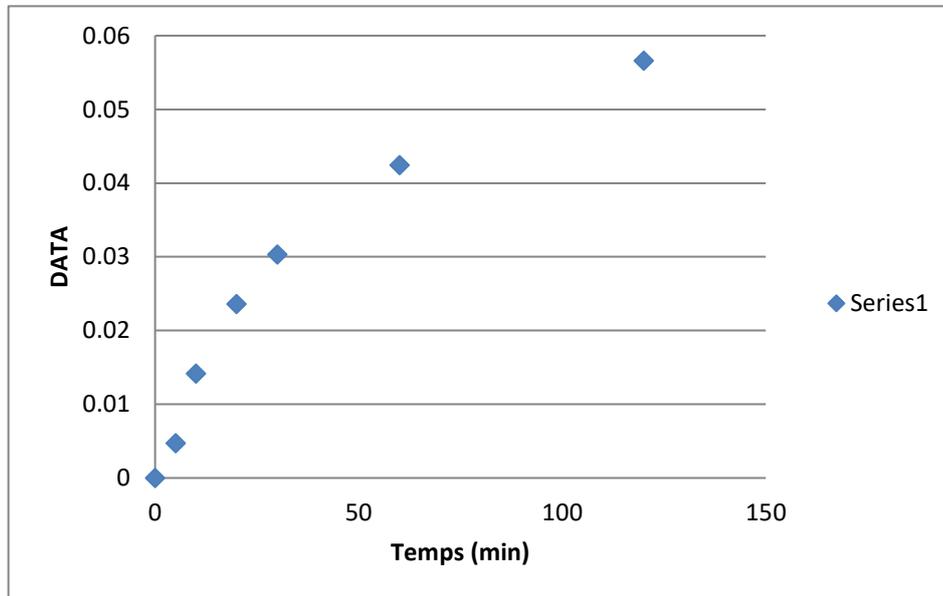
Le premier exemple d'un modèle mathématique destiné à décrire la libération du P.A à partir d'un système matriciel a été proposé en 1961 par Higuchi. Initialement conçu pour les systèmes planaires, il a ensuite été étendu à différentes géométries et systèmes poreux. Les données sont tracées en tant que pourcentage cumulatif du P.A libéré par rapport à la racine carrée du temps. Cette relation peut être utilisée pour décrire la dissolution d'un P.A à partir de plusieurs types de formes pharmaceutique à libération modifiée.

- **Korsmeyer Peppas**

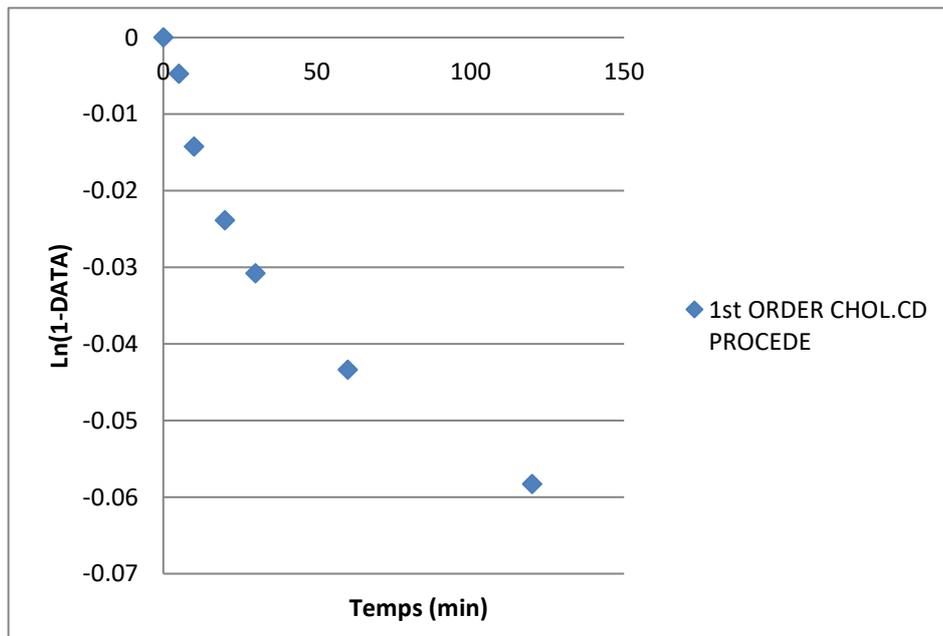
Korsmeyer et al. (1983) ont proposé une relation simple (équation présente dans le tableau) qui décrit la libération d'un P.A. Ces modèles seront utilisés en tant qu'un outil d'aide à l'interprétation des données cinétiques obtenues dans ce travail afin d'appréhender les mécanismes contrôlant les propriétés de relargage des substances actives.

**Annexe 2 : Cinétique de dissolution de la vitamine E et du cholestérol selon les modèles semi-empiriques**

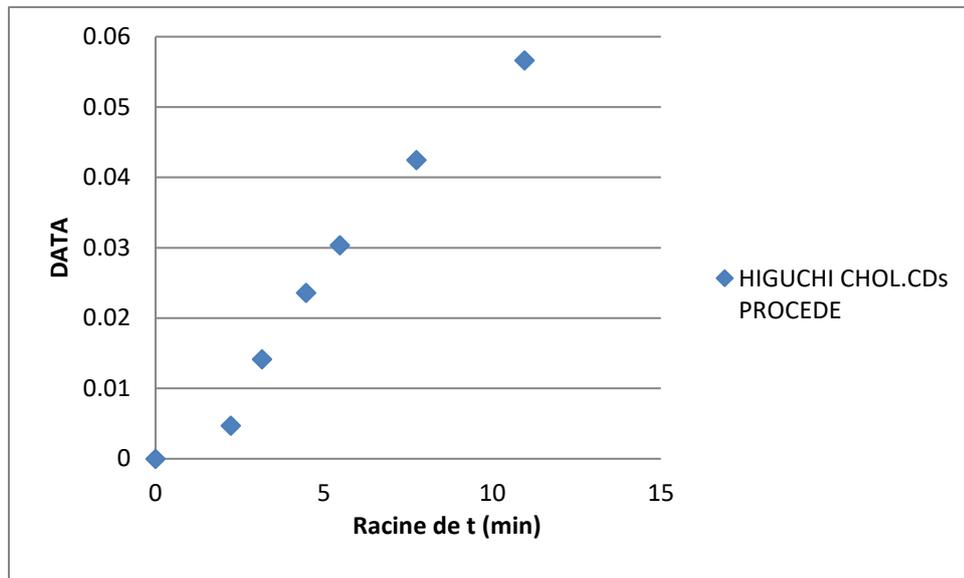
**Cholestérol procédé :**



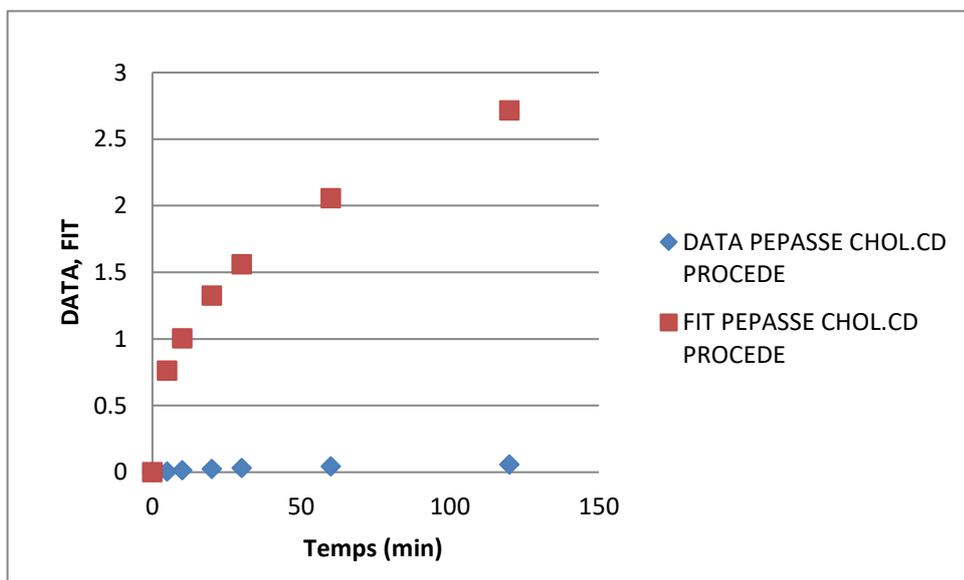
Cinétique de dissolution d'ordre zéro Chol/CDs par procédé



