

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**  
**Option : Science et Technologie du Médicament**

**Thème :**

***Préparation, optimisation et caractérisation des liposomes de  
vitamine E***

**Réalisées par :**

M<sup>lle</sup> DAOUD Lynda

M<sup>lle</sup> OUYAHIA El djida

**Encadré par :**

M<sup>r</sup> Sofiane FATMI

**Co- promotrice :**

M<sup>me</sup> N. BEL AHCENE

**Soutenus devant le jury :**

**Président :** Mr F. REZGUI

**Examinatrice :** M<sup>lle</sup> N. BOUKTIT

**Invitée :** M<sup>me</sup> F. BRADAI

**Promotion 2016**

## *REMERCIEMENT:*

Nous remercions tout d'abord Dieu, de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

### *À notre promoteur Monsieur FATMI*

Nous désirons tout d'abord vous exprimer notre très grande reconnaissance, pour non seulement avoir bien voulu diriger ce travail mais aussi pour avoir tout mis en œuvre pour son bon déroulement par votre disponibilité et la qualité de vos conseils.

Nous vous remercions de nous avoir fait bénéficier de votre expérience, de nous avoir guidé avec patience, et tout particulièrement pour la rigueur scientifique que vous avez sus nous inculquer, puissiez-vous trouver ici le témoignage de notre plus haute considération et de notre plus profond respect.

### *À Madame AMRANI*

Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Votre expérience et vos précieux conseils ont permis l'accomplissement de ce travail. Nous avons particulièrement apprécié votre enthousiasme et votre dynamisme communicatif, votre bonne humeur qui nous a toujours apaisées et surtout pour votre patience.

### *À Madame BEL AHCENE*

Nous vous remercions tout d'abord de nous avoir accordé l'opportunité de travailler au sein du laboratoire que vous dirigez, nous n'oublierons jamais votre premier accueil, vos encouragements et ces conseils très pertinents. Nous

sommes très reconnaissantes pour ces grandes contributions. Soyez assurée, de toute notre estime et de notre profond respect.

*À Monsieur HADJ SADOK,*

Nous le remercions tout d'abord de nous avoir accordé l'opportunité de travailler au sein du laboratoire qu'il dirige, nous n'oublierons jamais son accueil. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour ses conseils pertinents

*A Madame OUYAHIA*

Nous la remercions chaleureusement pour son appui et son aide si précieuse.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à **Mr IGUARWADA** qui nous a ouvert les portes du laboratoire qu'il dirige et qui nous a permis d'accéder au microscope casa. Nous remercions aussi, **Mr Ala Adine** pour le temps, aide et conseils qu'il nous a prodigués, Veuillez, Messieurs, trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions l'ensemble des membres du laboratoire de l'industrie TAPHCO pour leur accueil, et plus particulièrement les demoiselles Fahima, Zina et Ourida ainsi que Mr Omare et Mr farhate que nous avons côtoyés quotidiennement avec un réel plaisir. Nous remercions également le directeur général.

Nous adresserons aussi nos sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'enrichir ce modeste travail par leur expertise.

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

## *Dédicace*

Je dédie ce travail à mes très chers parents que j'affectionne de toute mon âme, qui m'ont toujours encouragé et donner beaucoup de volonté.

Combien sont sacrés pour moi leurs précieux conseils, leurs soutiens moraux ont été pour moi la source de mon énergie et de ma persévérance à aller de l'avant.

**A mes frères et sœurs**

**A mes belles sœurs**

**Et à mon beau frère**

Que j'aime beaucoup et que je remercie énormément pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Que Dieu vous accorde une vie pleine de bonheur et de santé.

**A mes petits neveux**

Que j'adore énormément

**A tous mes amis(es) que j'aime énormément**

A toute ma famille

A tous mes camarades de la promotion Génie des procédés 2016

A mon binôme Lynda qui m'a soutenu tout au long de notre travail

**EL DJIDA**

## *Dédicace*

### *A ma mère*

*A toi la plus douce, la plus tendre et la plus adorable des mamans,*

*Tu m'as généreusement comblé d'affection et de bienveillance.*

*Tu as toujours fait de ton mieux pour m'assurer bonheur et confort.*

*Pour ton amour profond, ton soutien infaillible et tes sacrifices*

*innombrables, je te dédie ce travail en témoignage de mon*

*éternelle reconnaissance et de mon très grand attachement.*

*Que le tout puissant te garde le plus longtemps parmi nous, te procure*

*santé, bonheur et sérénité et te protège de tout mal.*

*A mes très chères sœurs Amel et Melyssa, mes beaux-frères Sami et*

*Ahmed, et ma petite nièce Léa*

*Votre amour et votre soutien ne m'ont jamais fait défaut.*

*Qu'il me soit permis de vous exprimer toute mon adoration et mon*

*Indéfectible attachement.*

*Que Dieu vous accorde une vie pleine de bonheur et de santé.*

*A mon fiancé kousseyla*

*Qui n'a jamais cessé de croire en moi*

*A toutes mes amies*

*Que j'aime profondément*

*Ma famille (tantes et oncles, cousins et cousines*

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1.</b> La structure d'un liposome.....	4
<b>Figure I.2.</b> Structure chimique d'un phospholipide et représentation du caractère amphiphile...	5
<b>Figure I.3.</b> Structure de la molécule de cholestérol.....	6
<b>Figure I.4.</b> Représentation schématique de la structure des deux états d'une bicouche de phospholipides. a : Phase gel (solide). b : Phase cristal liquide (fluide).....	7
<b>Figure I.5.</b> Classification des liposomes.....	9
<b>Figure I.6.</b> Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	14
<b>Figure I.7.</b> Exemple d'encapsulation de molécules hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) dans un liposome (les molécules encapsulées sont représentées en rose).....	17
<b>Figure II.1.</b> La structure chimique du Tocophérol.....	21
<b>Figure II.2.</b> La structure chimique du Tocotriénol.....	21
<b>Figure II.3.</b> Structure chimique du dl-tocophérol.....	25
<b>Figure II.4.</b> Structure chimique du D-alpha tophérol acide succinate.....	25
<b>Figure II.5.</b> Structure chimique Alpha-tocophéryl nicotinate.....	25
<b>Figure III.1.</b> Structure des squelettes glycérophosphate et sphingosylphosphate.....	28
<b>Figure III.2.</b> Structure chimique de la phosphatidylcholine.....	30
<b>Figure III.3.</b> Structure des phospholipides selon la température de transition de phase.....	31
<b>Figure III.4.</b> Structure chimique de cholestérol.....	35
<b>Figure IV.1.</b> Structure d'un spermatozoïde.....	40
<b>Figure VI.1.</b> La collecte des spermatozoïdes du bovin.....	55
<b>Figure VII.1.</b> Chromatogramme de la solution contenant le cholestérol.....	57
<b>Figure VII.2.</b> Chromatogramme de la solution contenant le phospholipide.....	57
<b>Figure VII.3.</b> Chromatogramme du diluant (méthanol).....	68
<b>Figure VII.4.</b> Chromatogramme du standard vitamine E.....	58

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure VII.5.</b> Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	59
<b>Figure VII.6.</b> Facteurs statistiques obtenus.....	61
<b>Figure VII.7.</b> Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.....	63
<b>Figure VII.8.</b> Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des liposomes.....	63
<b>Figure VII.9.</b> Représentation de la surface de réponse du taux d'encapsulation.....	65
<b>Figure VII.10.</b> Représentation de la surface de réponse des tailles de liposomes.....	66
<b>Figure VII.11.</b> Chromatogramme de la solution liposomale optimale.....	67
<b>Figure VII.12.</b> Micrographies par MEB des matières premières, placebo et solution liposomale.....	69
<b>Figure VII.13.</b> Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire en ligne droite des SPZ en fonction des traitements.....	70

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.1.</b> Classification des liposomes selon Papadjopoulos (1977).....	9
<b>Tableau I.2.</b> Classification des liposomes selon les procédés de préparation.....	10
<b>Tableau II.1.</b> Dénomination de différents tocophérols et tocotrienols.....	22
<b>Tableau II.2.</b> Les principales sources de vitamine E.....	24
<b>Tableau III.1.</b> Classification des glycérophospholipides.....	29
<b>Tableau III.2.</b> Différents arrangements des phospholipides en solution aqueuse.....	33
<b>Tableau III.3.</b> Propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	36
<b>Tableau VI.1.</b> Matrice d'essai obtenue par le plan d'expérience factoriel.....	49
<b>Tableau VI.2.</b> Matrice d'expérience avec des valeurs centrées réduites.....	49
<b>Tableau VI.3.</b> Concentrations en vit E utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage (linéarité).....	53
<b>Tableau VII.1.</b> Résultats expérimentaux du taux d'encapsulation.....	60
<b>Tableau VII.2.</b> Résultats expérimentaux de la taille des liposomes.....	60
<b>Tableau VII.3.</b> Résultats expérimentaux de la matrice finale.....	61
<b>Tableau VII.4.</b> Valeurs numériques des caractéristiques statistiques.....	62
<b>Tableau VII.5.</b> Détermination de l'optimum.....	65

## ABREVIATIONS ET NOMENCLATURE

PLs	phospholipides
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PS	phosphatidylsérine
PI	phosphatidylinositol
PG	phosphatidylglycérol
Chol	cholestérol
Phos	phospholipide
Vit E	vitamine E
OLV	vésicules oligo lamellaire
MLV	vésicules multi- lamellaires
MVV	vésicules vésiculaires multiples
LUV	large vésicules uni lamellaires
SUV	petites vésicules uni lamellaires
EIV	vésicules a 'injection d'éther
VET	vésicules obtenu par extrusion
FPV	vésicules produites par presse de French
REV	vésicules évaporation en phase inverse
FTV	vésicules obtenus par congélation - décongélation
VCL	vitesse de la trajectoire curvilinéaire
VAP	vitesse de la trajectoire moyenne
VSL	vitesse de la trajectoire en ligne droite
CASA	analyse de sperme assisté par ordinateur
MEB	microscope électronique à balayage
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance

## ABREVIATIONS ET NOMENCLATURE

Spz	spermatozoïde
ADN	acide désoxyribonucléique
PAs	principes actifs
R1 et R2	chaînes d'acide gras
HMG	hydroxy-méthyl-glutaryl
ROS	les espèces réactives de l'oxygène
$x_i$	variables
y	réponse
x1	le niveau du facteur 1
x2	le niveau du facteur 2
a0	le coefficient constant du modèle
a1	le coefficient du facteur 1
a2	le coefficient du facteur 2
a12	le coefficient du terme $x_1x_2$
m	quantité de phospholipide,
m'	quantité de cholestérol
V	volume d'éthanol
V'	volume de la solution tampon pH=7.4

### Nomenclature

Tm	la température de transition de phase
P	paramètre d'empilement
v	le volume de la tête polaire du PL
a0	l'aire de la tête polaire du PL
lc	longueur critique de la chaîne hydrophobe du PL

## ABREVIATIONS ET NOMENCLATURE

T	température
°C	degré celsius

# SOMMAIRE

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Liste d'abréviation

## Introduction générale.....1

### Chapitre I : Les liposomes

#### I.1. Introduction.....3

#### I.2. Historique.....3

#### I.3. Définition des liposomes.....3

#### I.4. Composition des liposomes.....4

##### I.4.1. Les phospholipides.....4

##### I.4.2. Les stéroïdes.....5

###### I.4.2.1. Le cholestérol.....5

#### I.5. Structure des liposomes.....6

#### I.6. Les propriétés physico-chimiques des liposomes.....6

#### I.7. Classification.....7

##### I.7.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique.....8

###### I.7.1.1. Les liposomes multilamellaires.....8

###### I.7.1.2. Les liposomes unilamellaires.....8

##### I.8.2. Classification selon des critères technologiques.....9

##### I.8.3. Classification selon leur composition et leur application in vivo.....10

###### I.6.3.1. Les liposomes conventionnels.....10

###### I.6.3.2. Les liposomes furtifs.....10

###### I.6.3.3. Immunoliposomes.....11

###### I.6.3.4. Les liposomes cationiques.....11

#### I.7. Stabilité des liposomes.....11

# SOMMAIRE

I.7.1. Stabilité chimique.....	11
I.7.2. Stabilité physique.....	12
I.7.3. Stabilité colloïdale.....	12
I.8. Avantage et inconvénient des liposomes.....	13
I.8.1. Avantages.....	13
I.8.2. Inconvénients.....	13
I.9. Les principales méthodes de préparation.....	13
I.9.1. Hydratation d'un film lipidique.....	13
I.9.2. Evaporation en phase inverse.....	14
I.9.3. Méthode de chauffage.....	14
I.9.4. Injection d'une solution éthanolique de phospholipides.....	15
I.10. Dégradation des liposomes.....	15
I.11. Encapsulation de substances dans les liposomes.....	15
I.12. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes.....	16
I.12.1. Type de substances à encapsuler.....	16
a-Les substances hydrophiles.....	16
b-Les substances hydrophobes.....	16
c-Les substances amphiphiles.....	16
I.12.2. Type de liposomes.....	17
I.13. Mesure de l'efficacité d'encapsulation.....	18
I.13.1. Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation).....	18
I.13.2. Encapsulation pondérée.....	18
I.13.3. Volume aqueux encapsulé.....	18
I.14. Principaux modes d'encapsulation.....	18

# SOMMAIRE

1.14.1. Encapsulation passive.....	19
I.14.2. Encapsulation active.....	19
I.15. Conclusion.....	19

## Chapitre II : La vitamine E

II.1. Introduction.....	20
II.2. Historique de la vitamine E.....	20
II.3. Définition de la vitamine E.....	20
II.4. Structure chimique de la vitamine E.....	21
II.5. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E.....	22
II.6. La solubilité de la vitamine E.....	22
II.7. Propriétés biochimiques, métaboliques et rôle de la vitamine E.....	22
II.8. Origines de la vitamine E.....	23
II.8.1. Origine Naturelle.....	23
II.8.2. Origine synthétique.....	24
II.9. Les dérivés de la vitamine E.....	24
II.9.1. Synthétique.....	24
II.9.2. Estérifiés.....	25
II.9.2.1. tocophérol succinate.....	25
II.9.2.2. Alpha-tocophéryl nicotinate.....	25
II.10. Toxicité de la vitamine E.....	26
II.11. Dosage de la vitamine E.....	26
II.11.1. Dosage de la vitamine E par HPLC en phase inverse.....	26
II.11.2. Principe de la méthode.....	26
II.12. Conclusion.....	27

# SOMMAIRE

## Chapitre III : Phospholipide et cholestérol

III.1. Introduction.....	28
III.2. Les phospholipides.....	28
III.2.1. Définition de phospholipides.....	28
III.2.3. Définition de la phosphatidylcholine.....	29
III.2.4. Historique.....	29
III.2.5. Structure chimique.....	30
III.2.6. Propriétés physiques.....	31
III.2.7. Rôle des phospholipides.....	32
III.2.7.1. L'auto assemblage des phospholipides en solution aqueuse.....	32
III.3. Le cholestérol.....	34
III.3.1. Définition du cholestérol.....	34
III.3.2. Historique.....	34
III.3.3. Structure chimique du cholestérol.....	34
III.3.4. Sources du cholestérol.....	35
III.3.5. Rôles du cholestérol.....	35
III.3.6. Propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	36
III.3.7. La solubilité du cholestérol.....	36
III.3.8. Cholestérol et les liposomes.....	37
III.3.9. Le cholestérol et la membrane spermatique.....	37
III.3.10. Conclusion.....	38

## Chapitre IV : Le sperme

IV.1. Introduction.....	39
IV.2. Le sperme.....	39

# SOMMAIRE

IV.2.1. Composition chimique du sperme.....	39
IV.2.2. Structure de spermatozoïde.....	39
IV.2.3. Le plasma séminal.....	40
IV.3. Historique .....	40
IV.4. Evaluation de la qualité du sperme.....	40
IV.4.1. Examen macroscopique.....	40
IV.4.1.1. Volume de l'éjaculat.....	41
IV.4.1.2. Couleur du sperme.....	41
IV.4.1.3. Viscosité du sperme ou consistance.....	41
IV.4.1.4. pH du sperme.....	41
IV.4.2. Examen microscopique.....	41
IV.4.2.1. Mobilité.....	41
IV.5. Conservation du sperme.....	41
IV.5.1. Caractéristiques et rôles des dilueurs.....	42
IV.5.2. Cryoprotecteurs.....	42
IV.5.3. Les étapes de la congélation.....	42
IV.5.3.1. Centrifugation.....	42
IV.5.3.2. Dilution.....	43
IV.5.3.3. Equilibration.....	43
IV.5.3.4. Conditionnement.....	43
IV.5.3.5. Conservation.....	43
IV.5.3.6. Température et temps de décongélation.....	43
IV.5.3.7. Dilution après décongélation.....	43
IV.5.4. Réfrigération.....	44

# SOMMAIRE

IV.5.4.1. Les effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes.....	44
IV.6. La semence et la vitamine E.....	45
IV.7. Les dérivés actifs de l'oxygène.....	45
IV.8. Action antioxydante.....	45
IV.9. Conclusion.....	46

## Chapitre V : Les travaux antérieurs

V.1. Introduction.....	47
V.2. les travaux antérieurs.....	47

## Chapitre VI : Méthodes et matériels

VI.1. Réalisation du plan d'expérience.....	49
VI.2. Préparation des liposomes de vitamine E et placebo par Co-évaporation.....	49
VI.2.1. Préparation des liposomes (matrice d'essai) de vitamine E.....	50
VI.2.2. Préparation de la solution liposomale optimale.....	51
VI.2.3. Préparation du liposome placebo (blanc).....	51
VI.3. Caractérisation des liposomes.....	51
VI.3.1. Le taux d'encapsulation.....	51
VI.3.1.1. Ultracentrifugation des liposomes.....	51
VI.3.1.2. Le dosage de la vitamine E par HPLC.....	52
VI.3. Tailles des liposomes.....	54
VI.4. Analyse par microscopie à balayage électronique (MEB).....	54
VI.7. Conservation du sperme bovin en utilisant les liposomes de vit E.....	54
VI.7.1. Réfrigération du sperme bovin.....	54

# SOMMAIRE

## Chapitre VII : Résultats et discussions

VII.1. Vérification de la méthode de dosage de la vitamine E par HPLC.....	57
VII.1.1. Spécificité.....	57
VII.1.2. Répétabilité et paramètres de conformité.....	58
VII.1.3. Courbe d'étalonnage (linéarité).....	59
VII.2. Modélisation et optimisation des liposomes de vit E.....	60
VII.2.1. Détermination des réponses du plan d'expérience.....	60
VII.2.2. Analyse statistique.....	61
VII.2.3. Etude des effets propres.....	63
VII.2.4. Modèle mathématique proposé.....	64
VII.3. Détermination de l'optimum.....	64
VII.4. Caractérisations des liposomes.....	67
VII.4.1. Dosage de la solution liposomales optimal par HPLC.....	67
VII.4.2. Analyse par microscopie à balayage électronique (MEB).....	68
VII.5. Etude de l'impact des solutions liposomales sur la conservation des spermatozoïdes bovin.....	70
<b>Conclusion générale</b> .....	72
<b>Références bibliographiques</b> .....	73
<b>Annexes</b> .....	85

# Introduction générale

La conservation de la semence est un sujet qui a fait et fait encore l'objet de nombreuses recherches. Ces dernières ont toujours eu pour objectif de perfectionner les techniques de conservation et d'obtenir les meilleurs résultats possibles en termes de fécondité et de fertilité [1].

En effet, de nombreuses études ont montré un effet bénéfique des antioxydants (les enzymes, glutathion et les polyphénols) en général et des vitamines (vitamine E et vitamine C) en particulier sur la conservation du sperme. L'une des vitamines la plus souvent utilisée à cet effet, probablement du fait de son grand pouvoir réducteur est : l'alpha-tocophérol, une des formes de la vitamine E présente en grande quantité dans les huiles végétales [2].

Ainsi elle pourrait protéger les spermatozoïdes à l'état frais ou réfrigéré. On peut donc croire qu'elle puisse modifier le temps de conservation du sperme ou encore sa résistance à la congélation-décongélation, des aspects très importants pour l'insémination. Encore faut-il que cette **vitamine liposoluble** passe dans la **semence aqueuse** pour exercer une action de conservation [3].

Pour dépasser ce nouvel obstacle, notre choix c'est porté sur les liposomes, ce choix fut motivé par deux raisons majeures ; la première étant son pouvoir solubilisant et la deuxième est due à la composition même de ces vésicules qui contiennent du cholestérol, un élément connu pour son effet protecteur des parois membranaires.

Ces vecteurs de nouvelle génération, sont des vésicules constituées d'un volume interne aqueux entouré d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, qui permettent le piégeage de molécules hydrophobes améliorant ainsi leur solubilité [4].

Dans ce mémoire, nous présenterons une revue bibliographique concernant les liposomes, regroupant différents aspects à savoir leurs compositions, structures, classification et les différentes méthodes de leurs préparations.

Ensuite nous passerons en revue les principales caractéristiques et les différentes propriétés de l'antioxydant que nous avons choisi ; la vitamine E.

Puis nous résumerons et discuterons les différents tests et essais planifiés par un plan d'expérience ; ce dernier nous a permis d'optimiser le procédé de formulation des liposomes, par suite la solution liposomale optimale a été caractérisée par diverses techniques :

## INTRODUCTION GENERALE

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et microscopie électronique à balayage (MEB).

Nous avons aussi résumé et discuté les résultats obtenus lors de l'essai de conservation de sperme bovin en utilisant notre préparation optimale comme diluant.

En guise de conclusion on résumera les résultats les plus importants obtenus à l'issue de ce travail seront présentés tout en recommandant les perspectives qui pourront l'enrichir.

# Chapitre I: Les liposomes

## I.1. Introduction

Le terme de liposome ne s'applique qu'à l'entité comprenant une vésicule et une composition à base de phospholipides. En effet, ils sont des vésicules constituées d'un volume interne aqueux entouré d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques. Ils sont de plus en plus développés dans la recherche pharmaceutique comme vecteurs de médicaments car ils permettent d'encapsuler des principes actifs de solubilité différente. Ils sont notamment utilisés pour favoriser la solubilité de substances actives insolubles en milieu aqueux, pour augmenter leur biodisponibilité, pour améliorer dans certains cas la stabilité et pour diminuer les effets indésirables [1].

Dans ce chapitre, nous allons revenir plus particulièrement sur la signification du terme « liposome ». Puis nous l'étudierons d'un côté chimique (découverte, synthèse, caractérisation, propriétés, composition, préparation...) et d'un autre côté biologique (application, dégradation, stabilité...).

## I.2. Historique

Les liposomes ont d'abord été un outil d'étude précieux pour les biophysiciens dans la compréhension du comportement des composés amphiphiles en solution. Ils furent ensuite utilisés par les biologistes comme modèles pour l'étude de la perméabilité cellulaire avant d'être proposés, par la suite, comme vecteurs intracellulaires de substances médicamenteuses. Les applications des liposomes sont maintenant très variées dans des secteurs aussi différents que l'agro-alimentaire, cosmétique et la pharmacie [5].

La première méthode utilisée pour la préparation des liposomes est la méthode de Bangham. Elle consiste à évaporer une solution organique de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sec sur les parois d'un récipient. La dispersion du film lipidique dans un milieu aqueux accompagnée d'une agitation régulière permet d'obtenir des liposomes.

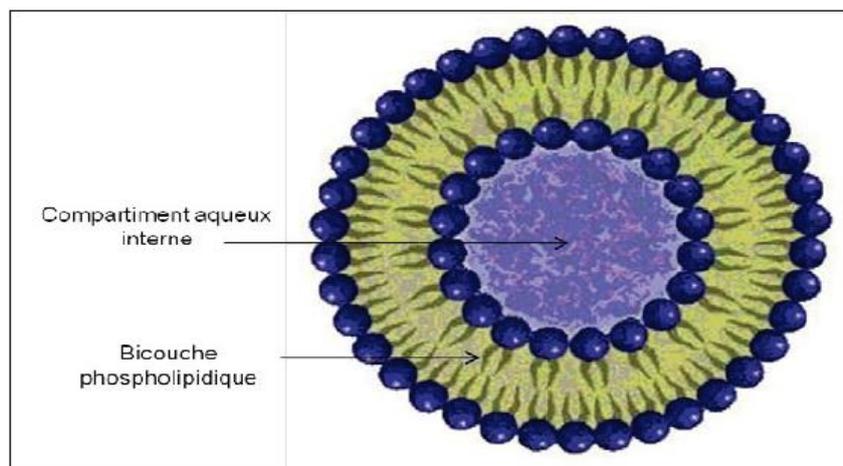
Mais c'est Mezei, qui le premier a suggéré que les liposomes pouvaient se relever utiles comme systèmes de transport médicamenteux pour le traitement des maladies cutanées [6].

## I.3. Définition des liposomes

Les liposomes sont des systèmes d'encapsulation de structures sphériques fermées constituées d'un espace aqueux interne. Ils sont caractérisés par la courbure des bicouches lipidiques composées de phospholipides entourant une partie du solvant environnant (figure I.1), mais aussi de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux ou d'autres composés.

La taille du liposome va dépendre de la technique utilisée pour le synthétiser, elle est environ 70 fois plus petite qu'un globule rouge, de l'ordre de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre [7].

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) [8].



**Figure I.1.** La structure d'un liposome.

### I.4. Composition des liposomes

Les liposomes peuvent être formés à partir de divers phospholipides avec ou sans cholestérol.

#### I.4.1. Les phospholipides

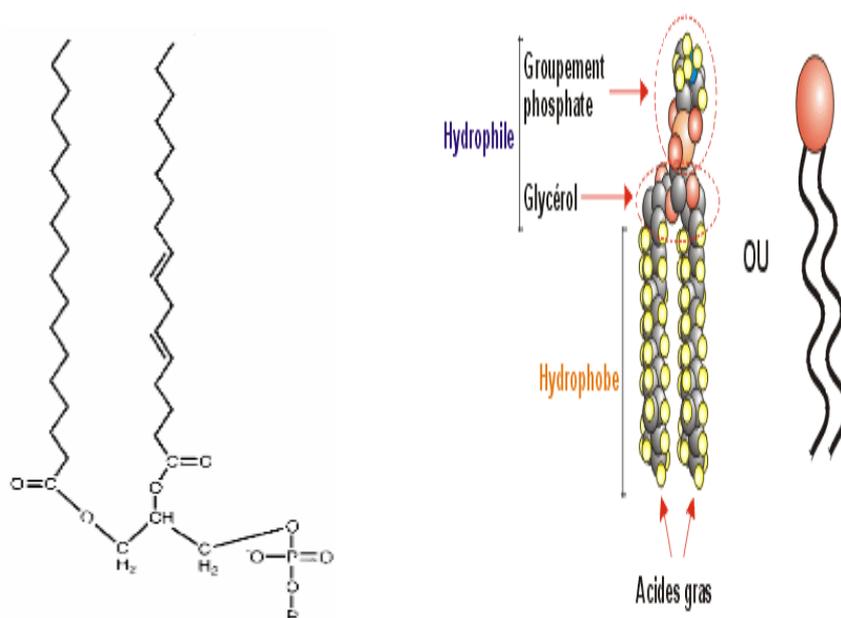
Les phospholipides (PLs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une zone polaire ou chargée à forte affinité pour l'eau (figure I.2), et d'une zone apolaire hydrophobe constituée de chaînes aliphatiques.

Les phospholipides (PLs) sont formés d'un glycérol estérifié par deux acides gras (R1 et R2) et à un groupement phosphoryle. C'est ce groupement qui donne le nom aux différents PLs.

- phosphatidylcholine (PC).
- phosphatidyléthanolamine (PE).
- phosphatidylsérine (PS).
- phosphatidylinositol (PI).
- phosphatidylglycérol (PG) [9].

## CHAPITRE I: LES LIPOSOMES

Les liposomes sont constitués à partir de différents phospholipides avec ou sans certains additifs. Les phospholipides les plus utilisés peuvent être d'origine naturelle (phosphatidylcholine d'œuf ou de soja) ou synthétique (par exemple la dimyristoylphosphatidylcholine, la dipalmitoylphosphatidylcholine) [9].



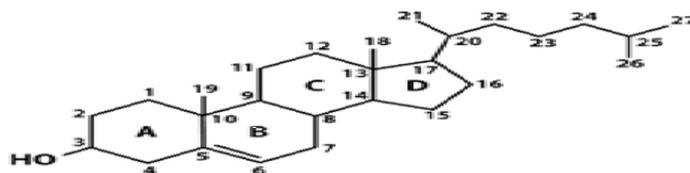
**Figure I.2.** Structure chimique d'un phospholipide et représentation du caractère amphiphile.

### I.4.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé 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 administration [10].

#### I.4.2.1. Le cholestérol

Le cholestérol est une substance cireuse molle, trouvée parmi les lipides dans le sang et dans toutes les membranes cellulaires, concentrée essentiellement dans le cerveau et la moelle épinière (Figure I.3). Il est le stérol majeur dans le corps humain et appartient à une classe de molécules appelées stéroïdes, il est nécessaire pour la biosynthèse des membranes cellulaires, plusieurs hormones, la vitamine D et les acides biliaires nécessaires pour digérer les graisses présentes dans nos aliments [11].



**Figure I.3.** Structure de la molécule de cholestérol.

Le cholestérol peut être ajouté au niveau des bicouches lipidiques des liposomes pour améliorer leurs caractéristiques, notamment en augmentant la micro viscosité, en réduisant la perméabilité aux molécules hydrophiles, en stabilisant la membrane et en augmentant la rigidité des vésicules [12, 13].

### I.5. Structure des liposomes

Les liposomes sont définis comme des vésicules d'une ou plusieurs formes et d'une ou plusieurs paroi(s) composée(s) de molécules amphiphiles formant des bicouches lipidiques et entourant une cavité aqueuse. Les bicouches comme nous l'avons déjà vu, sont composées de phospholipides naturels ou synthétiques, organisés de manière similaire à ceux présents dans les membranes des cellules. La proportion du cholestérol insérée dans les bicouches permet de jouer sur la stabilité des liposomes. La nature des phospholipides employés va également jouer un rôle sur la rigidité des membranes et sur leur perméabilité [14, 15].

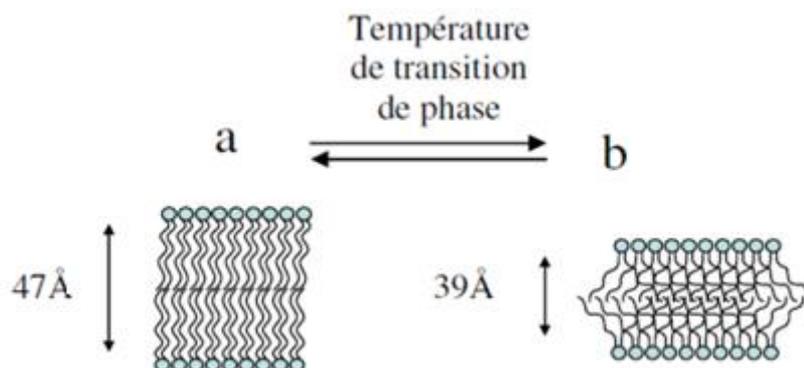
La structure des liposomes dépend de leur composition, mais également de leur mode de préparation. Dans la grande majorité des cas, les étapes générales d'obtention des liposomes sont les suivantes :

- Dissolution des lipides dans un solvant organique,
- Evaporation du solvant organique,
- Dispersion des lipides séchés dans une solution aqueuse [16].

### I.6. Les propriétés physico-chimiques des liposomes

L'état physique de la bicouche lipidique influe de manière importante sur les propriétés des liposomes. Les vésicules composées uniquement de phospholipides, maintenues à une température inférieure à la température de transition de la phase principale de ces phospholipides ( $T_c$ ), sont considérées comme « solides » (état « gel », dans lequel les chaînes acyles ont un aspect rigide) (figure I.4). A l'inverse, si la température du milieu ambiant est

supérieure à  $T_c$ , ces liposomes sont considérés « fluides » (état dans lequel les chaînes acyles ont une certaine liberté de mouvement).



**Figure I.4.** Représentation schématique de la structure des deux états d'une bicouche de phospholipides. a : Phase gel (solide). b : Phase cristal liquide (fluide) [17].

Cette température de transition de sa phase principale est fonction de la longueur des chaînes acyles. Ainsi, pour un phospholipide présentant les deux mêmes chaînes acyles, plus ces chaînes grasses seront longues, plus la valeur de  $T_c$  sera élevée. La présence d'insaturation, ainsi que de chaînes ramifiées ou incorporant des cycles (cyclopropane par exemple) induit une baisse considérable de  $T_c$ . D'autres facteurs, intrinsèques, tels que la polarité des lipides, ou extrinsèques, tels que l'adsorption d'ions ou de protéines, peuvent aussi provoquer une modification de la valeur de  $T_c$  [18].

La connaissance préalable de la température de transition de phase d'un lipide permet de faciliter sa formulation en liposomes. En effet, il convient d'hydrater le lipide préalablement avec une solution aqueuse à une température supérieure à  $T_c$ . Ainsi les lipides peuvent se dissocier-associer plus facilement entre eux et présenter une meilleure capacité à s'auto-assembler au sein d'une vésicule. La perméabilité d'un liposome à un soluté encapsulé est relativement faible lorsque la température est inférieure à  $T_c$ . Par contre, lorsque l'on s'approche de cette température ou qu'on la dépasse, la membrane des liposomes devient très perméable aux ions [19].

