

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira-Bejaïa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Memoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Génie des procédés

Option : Sciences et Technologie du Médicament

Thème

Etude de l'impact des cyclodextrines sur la solubilité de la vitamine E et du cholestérol

Réalisé par:

M^{elle} Chafia MAMMASSE

M^{elle} Sara MATOUB

Soutenu devant le jury composé de :

Président: M^r M. IGUER OUADA

Examineur: M^r I. YAHIAOUI

Invitée: M^{me} Y. AMRANI

Promoteur: M^r S. FATMI

Promotion : 2013

Remerciements

Nous remercions DIEU tout puissant de nous avoir donné la force, la santé, le courage et la patience de pouvoir accomplir ce travail.

*Un grand merci à notre promoteur **Monsieur FATMI**. S d'avoir accepté de nous guider tout au long de ce travail, pour tous les moyens mis à notre disposition, et ces précieux conseils qui ont permis l'accomplissement de ce travail. Et bien sur son dynamisme communicatif, sa bonne humeur qui nous a toujours apaisé et surtout pour sa patience .merci d'avoir toujours dit de nous " mes filles ".*

*Nos sincères remerciements s'adressent aussi à **Monsieur IGUEROUADA** de nous avoir accordé l'opportunité de travailler dans le laboratoire R.B.A. Nous sommes très reconnaissantes pour sa grande contribution.*

*Nous tenons aussi à remercier également tous **les membres de jury** pour avoir accepté d'évaluer notre travail.*

*Nous remercions également **M^{me} AMRANI** et **M^{me} RABHI** pour leurs aides et leurs soutiens, ainsi que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de ma mère que je porte toujours dans mon cœur et que j'aurais tant aimé qu'elle soit avec moi.

À mon père, à mes sœurs ainsi *que tout mes frères* pour leurs sacrifices et leurs encouragements sans les quels je ne serais jamais arrivée à réussir dans mes études. Je sais bien quelque soit les remerciements que je leurs adresse c'est peu, que Dieu les protège et leur donne la santé et une longue vie.

Mes beaux frères ainsi que *mes belles sœurs*.

Mes neveux et ma nièce.

Mon binôme ainsi que *toute sa famille*.

Mes copines Chafika, Lynda, Fahima, Nabila, Missilia, Karima, Souhila, Assia et Lamia.

Tous mes adorables amis (es).

Ma famille (tantes et oncles, cousins et cousines)

Tout mes enseignants.

Chafia.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers Parents sans leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements je ne serais jamais arrivée à réussir dans mes études. Je sais bien quelque soit les remerciements que je leurs adresse c'est peu, que Dieu les protège et leur donne la santé et une longue vie.

Mon cher frère ANIS

Mes grands parents que dieu les bénisse

Ma famille (tantes et oncles, cousins et cousines)

Mes adorables amis

Tout mes enseignants.

Sara



Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I : Généralités sur les cyclodextrines

I.1. Introduction.....	2
I.2. Historique	2
I.3. Structure et propriétés des cyclodextrines	3
I.3.1. Structure	3
I.3.2. Propriétés physico-chimiques	5
I.4. Stabilité des cyclodextrines en solution.....	6
I.5. Toxicité des cyclodextrines.....	6
I.6. Modifications sélectives des α , β et γ - cyclodextrines.....	6
I.7. Formation de complexes d'inclusion	7
I.8. Diagramme de solubilité	9
I.9. Préparation des complexes d'inclusion.....	10
I.9.1. La méthode de précipitation	10
I.9.2. La méthode de pétrissage (kneading).....	10
I.9.3. Mélange physique	10
I.9.4. Lyophilisation.....	10
I.10. Techniques analytiques de caractérisation des complexes d'inclusion	11
I.10.1. Méthode spectrophotométrique UV-visible	11
I.10.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	11
I.10.3. Spectroscopie Infrarouge (IR).....	11

I.10.4. Diffraction des rayons X (DRX)	12
I.10.5. La microscopie électronique à balayage (MEB)	12
I.10.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)	12
I.10.7. Test de dissolution.....	12
I.11. Application des cyclodextrines	13
I.11.1. Domaine pharmaceutique.....	13
I.11.2. Industrie alimentaire.....	13
I.11.3. En cosmétique	13
I.11.4. En agriculture	13
I.12. Conclusion	14