Cinétique de dissolution de premier ordre Chol/CDs par procédé

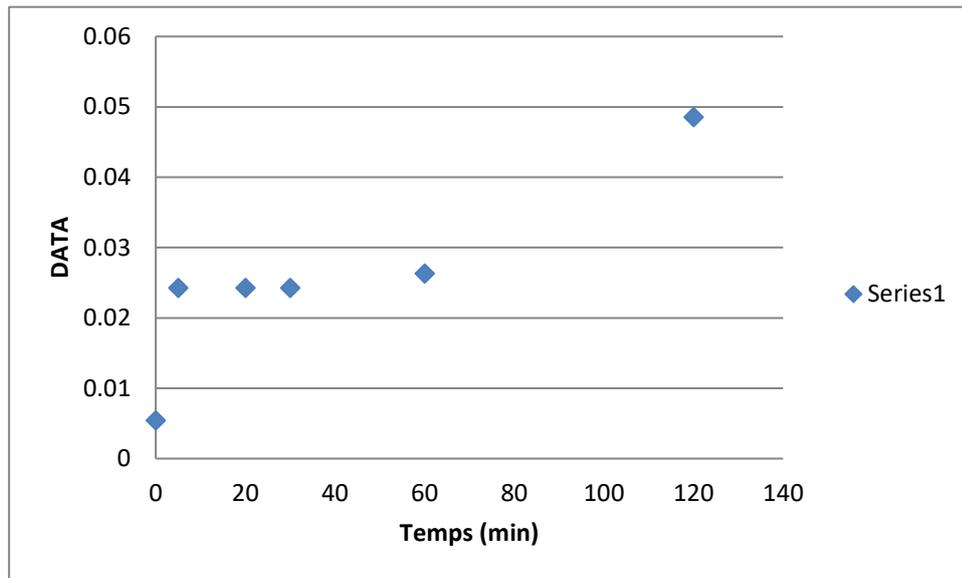


Cinétique de dissolution selon higuchi Chol/CDs par procédé

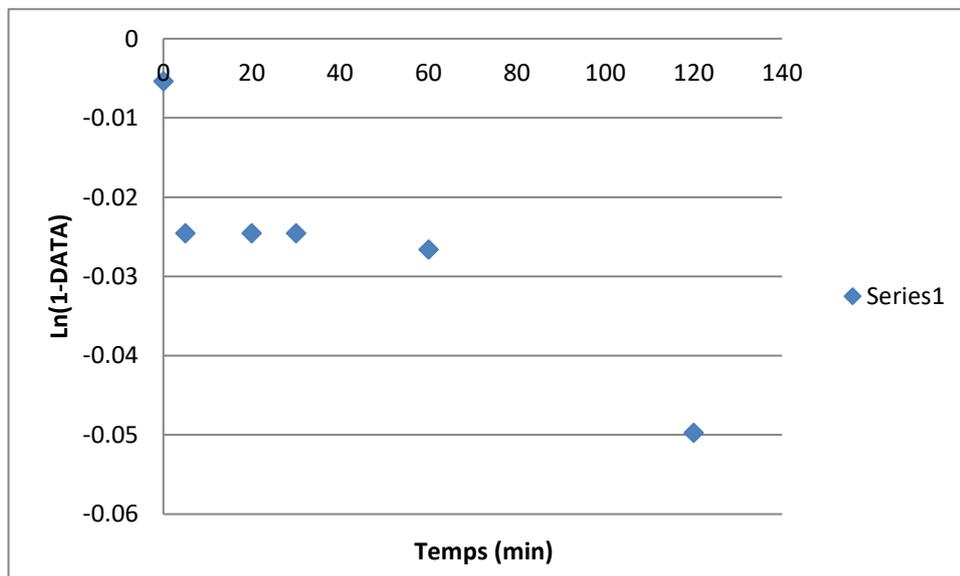


Cinétique de dissolution selon Korsmeyer Peppas Chol/CDs par procédé

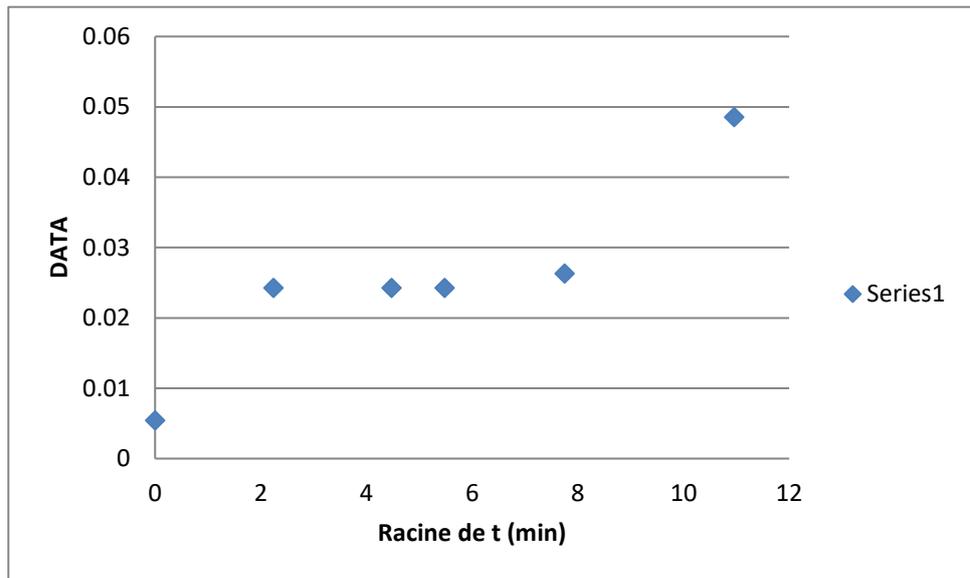
## Annexes



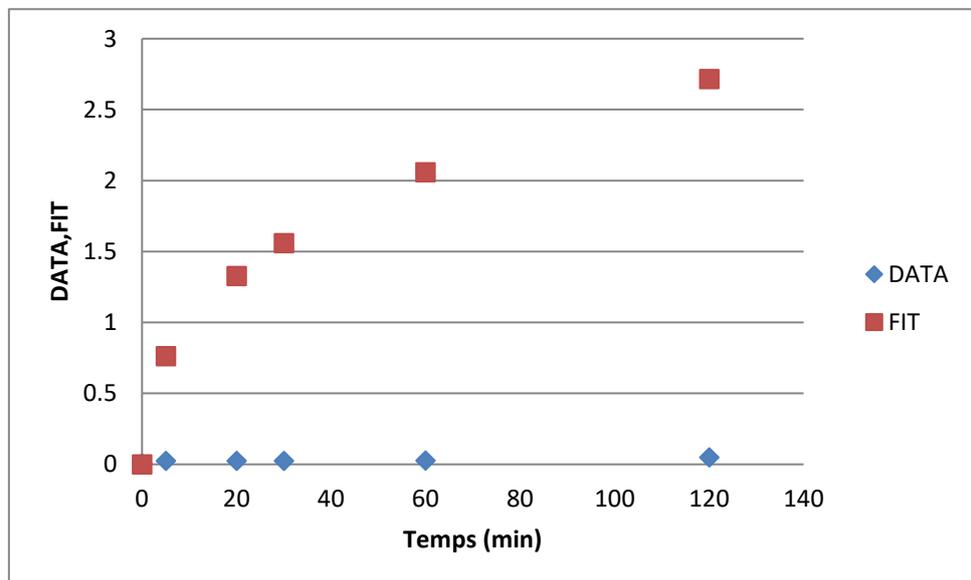
Cinétique de dissolution d'ordre zéro Chol/PEG par procédé