## I.7. Classification

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application *in vivo*) ou même, selon leur méthode de préparation [20].

### I.7.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité (figure I.5 et tableau I.2). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères [20].

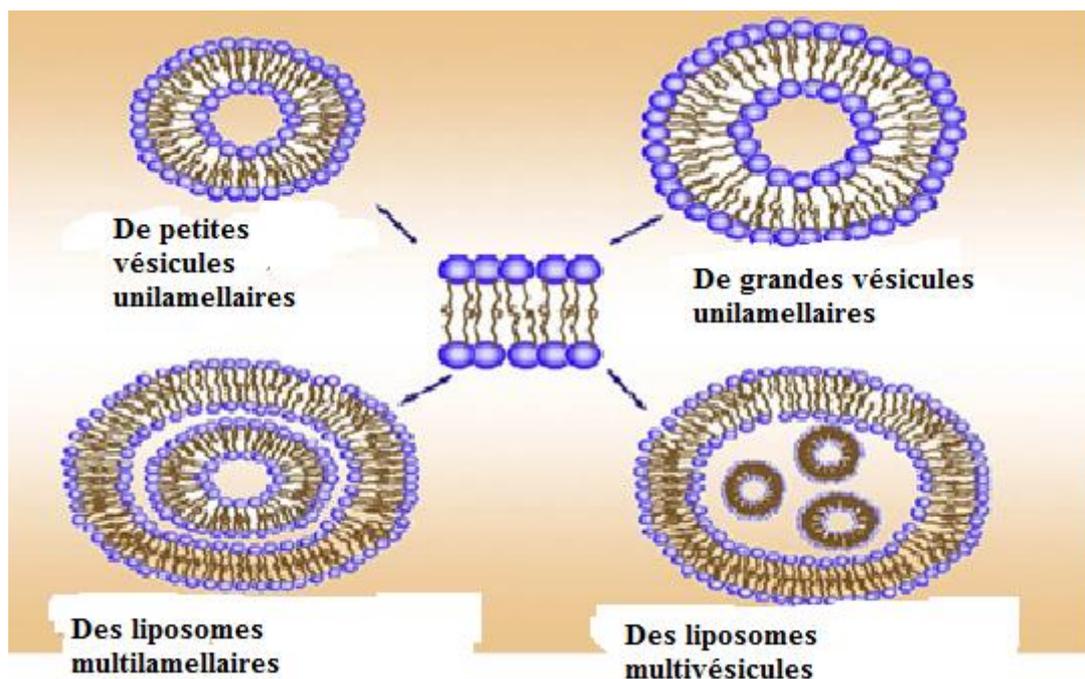
#### I.7.1.1. Les liposomes multilamellaires

Sont des liposomes comportant soit plusieurs bicouches concentriques (**O.L.V.** pour « oligo-lamellar vesicles » qui ont environ 5 bicouches, **M.L.V.** pour « multi lamellar vesicles » qui ont entre 5 et 20 bicouches), soit plusieurs bicouches non concentriques délimitant plusieurs compartiments aqueux (**M.V.V.** pour « multi vesicular vesicles »). Leur diamètre total, suivant le nombre de lamelles, est compris entre 400 à 3500 nm [21].

#### I.7.1.2. Les liposomes unilamellaires

Ne comportent qu'une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Ils peuvent être de grande taille (**L.U.V.** ou « large unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen allant de 100 nm à 1 µm, ou de petite taille (**S.U.V.** pour « small unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen variant de 20 à 100 nm [22].

## CHAPITRE I: LES LIPOSOMES



**Figure I.5.** Classification des liposomes [22].

**Tableau I.1.** Classification des liposomes selon Papadopoulos (1977) [21].

Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
Représentation	○	◯	⊙	⊕
Taille	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 μm
Capacité	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV.	peu utilisés
% d'encapsulation	0,5-1	35-60	5-15	
Stabilité	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface : MLV > LUV > SUV La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm.			

### I.8.2. Classification selon des critères technologiques

Il existe une grande diversité de procédés de préparation des liposomes qui sont cités dans la littérature, nous en avons retenu quelques un qui sont présentés dans le tableau I.2. Chaque

procédé génère des liposomes de caractéristiques données : lamellarité et diamètre en particulier [23].

**Tableau.I.2.** Classification des liposomes selon les procédés de préparation.

REV	Vésicules obtenues par évaporation en phase inverse (SUV et LUV)
MLV	MLV obtenues par évaporation en phase inverse
VET	Vésicules obtenues par extrusion
LUVET	LUV obtenues par extrusion
FPV	Vésicules produites par french press
FTV	Vésicules obtenues par congélation-décongélation
DRV	Vésicules obtenues par déshydratation-réhydratation
EIV	Vésicules obtenue par la méthode d'injection d'éther

### **I.9.3. Classification selon leur composition et leur application in vivo**

#### **I.9.3.1. Les liposomes conventionnels**

Ils peuvent être définis comme les liposomes typiquement composés de phospholipides (neutres ou chargés négativement) et /ou cholestérol. La plupart des liposomes utilisés comme vecteurs de médicaments sont des liposomes conventionnels. Ils sont caractérisés par un temps de circulation sanguine relativement court. En effet, après administration in vivo, on observe une captation rapide de ces liposomes par les cellules phagocytaires (macrophages) du système réticuloendothélial. Ils s'accumulent alors dans le foie et la rate principalement. La capture naturelle des liposomes par les macrophages permet leur utilisation pour cibler et libérer des agents antimicrobiens vis-à-vis un certain nombre de microorganismes infectieux [23].

#### **I.9.3.2. Les liposomes furtifs**

L'élimination rapide des liposomes conventionnels de la circulation sanguine, par les macrophages du foie et de la rate, a sérieusement compromis leur application pour un grand nombre de traitements concernant l'affection d'autres tissus. A la fin des années 80, la

découverte de liposomes dit furtifs a élargi les potentialités thérapeutiques des liposomes, grâce à l'amélioration de leurs temps de circulation dans l'organisme [24].

Le principe de ces liposomes est de réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et d'échapper à la phagocytose par les cellules du système réticuloendothélial, en modifiant leur membrane [25].

### **I.9.3.3. Immunoliposomes**

Ce sont des liposomes qui portent à leur surface des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques d'une cible antigénique et pouvant contenir différents composés à activité biologique. Grâce à ce système de vectorisation et de protection des molécules encapsulées, il est possible de fixer spécifiquement ces liposomes à la surface des cellules cibles (tumorales par exemple) afin d'y déverser leur contenu.

Plusieurs études ont été réalisées où les immunoliposomes sont également rendus furtifs afin de prolonger leur demi-vie dans l'organisme et de favoriser leur passage vers les tissus ciblés [26].

### **I.9.3.4. Les liposomes cationiques**

Les liposomes cationiques sont utilisés dans une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée lipofection. Du fait de leur nature lipidique et de leurs propriétés d'encapsulation de grosses molécules, les liposomes cationiques sont des candidats potentiels au transfert de gènes et font l'objet, depuis une vingtaine d'années, d'études intensives comme véhicules d'ADN. Ces liposomes sont composés d'un lipide cationique synthétique, les liposomes cationique et l'ADN interagissent spontanément par interaction de charges pour former un complexe de grande taille (environ 500 nm) et chargé positivement [26].

## **I.10. Stabilité des liposomes**

La stabilité est l'un des principaux problèmes limitant l'utilisation généralisée des liposomes.

### **I.10.1. Stabilité chimique**

Les phospholipides assurent la stabilité de la membrane du liposome. Ces molécules sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles [27].

Des paramètres tels que la température, le pH et la conformation des phospholipides dans la membrane influencent la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Un pH optimal de 6.5 et une faible température permettent de limiter la dégradation des phospholipides par hydrolyse.

La peroxydation des chaînes d'acyles peut être limitée grâce à certaines précautions comme une température faible, l'absence de métal lourd en contact direct avec le liposome, une atmosphère inerte ou encore l'addition d'antioxydant (vitamine C) [28].

Grit et Crommelin ont démontré que la dégradation des phospholipides par hydrolyse entraîne une hausse considérable de la perméabilité de la membrane. De même, la peroxydation des phospholipides dégrade les constituants de la membrane et des questions restent ouvertes actuellement sur l'innocuité des produits de cette réaction [29].

### **I.10.2. Stabilité physique**

Les liposomes sont des vésicules à double couche qui se forment lorsque les phospholipides sont hydratés dans l'eau. Les vésicules obtenues au cours de ce processus sont de tailles différentes. Pendant leur stockage, les vésicules ont tendance à s'agréger et augmentent en taille pour atteindre un état thermodynamiquement favorable. Au cours de l'entreposage, des fuites de PAs des vésicules peuvent survenir en raison de la fusion et de la rupture des vésicules [30].

Afin de surveiller ce type de stabilité, une variété de techniques comme, la microscopie à balayage électronique pour la morphologie et la granulométrie laser pour la taille sont utilisées [31].

### **I.7.3. Stabilité colloïdale**

Les deux grands types d'instabilités auxquels sont soumis les liposomes sont l'agréation et la fusion. Les forces électrostatiques, stériques ou d'hydratation (c'est-à-dire les forces liées aux propriétés particulières des molécules d'eau près de la surface) qui existent entre deux liposomes, sont fonction de la nature des phospholipides constituant la membrane [32].

Le bilan de ces forces (attractives et répulsives) détermine la stabilité des suspensions de liposomes. Si les forces répulsives prédominent et si l'énergie répulsive qui en résulte est suffisamment efficace pour compenser les forces attractives, les membranes ne viennent pas au contact l'une de l'autre et la suspension de liposomes reste cinétiquement stable. Par contre, si la densité de charges à la surface du liposome est faible ou s'il n'y a pas de répulsion stérique

entre les objets, la barrière répulsive n'est alors pas suffisante pour compenser les forces attractives de Van Der Waals et les liposomes s'agrègent [33, 34, 35].

### I.11. Avantages et inconvénients des liposomes

#### I.11.1. Avantages

- ❖ Les liposomes sont biocompatibles, entièrement biodégradables, non toxiques et non immunogènes.
- ❖ Les liposomes sont adaptés pour la livraison du PA d'hydrophobe et hydrophile.
- ❖ Les liposomes protègent le PA encapsulé dans le milieu extérieur.
- ❖ Les liposomes réduisent la toxicité des agents encapsulés et augmentent l'effet des médicaments chimio- thérapeutiques.
- ❖ Les liposomes réduisent l'exposition des tissus sensibles aux PAs toxiques.
- ❖ Les liposomes fournissent une libération prolongée.
- ❖ Les liposomes modifient la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament.
- ❖ Les liposomes peuvent être administrés par des voies diverses [36, 37].

#### I.11.2. Inconvénients

- ❖ Le coût de production élevé.
- ❖ Courte demi-vie.
- ❖ Problème de stabilité.
- ❖ Fuites et fusion des PA(s) encapsulés [38].

### I.12. Les principales méthodes de préparation

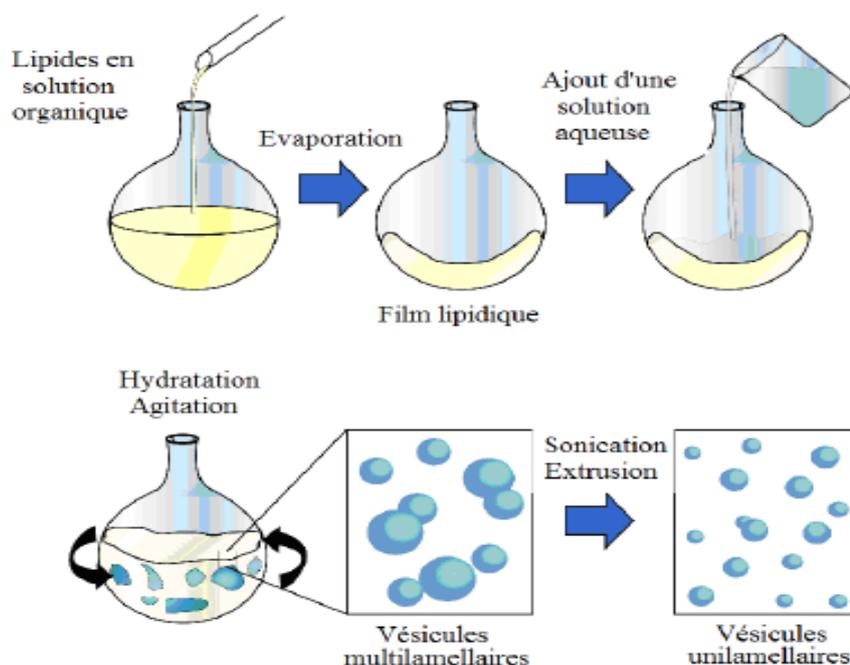
De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été développées mais seules quelques-unes permettent d'encapsuler des quantités suffisantes de composés hydrosolubles. La plupart des médicaments hydrosolubles sont incorporés dans les liposomes par la technique d'évaporation en phase inverse, par infusion d'éther ou par la méthode de congélation-décongélation pour n'en citer que trois. Ces techniques permettent d'obtenir des LUV mais généralement toutes les méthodes de préparation des liposomes produisent un mélange hétérogène de vésicules de différentes tailles [39].

#### I.12.1. Hydratation du film lipidique

En 1965, Bangham et ses collaborateurs ont décrit la formation de vésicules lipidiques par hydratation d'un film phospholipidique. Au contact d'une solution aqueuse, plusieurs bicouches lipidiques superposées, s'hydratent, deviennent fluides, gonflent puis se décollent

des parois du ballon pour former spontanément des vésicules (Figure I.6). Ce procédé permet d'obtenir des vésicules multilamellaires de grande taille (de l'ordre du micromètre). La distribution de la taille est par ailleurs très hétérogène.

Cette méthode originale décrite par Bangham est simple et largement employée mais son utilisation est limitée par la faible capacité d'encapsulation des liposomes formés [40].



**Figure.I.6.** Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.

## I.12.2. Evaporation en phase inverse

Le processus d'évaporation en phase inverse a été décrit par Szoka et Papahadjopoulos en 1971. La technique est réalisée par solubilisation des lipides dans un solvant organique, en ajoutant des aliquotes de la phase aqueuse. Le mélange est ensuite soniqué pour produire des micelles inverses. Le solvant organique est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Il se forme alors un gel visqueux. Cette méthode présente l'inconvénient de mettre en contact le principe actif avec un solvant organique avant le procédé d'encapsulation [41].

## I.12.3. Méthode de chauffage

Une méthode développée par Mozafari implique l'hydratation des composants phospholipidiques dans une solution aqueuse contenant du glycérol à 3% du volume total pendant une heure, suivie d'un chauffage à une température allant de 60 °C à 120 °C et d'une

agitation à 1000 tours par minute au bain Marie. Le glycérol est le solvant utilisé car il est soluble dans l'eau et physiologiquement acceptable. Cet agent isotonique permet d'augmenter la stabilité des vésicules lipidiques due à son effet anticoagulant et empêchant de ce fait la sédimentation. Cette méthode économique permet d'élaborer des transporteurs bioactifs, y compris des liposomes et nanoliposomes, avec une monodispersité et une stabilité supérieure [42].

### **I.12.4. Injection d'une solution éthanolique de phospholipides**

D'autres méthodes, qui elles sont utilisées dans l'industrie, sont fondées également sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides. L'une d'entre elles consistent à injecter une solution éthanolique de phospholipides dans une phase aqueuse. Dans ce cas, les lipides secs sont dissous dans de l'éthanol et la solution est alors injectée. On obtient des liposomes unilamellaires dont le diamètre dépend de la vitesse d'injection, de la vitesse d'agitation et de concentration en phospholipides dans l'éthanol [43].

### **I.13. Dégradation des liposomes**

Les phospholipides sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles. Ces deux dégradations altèrent l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peuvent entraîner la libération des principes actifs encapsulés. Les conditions (température, cinétique) conduisant à ces dégradations ne sont pas détaillées [44].

### **I.14. Encapsulation de substances dans les liposomes**

Les liposomes sont capables d'encapsuler des principes actifs lipophiles au niveau de leur bicouche lipidique ainsi que des principes actifs hydrophiles au niveau de leur cavité aqueuse.

Dans toutes les méthodes de préparation des liposomes, on peut incorporer des substances dans la phase aqueuse ou dans la phase organique selon leur polarité. Le principe actif est ajouté avec la phase organique quand il est lipophile ou la phase aqueuse lorsqu'il est hydrophile. On peut alors schématiquement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules : dans le compartiment aqueux (ou les espaces inter lamellaires) pour les substances hydrosolubles, et dans les bicouches lipidiques pour les substances liposolubles.

L'encapsulation efficace et stable de substances médicamenteuses dans les liposomes est l'un des principaux challenges de l'industrie pharmaceutique depuis plus de 10 ans. L'encapsulation

d'une molécule dépend beaucoup de ses propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...) mais aussi des caractéristiques du liposome lui-même (taille, type, composition et concentration en lipides...).

D'autre part, l'encapsulation des substances peut se faire de façon passive au cours de leur préparation, ou de façon dite active, en introduisant les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés. Différents paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées [45].

### **I.15. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes**

#### **I.15.1. Type de substances à encapsuler**

Le principal caractère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé. La plupart des molécules peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles (Figure I.7) [45].

##### **a-Les substances hydrophiles**

Sont les plus faciles à encapsuler. On peut les dissoudre directement dans la phase aqueuse constituée d'eau ou de tampons, C'est d'autant plus intéressant que les composés essentiellement hydrophiles pénètrent souvent mal dans les cellules et c'est donc eux qui sont généralement destinés à être encapsulés. Il faut néanmoins tenir compte de la charge de ces composés hydrophiles qui peut influencer notamment l'efficacité de l'encapsulation mais aussi sa stabilité dans le temps.

**Exemple :** sucre, Gentamycine et Salbutamol [45].

##### **b-Les substances hydrophobes**

Ont un comportement différent. Les produits insolubles dans l'eau et les solvants organiques seront très difficiles à encapsuler. Parmi les produits solubles dans le méthanol ou le chloroforme, certains seront partiellement ou totalement fixés dans la membrane (selon la concentration) et d'autres non.

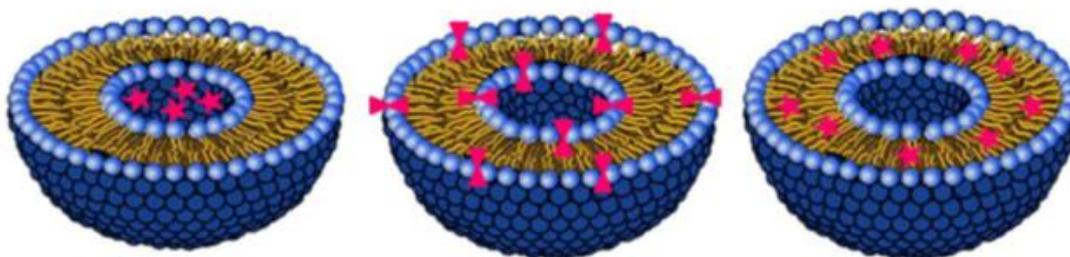
**Exemple :** Rifamicine, Diclofinac, Trimetoprime Indométacine [45].

##### **c-Les substances amphiphiles**

Sont très difficiles à encapsuler quel que soit le type du liposome. Ces composés passent à travers la membrane et peuvent se distribuer dans la bicouche lipidique comme dans la phase

aqueuse. Ils peuvent être encapsulés que par encapsulation active mais ils s'échappent rapidement des liposomes. Pour ces substances, il est intéressant d'étudier leur coefficient de partage entre deux phases (octanol /eau ou butanol/eau) en faisant varier le pH pour connaître la polarité des molécules en milieu acide ou basique, ce qui permet d'en déduire leur répartition dans les liposomes.

**Exemples :** Josamycine, Doxycycline, Doxorubicine [45].



**Figure I.7.** Exemple d'encapsulation de molécules hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) dans un liposome (les molécules encapsulées sont représentées en rose).

### I.15.2. Type de liposomes

La capacité à transporter les molécules est différente selon le type de liposomes : LUV > MLV > SUV. En effet, plus la taille des liposomes est importante, plus la capacité d'encapsulation sera grande. De nombreuses techniques permettent de déterminer la taille mais aussi la distribution de la taille des liposomes. Ce sont par exemple la microscopie électronique, les techniques de chromatographie, et la mesure dynamique de la diffusion de la lumière.

La concentration en lipides est importante également car il y a bien sûr une relation directe entre le nombre de liposomes formés et la capacité d'encapsulation. De plus, plus la concentration en lipides augmente, plus le nombre de lamelles augmente et plus on augmente le volume de l'espace inter lamellaire. Enfin la composition en lipides influe sur des molécules dans les liposomes mais surtout sur le relargage dans le temps. Silvander et ses collaborateurs ont observé une différence de perméabilité de la bicouche des liposomes avec ou sans lipides pégylés pour différents types de molécules [46].

### **I.16. Mesure de l'efficacité d'encapsulation**

Quelle que soit l'application envisagée ; les effets observés sont généralement dépendants de la dose utilisée et il convient donc de déterminer au préalable ; la quantité de molécules encapsulées dans les vésicules. Différents paramètres servent à quantifier le contenu interne liposomal [45].

#### **I.16.1. Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation)**

Le pourcentage d'encapsulation est défini par la proportion de molécule associée aux vésicules par rapport à la quantité initialement présente. Cette mesure n'est effectuée qu'après élimination des molécules non encapsulées. Elle peut s'appliquer pour les substances liposolubles comme pour les substances hydrosolubles. Dans la mesure du possible, il est préférable de rapporter le pourcentage d'encapsulation à la quantité de lipides [45].

#### **I.16.2. Encapsulation pondérée**

L'encapsulation pondérée correspond à la quantité de molécule encapsulée rapportée à la quantité de lipides (en g/mol ou en g/mg).

Il y a plusieurs possibilités pour quantifier l'encapsulation d'une molécule dans les vésicules. On peut utiliser un analogue radiomarqué de la molécule et compter la radioactivité des liposomes. On peut également doser l'activité biologique d'une molécule après lyse des vésicules par un solvant.

Dans le cas d'une molécule hydrosoluble, qui n'interagit pas avec les bicouches lipidiques, on peut déduire une autre expression de l'encapsulation pondérée qui définit plus la vésicule elle-même que son contenu : le volume aqueux interne. Pour cela, il faut bien sûr considérer que le marqueur (ou la molécule à encapsuler) a la même concentration dans la phase aqueuse initiale. Le marqueur doit donc se répartir uniquement dans l'espace aqueux des liposomes et ne pas subir de fuite lors de l'étape d'élimination de la substance non encapsulée [45].

#### **I.16.3. Volume aqueux encapsulé**

Le volume aqueux encapsulé correspond au volume de la phase aqueuse encapsulée dans les vésicules par la quantité de lipides ( $\mu\text{l} / \mu\text{mol}$ ). Il est compris généralement entre  $0.5 \mu\text{l} / \mu\text{mol}$ , pour les MLV et les SUV, et  $30 \mu\text{l} / \mu\text{mol}$  pour les LUV. Ce volume encapsulé varie néanmoins selon les techniques de préparation des liposomes et leur composition en lipides. Il peut être significativement amélioré en augmentant la concentration en lipides [45].

### **I.17. Principaux modes d'encapsulation**

Les substances actives sont généralement ajoutées au cours du procédé de fabrication des liposomes par encapsulation dite passive dans la phase au sein de laquelle elles sont les plus

solubles : phase organique pour les PAs lipophiles, phase aqueuse pour les PAs hydrophiles. Afin de majorer la faible capacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dans certains cas, différentes méthodes de préparation ont été développées :

### **1.17.1. Encapsulation passive**

L'encapsulation passive a lieu lors de la synthèse des liposomes en hydratant le film lipidique directement avec une solution aqueuse contenant la molécule hydrophile à encapsuler. Elle est également possible avec des principes actifs lipophiles. Il suffit de les ajouter à la phase organique contenant les phospholipides et ils sont intégrés à la bicouche des liposomes au cours de leur préparation [45].

### **1.17.2. Encapsulation active**

Les différentes méthodes de préparation des liposomes se font souvent dans des conditions rigoureuses, avec des solvants organiques, des agitations, sonication sous hautes températures qui peuvent conduire à la destruction, l'inactivation ou la perte d'activité de la substance que l'on veut encapsuler, particulièrement des peptides. D'où l'intérêt d'utiliser une autre technique d'encapsulation que celle qui a été précédemment citée [47].

L'encapsulation active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés. Les molécules non chargées et suffisamment lipophiles diffusent à travers la bicouche lipidique et se retrouvent dans la phase aqueuse des liposomes. Elles peuvent alors s'y retrouver dans la phase aqueuse des liposomes, piégées comme elles peuvent en ressortir rapidement. Plusieurs méthodes d'encapsulation active ont été décrites, utilisant des gradients de pH ou des différences de pression de part et d'autre de la membrane liposomale, permettant de remédier à ce problème et d'obtenir une encapsulation à la fois efficace et stable [48].

### **1.18. Conclusion**

Les liposomes sont l'un des systèmes de vectorisation de molécules actives les plus utilisés car ils permettent d'encapsuler les molécules hydrophiles, lipophiles et amphiphiles ; ceci pour diverses raisons, tels que l'amélioration de la solubilité, stabilité et biodisponibilité.

Ils sont utilisés dans plusieurs domaines tels que le domaine pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique.

# Chapitre II :

# La vitamine E

### II.1. Introduction

Les vitamines sont des substances organiques indispensables à la vie, qui jouent, même à 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. Les vitamines ne possèdent aucune valeur énergétique [49].

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

### II.2. Historique de la vitamine E

En 1922, l'embryologiste Herbert Evans et son assistante Katherine Bishop, de l'Université de Californie à Berkeley, en effectuant leurs expériences sur les rats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une substance liposoluble, qui s'avéra être un facteur de fécondité et un composé indispensable au bon développement du fœtus. Les deux scientifiques soupçonnent l'existence d'un composé lipophile, qu'ils nomment Facteur X, indispensable au développement du fœtus.

En 1924, indépendamment des recherches de H Evans et K Bishop, Bennett Sure, de l'Université de l'Arkansas, montre qu'un composé retiré d'un régime alimentaire induit la stérilité chez les rats mâles. Bennett Sure nomme ce composé Vitamine E, elle reçoit aussi le nom de tocophérol, du grec « tokos » qui signifie « descendance » et « pherein », « porter ».

Par la suite Evans et Emerson réussirent à isoler la vitamine E à partir de l'huile de germe de blé en 1936, et Erhard Fernholz en détermine la structure en 1938. La même année, le Prix Nobel de chimie Paul Karrer qui réalise a été décerné à la synthèse de l'alpha-tocophérol racémique.

Ce n'est qu'en 1968 que la vitamine E est reconnue comme un élément nutritif essentiel pour l'Homme par le National Research Council des États-Unis. Les circonstances de la découverte de la vitamine E lui ont valu chez le grand public une réputation de vitamine de la fertilité, voire de la puissance sexuelle. Historiquement, la vitamine E reste tout de même la vitamine de la reproduction [50-56].

### II.3. Définition de la vitamine E

D'un point de vue biochimique, la vitamine E existe sous huit formes différentes, quatre tocophérols ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ ) 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.

La vitamine E est peu synthétisée par l'organisme. Il est donc nécessaire d'en consommer quotidiennement par le biais de l'alimentation ou de la supplémentation [56-58].

#### II.4. Structure chimique de la vitamine E

La structure chimique des tocophérols (figure II.1) se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthyle auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones.

Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol [60,61].

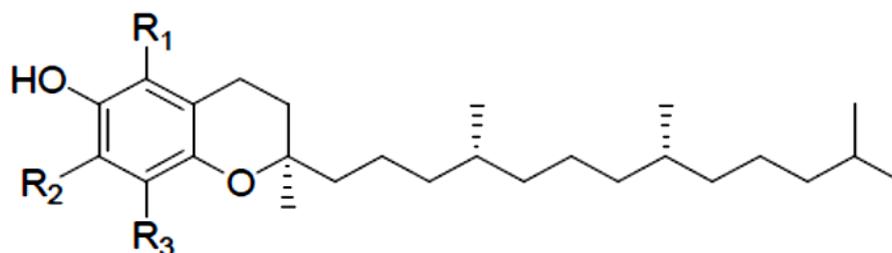


Figure II.1. La structure chimique du Tocophérol.

La structure chimique des tocotriénols (figure II.2) se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou tri- méthyle avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' [60,61].

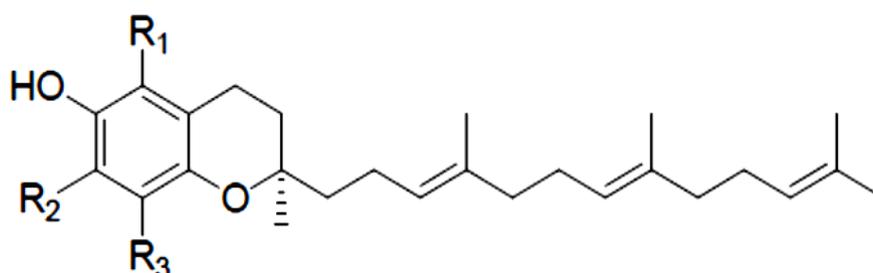


Figure II.2. La structure chimique du Tocotriénol.

**Tableau II.1.** Dénomination de différents tocophérols et tocotrienols [56,58].

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Nom	
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α-tocophérol	α-tocotriénol
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	β-tocophérol	β - tocotriénol
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	γ-tocophérol	γ- tocotriénol
H	H	CH <sub>3</sub>	δ- tocophérol	δ- tocotriénol

### II.5. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

Tous les tocophérols se présentent, à température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases.

Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl-α-tocophérol sont relativement stables, ils doivent être hydrolysés par une ester hydrolase pancréatique afin de permettre l'absorption des tocophérols libres [59].

### II.6. La solubilité de la vitamine E

La solubilité de la vitamine E dans un solvant dépend de manière générale des interactions qu'elle peut avoir. Donc elle ne peut pas interagir physiquement avec l'eau ou une phase polaire.

Le caractère lipophile de la vitamine E est caractérisé par la présence de groupement CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-, =CH- et du noyau aromatique [60].

### II.7. Propriétés biochimiques, métaboliques et rôle de la vitamine E

La fonction naturelle de la vitamine E est d'être antioxydant. Grâce à ce rôle, elle assure la protection des membranes cellulaires et prévient le durcissement des cellules. Elle aide également à maintenir la santé du système immunitaire en protégeant la vie des globules rouges dans la circulation sanguine. Son rôle physiologique d'antioxydant permet de lutter contre les dérivés réactifs de l'oxygène appelés radicaux libres (molécules contenant un nombre impair

d'électrons, ils sont produits suite aux oxydations cellulaires induites par l'oxygène) qui entraîne une agression des cellules que l'on appelle le stress oxydatif. Ce phénomène physiologique, est impliqué dans le vieillissement de l'Homme [61, 62,63].

Ainsi nous retrouvons d'autres rôles qui caractérisent la vitamine E :

- **Anti-cancer** : En association avec la vitamine C, la vitamine E intervient comme un facteur de prévention retardant l'apparition de certains cancers.
- **Prévention des maladies Cardio-vasculaires** : En diminuant le niveau du cholestérol, la vitamine E favorise la circulation sanguine et par là même diminue les risques de maladies Cardio-vasculaires.
- **Fertilité** : Les études en laboratoire ont démontré l'action bénéfique de la vitamine E sur la fertilité des animaux. Il nous faut toutefois reconnaître que cette action n'a pas encore été démontrée sur l'Homme [53, 64, 65].

### II.8. Origines de la vitamine E

La vitamine E est très répandue dans la nature, elle existe sous formes naturelles ou synthétiques, on la trouve aussi bien dans les aliments d'origine animale que dans les aliments d'origine végétale [66].

#### II.8.1. Origine Naturelle

- **Animale** : La vitamine E est présente dans les viandes, les œufs, le foie, le lait et ses dérivés.
- **Végétale** : La vitamine E est présente en abondance dans les huiles d'origine végétales ainsi que dans les fruits secs tels que les noisettes, les arachides et les amandes.

**Tableau II.2.** Les principales sources de vitamine E [66].

Sources naturelles de vitamine E	En mg pour 100g
Huile de germe de blé	150 à 500
Huile de soja	140
Huile d'arachide	15 à 30
Amande, noisette	15 à 20
Germes de céréales	14 à 20
Huile d'olive	8 à 20
Oeuf, foie, maquereau	1 à 2
Lait maternel	0.7
Filet de boeuf, laitue	0.6
Banane, carotte	0.5
Gruyère	0.3
Tomate, orange	0.2
Lait de vache	0.06

### II.8.2. Origine synthétique

La vitamine E existe également sous forme synthétique : il s'agit du dl-alpha tocophérol que l'on retrouve dans les suppléments en vitamine E. On retrouve également l'acétate ou le succinate de tocophérol. Bien que la forme synthétique soit bénéfique, la forme naturelle est particulièrement recommandée. En effet, elle est deux fois mieux assimilée par les tissus que sa forme synthétique. De plus, la forme naturelle est la plus active [68].

## II.9. Les dérivés de la vitamine E

### II.9.1. Synthétique

Le dl-alpha-tocophérol était en effet la première forme de vitamine E synthétique, disponible à partir des années 40 [64].