Chapitre II : Généralités sur la vitamine E

II.1. Introduction.....	15
II.2. Historique	15
II.3. Caractéristiques de la vitamine E	16
II.4. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E.....	17
II.5. Propriétés biochimiques et métaboliques de la vitamine E	18
II.6. Source de la vitamine E	19
II.7. Toxicité de la vitamine E.....	19
II.8. Les dérivés de la vitamine E.....	20
II.8.1. Synthétique.....	20
II.8.1.1. dl- α -tocopherol.....	20
II.8.2. Estérifiés	21
II.8.2.1. D- α tocophérol succinate acide	21
II.8.2.2. Alpha-tocophéryl nicotine.....	21
II.8.2.3. Mélange de tocophérol	21
II.9. Conclusion	21

Chapitre III : Généralités sur le cholestérol

III.1. Introduction.....	22
III.2. Historique	22
III.3. Caractéristiques du Cholestérol	22

III.4. Propriétés physico-chimiques du cholestérol	23
III.5. Localisation et extraction du cholestérol.....	23
III.6. Produits d'oxydation du cholestérol.....	24
III.7. Le cholestérol et la membrane	25
III.8. Conclusion.....	25

Chapitre IV : Etude théorique sur le sperme

IV.1. Introduction.....	26
IV.2. Historique.....	26
IV.3. Caractéristique des spermatozoïdes	26
IV.3.1. Le sperme.....	26
IV.3.2. Les spermatozoïdes	26
IV.3.2.1. La morphologie du spermatozoïde	26
IV.3.2.2. Mobilité	27
IV.3.2.3. Viabilité	28
IV.4. Récolte du sperme.....	28
IV.4.1. Méthode de récolte du sperme du coq	28
IV.4.2. Méthode de récolte du sperme de lapin.....	28
IV.4.3. Méthode de récolte du sperme épидidymaire du bovin	28
IV.5. Cryopréservation des spermatozoïdes	29
IV.5.1. Dilution.....	29
IV.5.2. Cryoprotecteurs	29
IV.6. Les étapes de la technique de congélation de sperme.....	30
IV.6.1. La Phase de refroidissement.....	30
IV.6.2. Phase de conditionnement.....	30
IV.6.3. La phase de congélation	30
IV.6.4. La phase de décongélation	30
IV.6. Conclusion	31

Chapitre V : Travaux antérieurs

V.1. Introduction	32
V.2. Travaux antérieurs	32
V.3.1. Travaux effectués sur la complexation du cholestérol par les cyclodextrines	32

V.3.2. Travaux effectués sur la complexation de la vitamine E par les cyclodextrines.....	33
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre VI : Matériel et méthodes

VI.1. Introduction.....	35
VI.2. Pré-développement de la méthode de quantification	35
VI.2.1. Absorbance du cholestérol dans l'éthanol.....	35
VI.2.2. Spécificité.....	35
VI.2.3. Linéarité	36
VI.3. Diagramme d'Higuchi.....	37
VI.4. Préparation des complexes d'inclusion.....	38
VI.4.1. Le mélange physique.....	38
VI.4.2. Méthode Co - évaporation.....	39
VI.5. Caractérisation des complexes d'inclusion	40
VI.5.1. Analyse par spectroscopie IR.....	40
VI.5.2. Diffraction de rayon x	40
VI.6. Application sur modèle cellulaire (spermatique).....	41
VI.6.1. Concervation et réfrigération du sperme bovin	41
VI.6.2. Réfrigération et congélation du sperme du lapin et du coq.....	43

Chapitre VII: Résultats et discussions

VII.1. Pré-développement	45
VII.2. Linéarité.....	46
VII.3. Le diagramme de solubilité (diagramme d'Higuchi).....	46
VII.4. Caractérisation des complexes d'inclusion.....	48
VII.4.1. Analyse par spectroscopie Infrarouge	48
VII.4.1.1. Cholestérol.....	48
VII.4.1.2. Vitamine E	50
VII.4.2. Diffraction des Rayons X	52
VII.4.2.1. Cholestérol.....	52
VII.4.2.2. Vitamine E.....	55
VII.5. Etude de l'action des complexes à base de vitamine E et cholestérol sur les spermatozoïdes	57
VII.5.1. Etude sur le sperme du bovin	57

VII.5.2. Etude sur le sperme du lapin.....	64
Conclusion générale	68
Références bibliographique.....	69
Annexes.....	78