Cinétique de dissolution de premier ordre Chol/PEG par procédé

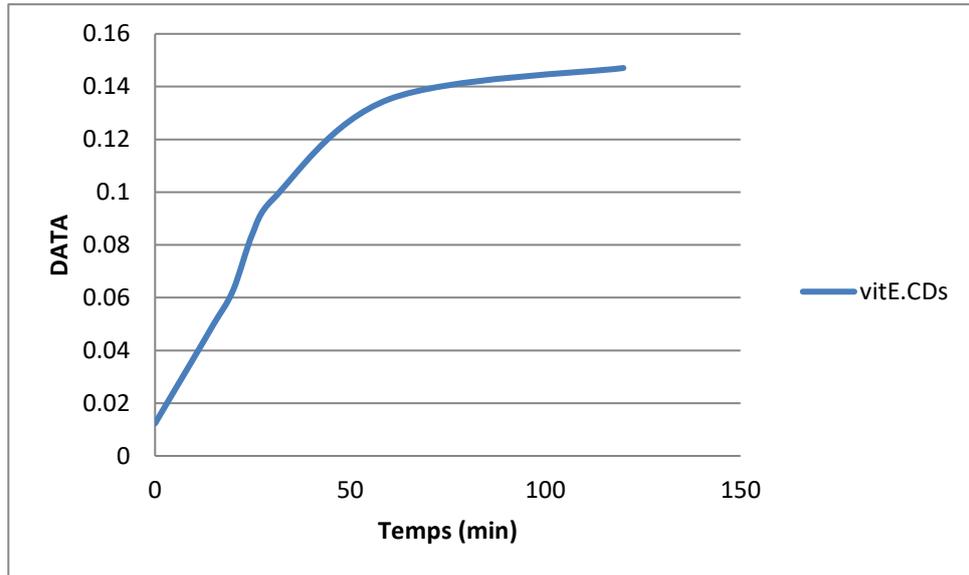


Cinétique de dissolution selon Higuchi Chol/PEG par procédé

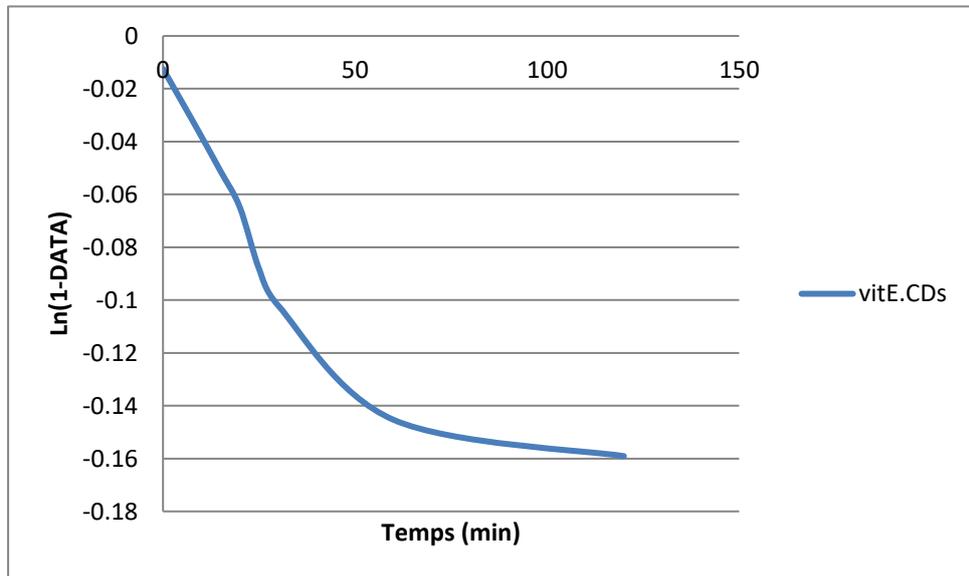


Cinétique de dissolution selon Kosmeyer Peppas Chol/PEG par procédé

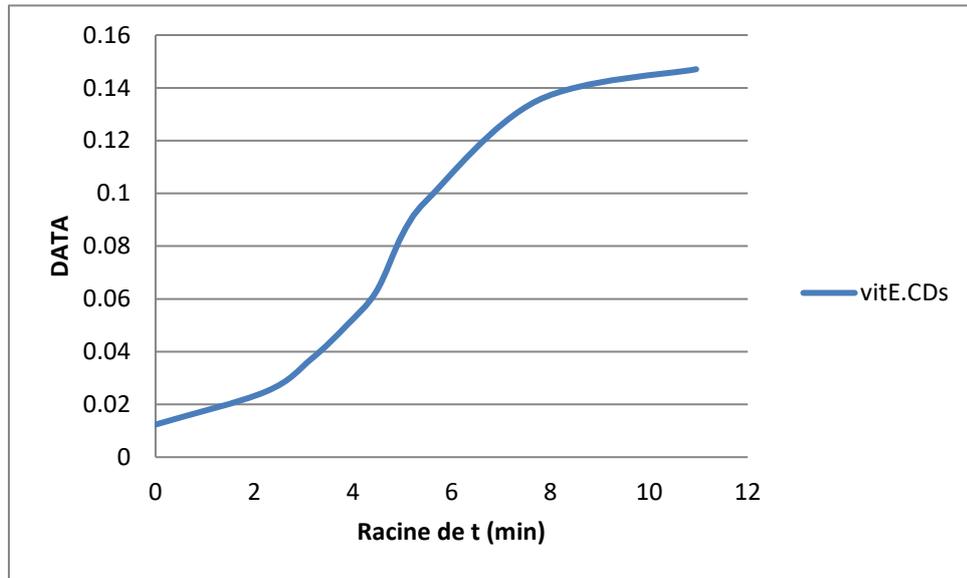
Vitamine E procédé



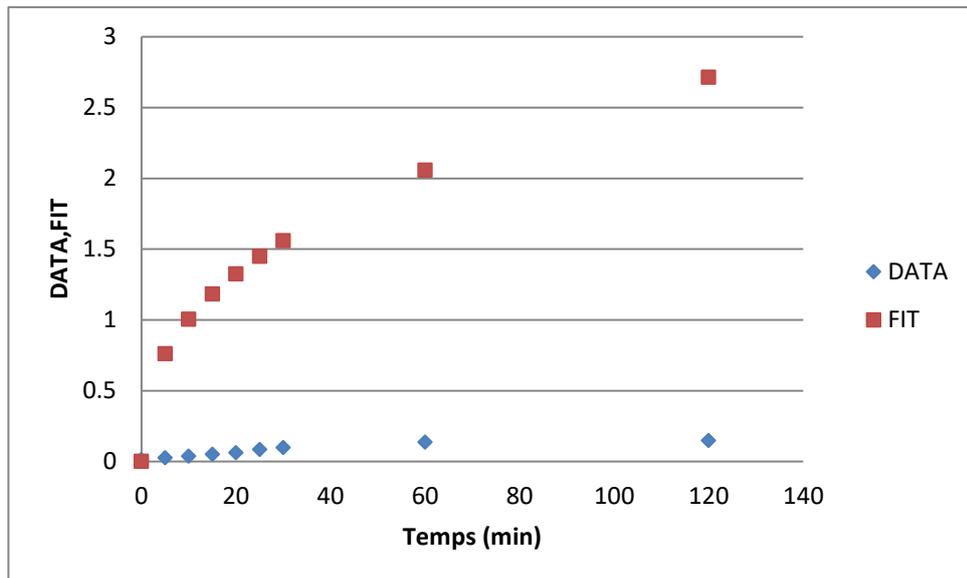
Cinétique de dissolution d'ordre zéro VitE/CDs par procédé