Il possède 3 groupements méthyles sur le noyau 6-chromanol. La forme "d" naturelle de l'alpha-tocophérol est plus active que la forme synthétique "dl". Tous les produits de d-alpha-tocophérol ont une viscosité très basse, qui les fait idéalement adaptés à l'utilisation dans les capsules molles.

Elle est utilisée comme supplément alimentaire, ainsi que antioxydant dans les préparations contenant de la graisse (les onguents, les crèmes et les huiles) (figure II.3) [69].

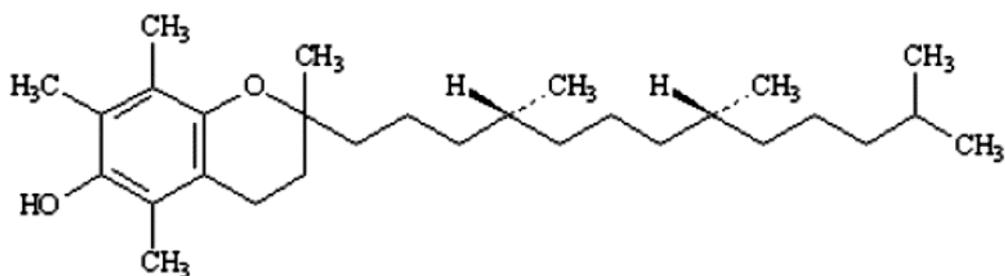


Figure II.3. Structure chimique du dl-tocophérol.

### II.9.2. Estérifiés

Les esters de vitamine E s'obtiennent par estérification du groupement hydroxyle en position 6 du cycle chromanol avec de l'acétate, du succinate, du nicotinate ou du phosphate. Les formes estérifiées ont l'avantage d'être plus stables et moins sensibles à l'oxydation [69].

#### II.9.2.1. tocophérol succinate

Le D-alpha-Tocophérol Acide Succinate est le produit estérifié du d-alpha-tocophérol et de l'acide succinique, c'est une poudre blanche ou en granules cristallins gris-blancs, presque inodores, de structure chimique (figure II.4) [69].

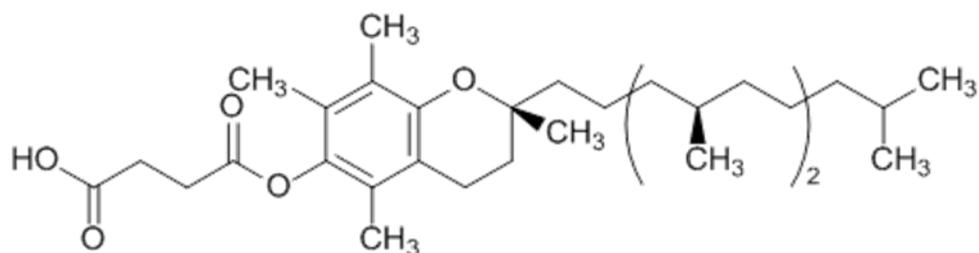


Figure II.4. Structure chimique du D-alpha tophérol acide succinate.

#### II.9.2.2. Alpha-tocophéryl nicotinate

L'alpha-tocophéryl nicotinate (figure II.5) comme un supplément de vitamine E, il est sous forme d'une poudre blanche. Ce produit est plutôt utilisé dans les produits de beauté [70].

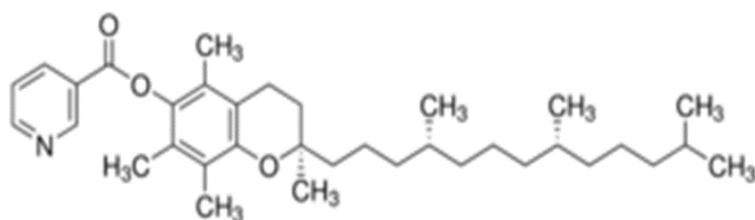


Figure II.5. Structure chimique Alpha-tocophéryl nicotinate.

### **II.10. Toxicité de la vitamine E**

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

Une supplémentation élevée à long terme en alpha-tocophérol est susceptible d'augmenter le risque de saignement chez certaines personnes. Certains médecins recommandent d'arrêter une supplémentation en vitamine E un mois avant une opération chirurgicale non urgente afin de réduire le risque de saignement [71].

### **II.11. Dosage de la vitamine E**

La vitamine E a été historiquement dosée par colorimétrie, fluorométrie, chromatographie..., la méthode actuellement la plus utilisée est la chromatographie liquide haute performance.

Le choix de la méthode analytique dépend en premier lieu du but poursuivi lors de l'analyse, et ensuite de la nature de l'échantillon. Il s'agit donc de déterminer quel est l'analyte recherché. Certaines analyses ont pour seul but d'identifier l' $\alpha$ -tocophérol. D'autres visent la détermination de l'ensemble des tocophérols et tocotriénols, voire même celle de leurs métabolites. Enfin, certaines méthodes s'intéressent en plus à la structure des molécules [72].

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

La HPLC est une technique de séparation très puissante, elle est très utilisée dans de nombreux secteurs d'activités tels que l'agriculture, l'agroalimentaire, l'industrie chimique et pharmaceutique, les cosmétiques, etc.

C'est une méthode physico-chimique basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire [73].

#### **II.11.2. Principe de la méthode**

Pour réaliser une séparation d'un mélange on le fait diluer dans un solvant approprié, puis on injecte un volume connu dans le système chromatographique à travers la boucle d'injection. Les composés du mélange sont transportés par la phase mobile dont laquelle ils sont solubles vers la colonne siège de la phase stationnaire. Sous l'influence des deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile, effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont séparés.

Cette séparation est basée sur la différence d'affinité des composés du mélange vis à vis de la phase stationnaire, le constituant qui a plus d'affinité sera le plus retenu. Au niveau du détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme [73].

### II.12. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que la vitamine E est composée de plusieurs mélanges, dont un seul joue un rôle très important d'antioxydant.

La vitamine E présente un problème majeur de solubilité en milieu physiologique, de ce fait plusieurs techniques ont été proposées dans la littérature, parmi lesquelles on trouve l'utilisation de vecteurs.

Dans cette optique, nous avons choisi, un vecteur d'actualité qui est connu pour son potentiel solubilisant : le liposome, ce dernier a fait l'objet du chapitre précédent.

# Chapitre III :

# Phospholipide et Cholestérol

### III.1. Introduction

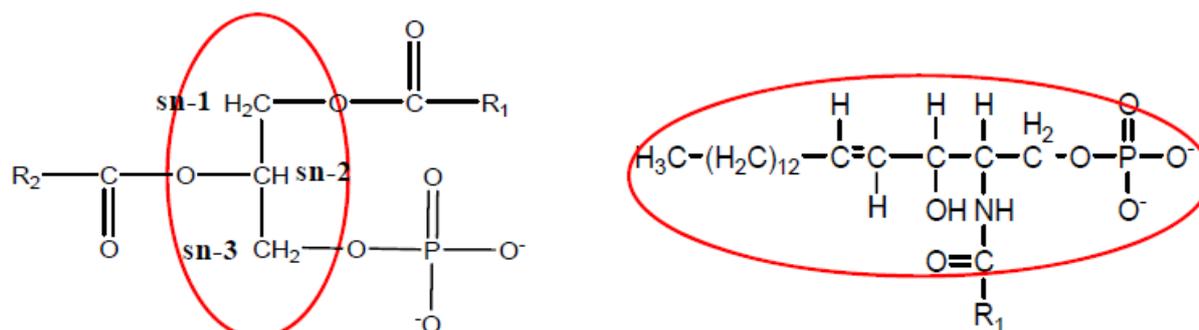
Afin de préparer un système liposomal, il est généralement préconisé d'utiliser : un ou plusieurs phospholipides, éventuellement un stérol et une substance ionique lorsque les liposomes souhaités doivent avoir une charge positive ou négative.

Les caractéristiques des liposomes dépendent de leur mode de fabrication et du choix des composants de la bicouche, notamment des phospholipides, qui influencent fortement la rigidité (ou la fluidité) et le cholestérol qui confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité des parois.

### III.2. Les phospholipides

#### III.2.1. Définition de phospholipides

Les phospholipides sont des lipides divisés en deux classes principales selon qu'ils contiennent un squelette glycérol ou sphingosyl. Chez les glycérophospholipides, une ou deux chaînes d'acide gras R1 et R2 sont estérifiées au glycérol et d'un acide phosphorique lié en position sn-3 du glycérol, tandis que pour les sphingophospholipides, une chaîne d'acide gras est ajoutée au squelette (figure III.1) [74].



Les cercles représentent : la base glycérol et la base sphingosine

sn-1, sn-2 et sn-3 représentent la numérotation stéréospécifique au niveau du glycérol.

**Figure III.1.** Structure des squelettes glycérophosphate et sphingosylphosphate.

Les phospholipides les plus employés sont les glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithine de soja ou de jaune d'œuf) ou synthétique (phosphatidylcholines, phosphatidylsérine, phosphatidylglycérol et phosphatidyléthanolamines) (tableau III.1) et des sphingolipides.

Les phospholipides naturels sont disponibles à différents degrés de pureté. Leur utilisation peut être limitée par des problèmes de stabilité (dégradation enzymatique). Les dérivés synthétiques sont d'une grande pureté et stable et définis selon leur composition [75].

**Tableau III.1.** Classification des glycérophospholipides [75].

Substituant HO-X		Glycérophospholipides	
Nom	Formule	Famille	Symboles
Sérine		Phosphatidylsérines	PS
Ethanolamine		Phosphatidyléthanolamines Céphalines	PE
Choline		Phosphatidylcholines Lécithines	PC
Myo-inositol		Phosphatidylinositols Inositides	PI
Glycérol		Phosphatidylglycérols	PG

Dans la suite de ce chapitre nous avons choisi de nous attarder sur la phosphatidylcholine qui sera le phospholipide que l'on utilisera dans la fabrication de nos systèmes liposomales.

### III.2.3. Définition de la phosphatidylcholine

La phosphatidylcholine est une substance grasse de la famille des lécithines, on en trouve sur les membranes des cellules, dont elle préserve l'élasticité, mais aussi dans la bile puisqu'elle joue un rôle important dans la dissolution des graisses.

La phosphatidylcholine est sécrétée naturellement par le foie, on en trouve également dans certains aliments comme le tournesol, le foie, le soja et les œufs.

Sous sa forme synthétique, elle est d'une grande pureté et stabilité. Elle est formée à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras. Elles adoptent diverses couleurs selon leur composition : du jaune, pour la lécithine végétale, au brun, pour la lécithine de poisson [76-78].

### III.2.4. Historique

La phosphatidylcholine est plus connue sous le nom de « lécithine » ; cette dénomination a été attribuée au milieu du 18<sup>ème</sup> siècle par Théodore Gobley, un pharmacien, chimiste et

chercheur français, en référence au mot grec *Lekithos*, qui désigne le jaune d'œuf, duquel il avait extrait initialement une substance phosphorée (1847), dont il montra par la suite la présence également dans les substances grasses (tels la bile et le sang veineux) et les tissus cérébraux de divers animaux et enfin de l'Homme. Gobley aboutit à l'issue de près de trente années de travaux à une compréhension complète de sa structure chimique [79].

### III.2.5. Structure chimique

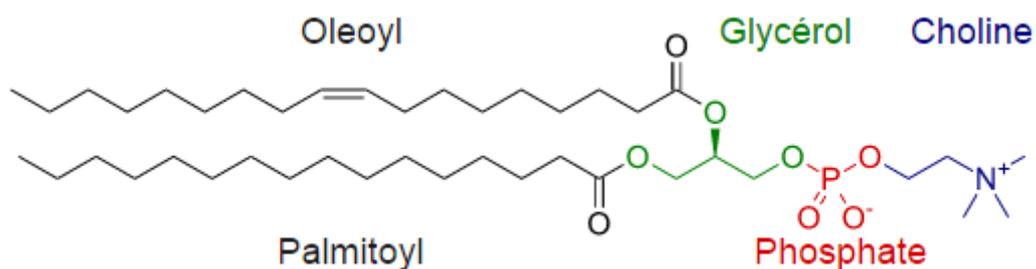
Les glycérophospholipides constituent la famille de lipides la plus répandue dans les membranes biologiques, ils sont particulièrement abondants dans les membranes internes. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile et d'une queue apolaire hydrophobe, comportant deux chaînes d'acides gras de longueur différente, dont l'une peut porter une ou plusieurs doubles liaisons. La longueur moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm.

Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre de carbones, présence d'insaturations...).

La structure de ces lipides consiste en un squelette de à base de glycérol (trialcool), sur lequel deux des fonctions alcool, dont la fonction secondaire, sont estérifiées par des acides gras, constituant les chaînes hydrocarbonées hydrophobes (principalement supérieures à 16 atomes de carbone), dont une est habituellement insaturée sur une ou plusieurs positions.

La tête polaire est constituée d'un groupement phosphate, substituant la troisième fonction alcool du squelette glycérol. Le phosphate est lui-même substitué par différents groupements qui définissent la nature du glycérophospholipide. Il s'agit classiquement de la phosphatidylcholine (PC), les phosphatidyléthanolamine (PE) et les phosphatidylsérine (PS) ou l'inositol [80].

L'exemple le plus classique de phospholipides est la phosphatidylcholine (Figure III.2).



**Figure III.2.** Structure chimique de la phosphatidylcholine.

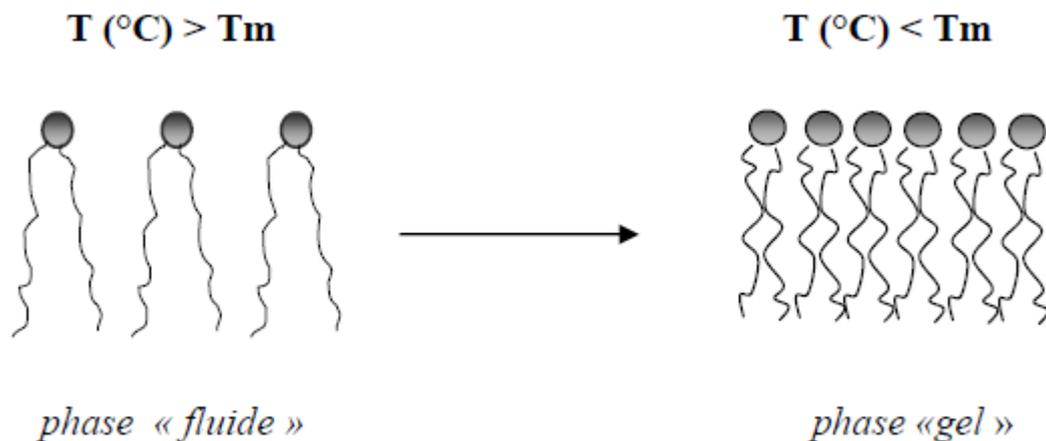
Le groupement phosphatidyl est ici lié à la choline, groupement chargé positivement. C'est donc un phospholipide zwitterionique. Comme le groupement phosphate est chargé négativement, l'ensemble de la molécule est neutre.

Les phosphatidylcholines ont généralement deux chaînes acyles de longueur comparable de 16 ou 18 carbones avec celle en position 1 souvent saturée tandis que l'autre peut comporter plusieurs doubles liaisons [80].

### III.2.6. Propriétés physiques

Les phospholipides sont caractérisés par leur température de transition de phase ( $T_m$ ) qui doit être prise en compte lors de la préparation des liposomes et qui influence leur comportement in vivo. En effet, la température de transition de phase des phospholipides détermine leur fluidité membranaire et influe notablement sur la stabilité des liposomes durant leur stockage et au sein des lipides biologiques. En dessous de la ( $T_m$ ) les molécules de phospholipides s'arrangent suivant une configuration solide (phase gel) ou les chaînes lipidiques sont ordonnées ; parallèles entre elles et peu mobiles. Au-dessus de cette température de transition de phase, l'état devient plus désordonné et les chaînes hydrophobes sont animées de mouvements plus ou moins pendulaires (phase fluide) (figure III.3).

Les liposomes ne se forment que si la proportion d'eau est suffisante et si sa température est supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. En cas de mélange de phospholipides la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la  $T_m$  du phospholipide [81,82].



**Figure III.3.** La structure des phospholipides selon la température de transition de phase.

**III.2.7. Rôle des phospholipides**

**III.2.7.1. L’auto assemblage des phospholipides en solution aqueuse**

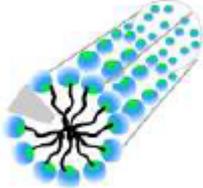
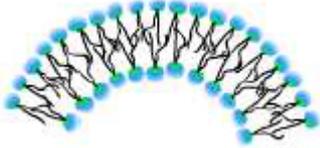
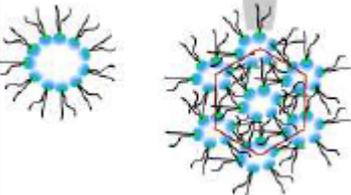
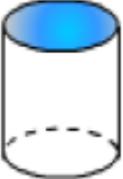
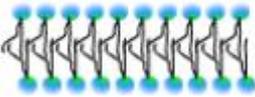
La nature amphiphile des phospholipides est à l’origine de leur propriété à s’auto assembler en phase aqueuse. Les phospholipides s’agencent de manière à ce que les têtes polaires interagissent avec la phase aqueuse minimisant ainsi les interactions des chaînes hydrophobes avec cette dernière. Il en résulte différentes organisations spatiales. Ce comportement dépend toutefois de la température, de la pression, de la structure du phospholipide (notamment de la nature de la tête polaire), de sa concentration ainsi que de la proportion d’eau dans le mélange. [83].

La forme finale des assemblages dépend de la structure moléculaire des PL. En suivant une approche géométrique introduite par Israel achvili [84], la forme est déterminée par le paramètre d’empilement P. Il est le rapport entre le volume de la tête (*v*) polaire du PL et l’aire de cette dernière (*a*<sub>0</sub>) multipliée par la longueur critique (*l<sub>c</sub>*) de la chaîne hydrophobe :

$$P = v / a_0 l_c \dots\dots\dots (1)$$

Selon le paramètre P du PL, il s’organisera plutôt sous forme de bicouches planes, de vésicules, de micelles sphériques, cylindriques (Tableau III.2). La structure la plus fréquente dans la nature est la bicouche lipidique. Dans cette configuration, deux monocouches de PL sont apposées. Si le PL possède un volume tronconique, les bicouches peuvent présenter un rayon de courbure permettant la formation de structures sphériques appelées liposomes [85].

**Tableau III.2.** Différents arrangements des phospholipides en solution aqueuse.

Type de lipides	$P = \frac{v}{a_0 l_c}$	Forme	Structure
Lipides monocaténaire à large tête polaire, surfactant à faible force ionique	$P < 1/3$		Micelle sphérique 
Lipides monocaténaire à petite tête polaire, Surfactant à grande force ionique ou lipides non ioniques.	$1/3 < P < 1/2$		Micelle cylindrique 
Lipides bicaténaires à large tête polaire, chaînes fluides PC, PS, PA	$1/2 < P < 1$		Visicule 
Lipides bicaténaires à petites tête polaire, lipides anioniques à grande force ionique, chaînes gelées PE, PS + Ca <sup>2+</sup>	$P > 1$		Micelle inverse 
Lipides bicaténaires à petites tête polaire, lipides non ioniques chaînes poly-cis-insaturées, température élevée PE insaturée, PA+ CA <sup>2+</sup>	$P \sim 1$		Bicouches planes 

### III.3. Le cholestérol

#### III.3.1. Définition du cholestérol

Le cholestérol est une substance cireuse molle, elle est présente dans les lipides ou les graisses, dans le sang et dans toutes les membranes cellulaires concentré essentiellement dans le cerveau et la moelle épinière. Il est le stérol majeur dans le corps humain et appartient à une classe de molécules appelées stéroïdes, utilisé pour former des membranes cellulaires, plusieurs hormones, la vitamine D, et les acides biliaires nécessaires pour digérer les graisses présentes dans nos aliments [86,87].

#### III.3.2. Historique

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

Depuis cette date, et jusqu'à nos jours, se sont développées de très nombreuses recherches pour établir sa structure chimique, sa répartition dans les différents tissus, son rôle, sa formation et sa dégradation.

Le cholestérol n'est plus un inconnu du grand public. Ces dernières années, une si large publicité accablante lui a été consacrée ; il est considéré comme le grand responsable de l'athérosclérose et on a tendance à ne voir en lui qu'une entité chimique nuisible qui contribue à épaissir la paroi des artères en s'y déposant en quantité anormalement importante [88].

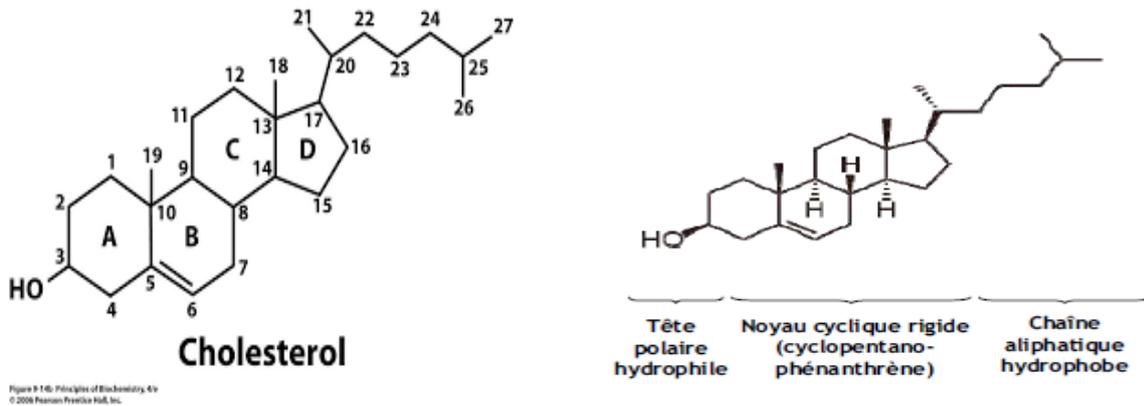
#### III.3.3. Structure chimique du cholestérol

La structure admise actuellement pour le cholestérol a été établie dès 1932, grâce aux travaux de nombreux chercheurs.

Les principales caractéristiques de cette structure sont :

- Présence de quatre cycles carbonés, 3 cycles pyraniques (à 6 carbones) A, B et C et un cycle furanique D (à 5 carbones) (figure III.4).

- Présence d'une fonction alcool sur le carbone 3, cette dernière constitue la tête polaire, donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau.
- Présence d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe sur le carbone 17 (la queue aliphatique apolaire).
- Présence d'une double liaison en 5-6 [89].



**Figure III.4.** Structure chimique de cholestérol.

### III.3.4. Sources du cholestérol

Les sources de cholestérol alimentaire sont uniquement d'origine animale : abats, graisses animales (beurre, crème fraîche,...), charcuteries, jaunes d'œufs, crustacés, fromages et viandes.

Ainsi la plupart des molécules de cholestérol sont produites dans notre organisme. La synthèse du cholestérol peut avoir lieu dans de nombreuses cellules, mais c'est le foie qui fabrique le plus de cholestérol.

Une des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol est l'HMG Coenzyme A réductase qui transforme l'acide mévalonique en cholestérol. Cette enzyme est la cible d'une classe de médicaments anti-cholestérol : les statines. Le cholestérol sort de l'organisme sous forme de bile fabriquée par le foie, mais aussi sous forme de coprostérol dans les selles [90].

### III.3.5. Rôles du cholestérol

C'est un composant majeur des membranes cellulaires animales qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides (formant la bicouche de la membrane). Il fluidifie la membrane car il empêche sa gélification en évitant la cristallisation des acides gras, et diminue la perméabilité membranaire aux molécules

hydrosolubles. Il a un rôle de « tampon thermique » : à 37°, il limite le mouvement des phospholipides, donc la fluidité membranaire diminue ; à des températures plus basses, il empêche l'entassement des phospholipides. Dans la membrane, il permet la formation de radeaux lipidiques, zone essentielle à l'ancrage de protéines fonctionnelles. Dans les neurones, il permet la synthèse des neurotransmetteurs par exocytose et donc la propagation de l'influx nerveux.

Dans les liposomes son incorporation confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité des parois [91].

### III.3.6. Propriétés physico-chimiques du cholestérol

Le cholestérol est un solide blanc, cristallin, insoluble dans l'eau, soluble dans les liquides organiques. Le cholestérol est sensible à l'action de la lumière. Le tableau suivant récapitule les paramètres physico-chimiques les plus importants du cholestérol [88].

**Tableau III.3.** Propriétés physico-chimiques du cholestérol [88].

<b>Propriétés chimiques</b>	
Formule brute	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
Nom systématique	Cholest-5-en-3-β-ol
Masse molaire	386.65 g/mol
<b>Propriétés physique</b>	
T° fusion	147 à 150 °C
T° ébullition	360°C (décomposition)
Solubilité	<b>Pratiquement insoluble (eau)</b>
Masse volumique	1.07 g.cm <sup>-3</sup> 20°C
Point d'éclair	250°C

### III.3.7. La solubilité du cholestérol

Le cholestérol est soluble dans l'alcool bouillant, peu soluble dans l'alcool froid, soluble dans l'éther, le chloroforme et le benzène.

Et parce qu'il contient à la fois des groupes hydrophobes et hydrophiles, le cholestérol va aider à solubiliser les éléments non polaires transportés par les lipoprotéines de basse densité [88].

### III.3.8. Cholestérol et les liposomes

Le cholestérol joue un rôle fondamental dans la stabilité des liposomes. C'est un composé important des membranes biologiques des cellules eucaryotes. Il a ainsi été démontré que l'introduction de ce composé au sein des membranes constituées de phospholipides à chaînes courtes (jusqu'à C16) entraîne une augmentation de l'épaisseur de la bicouche alors qu'on observe l'effet inverse lorsque les chaînes sont plus longues (à partir de C18) [92].

En dessous de la température de transition de phase d'un lipide (état solide), le cholestérol a un effet faiblement fluidifiant de la bicouche alors que, au-dessus de cette température (état fluide), il provoque l'effet inverse et diminue la fluidité [93].

De plus, le cholestérol réduit la facilité qu'ont certaines protéines à pénétrer dans la bicouche lipidique. Il confère donc aux liposomes une augmentation de leur stabilité *in vitro* et *in vivo* (en présence de plasma, par exemple) [94,95].

### III.3.9. Le cholestérol et la membrane spermatique

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 vers l'intérieur de la membrane [96].

Les lipides les plus représentés sont les phospholipides et le cholestérol qui peuvent se déplacer latéralement dans la membrane spermatique [97].

A basse température, les phospholipides membranaires subissent une transition de phase passant de la phase dite liquide avec la phase cristalline [98].

En revanche, tous les lipides ne subissent pas la transition de phase au même moment ainsi que les protéines. De ceci résulte une diminution des mouvements lipidiques au sein de la membrane conduisant à une instabilité et perte des fonctions [99].

Selon certaines études, le ratio cholestérol/phospholipides (C/P) élevé des membranes spermatiques de certaines espèces, permet leur résistance au froid [97].

De plus les lipides des spermatozoïdes humains ne subissent pas de transition de phase en raison de leur ratio C/P très élevé ( $r=0.99$ ). Ceci s'explique par le fait que le cholestérol ne

subissant pas de transition de phase interagit avec les phospholipides membranaires et maintient la stabilité et la fluidité membranaire à basse température [100].

Le cholestérol a également un rôle important dans la réduction de la perméabilité des membranes spermatozoaires, ce qui conduit à la diminution des transferts d'eau, maintenant intact la structure membranaire des cellules pendant les variations osmotiques au moment de la cryoconservation [101].

### **III.3.10. Conclusion**

Dans ce chapitre nous avons vu principalement le rôle des phospholipides et du cholestérol, ce dernier confère une stabilité accrue aux liposomes par augmentation de la rigidité des parois, les phospholipides influencent fortement la rigidité (ou la fluidité).

# Chapitre IV :

# Le sperme

### IV.1. Introduction

Dans les chapitres précédents nous nous sommes axés sur l'étude globale des liposomes, il en a ressorti que ces derniers pourraient améliorer la solubilité de la vitamine E qui à son tour pourrait améliorer la qualité de conservation des spermatozoïdes. Ainsi la vitamine E pourrait modifier le temps de conservation du sperme, alors il nous a paru évident qu'une étude théorique sur le sperme et les méthodes utilisées pour sa conservation s'imposait.

### IV.2. Le sperme

Le sperme est un liquide biologique blanchâtre, d'aspect visqueux contenant des cellules reproductrices mâles appelées spermatozoïdes. Ce liquide est composé des spermatozoïdes sécrétés par les testicules, mais aussi du liquide séminal sécrété par les vésicules du même nom, et de liquide d'origine prostatique [102].

#### IV.2.1. Composition chimique du sperme

Le sperme est une combinaison de plusieurs fluides dans lesquels les spermatozoïdes sont maintenus en vie pour une courte durée. Il contient des sucres (fructose et sorbitol), des vitamines (C et B12), de nombreux sels minéraux (Ca, Mg, P, K, Na et du Zn) et il est riche en protéines et cholestérol, il contient des traces de testostérone et d'autres hormones [103,104].

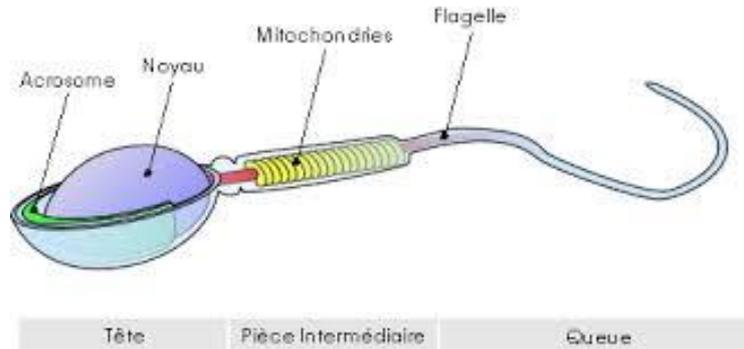
#### IV.2.2. Structure de spermatozoïde

Cellule de forme allongée, pauvre en cytoplasme, se composant essentiellement d'une tête, d'un col et d'un flagelle (figure IV.1). Son rôle est de propulser l'ADN paternel dans l'ovocyte après lui avoir fait franchir les voies génitales femelles et les membranes de l'œuf, il présente des caractéristiques propres à chaque espèce.

La tête est de forme et de dimensions variables selon les espèces, chez le taureau elle est allongée (9.5 sur 5.5 microns), comprenant essentiellement le noyau, la tête est recouverte sur ses deux tiers de l'acrosome qui renferme des enzymes impliquées dans la pénétration de l'ovule par le spermatozoïde.

La pièce intermédiaire est de forme cylindrique d'environ 10 à 12 microns de longueur et d'un diamètre inférieur à 1 micron, riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire à la mobilité des spermatozoïdes.

Le flagelle, élément moteur est constitué de fibres contractiles à l'origine de l'ondulation qui permet aux spermatozoïdes la motricité [105,106].



**Figure IV.1.** Structure d'un spermatozoïde.

### IV.2.3. Le plasma séminal

Le plasma séminal peut être défini comme le sperme duquel les spermatozoïdes ont été enlevés et résultant du mélange séquentiel des sécrétions des glandes et des testicules, les principales fonctions du plasma séminal sont hydrodynamiques et énergétiques. Celui-ci étant essentiellement constitué d'eau, il doit permettre le déplacement et la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle après l'éjaculation [107].

### IV.3. Historique

A la suite des expériences d'insémination artificielle chez les poissons par JACOBI en 1763, des essais ont été effectués chez le chien en 1770 par SPALLANZANI et en 1782 par ROSSI. C'est en 1887 qu'un vétérinaire praticien français REPIQUET proposa d'inséminer des juments et d'une façon plus générale d'appliquer l'insémination artificielle aux grands animaux domestiques. Mais l'insémination artificielle commença à se développer chez les bovins en 1947 avec la découverte par POLGE et ses collaborateurs de l'effet cryoprotecteur du glycérol pour congeler les spermatozoïdes du taureau. Depuis cette date, l'insémination artificielle s'est développée dans le monde entier, chez les différentes espèces d'animaux domestiques et même sauvages, sans oublier l'espèce humaine. Actuellement, l'insémination artificielle peut être effectuée soit avec du sperme frais, soit avec du sperme réfrigéré, soit avec du sperme congelé [108].

### IV.4. Evaluation de la qualité du sperme

L'évaluation a pour objectif d'apprécier les différentes caractéristiques du sperme et préciser le niveau de dilution qu'il pourra supporter, afin de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché, cette évaluation comporte :

#### IV.4.1. Examen macroscopique

Il a pour but d'apprécier le volume de l'éjaculat, la consistance du sperme et sa couleur.

### IV.4.1.1. Volume de l'éjaculat

La qualité du sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu [106].

Le volume est directement lu sur le tube de collecte gradué, il varie de 4 à 6 ml chez un taureau adulte, tandis qu'il est de l'ordre de 2 ml chez le jeune taureau [109].

### IV.4.1.2. Couleur du sperme

Le sperme est normalement blanchâtre. Une coloration jaunâtre n'a pas de signification pathologique, contrairement aux colorations brunâtres, liées à la présence de souillures, comme par exemple le sang [110].