Liste des figures

Figure I.1 : Structure des cyclodextrines.....	3
Figure I.2 : Structure et propriétés des cyclodextrines.....	4
Figure I.3 : Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine.....	4
Figure I.4 : Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leurs cavités respective	5
Figure I.5 : Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion.....	7
Figure I.6 : Description schématique des deux complexes d'inclusions les plus couramment rencontrés.....	7
Figure I.7. Diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors.....	9
Figure II.1 : Structure des tocophérols et tocotriénols.....	16
Figure II.2 : Structure l'alpha tocophérol.....	20
Figure II.3 : Structure l'alpha tocopherylnicotinate.....	21
Figure III.1. Structure du cholestérol.....	23
Figure III.2. Structure de quelques produits d'oxydation du cholestérol.....	24
Figure IV.1 : Représentation schématique d'un spermatozoïde.....	27
Figure VII.1 : Spectre d'absorbance du cholestérol dans l'éthanol.....	45
Figure VII.2 : Courbe de linéarité du cholestérol.....	46

Figure VII.3 : Diagramme d'Higuchi (Chl /Hp β -CD) par UV- visible.....	47
Figure VII.4 : Diagramme d'Higuchi (Chl /Hp β -CD).....	47
Figure VII.5 : Spectres Infrarouge du Chl, β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.....	48
Figure VII.6 : Spectres Infrarouge du Chl, M β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.....	49
Figure VII.7 : Spectres Infrarouge du Chl, Hp β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.....	49
Figure VII.8 : Spectres Infrarouge du Chl, PEG, leur mélange physique et leur dispersion...50	
Figure VII.9 : Spectres Infrarouge de la Vit E, β -CD et leur complexe.....	51
Figure VII.10 : Spectres Infrarouge de la Vit E, M β -CD et leur complexe.....	51
Figure VII.11 : Spectres Infrarouge de la Vit E, Hp β -CD et leur complexe.....	51
Figure VII.12 : Spectres Infrarouge de la Vit E, PEG et de leur dispersion.....	52
Figure VII.13 : Diffractogrammes du Chl, β -CD, leur mélange physique et leur complexe d'inclusion.....	53
Figure VII.14 : Diffractogrammes X du Chl, M β -CD,leur mélange physique et leur complexe d'inclusion.....	53
Figure VII.15 : Diffractogrammes du Chl, Hp β -CD, leur mélange physique et leur complexe d'inclusion.....	54
Figure VII.16 : Diffractogrammes du Chl, PEG, leur mélange physique et leur dispersion solide.....	54
Figure VII.17 : Diffractogrammes de la Vit E, β -CD et leur complexe.....	55
Figure VII.18 : Diffractogrammes de la Vit E, M β -CD et leur complexe.....	55
Figure VII.19 : Diffractogrammes de la Vit E, Hp β -CD et leur complexe.....	56
Figure VII.20 : Diffractogrammes de la Vit E, PEG et leur dispersion solide.....	56

Figure VII.21 : Diagramme en bâton des SPZ progressif rapide et statique en fonction des traitements.....	57
Figure VII.22 : Diagramme en bâton des SPZ progressif rapide et statique en fonction des traitements.....	59
Figure VII.23 : Diagramme en bâton des vitesses linéaires des SPZ en fonction des traitements.....	60
Figure VII.24 : Diagramme en bâton des vitesses linéaires des SPZ en fonction des traitements.....	61
Figure VII.25 : Diagramme en bâton des pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités et non traités.....	62
Figure VII.26 : Diagramme en bâton des pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités et non traités.....	63
Figure VII.27 : Diagramme en bâtons de la mobilité des SPZ à température ambiante en fonction des traitements.....	64
Figure VII.28 : Diagramme en bâtons de la mobilité des SPZ après réfrigération en fonction des traitements.....	65
Figure VII.29 : Diagramme en bâtons des vitesses linéaires des SPZ avant et après congélation en fonction des traitements.....	65
Figure VII.30 : Diagramme en bâtons des SPZ progressifs rapides après congélation en fonction des traitements.....	66