Cinétique de dissolution de premier ordre Vit.E/CDs par procédé

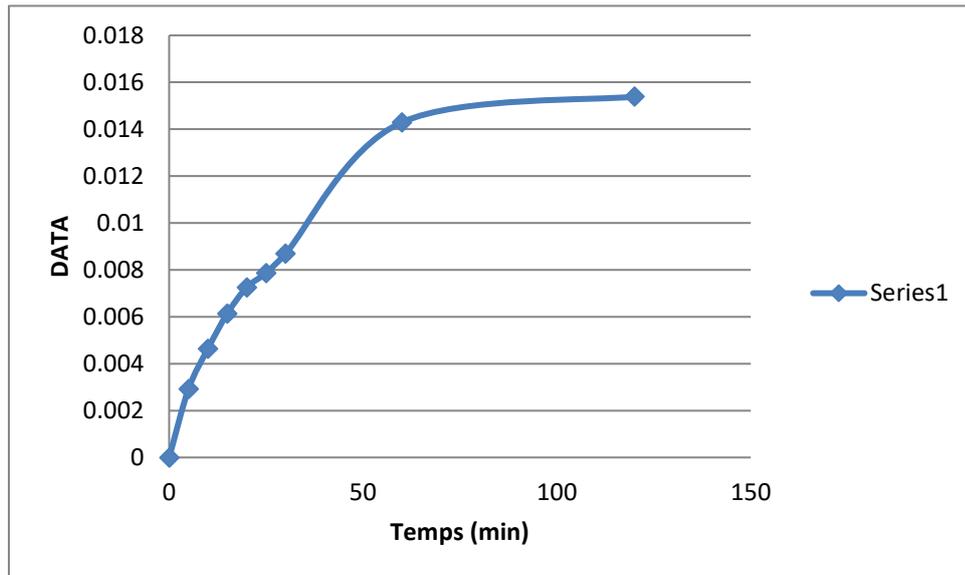


Cinétique de dissolution selon Higuchi Vit.E/CDs par procédé

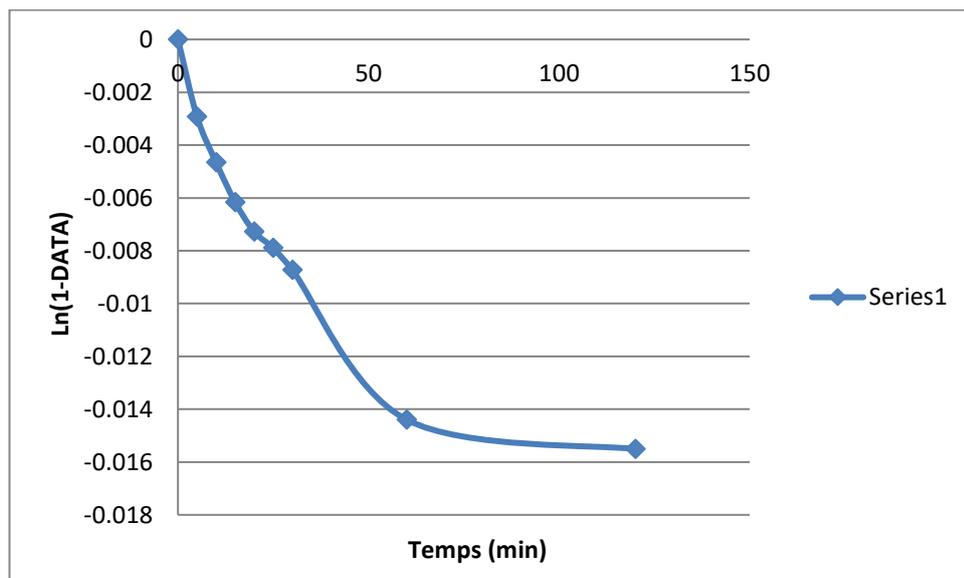


Cinétique de dissolution selon Korsmeyer Peppas Vit.E/CDs par procédé

## Annexes

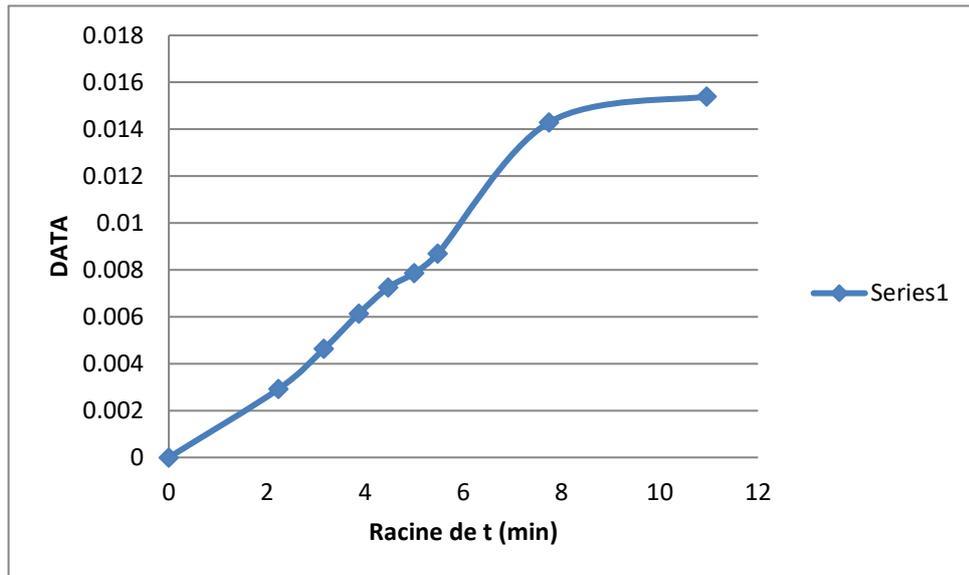


Cinétique de dissolution d'ordre zéro Vit.E/PEG par procédé

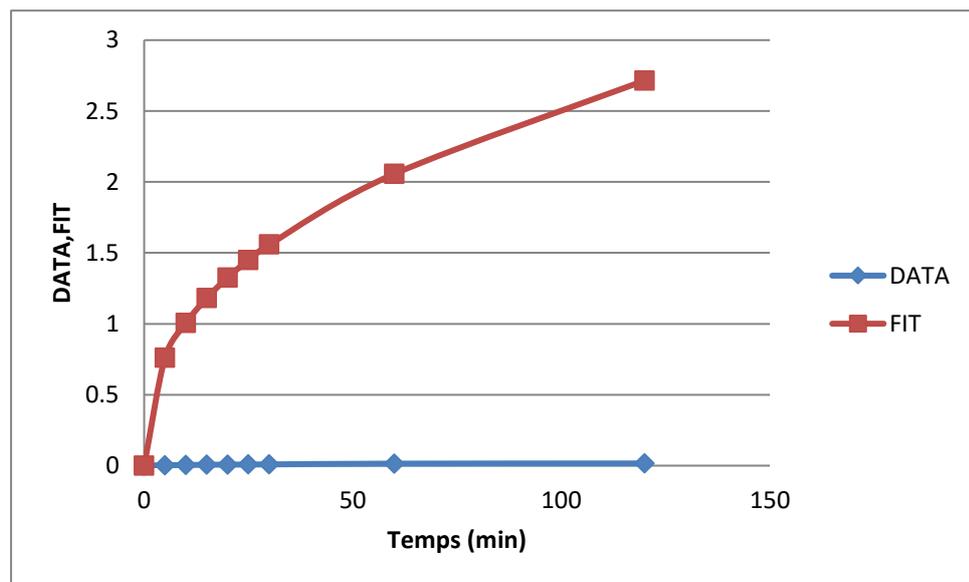


Cinétique de dissolution de premier ordre Vit.E/PEG par procédé

## Annexes

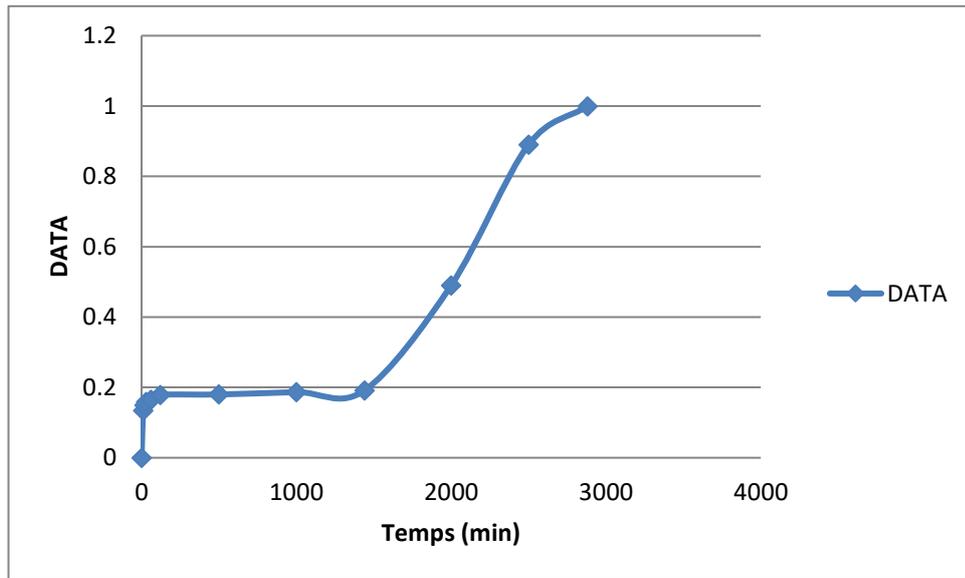


Cinétique de dissolution selon Higuchi Vit.E/PEG par procédé