### IV.4.1.3. Viscosité du sperme ou consistance

Elle est en rapport étroit avec la concentration en spermatozoïdes dans le plasma séminal [110], plus le sperme est opaque et épais, plus la concentration est importante [110].

### IV.4.1.4. pH du sperme

La mesure du pH doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement par la formation d'acide lactique, la valeur normale doit être comprise entre 6.9 et 7.1 [111,112].

## IV.4.2. Examen microscopique

### IV.4.2.1 Mobilité

La mobilité des spermatozoïdes est une caractéristique commune à travers le règne animal, elle est basée sur l'observation de l'échantillon au microscope. On peut les classer en plusieurs classes (excellente, modérée, vitesse non progressive avec peu ou pas de chemins droits) Un sperme mobile est nécessairement vivant, mais le contraire n'est pas tout le temps vrai [113].

La nouvelle technique la plus utilisée pour l'analyse de la mobilité spermatique chez les volailles est la spectrophotométrie, le principe consiste en un faisceau de lumière qui va traverser l'échantillon, l'absorbance notée à 550 nm est directement liée aux mouvements de la population spermatique [114].

## IV.5. Conservation du sperme

Le sperme frais est du sperme utilisé pour l'insémination artificielle dans les 30 minutes suivant sa récolte, en le conservant à 37°C pour éviter tous chocs thermiques et sans conservateur. Passé ce délai son pouvoir fécondant disparaît rapidement.

Le sperme réfrigéré est du sperme conservé à 4°C en présence de cryoprotecteurs pendant 48h, passé ce délai, les résultats sont plus aléatoires, mais des progrès sont en cours [106].

### IV.5.1. Caractéristiques et rôles des dilueurs

Un dilueur doit :

- être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spermatozoïdes,
- avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation,
- avoir un pouvoir antioxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- avoir une activité antimicrobienne, posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes [115,116].

### IV.5.2. Cryoprotecteurs

La congélation provoque la formation de cristaux de glace dans la cellule qui perforent la membrane plasmique et tue le spermatozoïde. Pour éviter ou limiter cette destruction des spermatozoïdes, il faut déshydrater les cellules pour permettre la formation de petits cristaux de glace qui seront moins nocifs, mais sans excès sinon le cytoplasme devient toxique pour le spermatozoïde d'où l'utilisation de cryoprotecteur.

Des chercheurs ont montré que le glycérol pouvait jouer ce rôle, associé au jaune d'œuf ce qui a permis la congélation avec succès du sperme de taureau dès 1950. Mais le glycérol est toxique pour les spermatozoïdes à 37°C, il faut le rajouter au stade de 4°C à la bonne concentration qui a été déterminée pour chaque espèce d'animaux domestiques. La perméabilité à l'eau de la membrane plasmique du spermatozoïde varie selon les espèces ce qui nécessite des dilueurs spécifiques, adaptés à chaque espèce animale [117].

### IV.5.3. Les étapes de la congélation

Après l'examen de la semence, l'éjaculat est soumis à différents traitements permettant sa congélation dans les meilleures conditions possibles. Même s'il n'existe pas de protocole reconnu par tous, les grandes étapes de la congélation sont désormais connues [118].

#### IV.5.3.1 Centrifugation

La centrifugation de la phase spermatique de l'éjaculat, de 300 à 1000 g pendant 5 à 6 minutes, est une étape préalable qui permet d'éliminer l'excès de fluide prostatique [118].

En effet, il a été montré qu'un excès de fluide prostatique (plasma séminal) a un effet délétère sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes après décongélation et que la centrifugation de la semence avant dilution est préférable [119].

### **IV.5.3.2. Dilution**

Les chercheurs s'intéressant à la conservation de la semence ont très vite remarqué la nécessité de diluer la semence dès sa récolte, sans quoi sa durée de vie ne dépasse pas une heure ou deux [120]. Après centrifugation, il faut diluer la semence avec un dilueur spécifique, comme vu précédemment, afin de protéger et de nourrir les spermatozoïdes au cours de la congélation et de la décongélation [121].

Il existe un grand nombre de dilueurs, à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes [122].

### **IV.5.3.3. Equilibration**

Cette étape correspond à une réfrigération de la semence à 4°C avant la congélation. Elle permettrait des remaniements membranaires nécessaires à la résistance à la congélation. Le temps d'équilibration couramment utilisé varie entre 1 et 3 heures [123].

### **IV.5.3.4. Conditionnement**

Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux conditionnements sont disponibles pour congeler la semence : les pastilles et les paillettes [124].

### **IV.5.3.5. Conservation**

La semence congelée peut être conservée pendant un temps indéfini dans de l'azote liquide à -196°C. Les paillettes ou les pastilles sont ainsi conservées dans des tanks contenant de l'azote liquide.

### **IV.5.3.6. Température et temps de décongélation**

La décongélation s'effectue en plongeant directement les paillettes congelées dans un bain marie à une certaine température pendant un temps donné.

Au cours de cette étape, il faut éviter tout contact de la semence avec l'eau car celle-ci est toxique pour les spermatozoïdes. Même si une décongélation rapide est préconisée, le couple temps-température utilisé pour la décongélation dépend de la technique de congélation pratiquée. Cependant, pour une même technique de congélation, de nombreuses études montrent qu'une décongélation à 70°C pendant 7 à 8 secondes donne de meilleurs résultats en termes de qualité de la semence après décongélation qu'une décongélation à 37°C pendant 15 secondes à 2 minutes [113 ,128].

### **IV.5.3.7. Dilution après décongélation**

Après décongélation, la semence est placée dans un milieu de décongélation qui permet d'apporter des substances nutritives, de modérer le pH et de diluer les substances toxiques.

L'effet bénéfique de l'utilisation d'un milieu de décongélation sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes a été montré [129].

### IV.5.4. Réfrigération

La longévité des spermatozoïdes réfrigérés dépend du dilueur employé, mais également de la vitesse de refroidissement et de la température de conservation.

La longévité des spermatozoïdes est significativement plus importante à 4°C qu'à 22°C ou à 37°C [117, 130].

En effet, conserver la semence à 4°C permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et donc de prolonger leur longévité.

De plus, la croissance bactérienne est plus importante à 22°C ou à 37°C qu'à 4°C.

Pour ces différentes raisons, la semence est, en général, réfrigérée et conservée à 4°C.

Lors de la réfrigération, il ne faut pas que la vitesse de refroidissement de la semence soit trop rapide ou trop lente [130].

#### IV.5.4.1. Les effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes

Lors de la réfrigération, les spermatozoïdes subissent des agressions qui sont susceptibles d'altérer leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles :

- chocs thermiques lors de leur réfrigération, de leur conservation et de leur réchauffement pour utilisation [131].
- acidification du milieu extra-cellulaire [132].
- choc osmotique lors de la dilution [133].
- chocs mécaniques lors de leur transport.

La réfrigération, de la semence de 37°C à 4°C met en jeu des remaniements des membranes ; des spermatozoïdes qui sont regroupés (choc froid), qui par suite, provoque la perte du pouvoir fécondant et la mort cellulaire. L'une des conséquences de ce choc est l'oxydation des membranes cellulaires [134].

Dans une étude comparative, des chercheurs ont montré que les conséquences d'une réfrigération est moins néfaste pour les spermatozoïdes de celle de la congélation. Les caractéristiques de la semence (mobilité, vitalité, intégrité membranaire et acrosomial et la morphologie des spermatozoïdes) réfrigérée sur de courte période (inférieur à 48 heures), sont supérieures à celle de la semence congelée. Les mêmes auteurs ont démontrés que plus le temps de réfrigération augmente, plus la qualité de la semence ne se détériore [137,138].

#### IV.6. La semence et la vitamine E

Du à leurs propriétés antioxydantes reconnues, certaines vitamines comme la C et la E pourraient protéger les spermatozoïdes à l'état frais. On peut donc croire qu'elles puissent modifier le temps de conservation du sperme ou encore sa résistance à la congélation-décongélation, des aspects très importants pour l'insémination. Encore faut-il que ces vitamines passent dans la semence pour exercer une action de conservation, et pour cela nous avons utilisé des liposomes pour améliorer la solubilité de la vitamine E [139].

#### IV.7. Les dérivés actifs de l'oxygène

Les dérivés actifs de l'oxygène, également connus sous le nom de ROS (reactive oxygen species) ou de radicaux libres oxygénés, ont au moins un électron non apparié, ce qui en fait des molécules très instables, capables de réagir avec les molécules voisines (protéines...) en leur arrachant un électron, les transformant à leur tour en molécules radicalaires [140].

Certaines ROS sont sous forme ionique (l'ion hydroxyle [OH<sup>-</sup>], l'ion superoxyde [O<sub>2</sub><sup>-</sup>]), et d'autres sous forme de molécules (le peroxyde d'hydrogène [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], l'acide hypochlorique [HOCl], le peroxyde de lipides [LOOH] et l'ozone [O<sub>3</sub>]). Le principal mécanisme à l'origine des ROS dans le spermatozoïde est la réaction Redox dépendante au niveau mitochondrial. En effet, les spermatozoïdes sont riches en mitochondries de par leur besoin important d'énergie nécessaire à leur mobilité. La plus fréquente des ROS dans le spermatozoïde est l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) qui se dimérise pour donner l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence de métaux comme le fer et le cuivre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup> subissent une réaction qui aboutit à une substance extrêmement toxique : OH<sup>-</sup> aboutissant à une peroxydation lipidique, et à l'oxydation de protéines et de l'ADN [141,142].

#### IV.8. Action Antioxydante

Les antioxydants agissent en interrompant les réactions en chaîne aboutissant à la production des ROS. Ils peuvent être divisés en 2 groupes en fonction de leur mode d'action :

- Les antioxydants préventifs sont les métaux chélateurs et les protéines de liaison, telles que la lactoferrine et la transferrine, qui préviennent la formation des ROS ;
- les antioxydants détoxifiants, tels que la vitamine C et E, qui suppriment les ROS déjà présents. Il y a eu de nombreux travaux qui ont étudié l'efficacité de chaque antioxydant isolément. Cependant, les résultats n'ont pas permis d'asseoir de conclusion ferme en raison des faibles effectifs, de variations des dosages et des durées de traitement et du manque de contrôles [143].

### **IV.9. Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons vu que pour conserver le sperme, on peut utiliser plusieurs méthodes tel que la réfrigération et la congélation, sauf que ces méthodes nécessitent quelques adjuvants particuliers, comme la vitamine E et le cholestérol.

# Chapitre V :

# Travaux antérieurs

## V.1. Introduction

Pour être efficaces et pertinents dans notre travail, nous avons recensé les travaux déjà effectués sur l'encapsulation par les liposomes.

## V.2. les travaux antérieurs

En 1965 A. Bengham et ses collègues ont découvert les liposomes, alors qu'ils effectuaient des recherches sur les propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique en étudiant les phospholipides et la coagulation du sang. Ils ont ainsi découvert que les phospholipides mis en présence d'eau formaient des sphères [144].

En 1975 I. Achvili et collaborateurs ont étudié le caractère amphiphile des phospholipides qui détermine leur comportement en solution aqueuse. L'auto-assemblage des phospholipides en solution aqueuse est dicté par le paramètre d'empilement (packing parameter), ce paramètre permet de caractériser la forme prise par la molécule (cylindre, cône etc. ...) et donc la morphologie des auto-assemblages (bicouches, micelles inverses etc...) [1].

En 1981 J. Kreuter et ses collègues ont étudié la relargation du cholestérol incorporé dans des petits liposomes uni-lamellaires à travers les membranes silastiques. La perméabilité du cholestérol incorporée dans les liposomes formés par phosphatidylcholine /cholestérol avec un rapport molaire de 1:1 a été étudiée. Les résultats obtenus suggèrent que le cholestérol s'est lié à la membrane de Silastic par formation de liposomes [145].

En 1995 S. Webb et ses collègues ont étudié une préparation liposomale contenant de la sphingomyéline et du cholestérol pour améliorer la stabilité et les propriétés biologiques de la vincristine à application anti-tumorale [146].

En 1997 A. Sharma et U.S. Sharma ont étudié les nanoparticules et plus particulièrement le développement des liposomes vecteurs de médicament [147].

En 2006 M. M. Nounou et ses collègues ont étudié la libération in vitro de médicaments hydrophiles et hydrophobes contenus dans des formulations liposomales, de forme galénique particulière : gel, ceci pour améliorer le taux de libération des : dibucaine et 5-fluorouracile [148].

En 2010 P. Kulkarni et ses collègues ont étudié les liposomes d'une manière théorique, comme agent de vectorisation de principes actifs [149].

En 2012 M. Mansoori et collaborateurs ont montré que les liposomes sont des vecteurs capables d'encapsuler des médicaments hydrophiles et lipophiles afin d'améliorer l'efficacité des molécules thérapeutiques et de protéger les médicaments de la dégradation [150].

En 2013 M. Rovoli et ses collaborateurs ont étudié le liposome B-lactoglobuline dans l'optique d'améliorer les propriétés d'encapsulation de la vitamine E pour développer un nouveau transporteur plus efficace dans un milieu aqueux [151].

En 2013 H. Tabandeh et S. Mortazavi ont étudié l'efficacité d'encapsulation d'Alpha-Tocophérol dans des vésicules multilamellaire (MLV). Cette étude a été réalisée en utilisant la lécithine d'œuf, le cholestérol avec divers rapports molaires de l'Alpha-tocophérol. La meilleure préparation liposomale a été incorporée dans un Carbonner 980 pour former un gel [152].

En 2014 N. Duhem et ses collaborateurs ont étudié le développement de la vitamine E pour la vectorisation pharmaceutique des principes actifs PA (s) par le biais des nanotechnologies.

Cette étude fut basée sur la combinaison entre les propriétés pharmaceutiques de la vitamine E et les nanomedicines afin d'améliorer la solubilité de PA hydrophobes dans l'eau, et par conséquent augmenter l'efficacité thérapeutique des agents anticancéreux [153].

# Chapitre VI :

# Méthodes et matériels

### VI.1. Réalisation du plan d'expérience

Nous avons utilisé le logiciel d'optimisation MODD 6.0 (annexe 1) pour construire une matrice d'expérience balayant des paramètres de formulation à étudier.

Après avoir effectué une recherche bibliographique, nous avons trouvé que les quantités de phospholipide et de cholestérol utilisées pour la fabrication des liposomes étaient respectivement comprises dans les intervalles : [10-50] et [1.5-10] mg [144-153].

Les matrices d'expérience en valeurs réelles et en valeurs centrées réduites sont présentées respectivement dans le tableau VI.1 et le tableau VI.2.

**Tableau VI.1.** Matrice d'essai obtenue par le plan d'expérience factoriel.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	phospholipide	cholesterol	taux d'encapsulation	taille des liposomes
1	1	N1	11	Incl	10	1,5		
2	2	N2	2	Incl	30	1,5		
3	3	N3	10	Incl	50	1,5		
4	4	N4	3	Incl	10	5,75		
5	5	N5	1	Incl	30	5,75		
6	6	N6	6	Incl	50	5,75		
7	7	N7	8	Incl	10	10		
8	8	N8	4	Incl	30	10		
9	9	N9	5	Incl	50	10		
10	10	N10	7	Incl	30	5,75		
11	11	N11	9	Incl	30	5,75		

**Tableau VI.2.** Matrice d'expérience avec des valeurs centrées réduites

1	2	3
Exp No	phospholipide	cholesterol
1	-1	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1
10	0	0
11	0	0

## VI.2. Préparation des liposomes de vitamine E et placebo par Co-évaporation

### ➤ Matières premières

- Phospholipide Rhone Poulenc (90 H lot : 90060) ;
- Cholestérol (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Vitamine E (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- La solution tampon pH=7.4 ;
- Tampon tris (milieu nutritif pour les spermatozoïdes) ;
- Ethanol ;

### ➤ Appareillages

- Balance Analytique (Denver) ;
- Plaque chauffante agitatrice (Velp Scientifica) ;
- Rota vapeur (Buchi) ;

### ➤ Méthodes

#### VI.2.1. Préparation des liposomes de vitamine E selon la matrice d'expérience

##### • Préparation de la solution tampon pH= 7.4

Pour la préparation de la solution tampon pH= 7.4 nous avons prélevé 393,4 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1M et 250,0 ml de phosphate mono potassique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,2M [157].

- Les liposomes sont préparés de la manière suivante :
  - Peser une quantité **m** de phospholipide, **m'** de cholestérol et 2 mg de vitamine E, que l'on dissout dans **15 ml** d'éthanol sous agitation à une température de 47C° ±3.
  - Verser le contenu dans un volume **40 ml** de la solution tampon pH=7.4 qui est sous agitation, ceci à l'aide d'une seringue poussoir.
  - Evaporer par un rota-vapeur l'éthanol en suivant les étapes suivantes :
    - Mettre de l'eau distillée dans le bain-marie.
    - Faire circuler l'eau dans le système de refroidissement (doucelement).
    - Fixer le ballon, contenant l'échantillon à l'aide d'un clip adapté.
    - Allumer le bain-marie à une température de 55-60 °C.
    - Allumer la pompe à vide.
    - Ajuster la vitesse de rotation à 80 tour/min.
    - Lancer l'évaporation, on arrête lorsque le solvant ne passe plus dans le ballon de récupération.

**NB :** Les masses **m** et **m'** représentent celles indiquées dans la matrice d'expérience (tableau V.1).

### **VI.2.2. Préparation de la solution liposomale optimale**

Après avoir déterminé, l'optimum grâce à notre plan d'expérience, nous l'avons préparé dans le but de :

- faire un essai de vérification et comparaison par rapport aux réponses prédites par le plan d'expérience.

- faire des tests de caractérisation (HPLC et MEB).

- **Préparation du tampon tris (TB)**

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

Pour la préparation de la solution liposomale optimale, nous avons suivi les mêmes étapes que précédemment décrites (**V.2.1**), tout en opérant les changements suivants :

- La masse du phospholipide = 162 mg,

- La masse du cholestérol = 5.5 mg.

**NB :** Le tampon pH= 7,4 fut substitué par le tampon tris de pH=7,4, qui est un milieu non destructeur vis-à-vis des spermatozoïdes.

### **VI.2.3. Préparation du liposome placebo (blanc)**

Pour cette préparation qui nous servira de blanc, nous avons suivi les mêmes étapes que précédemment décrites (**V.2.2**), la seule différence c'est que nous n'avons pas ajouté la vit E.

## **VI.3. Caractérisation des liposomes**

### **VI.3.1. Le taux d'encapsulation**

#### **VI.3.1.1. Ultracentrifugation des liposomes**

- **Matières Premières**

- Les solutions liposomales préparées ;
- Méthanol (Bio Chem) ;

- **Appareillages**

- Balance analytique (Denver) ;

- Plaque d'agitatrice magnétique (Velp Scientifica) ;
- Une ultracentrifugeuse (Sigma) ;

### ➤ Méthode

- Mettre les solutions liposomales préparées sous agitation pendant 5 minutes,
- Mettre les solutions liposomales de chaque essai dans les tubes de l'ultracentrifugeuse, fermer l'appareil, et lancer l'ultracentrifugation, en fixant les paramètres suivants :
  - Une agitation de 15500 g.
  - Une température de 4 C°.
  - Un temps approprié qui dépend de la séparation des phases de chaque échantillon de 120 à 180 min.
- Après l'ultracentrifugation on obtient une phase aqueuse transparente et un culot.
- On récupère le culot de chacune des solutions dans 20 ml de méthanol, on laisse sous une agitation 10 minutes et sous sonication 5 minutes.
- Filtrer avec des filtres de 0.45µm et remplir les vials pour le dosage.

### VI.3.1.2. Le dosage de la vitamine E par HPLC

#### ➤ Matières premières

- Vitamine E (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Méthanol (Bio Chem) ;

#### ➤ Appareillages

- Balance de précision (Sartorius) ;
- Plaque d'agitation magnétique (Wise Stir) ;
- Bain ultrason (Selecta) ;
- HPLC (Waters E2695, alliance) ;

#### ➤ Méthode

La quantification de la vitamine E dans les liposomes préparés s'est effectuée par HPLC suivant les étapes ci-dessous, cela dit nous avons commencé par une vérification de méthode (linéarité, spécificité et reproductibilité):

**a) Courbe d'étalonnage de la vitamine E (linéarité) et répétabilité**

Nous avons préparé six (06) concentrations différentes de vitamine E dans du méthanol (tableau V.3), ces solutions furent filtrées et quantifiées par HPLC.

Nous avons aussi injecté la solution C6 sept fois pour la vérification de **la répétabilité**.

**Tableau VI.3.** Concentrations en vit E utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage (linéarité).

<b>Solution</b>	<b>Concentration (mg /ml)</b>	<b>Masse de la vitamine E (mg)</b>	<b>Volume du méthanol (ml)</b>
<b>C1</b>	0.5	25	50
<b>C2</b>	0.4	20	50
<b>C3</b>	0.3	15	50
<b>C4</b>	0.2	10	50
<b>C5</b>	0.1	5	50
<b>C6</b>	0.05	2,5	50

**b) Vérification de la spécificité**

La spécificité a été vérifiée en injectant, le diluant, les constituants de notre liposome qui pourraient interférer lors du dosage de la vitamine E dans ce dernier :

- **Diluant** : méthanol.
- **Solution contenant le cholestérol** : 5mg cholestérol dans 10 ml de méthanol.
- **Solution contenant le phospholipide** : 10 mg dans 10ml de méthanol.

**c) Dosage de la vitamine E dans les solutions liposomales de la matrice d'essai, ainsi que dans la solution liposomale optimale**

La détermination de la quantité de la vitamine E encapsulé par les liposomes est effectuée par l'HPLC, tous les échantillons furent préalablement ultra-centrifugé (VI.2.), et filtré à travers des filtres seringues 0.45µm.

Les solutions obtenues furent quantifiées par HPLC selon les conditions opératoires suivantes :

- **La phase mobile** : méthanol 100%.
- **Diluant** : méthanol.
- **Colonne** : C18, 15 cm.
- **Longueur d'onde** : 292 nm.

- **Volume d'injection** : 20 µl.
- **Temps d'acquisition** : 15 min.
- **Débit** : 1 ml/min.

### VI.3. 2. Tailles des liposomes

#### ➤ **Matières premières**

- Placebo et solutions liposomale de la matrice d'essai ;

#### ➤ **Appareillages**

- Granulomètre laser (Perkin elmer) ;

#### ➤ **Méthode**

La détermination de la taille des liposomes, plus exactement de la distribution de la taille des liposomes dans les solutions liposomale préparées, a été effectuée à l'aide d'un granulomètre laser.

### VI.4. Analyse par microscopie à balayage électronique (MEB)

#### ➤ **Matières analysées**

- Phospholipide (Rhône Poulenc (90 H lot : 90060)) ;
- Cholestérol (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique ; de l'université de Rouen) ;
- Vitamine E (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique ; de l'université de Rouen) ;
- Echantillons liposomaux ;

#### ➤ **Appareillage**

- Microscope à balayage électronique (quanta 200 FEI) ;

#### ➤ **Méthode**

- Les matières premières (vit E, CHL et phospholipides) et les échantillons liposomes à analyser sont déposés sur des lamelles sous forme d'un film très fin afin de sécher, puis sont caractérisés par le microscope à balayage électronique, avec des grossissements allant de 10 à 50µm.

### VI.7. Conservation du sperme bovin en utilisant les liposomes de vit E

#### VI.7.1. Réfrigération du sperme bovin

#### ➤ **Matières**

- Solution liposomales préparé avec le tampon tris.
- Testicules du taureau .

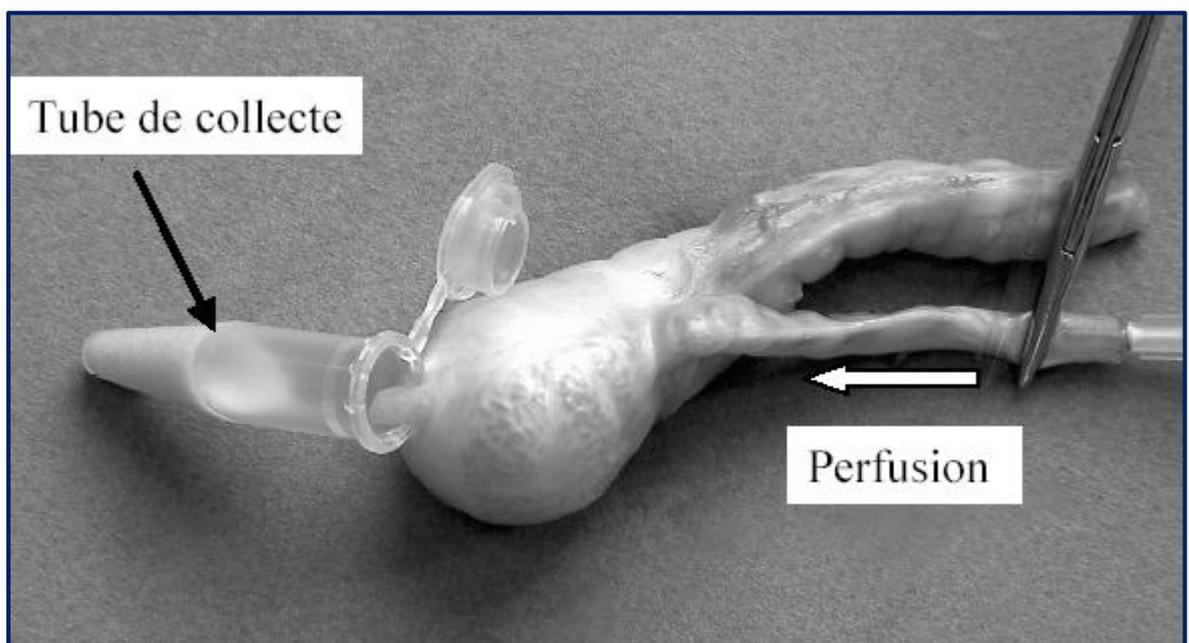
### ➤ Appareillage

- Balance analytique (Denver) ;
- Réfrigérateur (LG) ;
- Microscope à CASA (MiKoneclipse E200) ;

### ➤ Méthode de récolte du sperme épидидymaire du bovin

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

- Après nettoyage de la matrice, on commence par isoler l'épididyme et le canal déférent du testicule.
- Le tissu conjonctif est soigneusement séparé de l'épididyme.
- L'épididyme est ponctionné puis rincé avec une solution physiologique pour éviter toute contamination de la semence.
- Récupération du sperme par la méthode de pression à l'aide d'une seringue introduite dans le canal déférent et qui va pousser le sperme vers la sortie (incision) déjà faite au niveau de la queue épидидymaire.
- Les spermatozoïdes récupérés seront placés dans un eppendorf. La figure VI.1 représente la méthode de collecte des spermatozoïdes du bovin.



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

### ➤ Réfrigération du sperme

- Juste après la récolte de la semence, le volume et la motilité massale sont évalués.
- On utilise le formol pour fixer les spermatozoïdes.
- On dilue la semence à 1/200 afin de déterminer la concentration (nombre des spermatozoïdes).
- Ensuite on dilue le sperme dans 900  $\mu\text{L}$  avec ou sans traitement (contrôle) pour avoir une concentration finale de  $10^8$  spz/mL.
- L'analyse s'effectue à l'aide du CASA, à 15 min, 2 heures, 4 heures et à 24 heures de réfrigération à  $T = 4^\circ\text{C}$ .

# Chapitre VII:

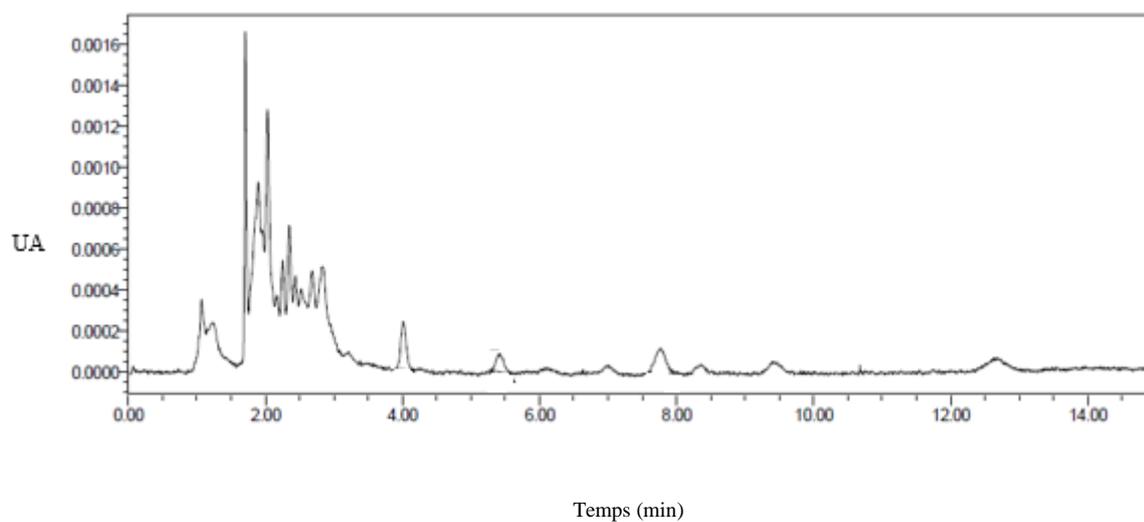
## Résultats et discussions

## VII.1. Vérification de la méthode de dosage de la vitamine E par HPLC

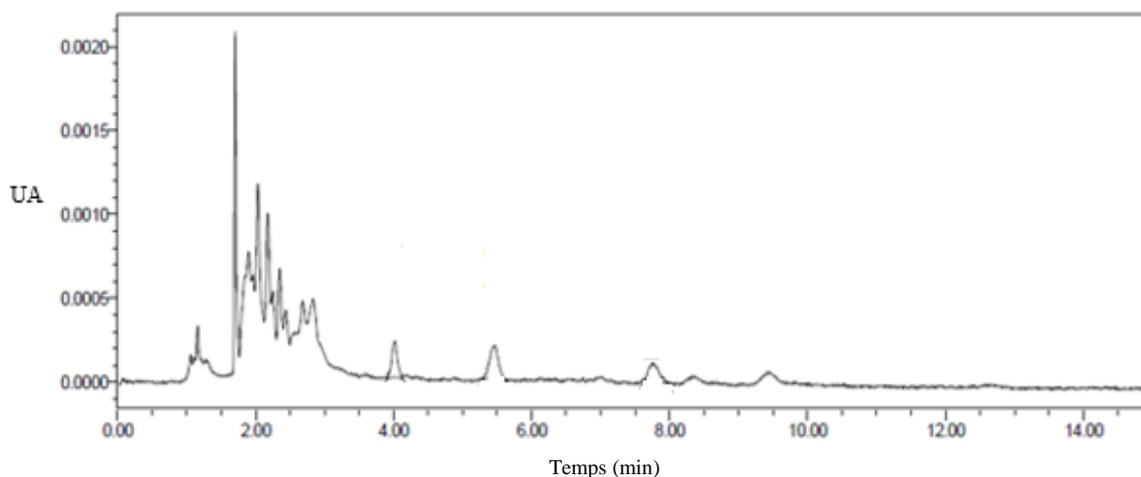
### VII.1.1. Spécificité

#### VII.1.1.1. Résultats

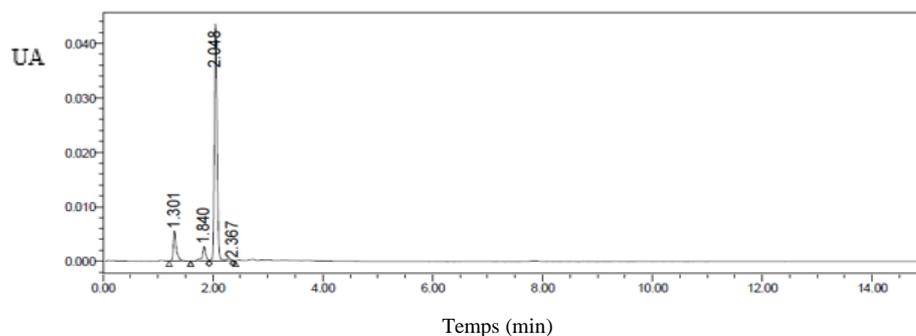
L'analyse par HPLC des solutions contenant le cholestérol, le phospholipide, le diluant (méthanol) et la vitamine E nous donne les chromatogrammes suivants (figures : VII.1, VII.2, VII.3 et VII.4).



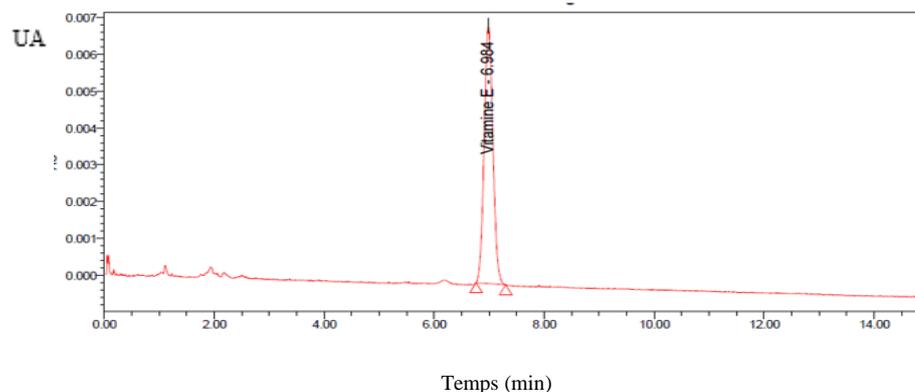
**Figure VII.1.** Chromatogramme de la solution contenant le cholestérol.