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Caractéristiques physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines.....	5
Tableau II.1 : Dénomination de différents tocophérols et tocotrienols.....	16
Tableau II.2 : Propriétés physico-chimique de dl- α -tocophérol acétate.....	18
Tableau.III.1 : Propriétés physico-chimiques du cholestérol.....	23
Tableau VI.1 : Différentes concentrations du cholestérol dans l'éthanol.....	36
Tableau VI.2 : Différentes quantités de Hp β –CD et cholestérol.....	37
Tableau VI.3 : Les quantités des matières premières pour former les mélanges physiques...38	
Tableau VI.4 : Les quantités des matières premières pour former les complexes d'inclusion.....	39
Tableau VI.5 : Quantités des matières premières et complexes utilisés pour les tests de réfrigération et conservation du sperme bovin.....	42
Tableau VI.6 : Quantités des matières premières et complexes utilisés pour les tests de réfrigération et conservation du sperme bovin.....	42
Tableau VI.7 : Quantités des complexes et matières premières utilisés pour la réfrigération et congélation du sperme du lapin et du coq.....	43

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

CD(s) : Cyclodéxtrine(s).

Chl : Cholestérol.

CPLX : Vitamine E-Cyclodextrine-Cholestérol.

CTRL : Contrôle.

DS : Dispersion solide.

βCD : Beta-cyclodextrine.

HPβCD : Hydroxyl-propyl beta-cyclodéxtrine.

MP : Matières premières.

PMβCD : Perméthyl beta-cyclodéxtrine.

PEG 6000 : Polyéthylènglycol.

SPZ : Spermatozoïde.

Vit E : Vitamine E.

VCDC : Vitamine E-Cyclodéxtrine-Cholestérol.

Introduction générale

La conservation du sperme animal en général et de certaines espèces telle que le bovin et l'aviaire pourrait être une solution pour aboutir à des espèces choisies qui répondent aux exigences des producteurs et des éleveurs [1].

Dans cette optique, plusieurs additifs dit diluants sont reconnus comme ayant un potentiel cryoprotecteur.

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

Ainsi, nous nous sommes proposés d'aborder cette problématique (conservation du sperme) d'un angle différent en étudiant l'influence d'une combinaison inédite dans le monde à savoir vitamine E/cholestérol sur la conservation du sperme de trois espèces ; l'aviaire, le bovin et le lapin.

Après avoir effectué l'étude bibliographique de ces deux molécules il nous est apparu une nouvelle problématique plus profonde : la faible solubilité de ces deux molécules en milieu aqueux.

Pour dépasser ce nouvel obstacle, il nous fallait trouver une molécule, qui en même temps pourrait régler ces carences de solubilité, tout en étant pas un facteur limitant de la conservation du sperme. Les cyclodextrines (naturelles et modifiées) furent une option sérieuse et prometteuse pour deux raisons ; la première étant que sa capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes permettait d'améliorer la solubilité de ces dernières, la deuxième étant que les cyclodextrines sont utilisées comme diluant lors de la congélation du sperme [3].

Dans le souci de récolter un maximum d'information sur les complexes formés, nous avons choisi de prendre une gamme de cyclodextrines (β , PM, Hp β) afin d'étudier leur impact, et pourquoi pas aboutir vers un modèle nouveau à base de spermatozoïde

Au final, ce mémoire fut divisé en deux parties théorique et pratique. Dans la première partie nous avons étudié chacune des trois molécules seule (Chl, Vit E, CDs).

Dans la seconde partie nous avons exposé l'essentiel de nos résultats et nous les avons interprétés.

I.1. Introduction

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composées d'unités glucosidiques. Les plus fréquentes sont α , β et γ -CDs, qui sont composées de six, sept et huit unités de glucose respectivement. L'extérieur des CDs est hydrophile tant dit que l'intérieur est hydrophobe. Elles sont connues pour leurs capacités à augmenter la solubilité de plusieurs molécules lipophiles et ce par formation de complexe d'inclusion. Ainsi, nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier ces molécules très attractives.

I.2. Historique

En 1891, Villiers isolait pour la première fois un groupe d'oligosaccharides non réducteurs provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par une amylase (cyclodextrine glucosyl transférase) produite par différents bacilles dont *Bacillus macerans*. Ces produits possèdent des particularités physico-chimiques proches de celles de la cellulose, il les baptise donc « cellulosines ». Schardinger, 20 ans plus tard, isole la souche microbienne responsable de la formation de ces molécules, qu'il dénomme *Bacillus Macerans* et, décrit le mode de purification et de préparation de ces oligosaccharides. Il met aussi en lumière la capacité de ces dernières à former des adduits particuliers avec les molécules d'iode.