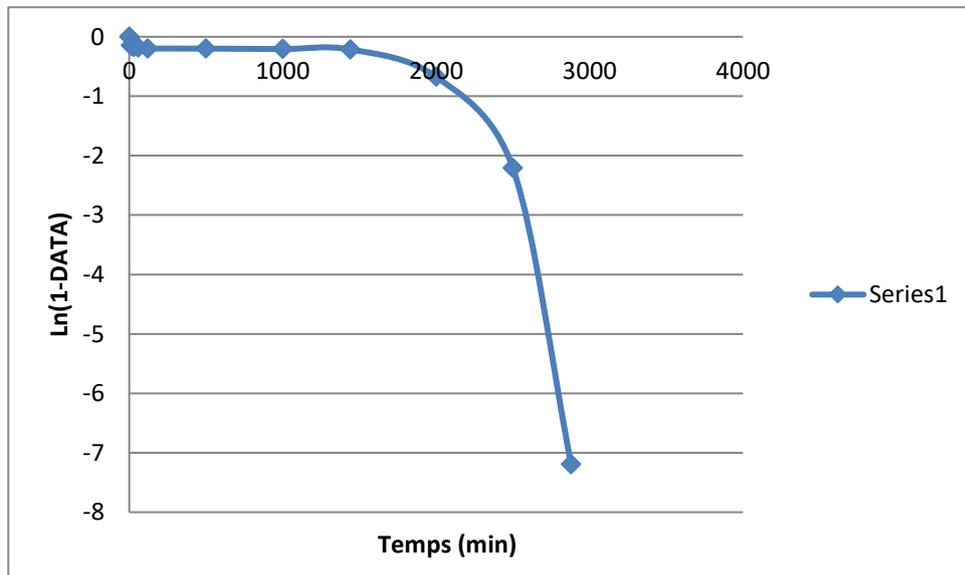


Cinétique de dissolution selon Korsmeyer Peppas Vit.E/PEG par procédé

## Annexes

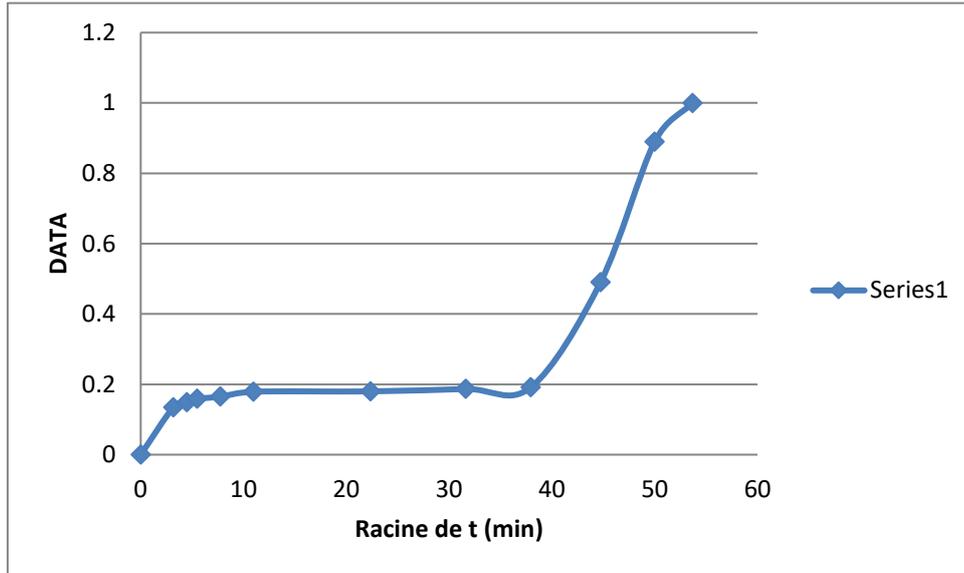


Cinétique de dissolution d'ordre zéro Vit.E/LIPO par procédé

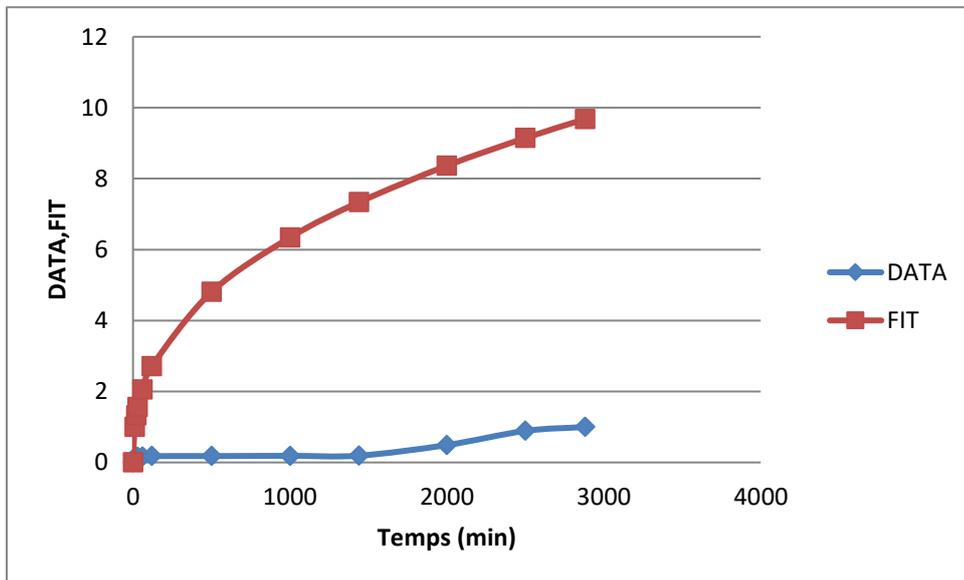


Cinétique de dissolution de premier ordre Vit.E/LIPO par procédé

## Annexes

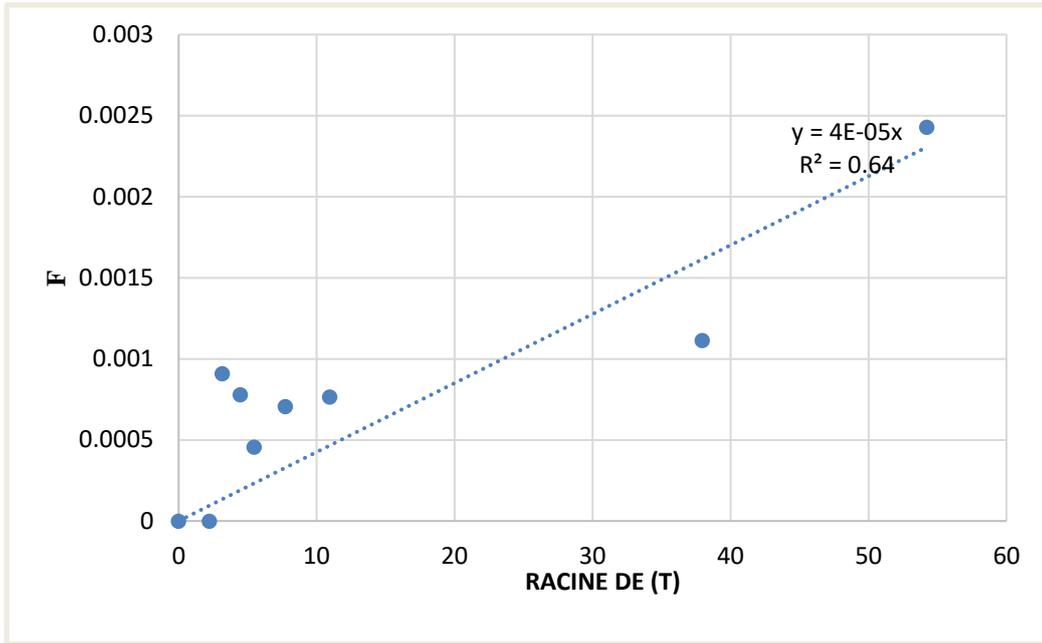


Cinétique de dissolution selon Higuchi Vit.E/LIPO par procédé

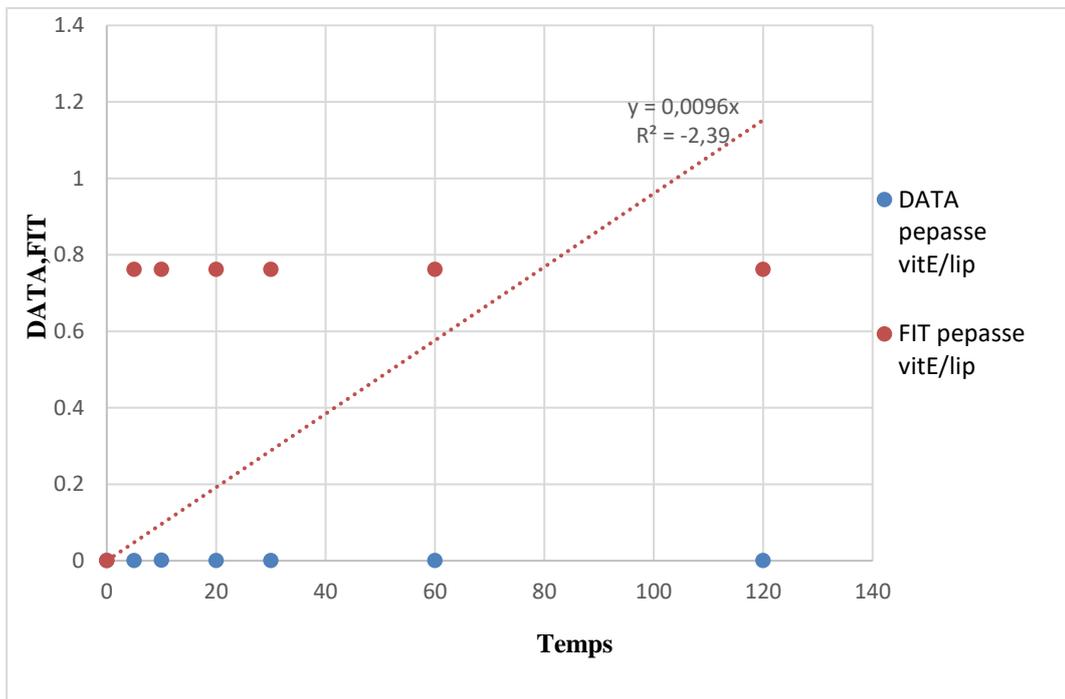


Cinétique de dissolution selon Korsmeyer Peppas Vit.E/LIPO par procédé



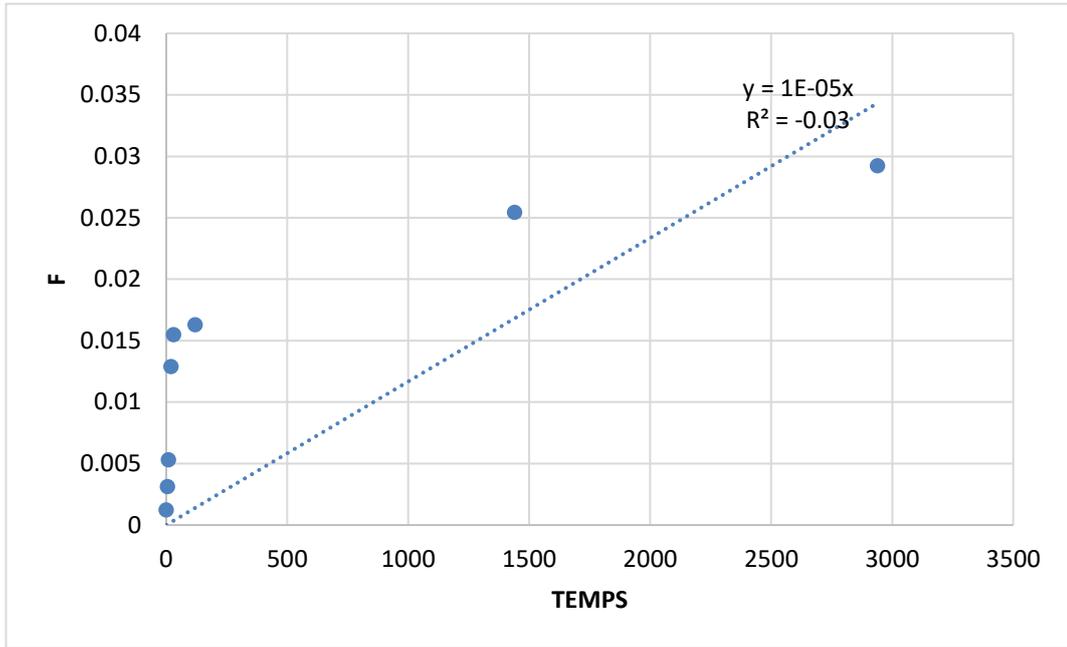