**Figure VII.2.** Chromatogramme de la solution contenant le phospholipide.



**Figure VII.3.** Chromatogramme du diluant (méthanol).



**Figure VII.4.** Chromatogramme du standard vitamine E.

### VII.1.1.2. Observations

Nous observons l'absence de pic au temps de rétention 6.98 min, temps de rétention correspondant à la vitamine E pour chacune des solutions contenant le cholestérol, phospholipide, et le diluant méthanol.

### VII.1.1.3. Interprétations

L'absence de pics au temps de rétention (tr) 6.984 min qui correspond à la vitamine E confirme que les trois composants (cholestérol, phospholipide et méthanol) n'absorbent pas à la longueur d'onde (292 nm) à ce temps de rétention, cela indique qu'aucun autre composant dans la préparation liposomale n'est détecté, et par suite aucun des composés n'interfèrent lors du dosage de la vitamine E, donc notre méthode est bien **spécifique**.

## VII.1.2. Répétabilité et paramètres de conformité

### VII.1.2.1. Résultats

L'analyse du standard de la vitamine E par HPLC nous donne le chromatogramme en figure VII.4.

### VII.1.2.2. Observations

Après dosage par HPLC de la vitamine E, nous avons obtenu les paramètres de conformité (suitability) suivant :

- L'écart relatif standard (RSD) : 0.4 %.
- Le nombre de plateaux théorique (NPT) : 9223.
- Le facteur de symétrie : 1.08.

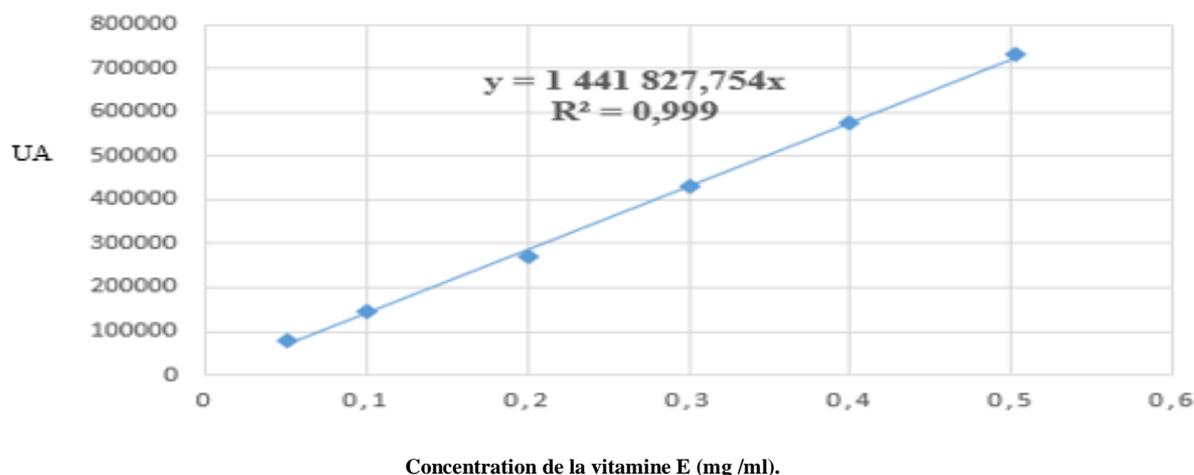
### VII.1.2.3. Interprétations

- L'écart relatif standard (RSD) est une grandeur qui représente la répétabilité de l'équipement (HPLC) sur six à sept injections de la même solution. Notre résultat suggère que la **répétabilité est confirmée** car selon la pharmacopée Européenne (PE) le RSD doit être inférieur ou égal à 2% [157].
- L'analyse par HPLC nous a donné un nombre de plateaux théoriques qui est de 9223, selon la pharmacopée Européenne ce résultat prouve que nous avons une bonne séparation. Ce qui indique que la colonne utilisée fonctionne correctement [157].
- Le facteur de symétrie qui est une grandeur qui définit la symétrie des pics, est de 1.08. Ce dernier est conforme aux normes de la pharmacopée européenne ( $0.5 < f < 1.5$ ). De plus ce résultat indique que les phases mobiles et stationnaires utilisées sont adéquates pour la séparation de la vitamine E [157].

### VII.1.3. Courbe d'étalonnage (linéarité)

#### VII.1.3.1. Résultats

La courbe obtenue lors de l'essai de linéarité par HPLC est présentée dans la figure VII.5 (les résultats bruts sont joints en annexe 3).



**Figure VII.5.** Courbe d'étalonnage de la vitamine E.

**VII.1.3.2. Observations**

Nous remarquons que la droite de régression passe par la majorité des points, cette dernière est sous forme  $y=a x$  où  $a= 1441827,75$ .

**VII.1.3.3. Interprétations**

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

**VII.2. Modélisation et optimisation des liposomes de vit E**

**VII.2.1. Détermination des réponses du plan d'expérience**

**VII.2.1.1. Résultats**

Les tableaux (VII.1, VII.2, VII.3) représentent les résultats expérimentaux du plan d'expérience obtenus.

**a) Taux d'encapsulation**

**Tableau VII.1.** Résultats expérimentaux du taux d'encapsulation.

Exp No	lipide	cholesterol	taux d'encapsulation
1	10	1,5	81,9642
	30	1,5	3,7743
	50	1,5	39,8494
2	10	5,75	55,6162
	30	5,75	35,868
3	50	5,75	41,0107
	10	10	62,4813
4	30	10	40,5941
	50	10	19,3426
5	30	5,75	37,8346
	30	5,75	37,8346
6			

**b) Taille des liposomes**

**Tableau VII.2.** Résultats expérimentaux de la taille des liposomes.

Exp No	lipide	cholesterol	taille des liposomes
1	10	1,5	131
	30	1,5	301000
	50	1,5	40800
2	10	5,75	243
	30	5,75	28200
3	50	5,75	622
	10	10	151
4	30	10	550
	50	10	22400
5	30	5,75	61500
	30	5,75	61500
6			

C) Matrice finale

Tableau VII.3. Résultats expérimentaux de la matrice finale.

Exp No	lipide	cholesterol	taux d'encapsulation	taille des liposomes
1	10	1,5	81,9642	131
	30	1,5	3,7743	301000
	50	1,5	39,8494	40800
2	10	5,75	55,6162	243
	30	5,75	35,868	28200
	50	5,75	41,0107	622
3	10	10	62,4813	151
	30	10	40,5941	550
	50	10	19,3426	22400
4	30	5,75	37,8346	61500
	30	5,75	37,8346	61500

VII.2.1.2. Observations et discussions

Nous avons exclu deux essais (le deuxième et le sixième) vu leurs valeurs aberrantes, car ils ne suivent pas la tendance des autres essais, et par conséquent ils risquent de fausser la modélisation.

VII.2.2. Analyse statistique

La qualité du modèle fourni par l'analyse des données peut être estimée particulièrement par deux grandeurs :  $R^2$  et  $Q^2$ .

- $R^2$  exprime le pourcentage de variabilité de la réponse expliqué par le modèle.
- $Q^2$  exprime le pourcentage de variabilité de la réponse qui peut être prédit par le modèle.

Les valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  obtenues sont présentées dans la figure VII.6.

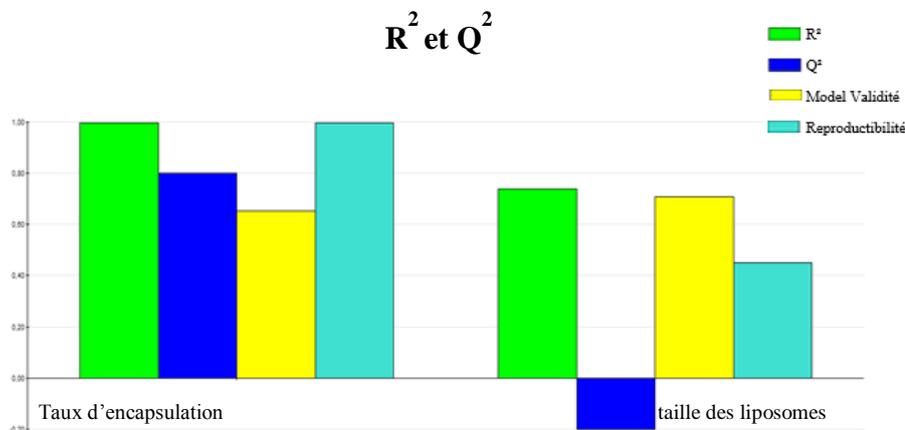


Figure VII.6. Facteurs statistiques obtenus.

Pour mieux exploiter ces résultats, les valeurs numériques de ces caractéristiques statistiques sont résumées dans le tableau V.II.4.

**Tableau VII.4.** Valeurs numériques des caractéristiques statistiques.

	R2	Q2	Model Validity	Reproducibility
taux d'encapsulation	0,997795	0,799954	0,653238	0,996138
taille des liposomes	0,73909	-18,9726	0,709096	0,449106

Les paramètres statistiques R2 et Q2 traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus. Lorsque ces deux derniers tendent vers 1, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse totalement. En revanche lorsque R2 ou Q2 tendent vers 0 ou sont négatives, alors le modèle ne peut être utilisé ni pour expliquer la variation ni pour la prédiction des réponses.

### VII.2.2.1. Taux d'encapsulation

#### VII.2.2.1.1. Observations

Les valeurs de R<sup>2</sup>, Q<sup>2</sup>, du modèle de validité ainsi que du modèle de reproductibilité sont très proches de 1.

#### VII.2.2.1.2. Interprétations

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque la valeur de Q<sup>2</sup> est positive et très proche de 1 alors nous pouvons conclure que notre modèle est prédictif.

**NB** : Nous avons obtenu une valeur très élevée de reproductibilité (0,99), cela indique une maîtrise du "process" de préparation de liposomes et d'encapsulation de la vitamine E.

### VII.2.2.2. Taille des liposomes

#### VII.2.2.2.1. Observations

La valeur de R<sup>2</sup>, du modèle de validité est proche de 1, celle du modèle de reproductibilité est acceptable par contre la valeur de Q<sup>2</sup> est négative.

#### VII.2.2.2.2. Interprétations

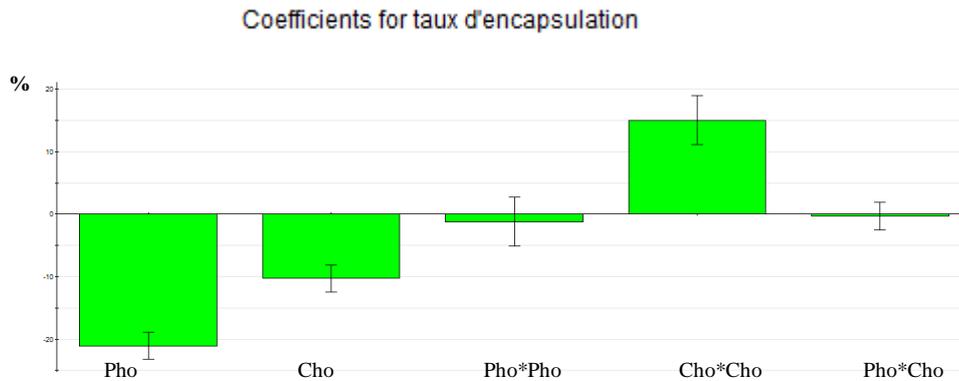
La valeur négative de Q<sup>2</sup> explique que le modèle est très peu prédictif. Cela, est un résultat très important car, le modèle prédictif qui sera obtenu, devra être utilisé avec précaution.

### VII.2.3. Etude des effets propres

Les figures VII.7 et VII.8 représentent respectivement les effets propres des facteurs sur le taux d'encapsulation et les tailles des liposomes.

Il y a des facteurs qui ont une influence positive sur les réponses (barre dirigée vers le haut), et ceux qui influent négativement sur ces réponses (barre dirigée vers le bas).

#### VII.2.3.1. Taux d'encapsulation



**Figure VII.7.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.

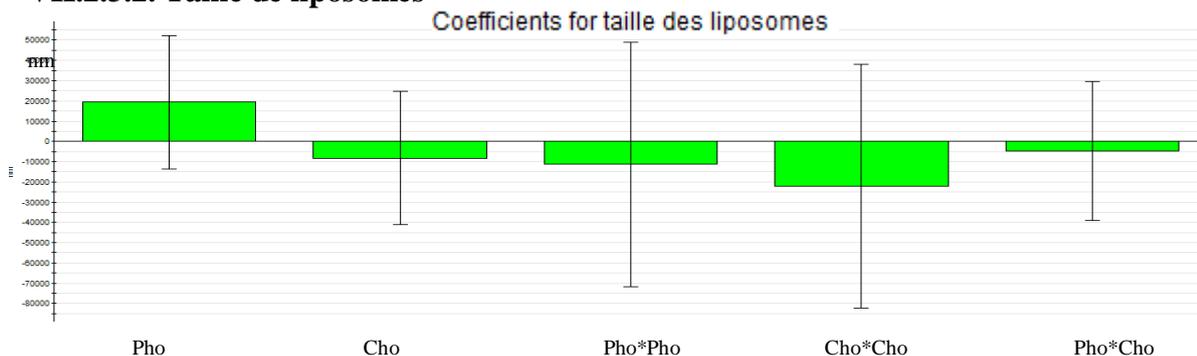
#### VII.2.3.1.1. Observations

Les paramètres : phospholipide et cholestérol influent de manière négative.

#### VII.2.3.1.2. Interprétations

Les valeurs des coefficients du phospholipide et cholestérol sont négatives, cela indique que plus la quantité de ces composés est petite dans la préparation, mieux est le taux d'encapsulation de la vitamine E. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la vitamine E a besoin d'espace au niveau de la bicouche du liposome, de ce fait moins il y a de CHL et Phospholipide mieux c'est, il faut juste en avoir suffisamment pour assurer la formation et la stabilité du liposome [12, 13].

#### VII.2.3.2. Taille de liposomes



**Figure VII.8.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des liposomes.

#### VII.2.3.2.1. Observations

Nous observons que la concentration en phospholipide a un effet positif, et que celle du cholestérol quant à elle a plutôt un effet négatif sur la taille du liposome.

#### VII.2.3.2.2. Interprétations

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la quantité du phospholipide influe positivement sur la formation de liposome de petite taille (valeur cible=100 nm), cela peut s'expliquer par le fait que le composant de base d'un liposome est le phospholipide, de ce fait sa présence est primordiale.

D'autre part, le cholestérol a une influence négative, de ce fait il serait intéressant d'en mettre le moins possible dans la préparation pour obtenir des liposomes de petite taille, cela est en adéquation avec la littérature ; car le cholestérol a tendance à rendre l'enveloppe de la bicouche plus rigide, est donc moins divisible, ce qui donnera alors de gros liposomes [12, 13].

#### VII.2.4. Modèle mathématique proposé

Réponse = cts + a<sub>1</sub> phospholipide + a<sub>2</sub> cholestérol + a<sub>3</sub> phospholipide\* cholestérol + a<sub>4</sub> phospholipide<sup>2</sup> + a<sub>5</sub> cholestérol<sup>2</sup>

- Réponses : Taux d'encapsulation.

Taille de liposome.

- Les constantes a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>4</sub> et a<sub>5</sub>, sont les coefficients du polynôme.

Ci-dessous les équations des réponses choisis :

- **Taux d'encapsulation** = 36.8338 – 21.0544 phospholipide -10.2564 cholestérol – 0.255975 phospholipide\*cholestérol – 1.23604 phospholipide<sup>2</sup> + 15.0527 cholestérol<sup>2</sup>.
- **Taille de liposomes** = 45518.6 + 19390.6 phospholipide – 8256.05 cholestérol – 4605 phospholipide\*cholestérol -11240.8 phospholipide<sup>2</sup> - 22068.3 cholestérol<sup>2</sup>.

#### VII.3. Détermination de l'optimum

Le but de cette étape est de déterminer une formulation optimale. Pour ce faire, une modélisation en surface de réponse est possible étant donné que les facteurs sont quantitatifs et continus.

La formulation optimale correspondra à la position optimale des facteurs de formulation considérés à savoir : les quantités en phospholipides et cholestérols susceptibles de conférer aux grandeurs observées (les réponses) ; le taux d'encapsulation et la taille des liposomes, des valeurs cibles ou optimales en utilisant les techniques d'optimisation des réponses.

Une fois la formulation optimale déterminée, il s'agira de réaliser des essais de confirmation tout en utilisant les valeurs optimales obtenues.

Après traitement des résultats, le logiciel Modde 6.0 a permis de déterminer les conditions optimales de fabrication des liposomes. Celles-ci sont présentées dans le tableau VII.5.

**Tableau VII.5.** Détermination de l'optimum.

Exp No	phospholipide	cholesterol	taux d'encapsulation	taille des liposomes
1	10,2676	1,8323	78,4161	115,221
	12,3906	9,3725	56,799	118,161
2	11,2841	1,5705	79,8619	68,5041
	10,7945	1,6948	79,1685	99,051
3	10,4951	1,769	78,7721	80,5977
	10,2676	1,8323	78,4161	115,221
4	12,1336	9,3309	56,893	68,981
	11,9224	9,2889	56,9436	98,5521

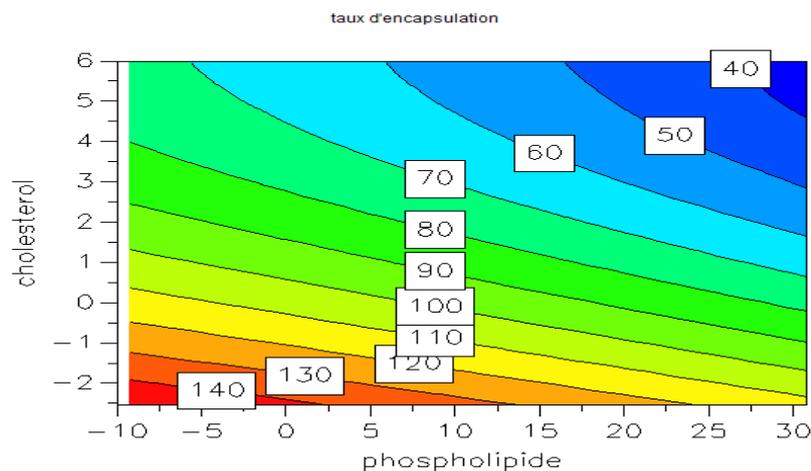
L'optimum est obtenu lorsque les facteurs prennent les valeurs suivantes :

- La quantité en phospholipide 10.79 mg.
- La quantité en cholestérol 1.69 mg.

Les deux figures VII.9 et VII.10 représentent les réponses étudiées (à savoir le taux d'encapsulation et la taille des liposomes) en deux dimensions sous forme de courbes iso-réponses en fonction des quantités du phospholipide ainsi que celles du cholestérol.

Ces deux représentations nous permettent de visualiser les deux paramètres, ainsi que les deux réponses choisies simultanément.

### VII.3.1. Taux d'encapsulation



**Figure VI.9.** Représentation de la surface de réponse du taux d'encapsulation.

**VII.3.1.1. Observations**

L'optimum est obtenu lorsque les facteurs prennent les valeurs suivantes :

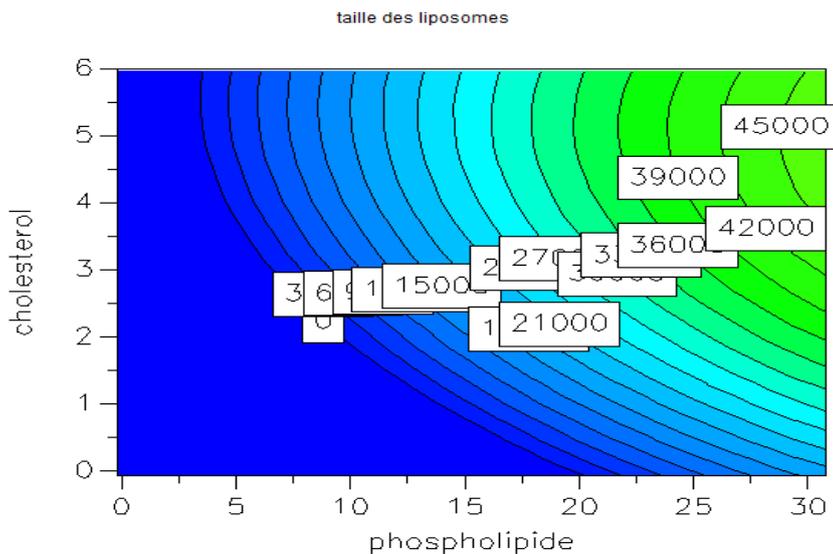
- Phospholipide 10.8 mg/ml
- Cholestérol 1.7 mg/ml

D'après la courbe iso-réponse les meilleurs résultats du taux d'encapsulation pour le cholestérol sont obtenus dans l'intervalle [0-2] et pour le phospholipide les résultats sont obtenus dans l'intervalle [5.5-10.5] (zone verte).

**VII.3.1.2. Interprétations**

Les valeurs des quantités du phospholipide et cholestérol sont petites (proche de la borne inférieures choisie), cela indique que plus la quantité de ces composés est petite dans la préparation, mieux est le taux d'encapsulation de la vitamine E. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la vitamine E a besoin d'espace au niveau de la bicouche du liposome comme dit précédemment (VII.2.3.1.2).

**VII.3.2. Taille de liposome**



**Figure VII.10.** Représentation de la surface de réponse des tailles de liposomes.

**VII.3.2.1. Observations**

L'optimum est obtenu lorsque les facteurs prennent les valeurs suivantes :

- Phospholipide 10.8 mg/ml
- Cholestérol 1.7 mg/ml

D'après la courbe iso-réponse les résultats où se situent les quantités optimisées qui donnent la taille de 100 nm sont dans l'intervalle [0-2] pour le cholestérol et [5.5-10.5] pour le phospholipide (zone bleu).

### VII.3.2.2. Interprétations

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons constater qu'il serait intéressant de mettre de petites quantités de cholestérol et de phospholipide dans la préparation pour obtenir des liposomes de petite taille, car le cholestérol a tendance à rendre l'enveloppe de la bicouche plus rigide, ce qui donnera alors de gros liposomes [13-14]

**NB :** Les courbes iso-réponses montrent que la région optimale est obtenue pour de très petites quantités de cholestérol et phospholipide, cela sous-entend que si on allait plus bas dans les concentrations on peut obtenir de meilleurs résultats.

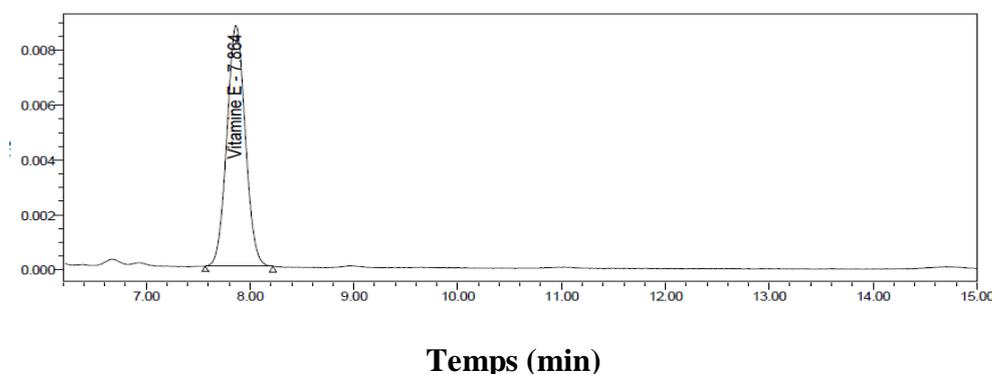
## VII.4. Caractérisations des liposomes

### VII.4.1. Dosage de la solution liposomale optimale par HPLC

La quantification de la vitamine E par HPLC des solutions liposomales dissoutes dans le méthanol nous a permis de déterminer le taux d'encapsulation.

#### VII.4.1.1. Résultats

Les chromatogrammes obtenus sont joints en annexe N° 2, nous avons choisi de présenter un d'entre eux en figure VII.11.



**Figure VII.11.** Chromatogramme de la solution liposomale optimale.

#### VII.4.1.2. Observations

L'analyse par HPLC du culot obtenu après centrifugation de la solution liposomale dissoute dans le méthanol montre un pic qui apparaît à un temps de rétention de 7,864 min.

Le taux d'encapsulation obtenu est présenté dans le tableau annexe N°4

### VII.4.1.3. Interprétations

L'apparition d'un pic intense à un temps de rétention (tr) égale à 7,864 min, est dû à la présence de la vitamine E.

L'analyse effectuée sur quatre préparations liposomales différentes nous a permis d'obtenir un taux d'encapsulation de 79 %, ce qui montre une efficacité d'encapsulation des liposomes. La quantité de la vitamine E non encapsulée a été dosée dans le surnageant (phase aqueuse), nous avons obtenus un taux de vitamine E en phase aqueuse de 22%.

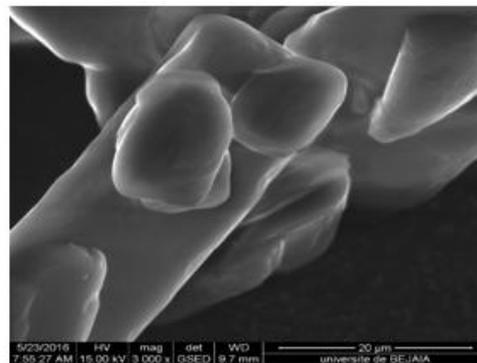
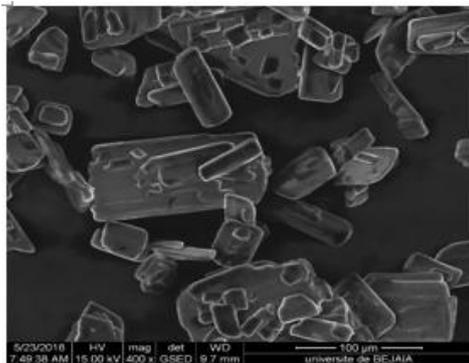
Les résultats expérimentaux obtenus sont très satisfaisants vue le pourcentage élevé du taux d'encapsulation obtenu.

Les résultats trouvés sont représenté dans les tableaux de l'annexe N°4.

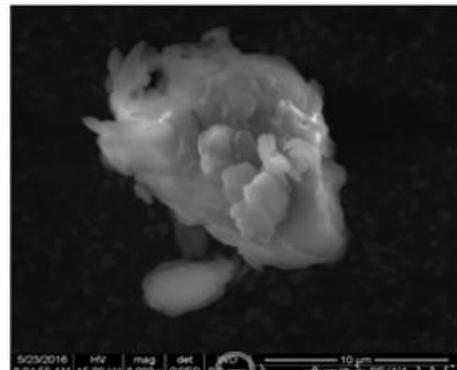
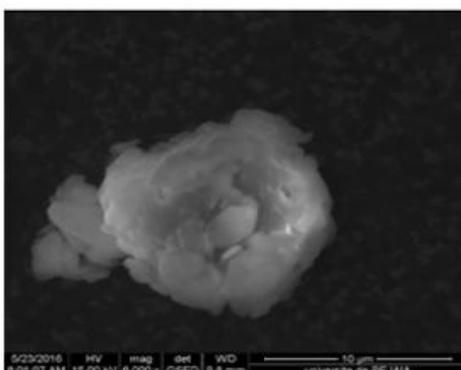
### VII.4.2. Analyse par microscopie à balayage électronique (MEB)

#### VII.4.2.1. Résultats

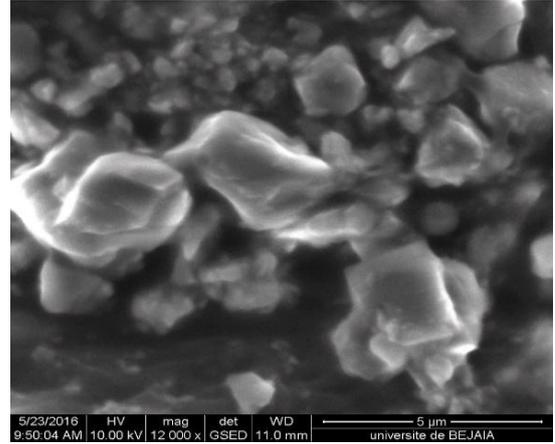
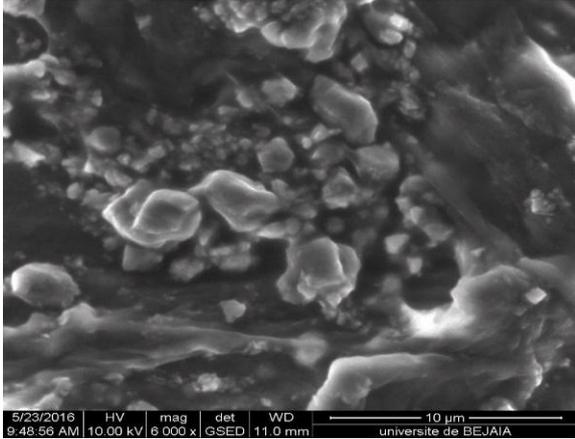
L'analyse par microscopie à balayage électronique des matières premières, placebo et solution liposomale optimale sont représentées en figure VII.12.



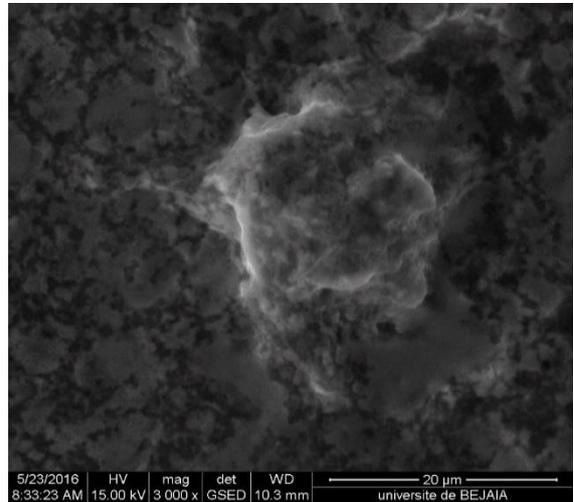
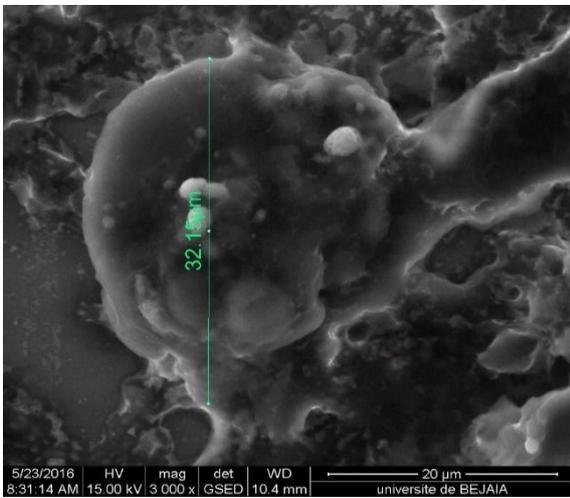
#### -Cholestérol-



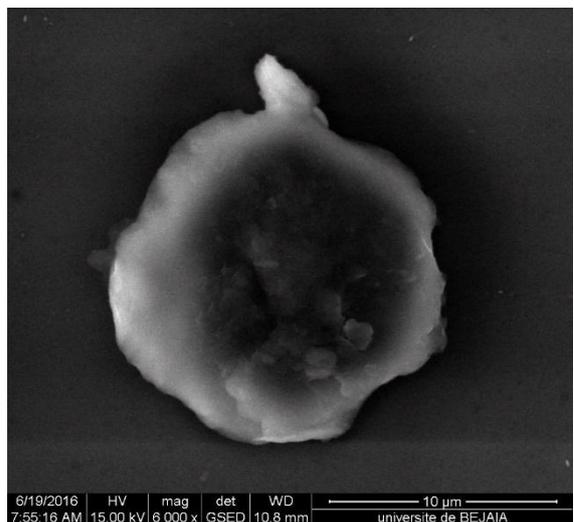
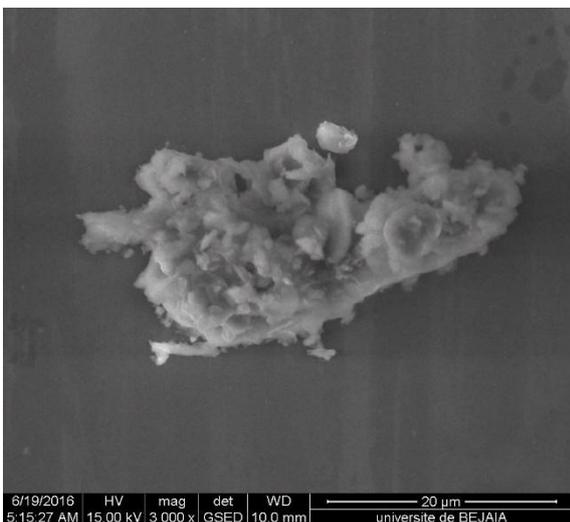
**-Phospholipide-**



**-Vitamine E -**



**-Placébo-**



**-Liposomes tris-**

**-liposome tampon-**

**Figure VII.12.** Micrographies par MEB des matières premières, placebo et solutions liposomale.

#### **VII.4.2.2 Observations**

- La micrographie du cholestérol montre une structure lisse sous formes bâtonnées.
- La micrographie des phospholipides montre des agrégats de surface assez lisse.
- La vitamine E est sous forme de cristaux de taille assez variable.
- Le placebo montre une forme pseudo-sphériques par contre la solution liposomale présente une forme sphérique de surface assez lisse ressemblant fortement à celle des phospholipides.
- La micrographie du liposome préparé avec le tampon tris montre une forme non régulière.