Cinétique de dissolution d'higushi Vit.E/LIPO in situ

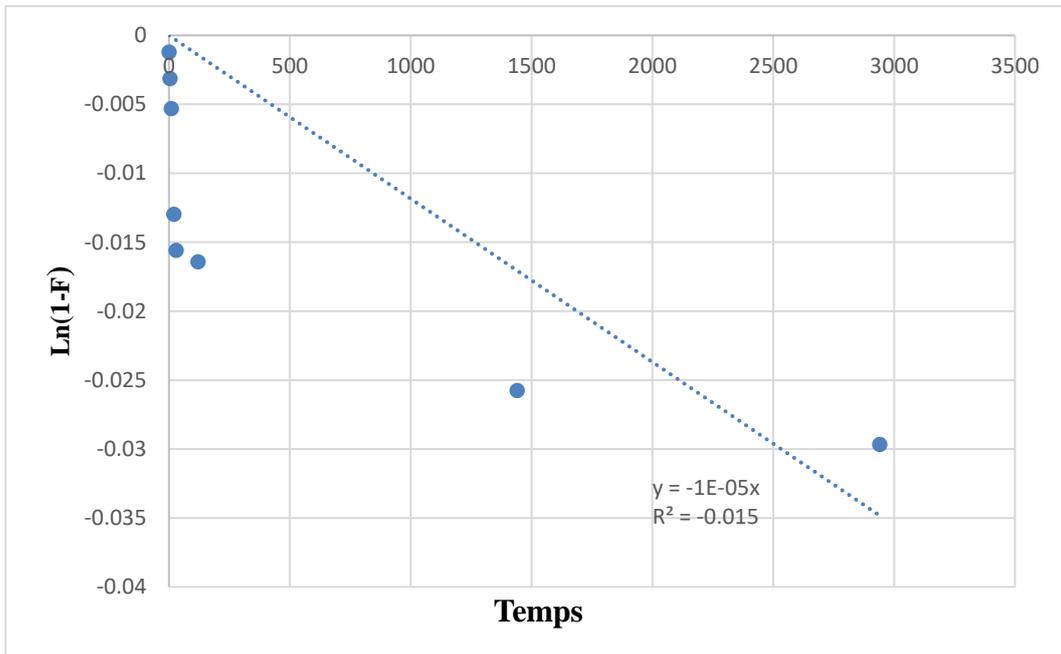


Cinétique de dissolution de korsmeyer Peppas Vit.E/lipo in situ

## Annexes

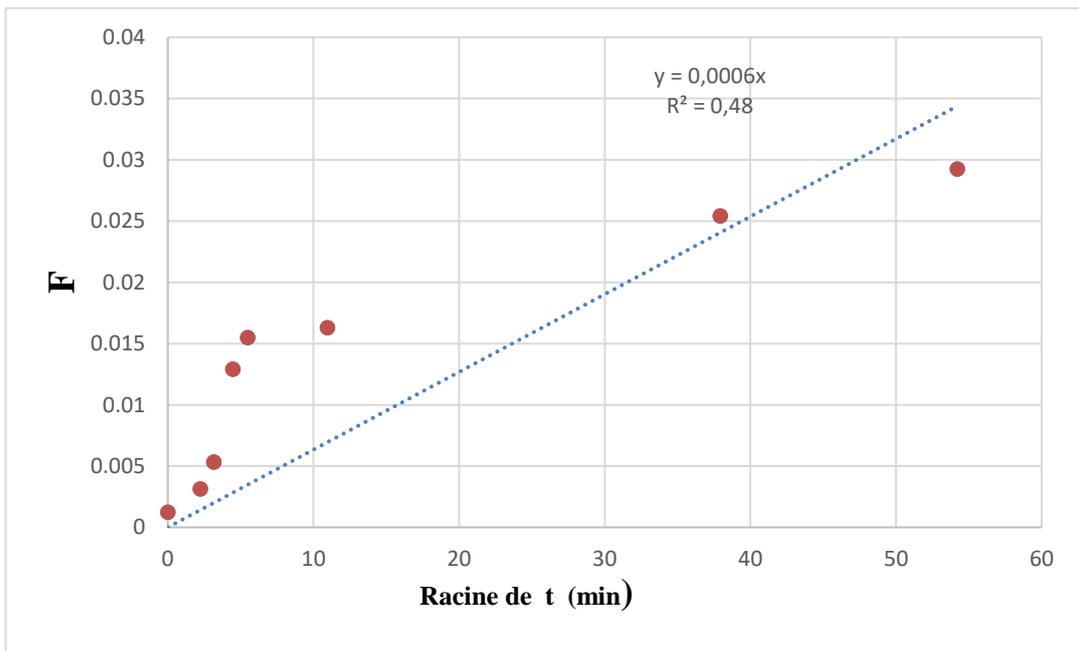


Cinétique de dissolution d'ordre zéro Vit.E/PEG in situ

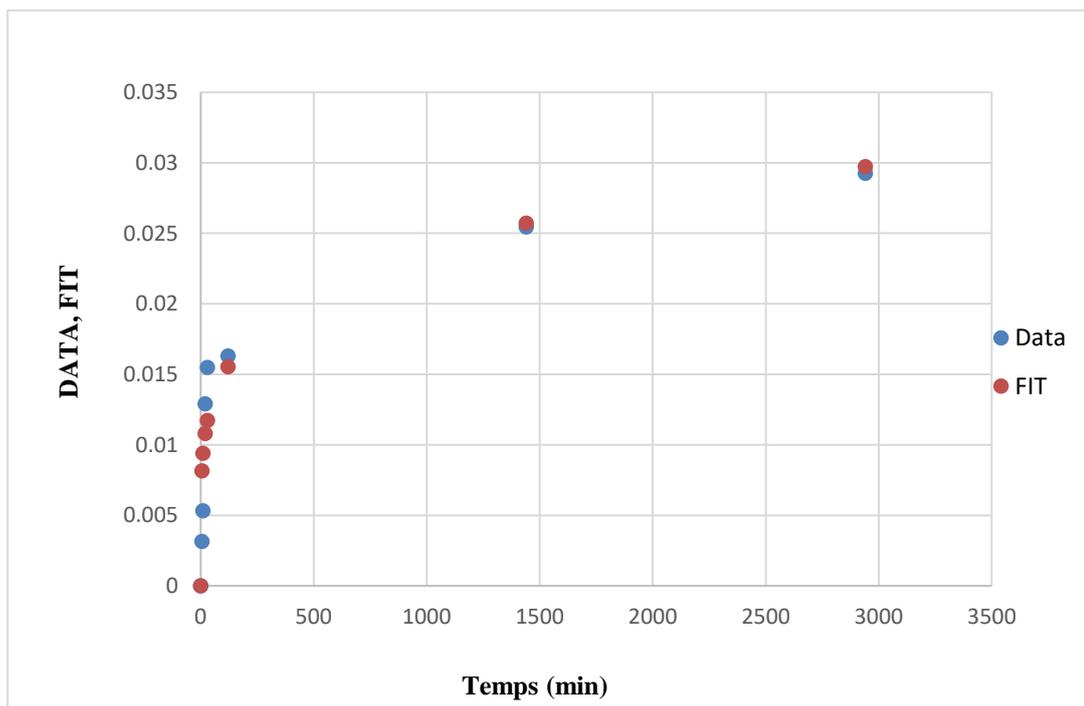


Cinétique de dissolution de premier ordre Vit. E/PEG in situ

## Annexes

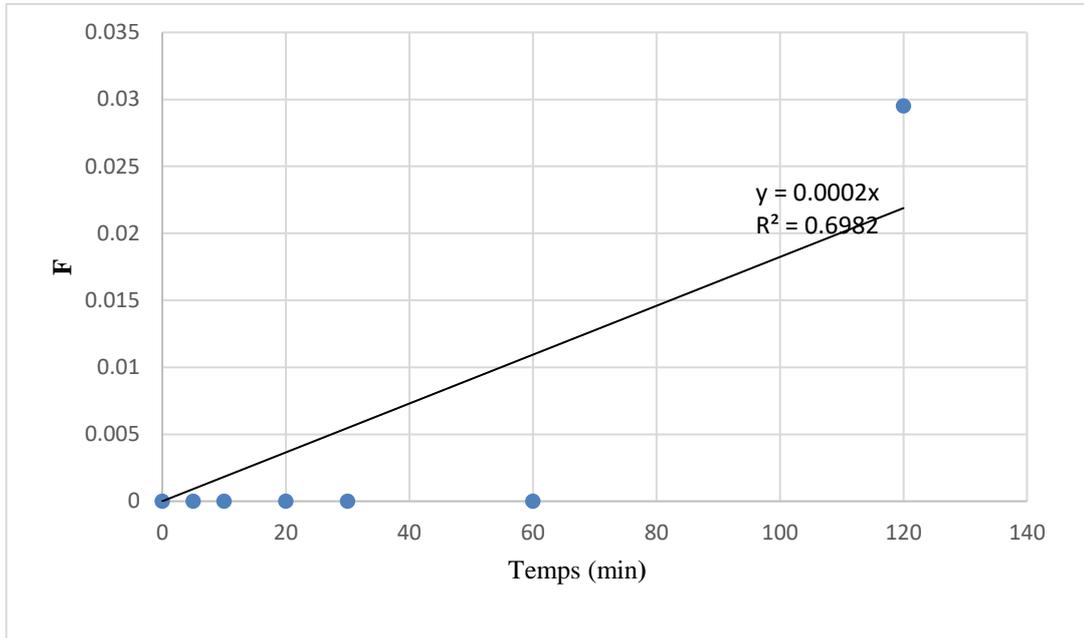


Cinétique de dissolution d'higushi Vit.E/LIPO in situ

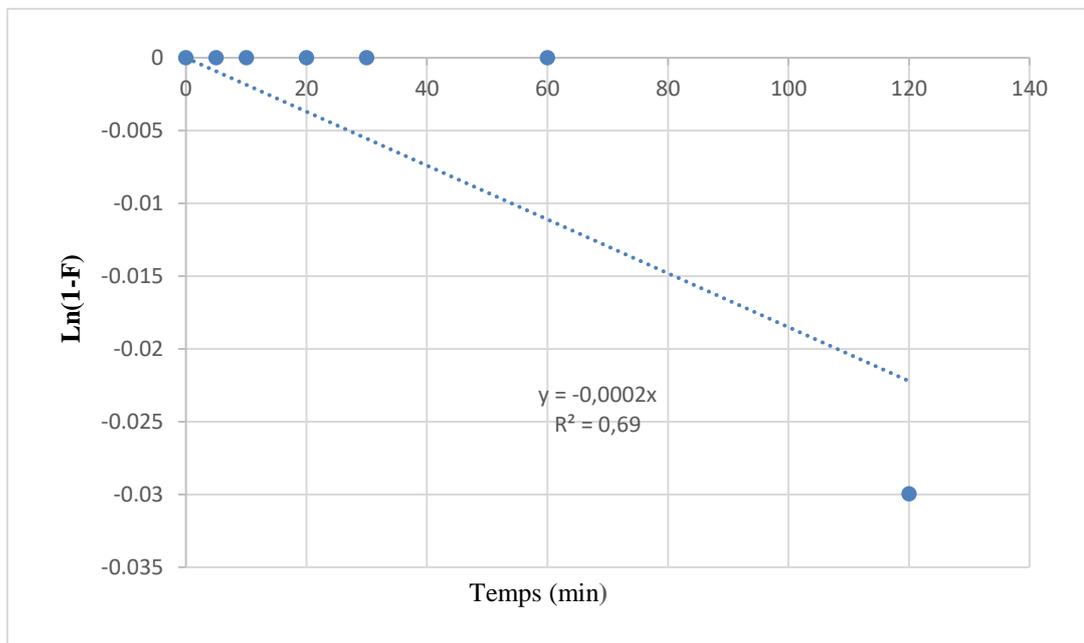


Cinétique de dissolution de Korsmeyer PeppasVit. E/LIPO in situ

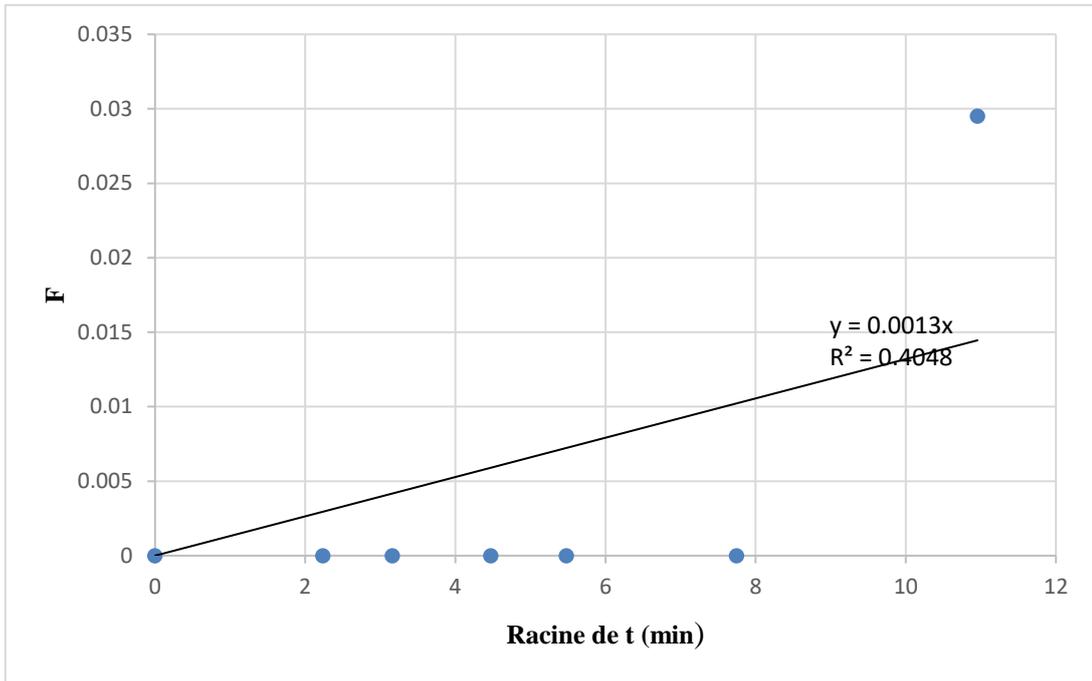