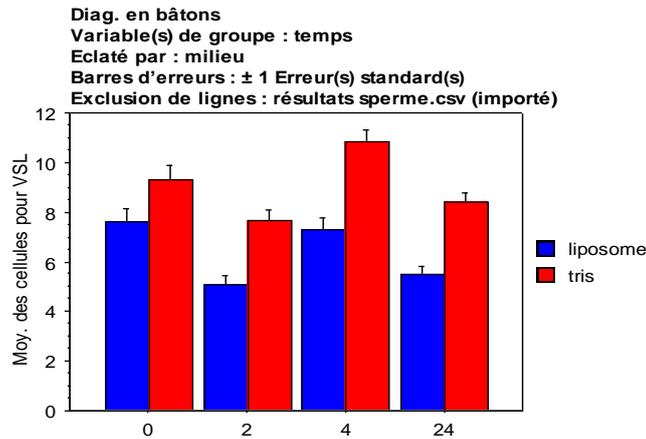
#### **VII.4.2.3. Interprétations**

L'obtention de la forme sphérique est un indicateur de la formation des liposomes. De plus la ressemblance de la texture de la paroi des liposomes avec la texture du phospholipide vient appuyer et fortifier l'hypothèse de la formation de liposome [158].

La forme non régulière des liposomes préparés avec le tampon tris prouve la non formation des liposomes. De plus la taille ainsi que la forme non régulière des liposomes, est probablement dû au fait d'avoir pris les micrographies sur l'échantillon tel quel, car dans la littérature il est souvent préconisé d'effectuer une lyophilisation en amont de ce type d'analyse [159].

### **VII.5. Etude de l'impact des solutions liposomales sur la conservation des spermatozoïdes bovin**

L'analyse informatisée du mouvement des spermatozoïdes mobiles nous a donné le diagramme présenté en figure VII.13.



**Figure VII.13.** Diagramme en bâton des vitesses de trajectoire en ligne droite des SPZ en fonction des traitements.

### VII.5.1. Observations

Nous observons que les valeurs maximales de la VSL sont obtenues lors du traitement de la semence par le tampon tris ceci quel que soit le temps de conservation (réfrigération).

### VII.5.2. Interprétations

Au vu des résultats obtenus il est clair que la solution liposomale préparée avec le tampon tris n'a pas permis de former des liposomes de vit E, et donc n'a pas amélioré la solubilité de cette dernière. Par conséquent la vitamine n'a pas pu exprimer son pouvoir d'antioxydant qui aide à la préservation et la protection des SPZ durant leur réfrigération.

# Conclusion générale

## CONCLUSION

Lors de cette étude, nous nous sommes fixés comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme bovin. Ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E en milieu aqueux. Pour cela, Nous nous sommes intéressés à un vecteur particulier, le liposome.

Pour atteindre le but fixé, une démarche méthodologique fut adoptée, nécessitant le passage par un enchainement d'étapes aussi importantes les unes que les autres : l'élaboration d'un plan d'expérience permettant l'étude des paramètres influents sur le taux d'encapsulation ainsi que la taille des liposomes, la détermination, la validation, la préparation et la caractérisation d'une solution liposomale.

Les solutions liposomales obtenues ont été préparées par la méthode de Co-évaporation, par suite nous les avons caractérisées par la **chromatographie liquide à haute pression (HPLC)** qui a été l'un des points forts dans notre partie expérimentale, en effet cette méthode nous a permis d'étudier le taux d'encapsulation, nous avons aussi utilisé la **microscopie à balayage électronique (MEB)** qui nous a permis de confirmer la formation des liposomes.

Dans ce travail, nous avons pu montrer que les meilleurs liposomes en termes de taux d'encapsulation de la vitamine E (79 %) et de taille (99 nm) furent obtenus pour les conditions suivantes : 162 mg phospholipide, 25.5 mg cholestérol et 2 mg /ml vitamine E.

Après avoir déterminé et préparé la solution liposomale optimale, nous l'avons utilisé pour réfrigérer du sperme bovin, cela fut un échec, ce dernier est probablement dû au milieu de dilution utilisé : le tampon tris, qui dénature et déstabilise les solutions liposomales préparées.

Il serait intéressant de compléter cette étude par :

- Des caractérisations plus poussées de la solution liposomale optimale lyophilisée (ATG, DSC, DRX et IR).
- Un élargissement de l'intervalle d'étude de la matrice d'expérience.
- Penser à coupler la vitamine E à la vitamine C qui est connue pour être une molécule qui augmente le potentiel de la vitamine E.

# Références Bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bangham A.D., Standish M.M, Watkins J.C: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* p : 238-252, 1965.
- [2] P.Therond, J.Auger, A.Legrand and P.Jouannet:  $\alpha$ -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction* vol.2 p : 739-744, 1996.
- [3] J. Jacques Matte, Ph. D, Lennoxville Isabelle Audet M. Sc et Lennoxville Jean-Paul Laforest Ph. D, France, Octobre 2001.
- [4] A. Iborra, M. Companyo, P. Martinez et A. Morros : Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa, *Biology of reproduction*, Spain, 2000.
- [5] Verumi S, Rhodes C.T: preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* , 1995.
- [6] Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J.C.Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1966.
- [7] Edwards K.A. et Baeumner A.J:Analysis of liposomes, *Talanta*, 2006
- [8] S.Ghanbarzadeh, A. Khorrami, S. Arami, *J. Pharm. Investig*, 44 33-39, 2014.
- [9] 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.
- [10] Learn and Live. American Heart Association, Inc, 2006.
- [11] Reversed-Phase HPLC Determination of Cholesterol in Food Items.
- [12] Liang, X., G. Mao, and K.Y.S. Ng: Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, p: 53-62, 2004.
- [13] Liu, D.-Z et al. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids Surf. A.*, p: 57-67, 2000.
- [14] Mezei, M. and V. Gulasekharam: Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.*, P: 1473-7, 1980.
- [15] Mezei, M. and V. Gulasekharam: Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1982.
- [16] aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques (Eds. : Elsevier), 1993.
- [17] Machy, P.; Leserman, L: *les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie*, Edition inserm, 1987.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [18] Viniegra, S.; Franco, J.; Cortes, E.: Incorporation of bovine thyroide peroxydase in liposomes. *Int. J. Biochem*, 16, 1167-1170, 1984.
- [19] Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isac, T: Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence; polarisation and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 311, 330-348, 1973.
- [20] New R.R.C., *Liposomes - A practical approach*. Ed. Rickwood D., Hames B.M, 1990.
- [21] New York: IRL Press, Oxford University Press.
- [22] Kirby C. and Gregoriadis G. "Liposomes". *The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Ed E Mathiowitz, 1999.
- [23] Puisieux F. Les liposomes. *Annales pharmaceutiques français* 41 N°1:3-13,1983.
- [24] Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G: Influence of surface hydrophobicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation : Studies with poly (ethylene glycol)-coated vesicles.*Biochimica et Biophysica*.
- [25] Srinath P. Diwan P.V Stealth liposomes, an overview. *Indian Journal of Pharmacology* 26 179-184, 1994.
- [26] Barbet J. Immunoliposomes. In: *Liposome. New systems and new trend in their applications*; Puisieux F, Couvreur P. Delattre J, Devissaguet J-P Editions de santé 159- 191, 1995.
- [27] In Vyas, S.P., Khar, R.K. Eds: *Targeted and controlled drug delivery: Novel carrier systems*. CBS publishers; 173- 248, 2002.
- [28] Vemuri, S., Rhodes, C.T: Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*; 70: 95-111, 1995.
- [29] Lu D, Hickey AJ. Liposomal Dry Powders as Aerosols for Pulmonary Delivery of Proteins. *AAPS PharmSciTech*; 6(4), 2005.
- [30] Rogers JA, Anderson KE, The potential of liposomes in oral drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1998.
- [31] Szoka, F., Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng*; 9: 467-508, 1980.
- [32] Cevc, G. and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim/ Biophys. Acta*, 1104(1), p: 226-32, 1992.
- [33] Liu, D.-Z., *et al.*, Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids Surf. A*, 172(1-3), p: 57-67, 2000.
- [34] Dragicevic-Curic, N., *et al.*, Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: *In vitro* skin penetration studies and stability. *Int. J. Pharm.*, 384(1-2): p. 100-108, 2010.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [35] Dragicevic-Curic, N., *et al.*, Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: *In vitro* skin penetration studies and stability. *Int. J. Pharm.*, 384(1-2): p. 100-108.SP; 2010. Non-Ionic Surfactant Based Vesicles Niosomes) in Drug Delivery. *Int J Pharm*; 172: 33-70, 1998.
- [36] Uchegbua IF, Vyas SP. Non-Ionic Surfactant Based Vesicles Niosomes in Drug Delivery. *Int J Pharm*; 172, P: 33-70, 1998.
- [37] Bangham A D, Horne R W, Glauert A M, Dingle J T, Lucy J A. Action of saponin on biological cell membranes, *Nature*, 196, 952-955, 1962.
- [38] Horne R W, Bangham A D, Whittaker VP. Negatively Stained Lipoprotein Membranes, *Nature*, 200(4913), 1340, 1963.
- [39] Szoka F.C , Jacobson K , Papahadjopoulos D. The use of aqueous markers to determine the mechanism of interaction between phospholipid vesicles and cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 511, P: 295- 303,1989.
- [40] Lipowsky R, Sackmann E: Lasic D.D Applications of liposomes, in : *Handbook of Biological physics*, chapitre 10, P: 491-519,1995.
- [41] Papahadjopoulos, D., Nir, S., Ohki, S. Permeability properties of phospholipid membranes: Effect of cholesterol and temperature. *Biochim Biophys Acta*; 266: 561-83, 1971.
- [42] 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.
- [43] Deamer D. Bangham A.D. Large volume liposomes by an ether vaporisation method. *Biochimica and Biophysica Acta* 443, P: 629-634,1976.
- [44] El Maghraby, G.M. and A.C. Williams, Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. *Expert Opin. Drug Deliv* ; 6(2), p : 149-63, 2009.
- [45] Marie Mouglin-Degraef, *Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie*, thèse de doctorat, Avril 2004.
- [46] Silvander M, Johnsson M, Edwards's k. Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine / cholesterol liposomes in buffer and in human serum. *Cheemistry and Physic of lipids* 97:15-26, 1998.
- [47] 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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [48] Mayer L.D., Bally M.B., Cullis P.R. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient, *Biochimica et Biophysica Acta* 857, P: 123-126, 1986.
- [49] Bender D.A: Nutritional biochemistry of the vitamins. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- [50] Anders Bjorneboe, Gjøenn- Elina. Bjorneboe and Christian A. Drevon: Transport and Distribution of Vitamin E. Critical Review. Journal of nutrition. National Institute of Forensic Toxicology and Institute for Nutrition Research, University of Oslo. Norway, 2012.
- [51] Erlangung Der Würde eines: Diastereo selective synthesis of  $\alpha$ -tocopherol. These de Doctorat. Universität Basel, 2008.
- [52] Kevin Pehr, MD; R. Roy Forsey, MD, FRCPC: Why don't we use vitamin E in dermatology? Current review-actualités. Université Montréal, 1993.
- [53] Jean Texier : Les vitamines. Editions Jibena, p : 99 - 106, 1989.
- [54] Marie-Céline Kibangadi: Beta-carotène et vitamines A et E chez l'enfant. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie ; 7 janvier 1998.
- [55] 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.
- [56] Céline Chanforan : Stabilité de micro constituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechiométrique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2010.
- [57] 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.
- [58] Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse J.L .
- [59] Pauline Elisabeth Pidou : La vitamine E chez le cheval : Synthèse bibliographique. Thèse Doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. 2010.
- [60] Absorption Distribution Métabolisme Elimination du Médicament.
- [61] Hedhi Lassaad : Les antioxydants dans les aliments. Agence Universitaire de francophonie ; IPEIN de Nabeul TUNISIE.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [62] Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L. Nutrition, Département des Productions Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège B43, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.
- [63] DL-alpha-tocopherol, Products for the Dietary Supplement, Beverage and Food Industries Technical Information, 2005.
- [64] J.-D. Nadeau : La relation des vitamines a la nutrition animale. Canadian journal of comparative Médecine. Vol, 1943.
- [65] J Pincemail, JO Defraigne, M Meurisse, R Limet : Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. Medi-Sphere. MS 90, 1998.
- [66] Bonvehi J.S., Coll F.V., Rius I.A. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, p : 627-634, 2000.
- [67] Claude Bourgeois ; Les vitamines dans les industries agroalimentaires, Editions TEC & DOC, pages 11, 74, 86 à 90, 274 à 277, 636 à 656, 2003.
- [68] ADM Natural Health and Nutrition, P.O. Box 2 • 1540 AA Koogaan de Zaan. The Netherlands.
- [69] Tocopherol nicotinate, Official Monographs for part I, JP XIV.
- [70] Lareal. Vitamine E et tocophérols. Note scientifique N°1.
- [71] Pauline Elisabeth Pidou : La vitamine E chez le cheval : Synthèse bibliographique. Thèse Doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 2010.
- [72] [Rosset R., Cande M., Jardy A., Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson, Paris, 1991.
- [73] 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.
- [74] Albessard, E; Mayzaud, P; Cuzin-Roudy, J. Variation of lipid classes among organs of the Northern Krill *Meganyctiphanes norvegica*, with respect to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology-A Molecular and Integrative Physiology*, 129, 373, 390, 2001.
- [75] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (1978) Nomenclature of lipids *Biochem. J.*, **171**:21-35, 1976.
- [76] International Union of Biochemistry and Molecular Biology Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2<sup>e</sup> éd, *Portland Press*, éditée par C. Liébecq, 1992.
- [77] Réalisé en collaboration avec des professionnels de la santé et de la médecine, sous la direction du docteur Pierrick Hordé, 2014.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [78] Theodore Gobley, Sur la lécithine et la cérébrine, Journal de Pharmacie et de Chimie, vol. t20, p. 98-103, 161-166, 1874.
- [79] Silvander M, Johnsson M, Edwards K. Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol liposomes in buffer and in human serum. Chemistry and physics of lipids 97:15-26, 1998.
- [80] Barenholz Y, Gibbes D, Litman B.J, Goll T, Thompson T.E, Carlson R.D. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. Biochemistry 16: 2806-2810, 1977.
- [81] 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.
- [82] Koynova R, Caffrey M. 2002. An index of lipid phase diagrams. Chemistry and physics of lipids, Vov .115, P:107-219, 2002.
- [83] Israelachvili J. Intermolecular and surface forces. [Ed] academic press. Seconde édition. 1985. p 450. Dalattre J, Couvreur P, Puisieux F. Les liposomes : Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. [Éd] Inserm p : 257, 1993.
- [84] Delattre J., Couvreur P., Puisieux F. 1993. Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. [Ed.] Inserm, p: 257, 1993.
- [85] Learn and Live. American Heart Association, Inc, 2006
- [86] Reversed-Phase HPLC Determination of Cholesterol in Food Items.
- [87] Henri Pacheco, le cholestérol 2ème édition, presses universitaires de France, 1969.
- [88] Aurelien Pommier. Rôle du cholestérol et des récepteurs nucléaires LXRs dans le cancer de la prostate. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010.
- [89] Université Pierre et Marie Curie Lipides et lipoprotéines Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie Métabolique et Régulations, 2003.
- [90] Senior I, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoradis G. influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation studies with poly(biochimica et biophysica acta 1062:77-82; 1991.
- [91] Jain, M. K.: Role of cholesterol in biomembranes and related systems. Curr. Top. Membr. Transp, 6, 1-57, 1975.
- [92] Szoka, F.; Papahadjopoulos, D.: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Ann. Rev. Biophys. Bioeng, 9, 467-508, 1980.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [93] Gregoriadis, G., Senior, J.: The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from circulation. *FEBS Lett*, 119, 43-46, 1980.
- [94] Senior, J.; Gregoriadis, G.: Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol component. *Life Sci*, 30, 2123-2136, 1982.
- [95] Chakrabarty, J, Banerjee, D, Pal, D, De, J, Ghosh, A & Majumder, G C Shedding of specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54 27-35, 2007.
- [96] Amann, R P & Pickett, B W Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7 145-73, 1987.
- [97] Mazur, P freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 C125-42, 1984.
- [98] Darin-Bennett, A & White, I G Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14 466-70, 1977.
- [99] Drobnis, E Z, Crowe, L M, Berger, T, Anchordoguy, T J, Overstreet, J W & Crowe, J H Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265 432-7, 1993.
- [100] Glazar, A I, Mullen, S F, Liu, J, Benson, J D, Critser, J K, Squires, E L & Graham, J K Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59 201-6, 2009.
- [101] Girobe C et Czyba JC, biologie de la reproduction. 2eme édit. Lyon Simep 109-110, 1997.
- [102] Clos et Muller, la reproduction gestation lactation et contrôle de la reproduction Nathan université, 1998.
- [103] Boccon L, Gibon et Lansac J. Pathologie chirurgicale, tome IV, chirurgie urologique et gynécologique Edi : paris : Masson P : 164, 1992.
- [104] Vaissaire JP. Secchi J. Hunt A. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Maloine Paris 81-389, 1991.
- [105] Mariem Chalbi, Rôle de la protéine spermatique Izumo1 dans l'interaction gamétique chez le murin Biophysique Ecole doctorale Interdisciplinaire pour le vivant (iViv / ED387).
- [106] Knobil, E., Neill, J ; Tainturier, D ; Bencharif, L ; Briand, E. Topie1 et A.R. Kamga-Waladjo Sénégal, 1988.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [107] D.Tainturier, D. Bencharif, L. Briand Tainturier, D. Bencharif, L. Briand and E.Topie, Biotechnologie et Pathologie de la Reproduction, ONIRIS Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, Atanpôle - La Chantrerie, France 2. Service de chirurgie Reproduction, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar, Sénégal.
- [108] Haskouri, H : gestation de la reproduction chez la vache : insémination artificielle et détection des chaleurs. Maroc, 2001.
- [109] Duclos P, Evaluation de la fonction reproductrice du taureau. Point vét, 35 (242) 26-30, 2004.
- [110] Watson PF. Recent Developement and Concepts in the cryoprervation of the spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 891, 1995.
- [111] Forman D.P, Kirby J.D: Sperm mobility: phenotype in rooster (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of reproduction* 72, 562-567, 2005.
- [112] Froman, DP et AJ Feltman: Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Repro.* 58:379-384 , 1998.
- [113] Elisabeth Blesbois, François Dubos, Isabelle Grasseau, Marie-Madeleine Richard, Yannick Roman, Michel Saint-Jalme, François Seigneurin : Recherche d'indicateurs d'aptitude à la congélation de la semence chez les oiseaux et mise au point de la cryopréservation du sperme de jars landais. *Les Actes du BRG*, 6 415-431P:200.
- [114] England G. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47: 243-255, 1993.
- [115] England G and Plummer J. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47:261-270; 1993.
- [116] Polge C; Smith A.V. et Parhes A.S, Revival spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature, *Nature*, 164: 666, 1949.
- [117] Linde – Forsberg C; Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medecine and Surgery*, 10, 48- 58, 1995.
- [118] Sirivaidyapong S., Ursem P., Bevers M. et Colenbrander B: Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57 (suppl), 383-386, 2001.
- [119] Katilat T, Combes GB, Atilat T, Varner DD, Blanchard TL. Comparaison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. 48 (7) 1085, 1997.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [120] Rota A, Martini M., Milani C and Romagnoli S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction, Nutrition and Development*, 45, 29-37, 2005.
- [121] Levillain N. Essai d'optimisation de la conservation de la semence équine par réfrigération : étude comparative de deux protocoles de réfrigération à 15°C et 5°C, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, p: 53, 83, 2005.
- [122] Okanot T, Muraset T, Asano M and TSUBOTA T. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 1359-1364, 2004.
- [123] Veyer E : Congélation de semence dans l'espèce canine : effet de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation. Thèse Méd. Vét. Lyon, n°103, p 63, 2002.
- [124] Linde-Forsberg C: Fertility data from controlled artificial inseminations in the dog. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Oslo. P 120, 2000.
- [125] Nothling J. et Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63, 1469-1480, 2005.
- [126] Pena A et Linde-Forsberg C: Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 859-875, 2000.
- [127] Pena A, Johannisson A et Linde-Forsberg C : Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57 (suppl), 371-376, 2001.
- [128] Leblanc B : Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse Méd. Vet, Alfort, n°102, p 55, 2004.
- [129] Bouchard G, Moris J, Sikes J et Youngquist R: Effect of storage, temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa mobility. *Theriogenology*, 34, 147-157, 1990.
- [130] Yvon Guérin, Yann Locatelli, Pierre Comizolli, Robert Mauget, Pascal Mermillod E, Xavier Legendre, Jean-Luc Gatti et Jean-Louis Dacheux : *Physiologie de la reproduction et des comportements*, UMR CNRS – Université de Tours - INRA, 37380 Nouzilly, France.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Parc de la Haute Touche, MNHN, 36290 Obterre, France. Conservation des Espèces Animales, Parc Zoologique, MNHN, 75012 Paris, France .

[131] Bue P, Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Médecin vétérinaire, Nantes, n°127, p:81.

[132] Ponglowhapan S, Essen-Gustavsson B et Linde-Forsberg C :Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62, 1498-1517, 2004.

[133] Hermansson U, Linde-Forsberg et C: Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65, 584-593, 2006.

[134] Magistrini. M : linsemination artificielle chez les équins. INRA. Haras. Pp 347-349, 1999.

[135] Kumi-Diaka J et Badtram G: Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*, 41, 1355-1366, 1994.

[136] Versteegen J, Onclin K. et Iguer-Ouada M: Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64, 720-733, 2005.

[137] Rota A, Pena A, Linde-Forsberg C et Rodriguez-Martinez H: In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*, 57, 199-215, 1999.

[138] J. Jacquesmatte Ph. D, agronome, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Lennoxville. Isabelle Audet M. Sc, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Lennoxville Jean-Paul Laforest Ph. D., agronome, Université Laval Guy-Pierre Martineau Vétérinaire, École vétérinaire de Toulouse, France Porc Québec, Octobre 2001.

[139] Miranda-Vilela AL, Alves PC, Akimoto AK, Pereira LC, Nazaré Klautau-Guimarães M et Grisolia CK. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on leukocytes depends on age and physical training in healthy human subjects carrying the same genotypes of antioxidant enzymes' gene polymorphisms. *Am J Hum Biol*, 2010.

[140] Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G: Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet*, 2013.

[141] Hazout A, Menezo Y, Madelenat P, Yazbeck C, Selva J, Cohen- Bacrie P. Causes and clinical implications of sperm DNA damages. *Gynecol Obstet Fertil*, 2008.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [142] Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl*, 2011.
- [143] Bangham, A. D., Standish, M.M., and Watkins, J.C: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* 13, 238-252, 1965.
- [144] Israelachvili, J. N. and Mitchell, D. J: A model for the packing of lipids in bilayer membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 389(1): 13-19, 1975.
- [145] Berger, N. Sachse, A. Bender, J. Schubert, R. and Brandl, M: Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics, *International Journal of Pharmaceutics* 223(1–2): 55-68, 2001.
- [146] Kant Shashi, Kumar Satinder and Prashar Bharat: A complete review on: liposomes. Department of Pharmaceutical Sciences, Manav Bharti University, Solan (H.P) India; 2012.
- [147] Amarnath Sharma, Uma S. Sharma: Liposomes in drug delivery: progress and limitations, Department of Experimental Therapeutics, Roswell Park Cancer Institute, and Department of Pharmaceutics, SUN Y at Buffalo, Buffalo, NY, USA; 1997.
- [148] Yiyin Chena, Le Van Minha,e, Jianwen Liua, Borislav Angelovb, Markus Drechslerc, Vasil M. Garamusd, Regine Willumeit-Romerd, Aihua Zoua : Baicalin loaded in folate-PEG modified liposomes for enhanced stability and tumor targeting ; 2015.
- [149] Loveleenpreet Kaur<sup>1</sup>, Prabhjot Kaur and MU. Khan: Liposome as a drug carrier. Department of pharmaceutics, Sri Sai College of Pharmacy, Badhani, Pathankot, Punjab,Chandigarh, India ; 2013.
- [150] Sandeep Kalepu, Sunilkumar K, Tsudheer Betha and Mohanvarma M : Liposomal drug delivery system, Department of Pharmaceutical Technology, Shri Vishnu College of Pharmacy, Bhimavaram, Andhra Pradesh, India.2013.
- [151] Mansoori M. A., Agrawal S., Jawade S., Khan M. I. Swami Vivekanand : A review on liposome . College of Pharmacy, Indore-452020, India, 2012.
- [152] Abdallah Laouini: Vitamin E encapsulation within pharmaceutical drug carriers prepared using membrane contactors; 2015.
- [153] Sarvesh Kumar Pathak, Roli Mishra, Sapan Kumar, Gyan Prakashe et Dr. R. Parthasarthy B.Pharm : Effect of cholesterol concentration on size of liposome, India, 2012.
- [154] Sorafenib and gadolinium co-loaded liposomes for drug delivery and MRI-guided HCC treatmentYanan Xiaoa, Yongjun Liua, Shaomei Yanga, Bo Zhanga, Tianqi Wanga, Dandan Jianga,Jing Zhanga, Dexin Yub, Na Zhanga, a School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan, People’s Republic of ChinabDepartment of Radiology Medicine, Affiliated Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, People’s Republic of Chinaa ; 2016.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [155] Harasym, D Masin, MB Bally and LD Mayer: Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models MS Webb; 1995.
- [156] Saraswathi Marripati, K. Umasankar, P. Jayachandra Reddy:A review on liposomes; Department of Pharmaceutics, Krishna Teja Pharmacy College, Chadalawada Nagar, Tirupathi, Andra Pradesh, India ; 2014.
- [157] Pharmacopée européenne sixième édition, Strasbourg,2007.
- [158] Behnoush Maherania, Elmira Arab-Tehranya, Azadeh Kheirilomomb, Franck Cleymandc, Michel Lindera, Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine, 2012.
- [159] Magdalini Rovoli<sup>1</sup>, Olga Gortzi, Stavros Lalas, and George Kontopidis<sup>1, b</sup> Lactoglobulin improves liposome's encapsulation properties for vitamin E delivery, 2013.
- [160] Vivier Stéphane, stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis. Ecole centrale de Lille.
- [161] Goupy Jacques «Introduction aux Plans d'expériences». Dunod. Paris. P: 303, 2001.

# Annexes

## 1. Introduction

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt,  $y$ , et des variables,  $x_i$ .

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur [160].

Dans notre expérience nous avons choisi de travailler avec un plan factoriel dans le but :

- d'arriver rapidement aux meilleurs résultats possibles,
- d'éviter de réaliser des expériences inutiles,
- d'obtenir la meilleure précision possible sur les résultats,
- de permettre d'avancer à coup sûr,
- d'établir la modélisation du phénomène étudié,
- de découvrir la solution optimale.

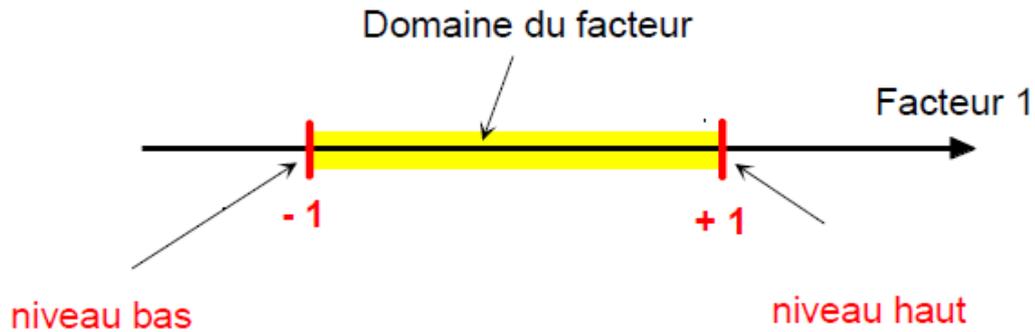
## 2. Choix de la méthode d'expérimentation

La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats. Elle doit également minimiser le nombre des essais sans toutefois sacrifier la qualité.

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais. On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent un coût minimum [161].

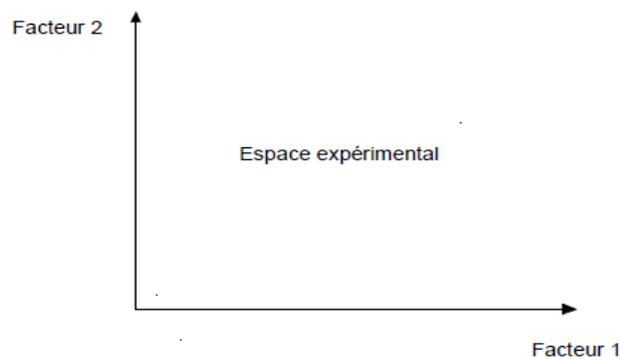
## 3. Notion d'espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la **réponse**, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme «variable» on utilisera **facteur**. La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 1). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée **niveau**. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.



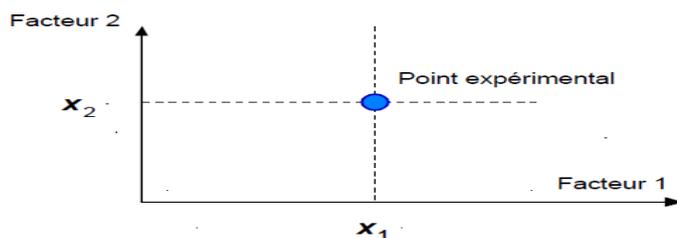
**Figure 1** : Représentation du domaine de facteur, le niveau bas du facteur est noté par - 1 et le niveau haut par +1.

Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut. L'ensemble de toutes ces valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le **domaine** du facteur. Nous avons l'habitude de noter le niveau bas par  $-1$  et le niveau haut par  $+1$ . S'il y a un second facteur, il est représenté lui aussi par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé **l'espace expérimental** comme le montre la figure 2.



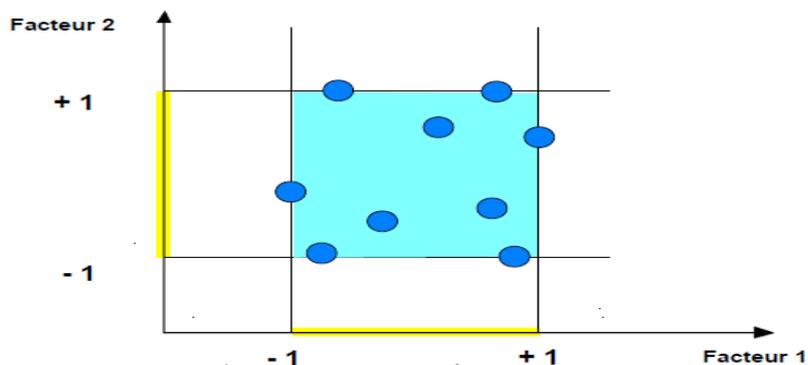
**Figure 2** : la représentation des facteurs par des axes gradués et orientés.

Le niveau  $x_1$  du facteur 1 et le niveau  $x_2$  du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental (Figure 3). Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de points expérimentaux.



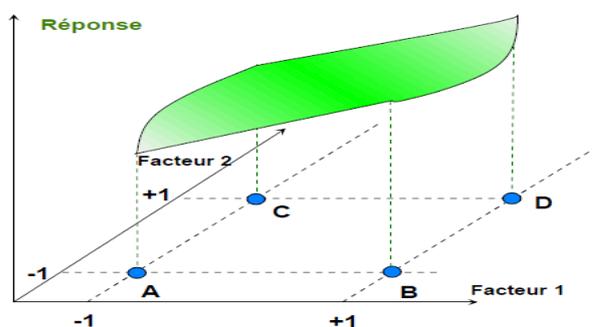
**Figure 3 :** La représentation des niveaux des facteurs par un point expérimental dans l'espace expérimental.

Le regroupement des domaines des facteurs définit le «**domaine d'étude**». Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude (Figure 4).



**Figure 4 :** La représentation du domaine d'étude défini par l'expérimentateur.

Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.