Association Vit.E/Chol/CD in situ



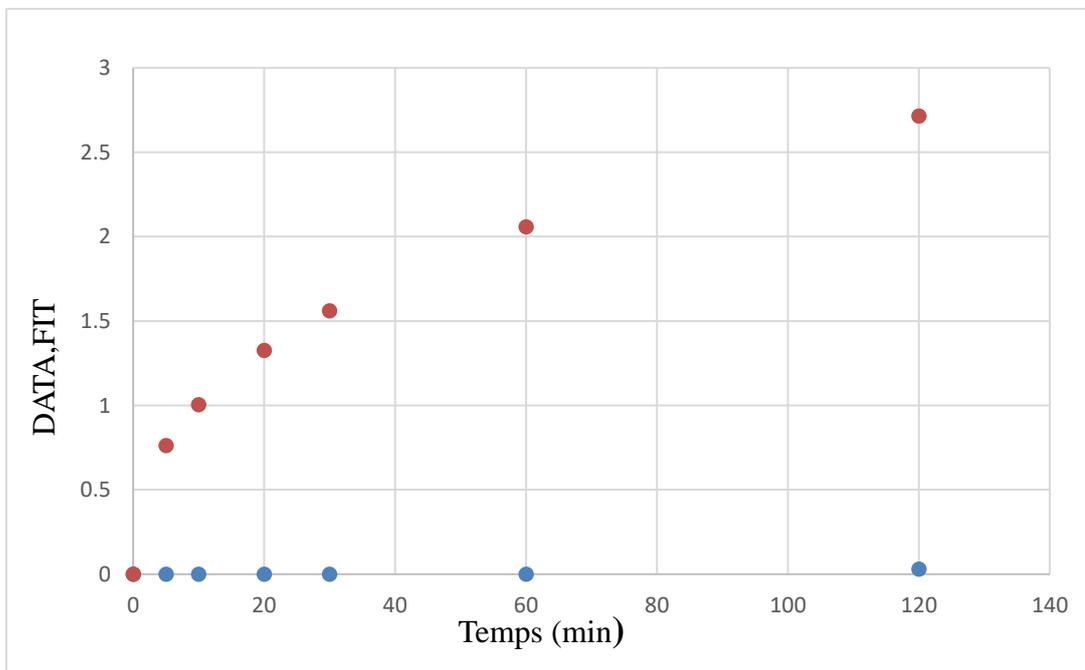
Cinétique de dissolution en association d'ordre zéro Vit. E/CD in situ



Cinétique de dissolution en association de premier ordre Vit.E/CD in situ

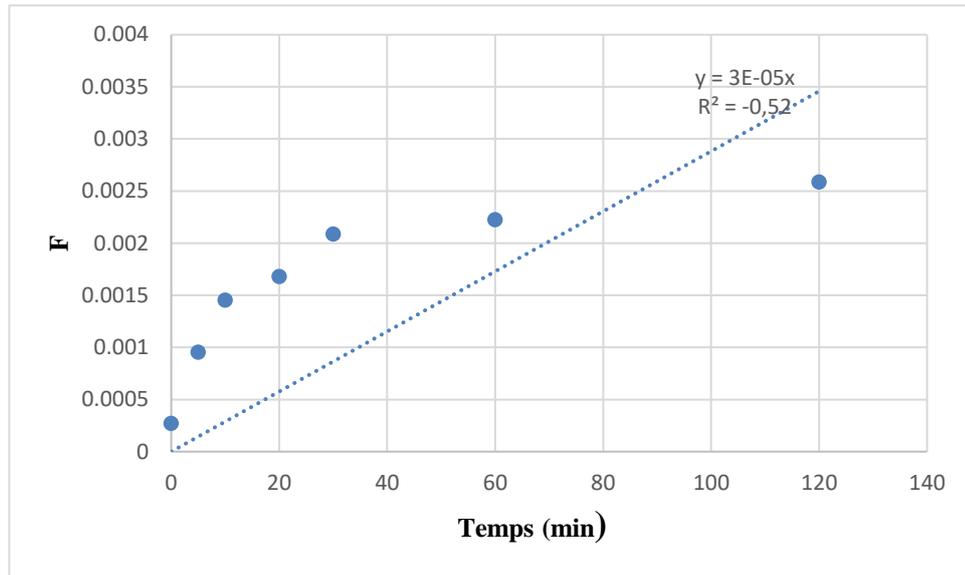


Cinétique de dissolution en association d'higushi Vit. E/CD in situ

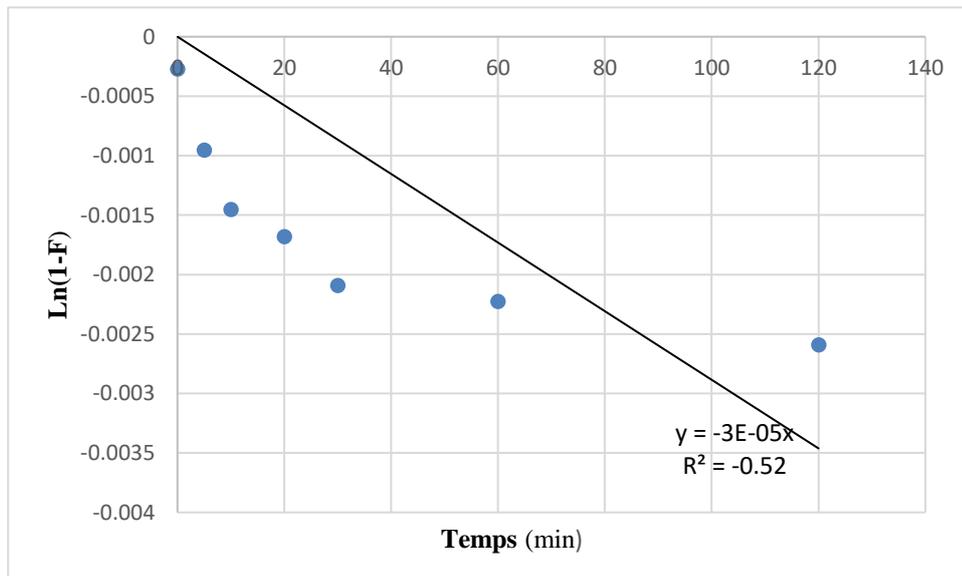


Cinétique de dissolution en association de Korsmeyer Peppas Vit.E/CD in situ

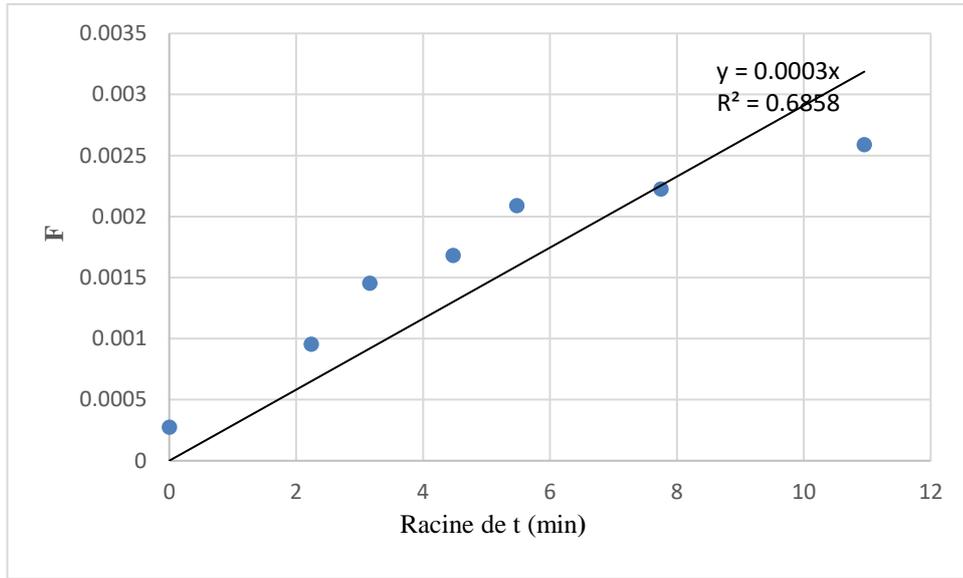
Association Vit.E/Chol/CD procédé



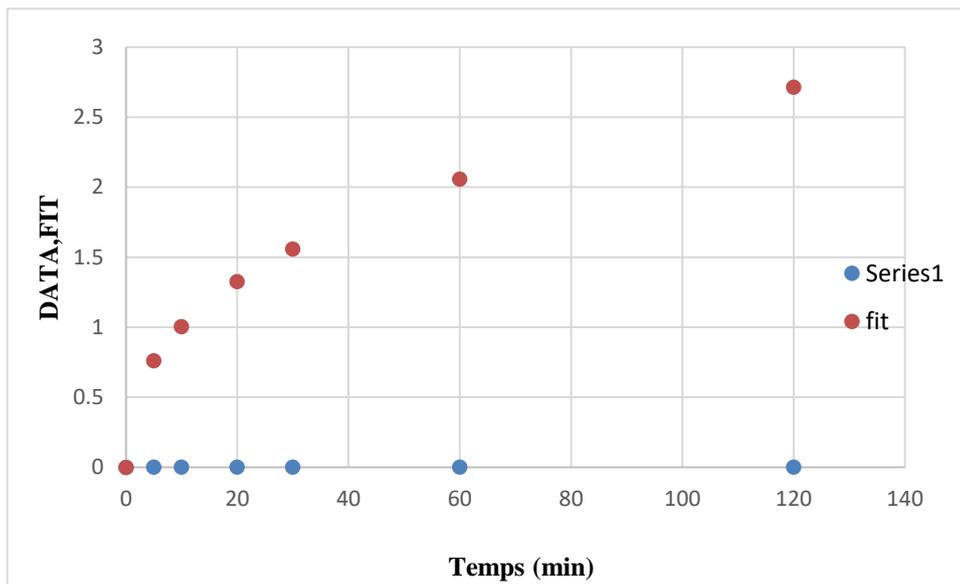
Cinétique de dissolution en association d'ordre zéro CD/Chol procédé



Cinétique de dissolution en association de premier ordre Chol/CD procédé

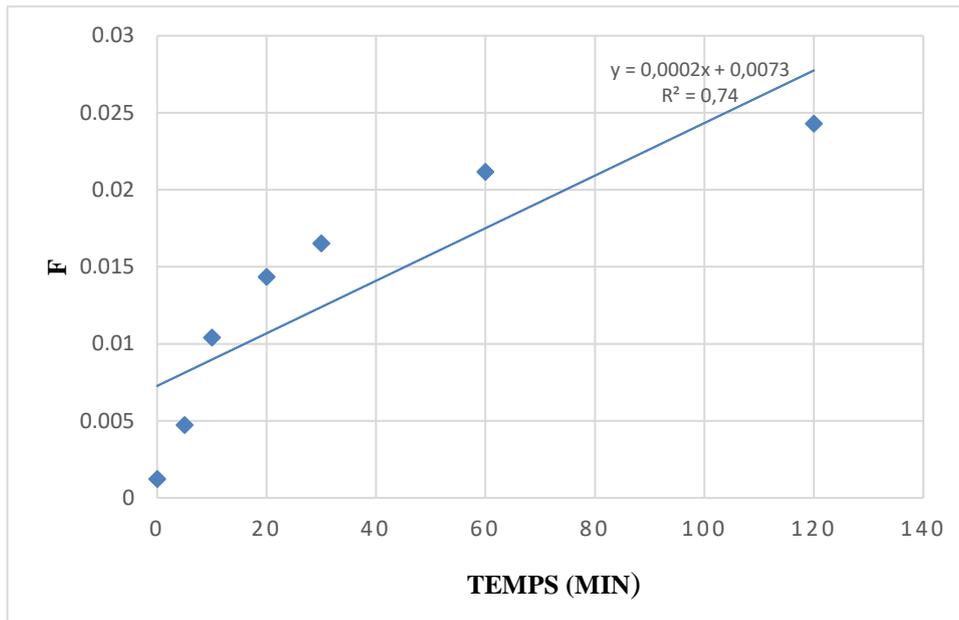


Cinétique de dissolution en association d'higushi Chol/CD procédé

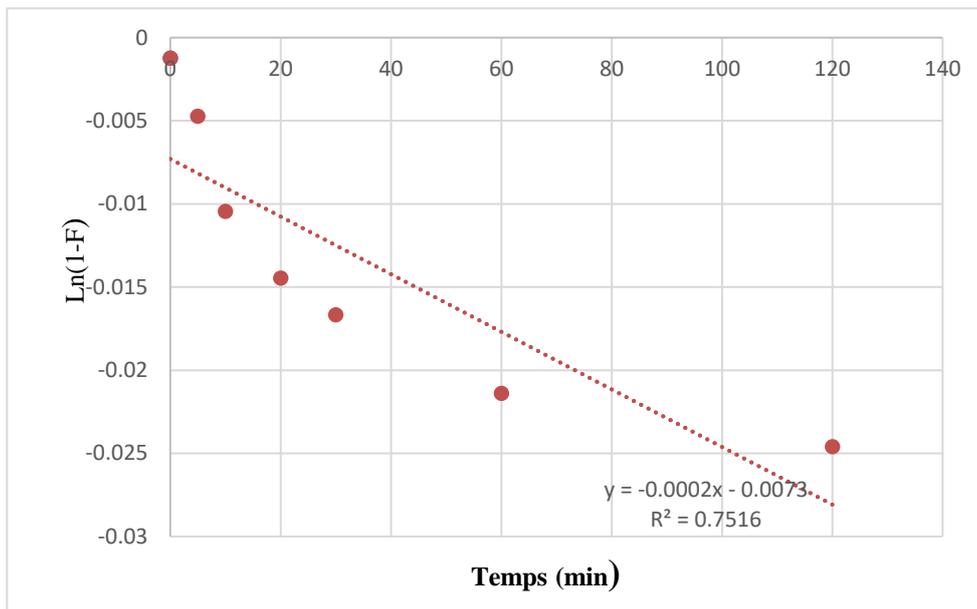


Cinétique de dissolution en association de Korsmeyer Peppas chol/CD procédé

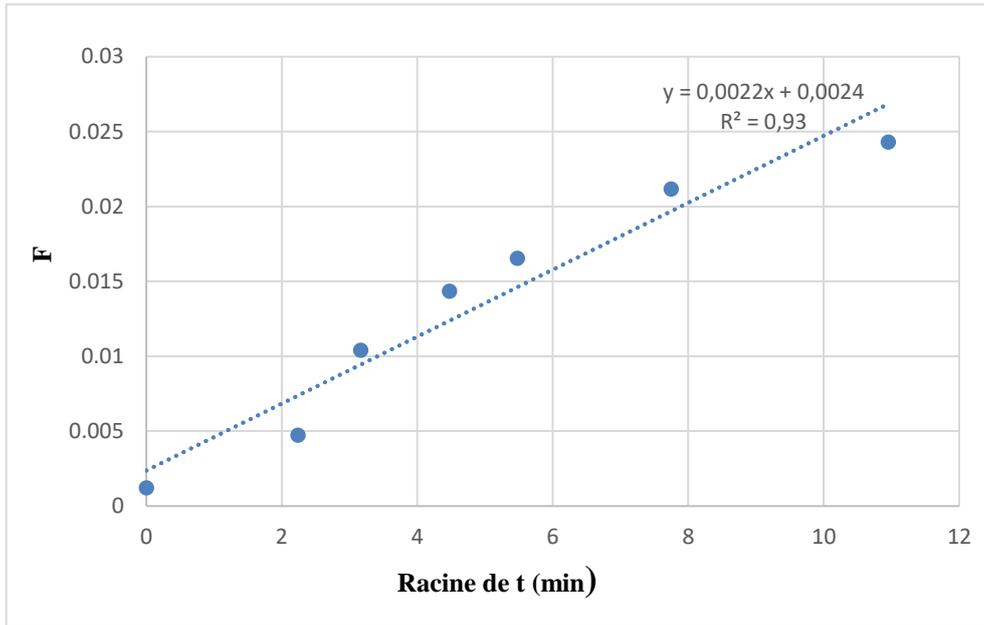
## Annexes



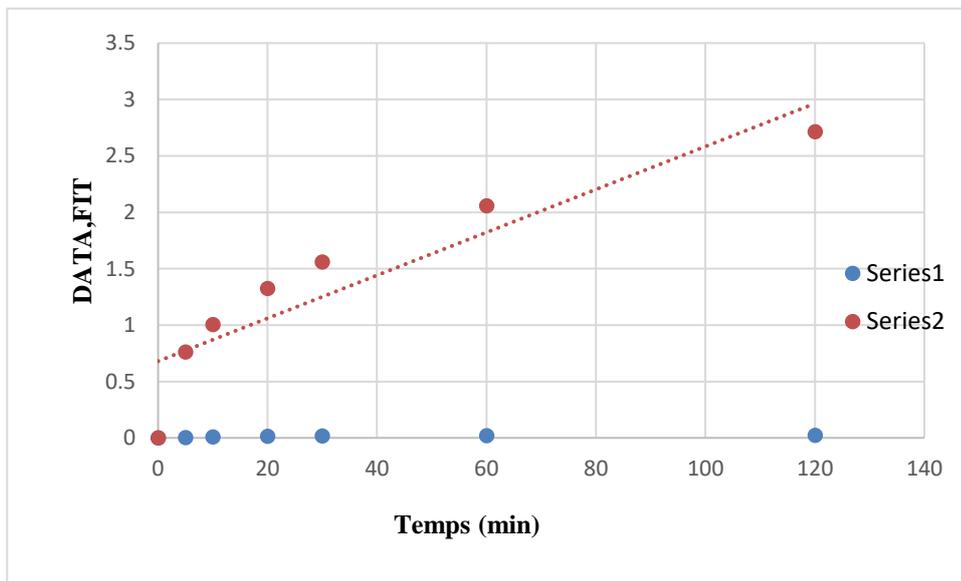
Cinétique de dissolution en association d'ordre zéro Vit..E/CD procédé



Cinétique de dissolution en association de premier ordre Vit.. E/CD procédé



Cinétique de dissolution en association d'higushi Vit.E/CD procédé



Cinétique de dissolution en association de Korsmeyer Peppas Vit.E/CD procédé

## **Résumé**

De nos jours, il est évident que la recherche et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques ne suffisent plus à combler la forte demande en médicament à utilisation humaine ou vétérinaire. L'une des stratégies les plus prometteuses consiste à associer le principe actif à un vecteur (cyclodextrine /polyéthylène glycol/ liposome). Il existe plusieurs techniques de préparation des complexes, la grande majorité de ces procédés consomment dans la plupart des cas beaucoup d'énergie et se basent sur des méthodes empiriques. L'objectif de notre travail est d'effectuer une comparaison entre les procédés classiques d'encapsulation et la complexation *in situ* et moduler les propriétés pharmacologiques (motilité spermatique) des substances active afin d'optimiser leur efficacité thérapeutique.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons commencé par préparer plusieurs solutions, que nous avons caractérisé par HPLC. Les résultats obtenus montrent que les solubilités optimales sont obtenues par procédé. Par la suite, nous avons réfrigéré le sperme ovin après l'avoir traité, durant un laps de temps, nous avons pu avoir un résultat, mais au bout de deux heures, la peroxydation et le choc thermique on prit le dessus, ce qui est probablement dû à la faible quantité solubilisée des molécules actives par *in situ*.

**Mots clé :** *in situ*, nano-encapsulation, vitamine E, cholestérol, cryoconservation spermatique.

## **Abstract**

Nowadays, it is obvious that the research and development of new therapeutic molecules is no longer sufficient to meet the high demand of drugs for human or veterinary use. One of the most promising strategies consists in associating the active ingredient with a vector (cyclodextrin/polyethylene glycol/liposome). There are several techniques for the preparation of complexes, the vast majority of these processes consume in most cases a lot of energy and are based on empirical methods. The objective of our work is to compare classical encapsulation processes and *in situ* complexation and to modulate the pharmacological properties (sperm motility) of the active substances in order to optimize their therapeutic effectiveness.

In order to achieve our objective, we started by preparing several solutions, which we characterized by HPLC. The results obtained show that the optimal solubilities are obtained by process. Then by refrigerating the ovine semen after having treated it, it was found that there was a result during a period of time, but after two hours, the peroxidation and the thermal shock took over, which is probably due to the low solubilized amount of active molecules by *in situ*.

**Key words :** *in situ*, nano-encapsulation, vitamin E, cholesterol, sperm cryopreservation.