Cholestérol

**Figure 5 :** la représentation à trois dimensions de réponses associées aux points du domaine d'étude.

#### 4. Notion de modélisation mathématique

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme : Le modèle postulé des plans factoriels complets de deux facteurs est :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2$$

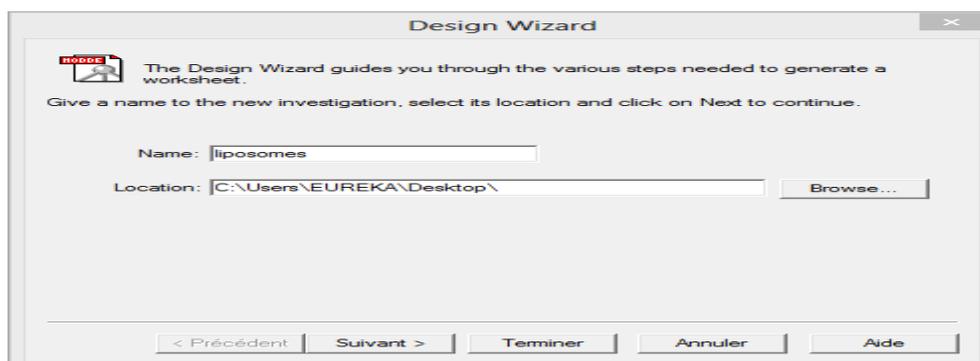
où :

- ✚ y est la réponse
- ✚  $x_1$  représente le niveau du facteur 1
- ✚  $x_2$  représente le niveau du facteur 2
- ✚  $x_1x_2$  est le produit des niveaux des facteurs 1 et 2
- ✚  $a_0$  est le coefficient constant du modèle
- ✚  $a_1$  est le coefficient du facteur 1
- ✚  $a_2$  est le coefficient du facteur 2
- ✚  $a_{12}$  est le coefficient du terme  $x_1x_2$

Ce modèle est appelé modèle polynomial du premier degré avec interactions. L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences.

#### V.5. Démarche de Plan factoriel par logiciel (MODD 6.0)

- Démarrez MODDE en cliquant sur l'icône du programme MODDE, Cliquez sur File puis New et l'assistant de conception s'ouvre.



- Donner à l'enquête un nom, et sélectionnez sa destination. Cliquez sur Terminer si vous souhaitez quitter l'assistant de conception et utiliser les menus de conception pour générer l'enquête.
- Pour avoir le guide de l'assistant, cliquez sur Suivant. La page de définition du facteur de l'assistant s'ouvre.

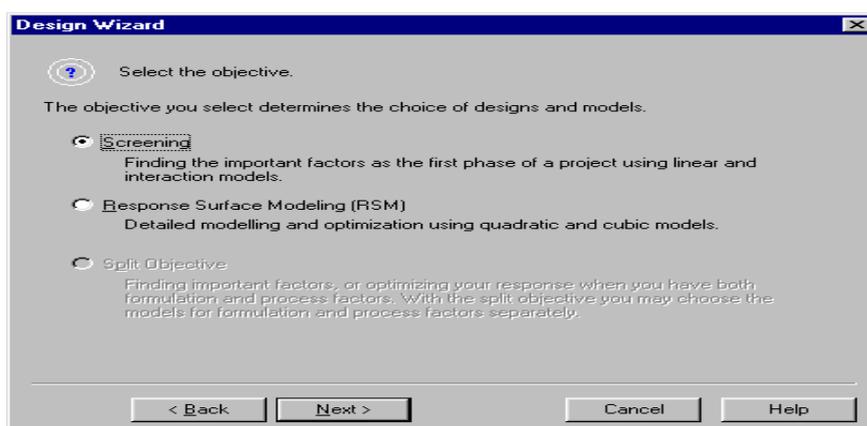
- Définir un facteur à la fois en donnant un nom, une abréviation, l'unité et les plages définies par des valeurs basses / hautes.



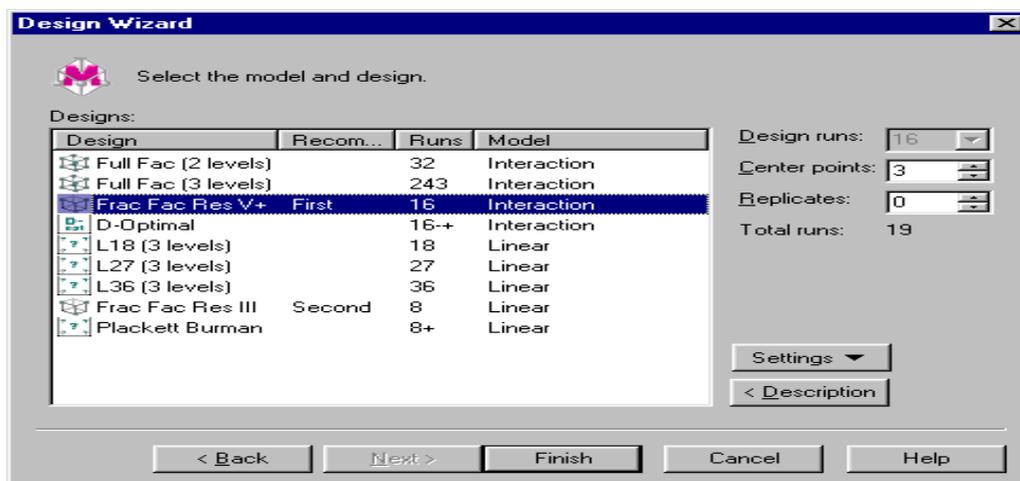
- Lorsque le dernier facteur est défini cliquez sur suivant pour terminer la définition du facteur.
- Cliquez sur Suivant pour ouvrir la page des réponses.



- Cliquez sur Suivant pour ouvrir la page Objectif.



- Les objectifs possibles sont nombreux, sélectionner celui qui vous intéresse et cliquez sur Suivant.



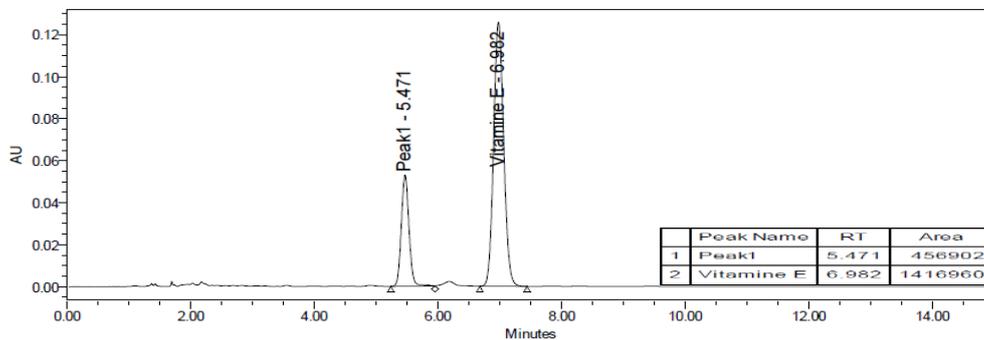
- Cliquez sur OK et la feuille de calcul (WS) est créé. Le WS est toujours affiché dans l'ordre standard. La randomisation (pour exécuter) est représentée dans une colonne spéciale. Dans le WS il y aura des colonnes vides pour les réponses.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	phospholipide	cholesterol	taux d'encapsulation	taille des liposomes
1	1	N1	2	Incl	10	1,5	81,9642	131
2	2	N2	5	Incl	30	1,5	3,7743	301000
3	3	N3	11	Incl	50	1,5	39,8494	40800
4	4	N4	3	Incl	10	5,75	55,6162	243
5	5	N5	9	Incl	30	5,75	35,868	28200
6	6	N6	7	Incl	50	5,75	41,0107	622
7	7	N7	8	Incl	10	10	62,4813	151
8	8	N8	6	Incl	30	10	40,5941	550
9	9	N9	4	Incl	50	10	19,3426	22400
10	10	N10	10	Incl	30	5,75	37,8346	61500
11	11	N11	1	Incl	30	5,75	37,8346	61500

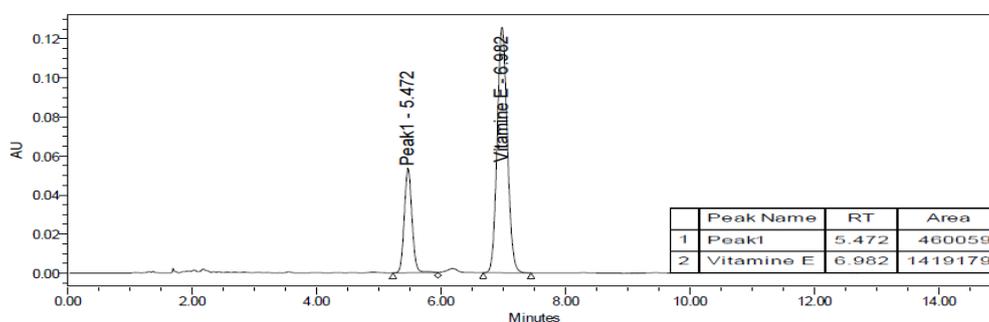
Vérifiez que le WS est correct et cliquez sur File puis Save enquête. L'enquête est maintenant enregistrée.

## ANNEXE 2

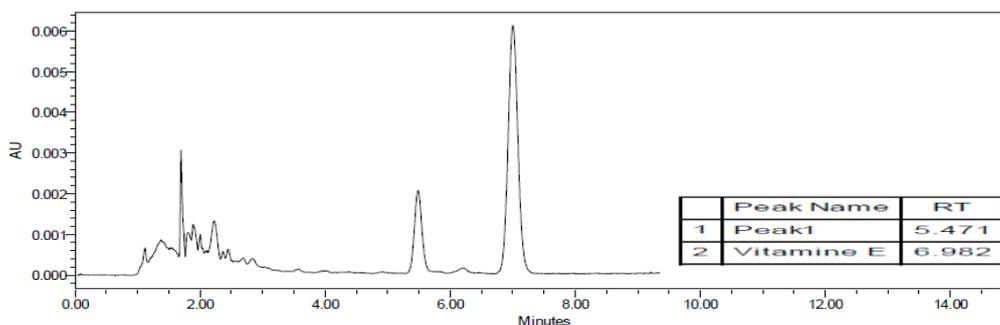
✓ Chromatogrammes des solutions liposomales (plan d'expérience).



Chromatogramme de la solution liposomale 1 (première injection).

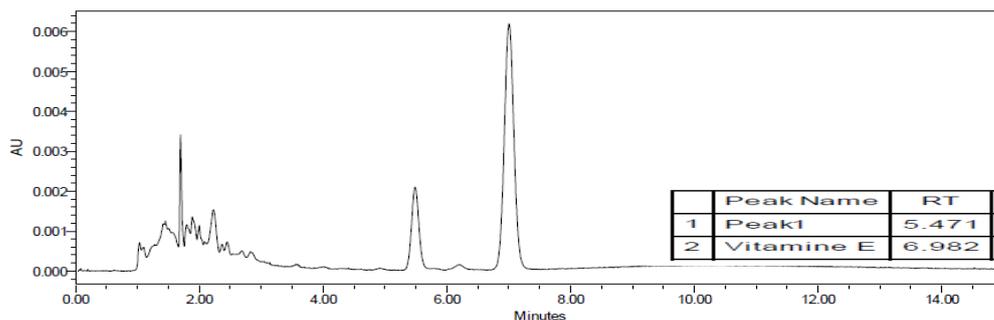


Chromatogramme de la solution liposomale 1 (deuxième injection).

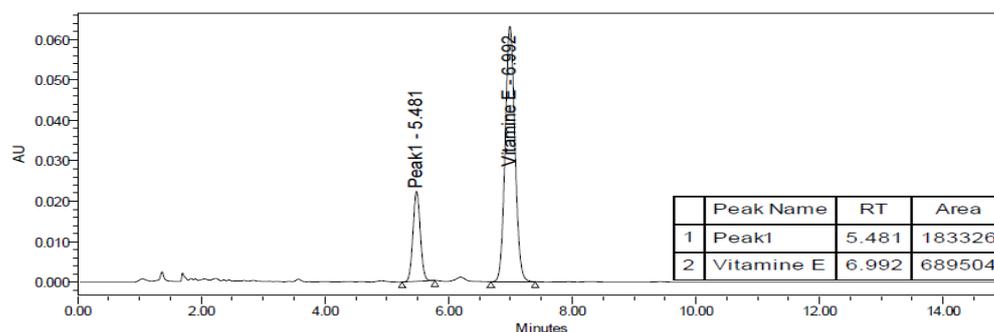


Chromatogramme de la solution liposomale 2 (première injection).

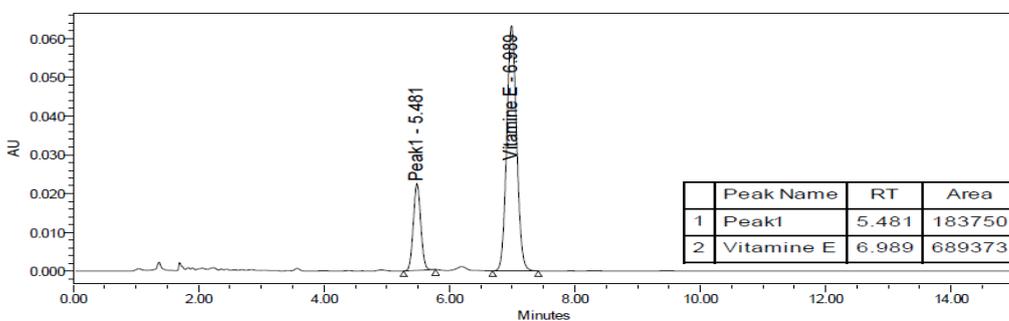
## ANNEXE 2



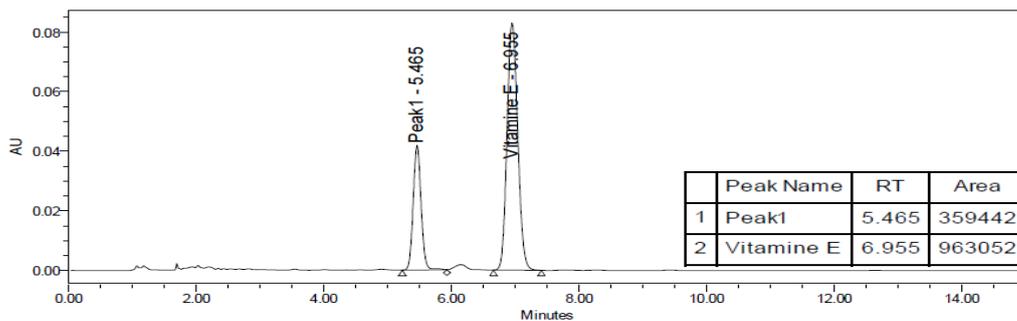
Chromatogramme de la solution liposomale 2 (deuxième injection).



Chromatogramme de la solution liposomale 3 (première injection).

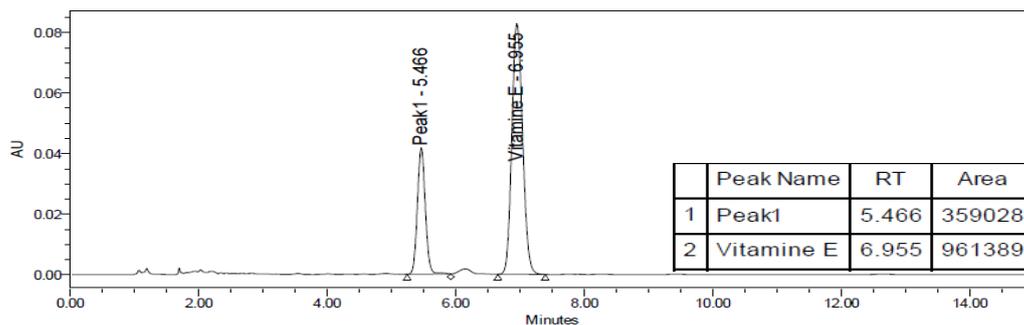


Chromatogramme de la solution liposomale 3 (deuxième injection).

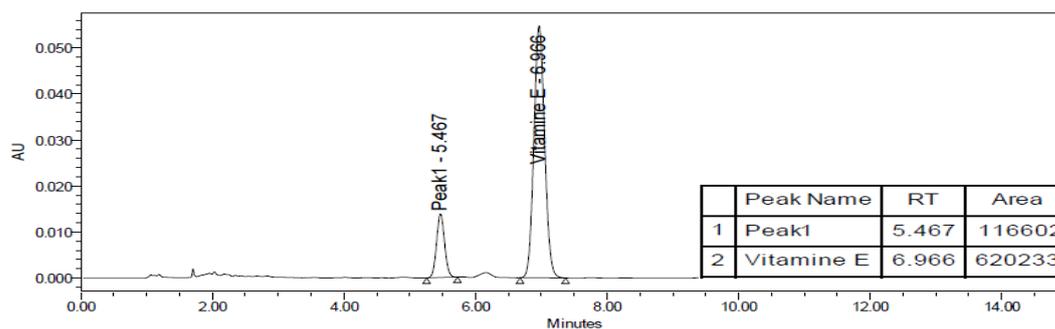


Chromatogramme de la solution liposomale 4 (première injection).

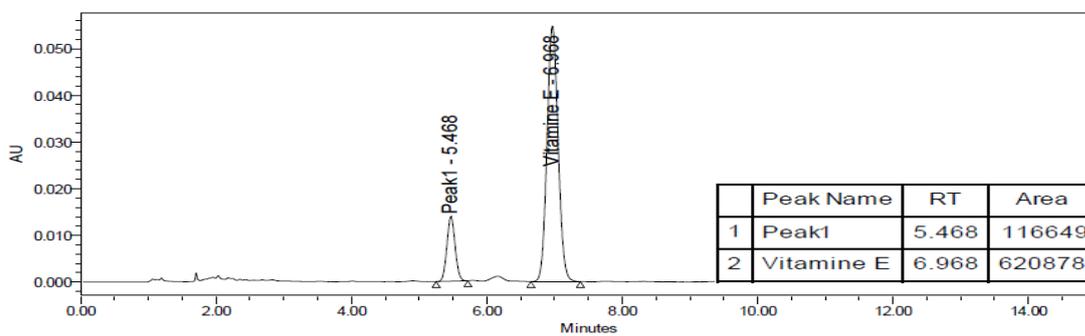
## ANNEXE 2



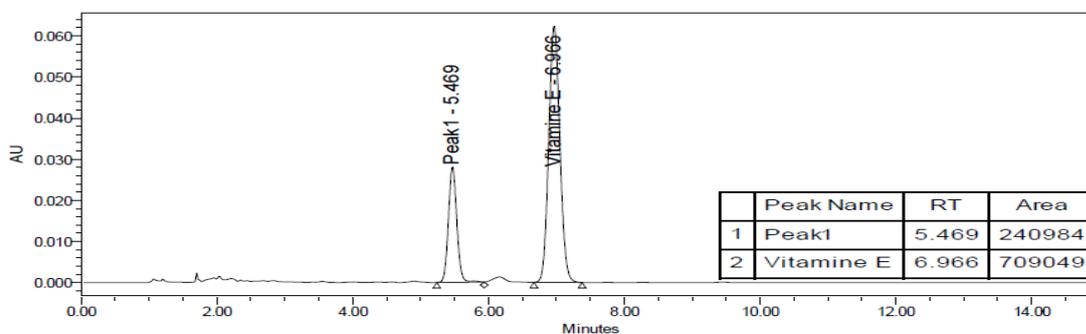
Chromatogramme de la solution liposomale 4 (deuxième injection).



Chromatogramme de la solution liposomale 5 (première injection).

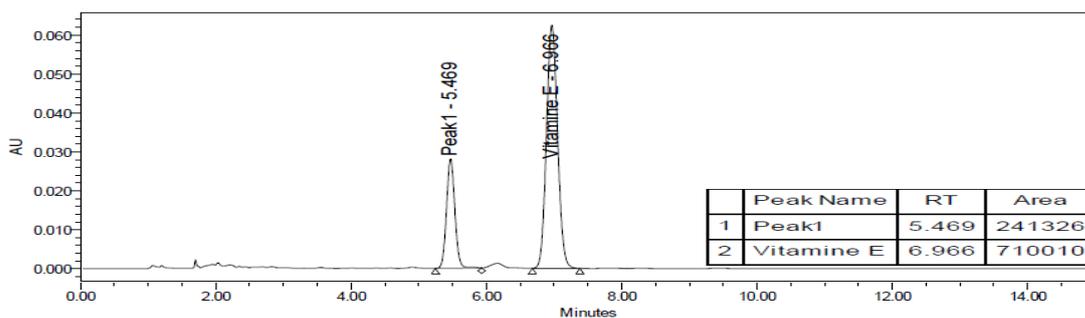


Chromatogramme de la solution liposomale 5 (deuxième injection).

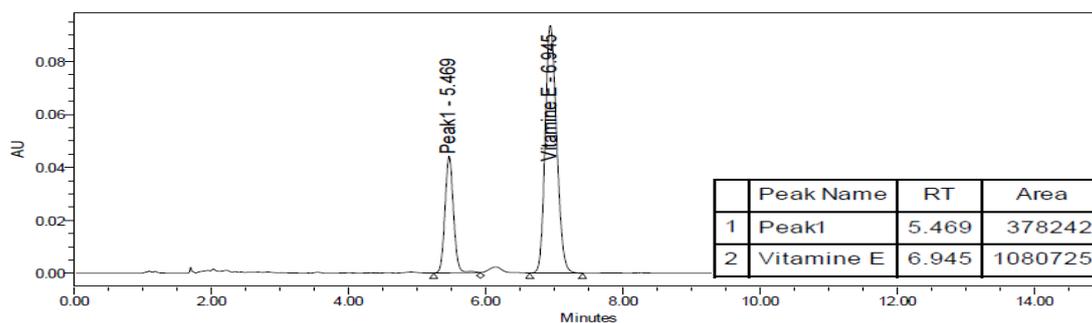


Chromatogramme de la solution liposomale 6 (première injection).

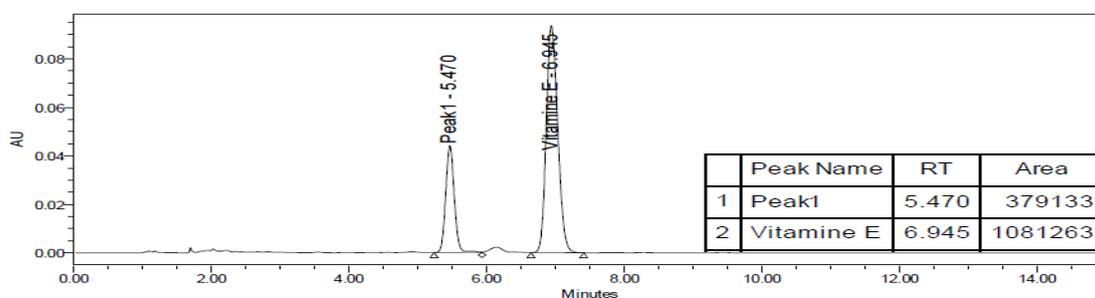
## ANNEXE 2



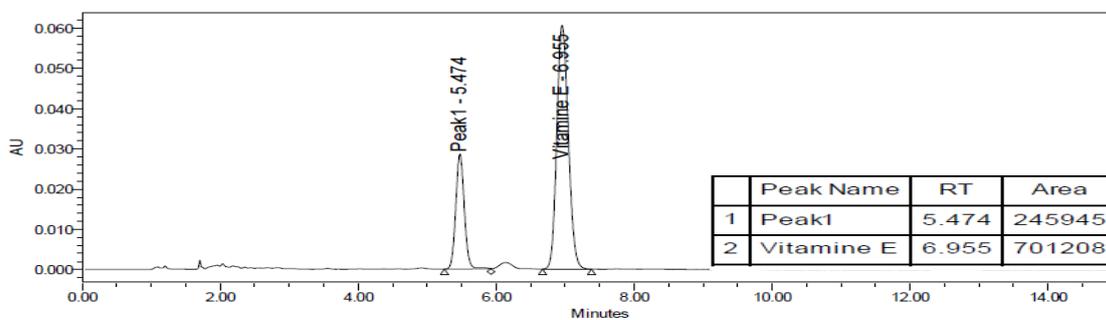
Chromatogramme de la solution liposomale 6 (deuxième injection).



Chromatogramme de la solution liposomale 7 (première injection).

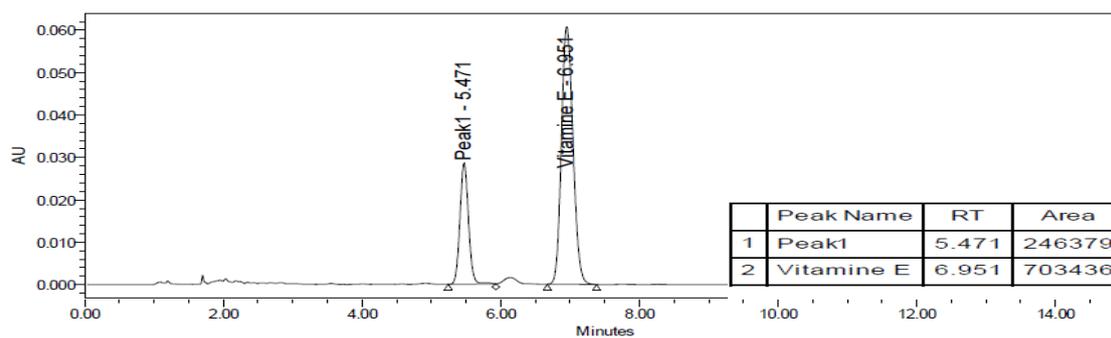


Chromatogramme de la solution liposomale 7 (deuxième injection).

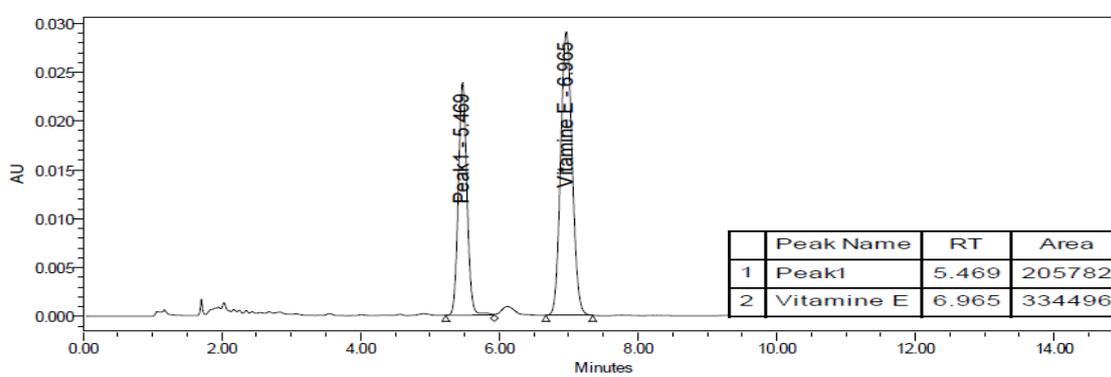


Chromatogramme de la solution liposomale 8 (première injection).

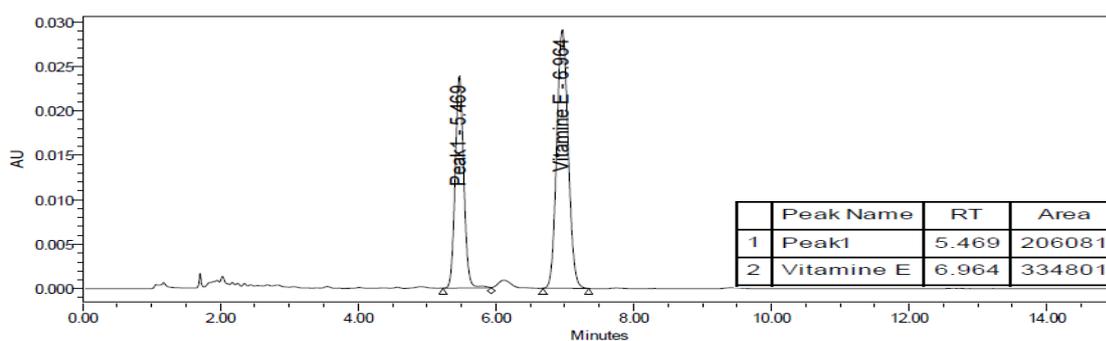
## ANNEXE 2



Chromatogramme de la solution liposomale 8 (deuxième injection).

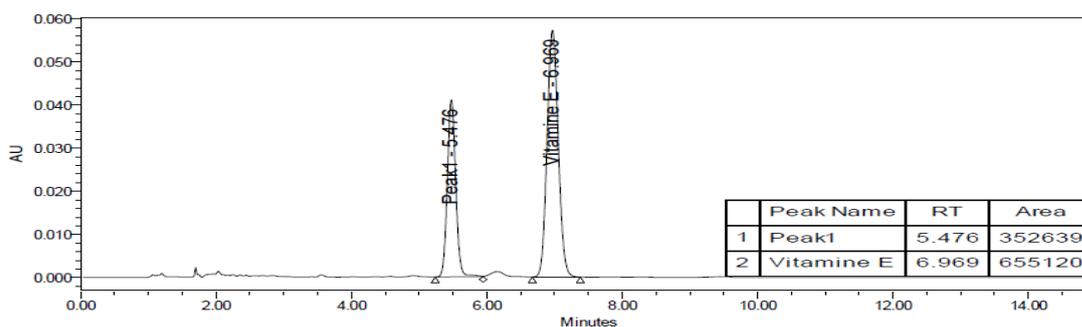


Chromatogramme de la solution liposomale 9 (première injection).

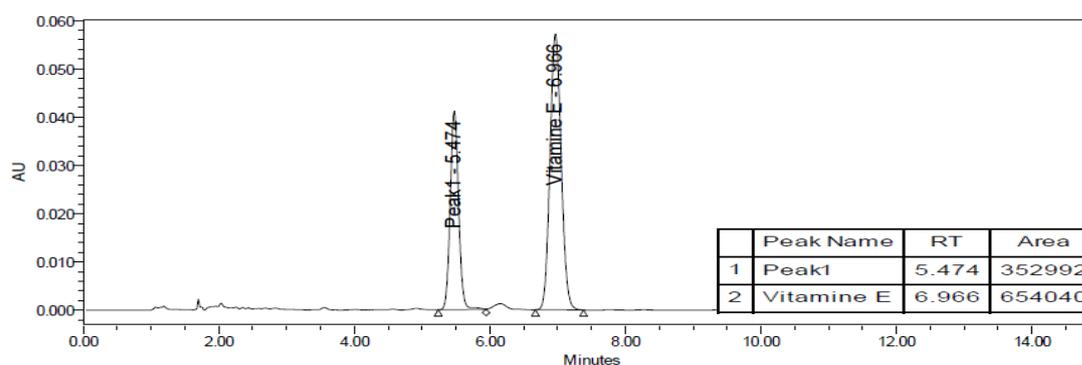


Chromatogramme de la solution liposomale 9 (deuxième injection).

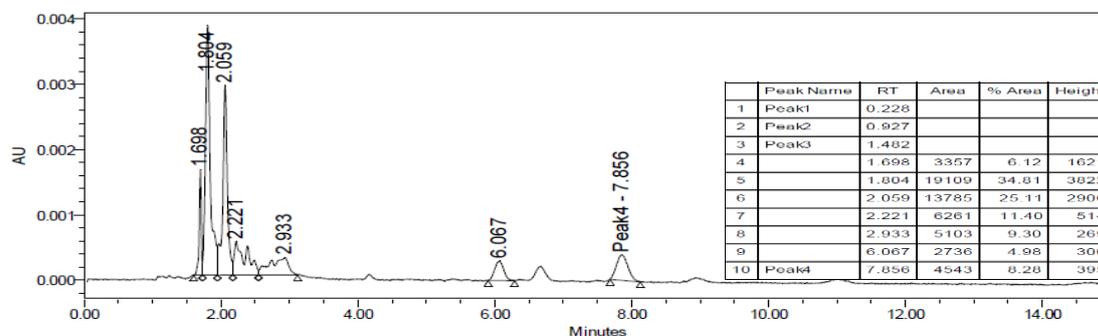
## ANNEXE 2



Chromatogramme de la solution liposomale 10 (première injection).

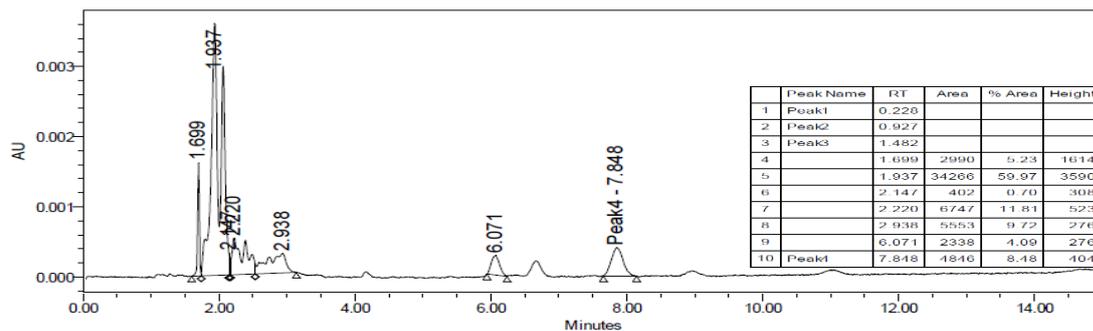


Chromatogramme de la solution liposomale 11 (deuxième injection).

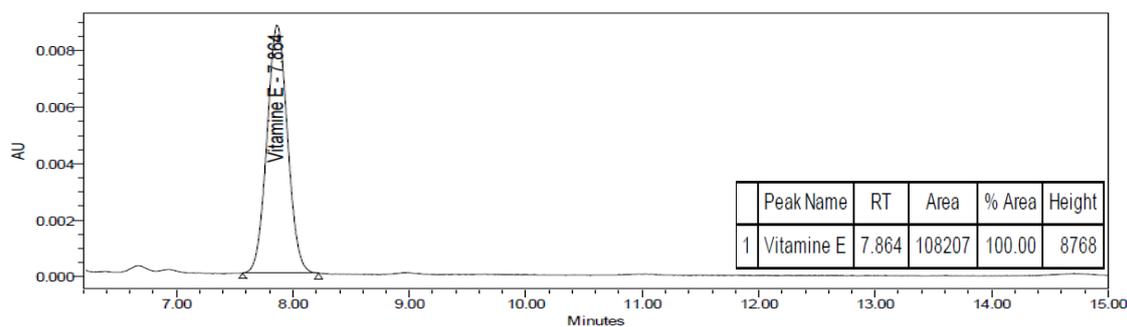


Chromatogramme de la solution liposomale placebo (le blanc) (première injection).

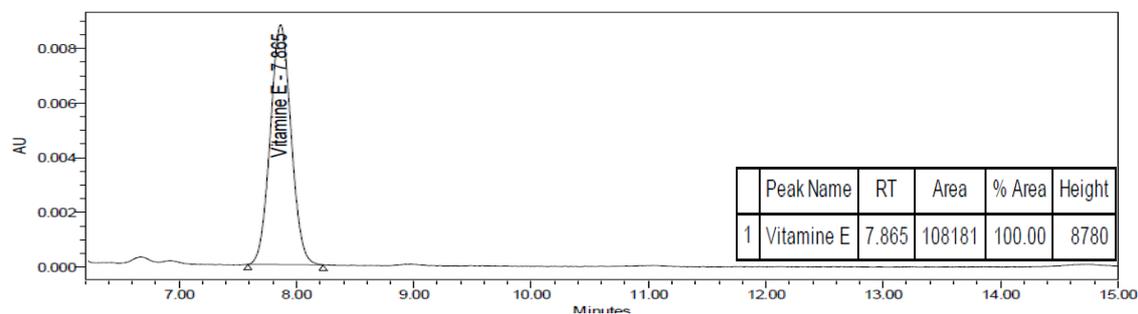
## ANNEXE 2



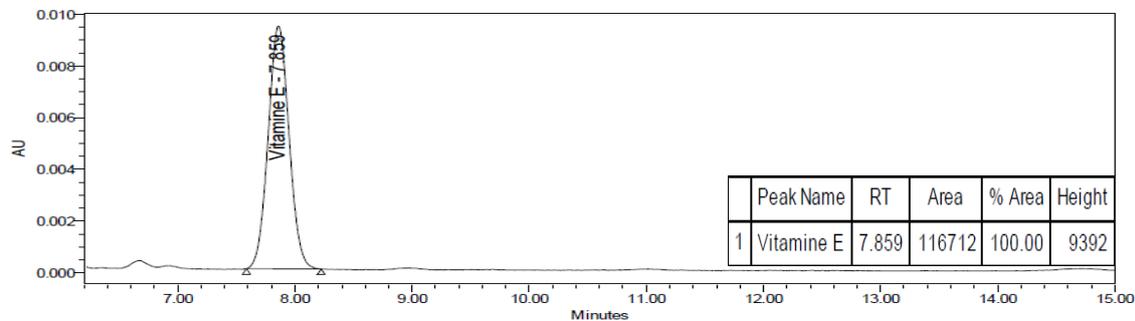
Chromatogramme de la solution liposomale placebo (le blanc) (deuxième injection).



Chromatogrammes de la première solution liposomales optimale (première injection)

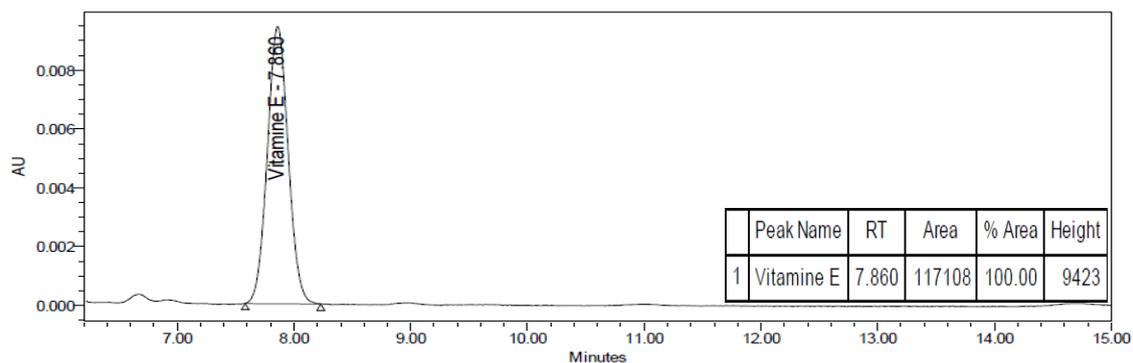


Chromatogrammes de la première solution liposomales optimale (deuxième injection)

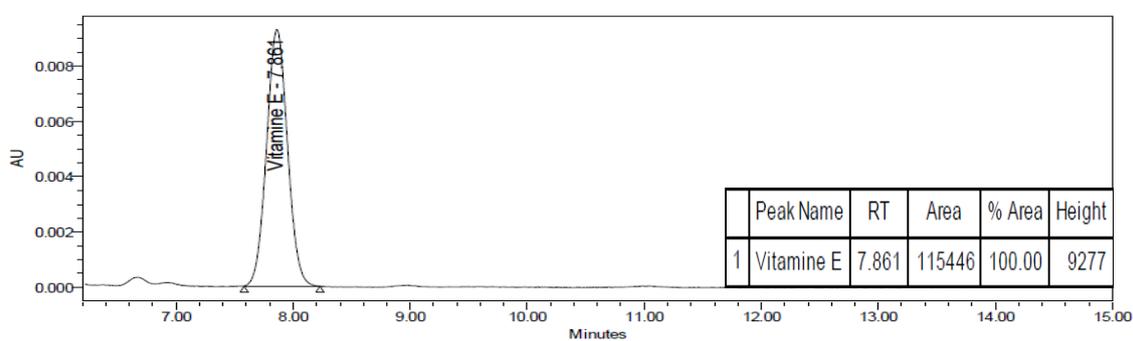


Chromatogrammes de la deuxième solution liposomales optimale (première injection)

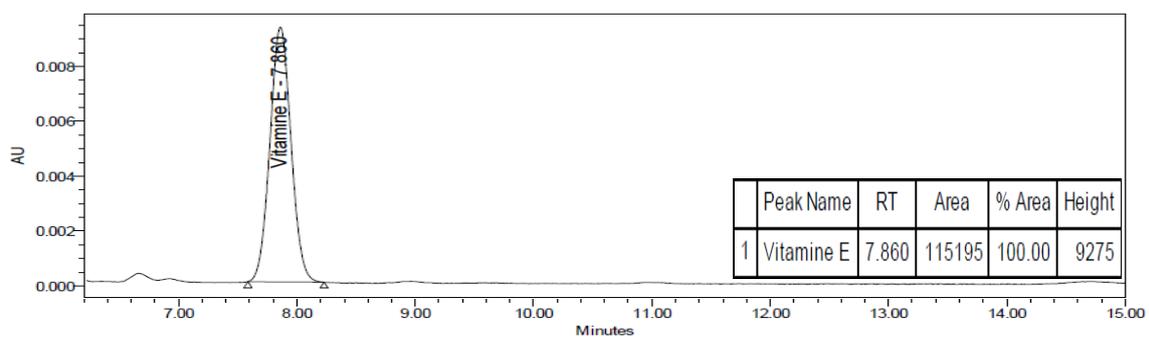
## ANNEXE 2



Chromatogrammes de la deuxième solution liposomales optimale (deuxième injection)

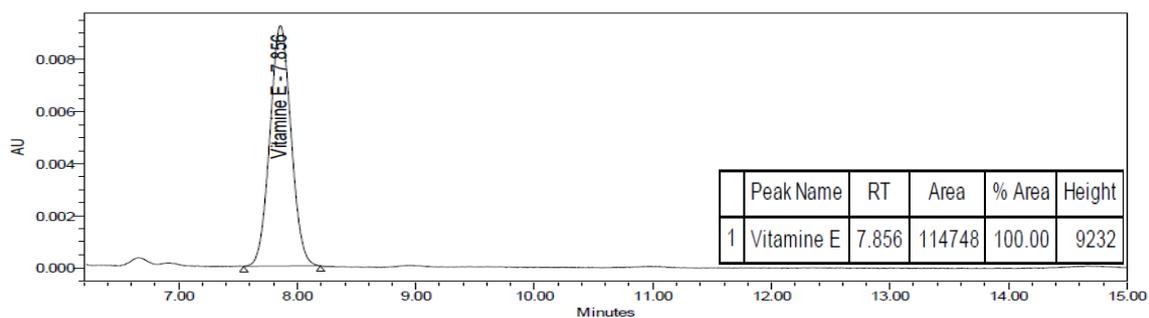


Chromatogrammes de la troisième solution liposomales optimale (première injection)

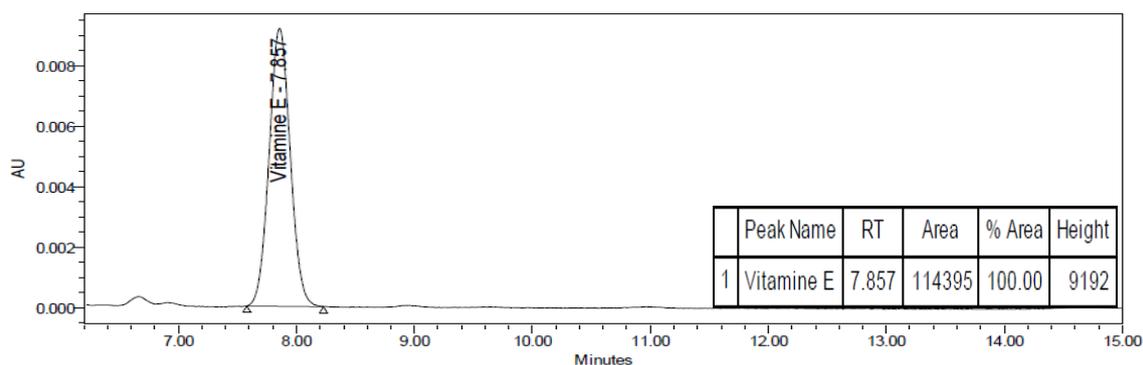


Chromatogrammes de la troisième solution liposomales optimale (deusième injection)

## ANNEXE 2

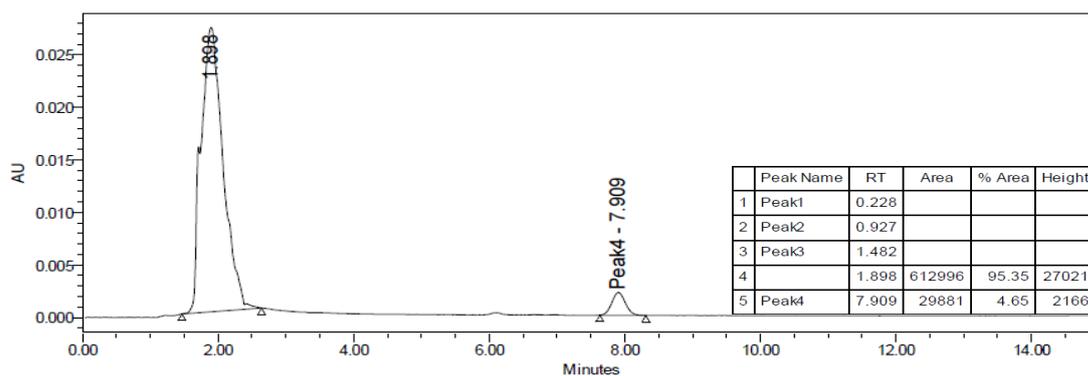


Chromatogrammes de la quatrième solution liposomales optimale (première injection)



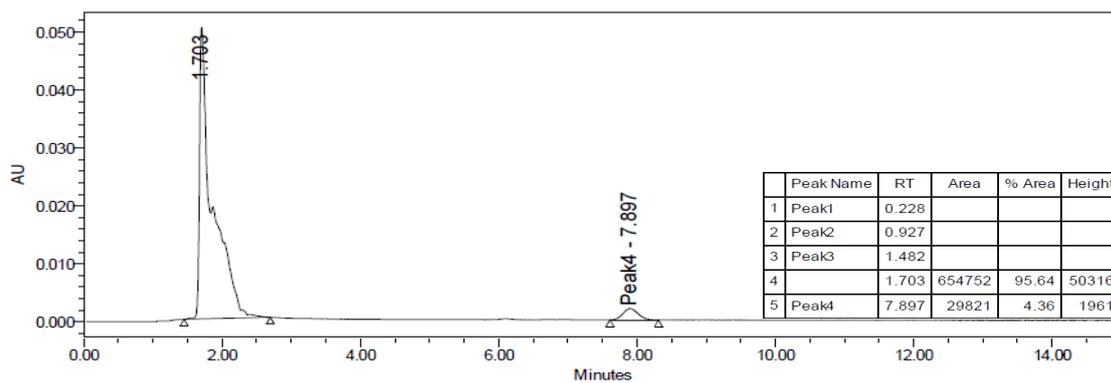
Chromatogrammes de la 4<sup>ème</sup> solution liposomales optimale (2<sup>ème</sup> injection)

- ✓ Chromatogrammes obtenus après analyse par HPLC du surnageant des 4 solutions optimales.

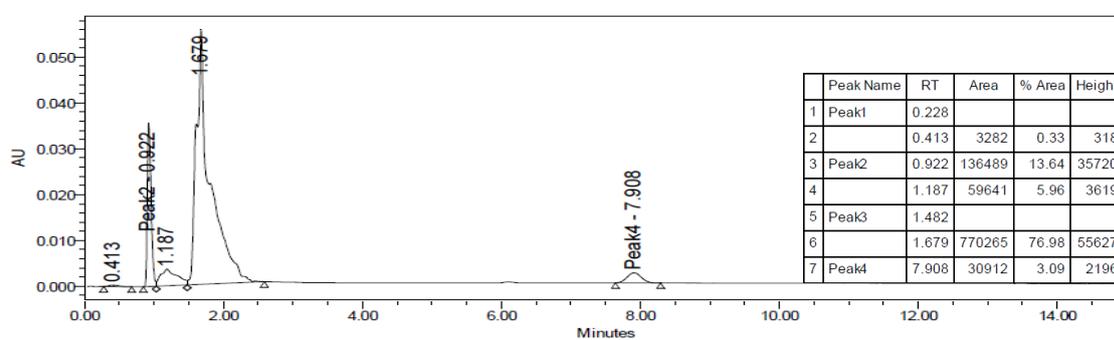


Chromatogramme de la première solution (première injection).

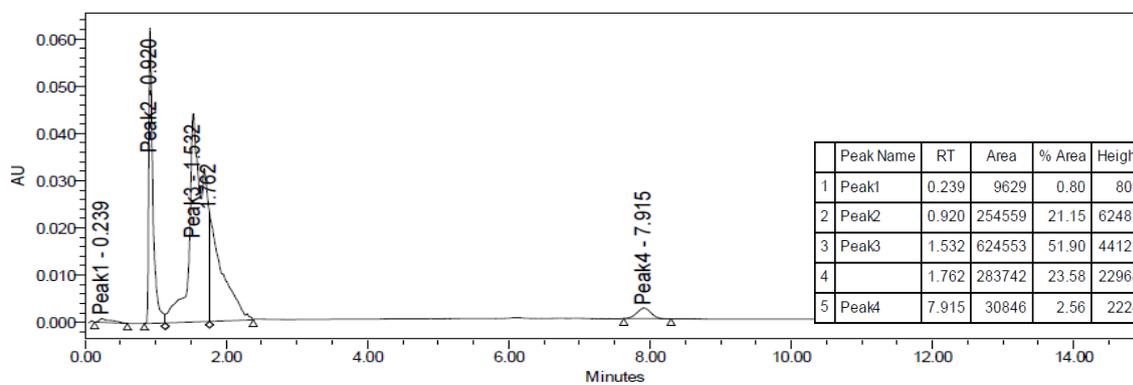
## ANNEXE 2



Chromatogramme de la première solution (deuxième injection).

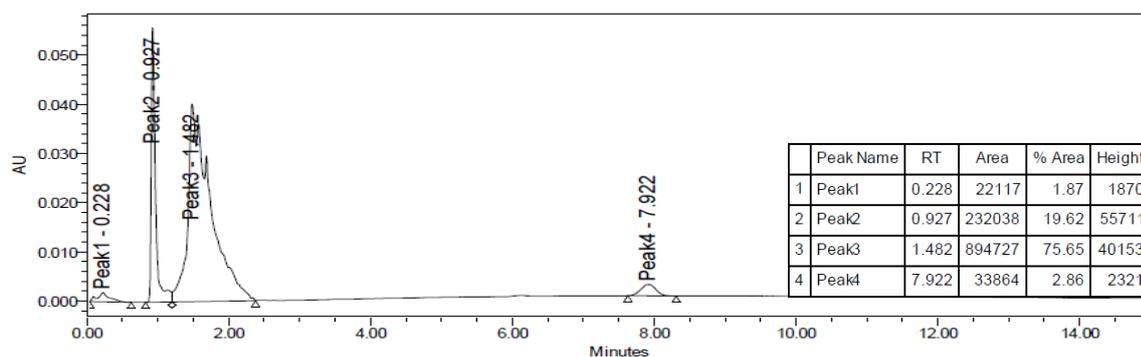


Chromatogramme de la deuxième solution (première injection).

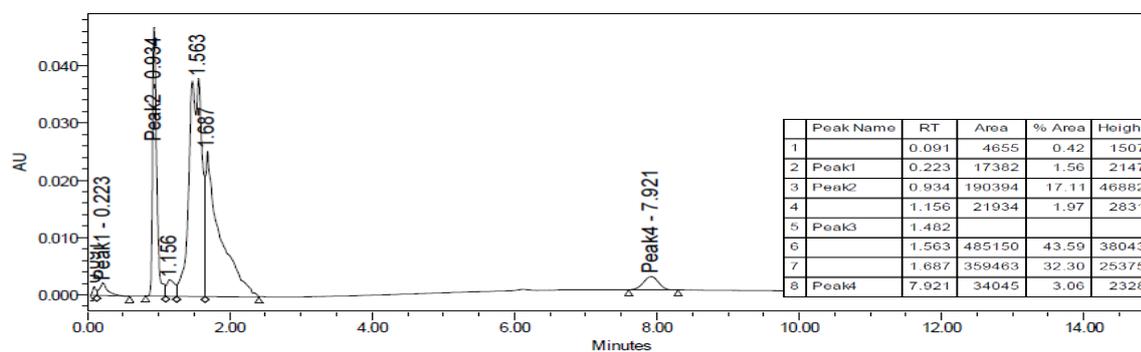


Chromatogramme de la deuxième solution (deuxième injection).

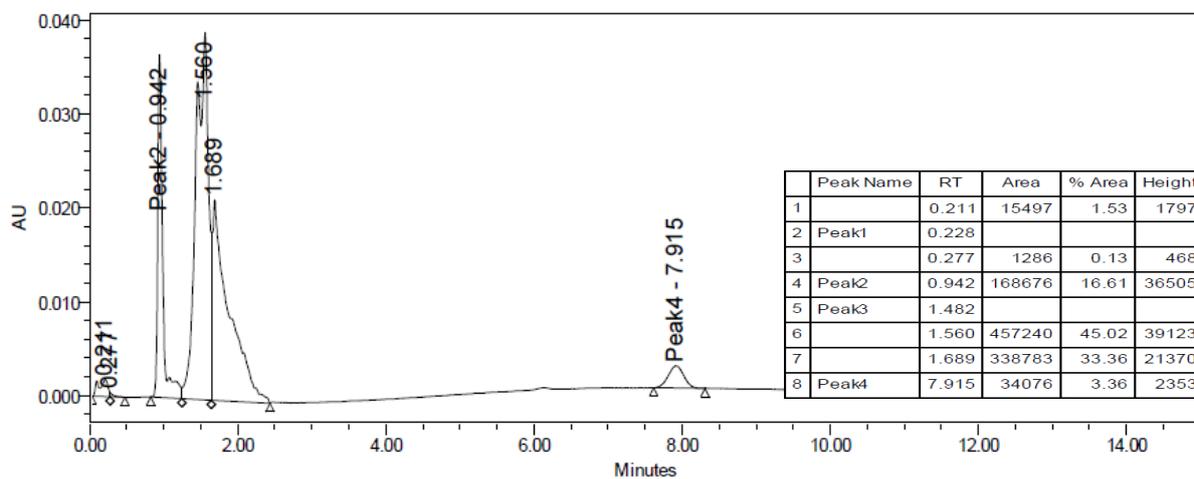
## ANNEXE 2



Chromatogramme de la troisième solution (première injection).

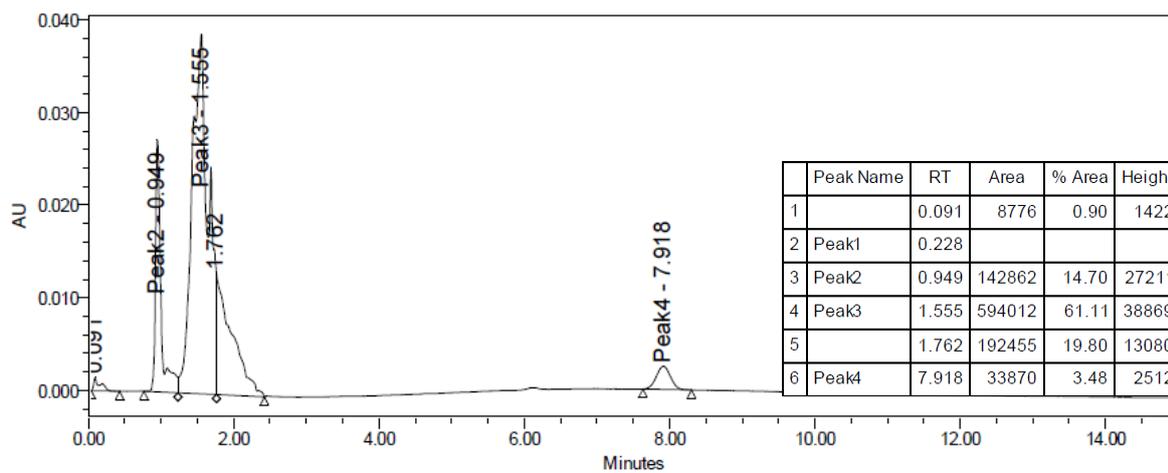


Chromatogramme de la troisième solution (deuxième injection).



Chromatogramme de la quatrième solution (première injection).

## ANNEXE 2



Chromatogramme de la quatrième solution (deuxième injection).

## ANNEXE 3

- Résultats des airs de pics des solutions standards analysés par HPLC utilisés pour le calcul de la répétabilité.

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response
1	Standard C6(0.05mg/ml)	1374	Vitamine E		0.050	76824.075
2	Standard C6(0.05mg/ml)	1375	Vitamine E		0.050	77004.600
3	Standard C6(0.05mg/ml)	1376	Vitamine E		0.050	77621.100
4	Standard C6(0.05mg/ml)	1377	Vitamine E		0.050	77478.850
5	Standard C6(0.05mg/ml)	1378	Vitamine E		0.050	77349.130
6	Standard C6(0.05mg/ml)	1379	Vitamine E		0.050	76841.540
7	Standard C6(0.05mg/ml)	1380	Vitamine E		0.050	76808.660
8	Standard C5(0.1mg/ml)	1381	Vitamine E		0.100	145890.201
9	Standard C5(0.1mg/ml)	1382	Vitamine E		0.100	145651.540
10	Standard C4(0.2mg/ml)	1383	Vitamine E		0.200	269939.491
11	Standard C4(0.2mg/ml)	1384	Vitamine E		0.200	269464.102
12	Standard C3(0.3mg/ml)	1385	Vitamine E		0.300	431506.853
13	Standard C3(0.3mg/ml)	1386	Vitamine E		0.300	430509.815
14	Standard C2(0.4mg/ml)	1387	Vitamine E		0.400	576665.850
15	Standard C2(0.4mg/ml)	1388	Vitamine E		0.400	576840.272
16	Standard C1(0.5mg/ml)	1389	Vitamine E		0.502	731114.032
17	Standard C1(0.5mg/ml)	1390	Vitamine E		0.502	731586.606

➤ Résultats représentant les temps de rétention des solutions liposomales.

	Sample Name	Inj	Vial	Vitamine E
1	Echantillon CULOT 1	1	9	6.982
2	Echantillon CULOT 1	2	9	6.982
3	Echantillon CULOT 2	1	10	7.002
4	Echantillon CULOT 2	2	10	7.005
5	Echantillon CULOT 3	1	11	6.992
6	Echantillon CULOT 3	2	11	6.989
7	Echantillon CULOT 4	1	12	6.955
8	Echantillon CULOT 4	2	12	6.955
9	Echantillon CULOT 5	1	13	6.966
10	Echantillon CULOT 5	2	13	6.968
11	Echantillon CULOT 6	1	14	6.966
12	Echantillon CULOT 6	2	14	6.966
13	Echantillon CULOT 7	1	15	6.945
14	Echantillon CULOT 7	2	15	6.945
15	Echantillon CULOT 8	1	16	6.955
16	Echantillon CULOT 8	2	16	6.951
17	Echantillon CULOT 9	1	17	6.965
18	Echantillon CULOT 9	2	17	6.964
19	Echantillon CULOT 10	1	18	6.969
20	Echantillon CULOT 10	2	18	6.966
Mean				6.969
Std. Dev.				0.017
% RSD				0.3

➤ Résultats représentant les airs de pics des solutions liposomales.

	Sample Name	Inj	Vial	Vitamine E
1	Echantillon CULOT 1	1	9	1416792
2	Echantillon CULOT 1	2	9	1419112
3	Echantillon CULOT 2	1	10	65411
4	Echantillon CULOT 2	2	10	65188
5	Echantillon CULOT 3	1	11	689497
6	Echantillon CULOT 3	2	11	689236
7	Echantillon CULOT 4	1	12	962877
8	Echantillon CULOT 4	2	12	961389
9	Echantillon CULOT 5	1	13	620292
10	Echantillon CULOT 5	2	13	620732
11	Echantillon CULOT 6	1	14	709436
12	Echantillon CULOT 6	2	14	710319
13	Echantillon CULOT 7	1	15	1080365
14	Echantillon CULOT 7	2	15	1081122
15	Echantillon CULOT 8	1	16	701548
16	Echantillon CULOT 8	2	16	703548
17	Echantillon CULOT 9	1	17	334551
18	Echantillon CULOT 9	2	17	334911
19	Echantillon CULOT 10	1	18	655289
20	Echantillon CULOT 10	2	18	654293
Mean				723795
Std. Dev.				365387
% RSD				50.5

## ANNEXE 4

Calcul du taux d'encapsulation.

<b>Echantillon</b>	<b>Air de pic</b>	<b>Concentration en mg /ml</b>	<b>Taux d'encapsulation</b>
<b>Echantillon 1</b>	1418069,5	0,983522096	81,96017467
<b>Echantillon 3</b>	689438,5	0,478169793	39,84748271
<b>Echantillon 4</b>	962220,5	0,667361595	55,61346623
<b>Echantillon 5</b>	620555,5	0,430395017	35,86625139
<b>Echantillon 7</b>	1080994	0,74973863	62,4782192
<b>Echantillon 8</b>	702322	0,487105326	40,59211047
<b>Echantillon 9</b>	334648,5	0,232100186	19,34168213
<b>Echantillon 10</b>	654580	0,453993188	37,8327657

Calcul du taux d'encapsulation optimale

<b>Echantillon</b>	<b>Air de pic</b>	<b>Concentration (mg /ml)</b>	<b>Taux d'encapsulation</b>
<b>Culot 1</b>	<b>108607,5</b>	<b>0,075326263</b>	<b>75,32626296</b>
<b>Culot 2</b>	<b>117577</b>	<b>0,081547186</b>	<b>81,54718615</b>
<b>Culot 3</b>	<b>116279,5</b>	<b>0,080647287</b>	<b>80,64728673</b>
<b>Culot 4</b>	<b>115695</b>	<b>0,080241899</b>	<b>80,24189851</b>
<b>Moyenne</b>	<b>114539,75</b>	<b>0,079440658</b>	<b>79,44065859</b>

Calcul du taux d'encapsulation de la phase aqueuse des solutions optimales

<b>Echantillon</b>	<b>Air de pic</b>	<b>concentration obtenue mg/ml</b>	<b>Taux d'encapsulation</b>
<b>phase aqueuse 1</b>	<b>29851</b>	<b>0,020703582</b>	<b>20,70358194</b>
<b>phase aqueuse 2</b>	<b>30879</b>	<b>0,021416566</b>	<b>21,41656583</b>
<b>phase aqueuse 3</b>	<b>33954,5</b>	<b>0,023549622</b>	<b>23,54962222</b>
<b>phase aqueuse 4</b>	<b>33973</b>	<b>0,023562453</b>	<b>23,56245316</b>
<b>moyenne</b>	<b>32164.375</b>	<b>0.022308056</b>	<b>22.30805579</b>

## ANNEXE 6

### Equipements et installations utilisés durant la préparation de ce travail

- Rota-vapeur (Buchi)

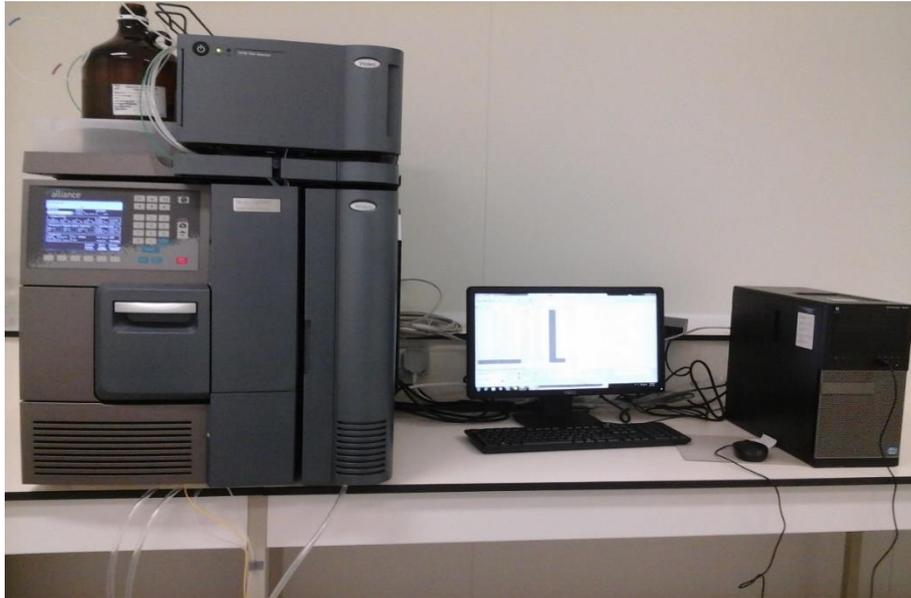


- Bain ultrason (Selecta)



## ANNEXE 6

- HPLC (Waters E2695, alliance)



- Microscope à balayage électronique (quanta 200 FEI).



- Microscope à CASA (MiKoneclipse E200)



## **Résumé**

Lors de cette étude, nous nous sommes fixés comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme bovin. Ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E en milieu aqueux. Pour cela, nous nous sommes intéressés à un vecteur particulier, le liposome.

Cette étude a été menée en s'appuyant sur une modélisation en surface de réponse mise en œuvre dans le cadre d'une planification expérimentale utilisant un plan d'expérience factoriel qui nous a permis de déterminer les valeurs optimales des facteurs choisis, à savoir ; le taux d'encapsulation et la taille des liposomes.

Pour cela nous avons préparé plusieurs solutions liposomales que nous avons caractérisées par l'HPLC et MEB. Les résultats obtenus montrent que les meilleurs liposomes en termes de taux d'encapsulation de la vitamine E (79 %) et de taille (99 nm) furent obtenus dans ces conditions expérimentales : 162 mg phospholipide, 25.5 mg cholestérol et 2 mg /ml vitamine E.

La réfrigération du sperme bovin en utilisant les liposomes optimisés fut un échec, ce dernier est probablement dû au milieu de dilution utilisé : le tampon tris qui dénature et déstabilise les solutions liposomales préparées.

**Mots clés :** Vitamine E, Liposome, Sperme, Cholestérol, Phospholipide.

## **Abstract**

The aim of this study was to improve the conservation of bovine semen. This passing through an intermediate objective; improvement of vitamin E solubility in aqueous medium. For this, we have been interested in using a particular vector: liposome.

This study has been conducted by using an experimental design, which has allowed us to determine the optimal values of the factors selected, namely; encapsulation efficiency and liposome size.

We have prepared several liposomal solutions that we have characterized by HPLC and SEM. The obtained results show that the best liposomes in terms of vitamin E encapsulation efficiency (79%) and liposome size (99 nm) were obtained when using these experimental conditions: 162 mg phospholipid, 25.5 mg cholesterol and 2 mg /ml vitamin E.

The refrigeration of the bovine semen using the optimized liposomes, was a failure, the latter is probably due to the dilution medium: Tris buffer, which denatures and destabilizes the liposomal solutions.

**Key words:** vitamin E, liposome, semen, cholesterol, phospholipid.