C'est en 1932, que Prigsheim et son équipe démontrent que ces produits avaient la propriété de former des complexes avec des molécules organiques. D. French, F. Cramer et K. Freudenberg contribuèrent également grandement à la connaissance des cyclodextrines et à l'élucidation de leur structure durant les années 30 à 40. Freudenberg et son équipe démontrent alors que ces oligosaccharides sont constitués d'un enchaînement de n unités α -D glucopyranosidiques, la fraction principale contenant l'alpha et la bêta-cyclodextrine (possédant respectivement 6 et 7 unités). C'est cette même équipe qui, en 1948, découvre la gamma-cyclodextrine (constituée de 8 unités de glucose) et qui détermine entièrement sa structure. Au début des années 1950, les équipes de French et de Cramer étudièrent de façon intensive les productions enzymatiques de cyclodextrines, leurs purifications, et leurs caractérisations physico-chimiques.

La propriété des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion devient alors le sujet d'études intensives, notamment par l'équipe de Cramer. C'est ainsi que le tout premier brevet concernant l'application des cyclodextrines pour la mise en forme d'un composé à activité biologique est déposé en 1953. A partir de ce moment, on observe une recrudescence de l'étude des cyclodextrines, tant du point de vue de leur fabrication industrielle, que de

l'exploitation de leurs propriétés, de leurs modifications chimiques ou bien encore, de leurs domaines d'applications [4].

I.3. Structure et propriétés des cyclodextrines

I.3.1. Structure

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques non-réducteurs obtenus industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase). Les trois types de CD les plus couramment rencontrés sont l' α , la β - et γ -CD, qui sont constitués respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques, liées en α (1, 4) (Figure I.1).

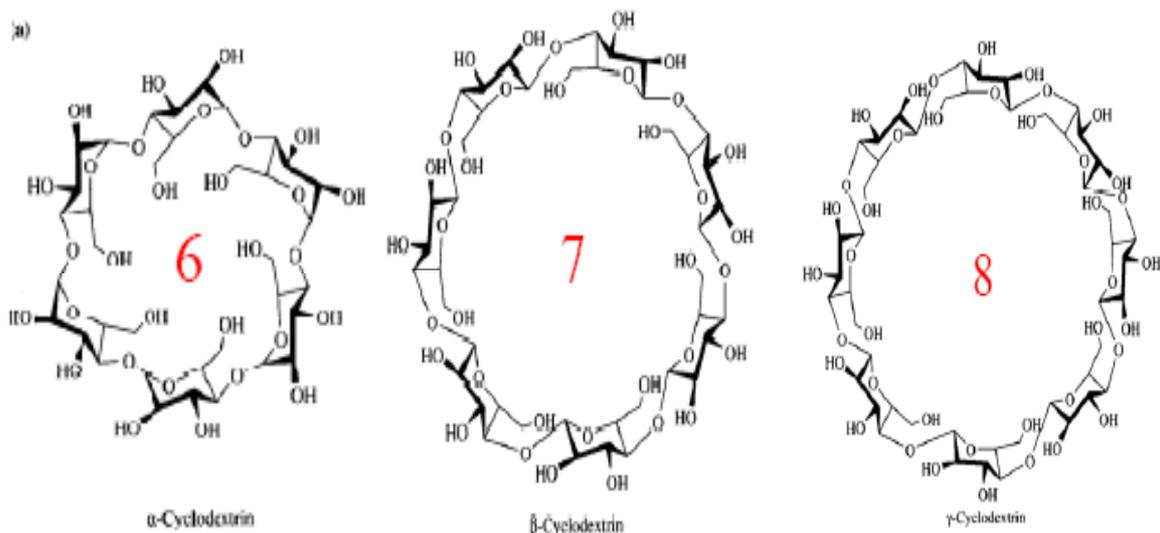


Figure I.1 : Structure des cyclodextrines.

Les cyclodextrines présentent donc une forme torique, le côté le plus étroit étant appelé face primaire (les hydroxyles primaires y étant situés) et le côté le plus large, face secondaire (les deux groupes hydroxyles secondaires de chaque unité y étant localisés).

De plus, on entrevoit sur la figure I.2, que les hydroxyles primaires et secondaires forment un réseau dense de liaisons hydrogène, contribuant ainsi à la rigidité du macrocycle, et stabilisant la forme tronc-conique des molécules. Cette structure spatiale des CD est aussi responsable de certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques.

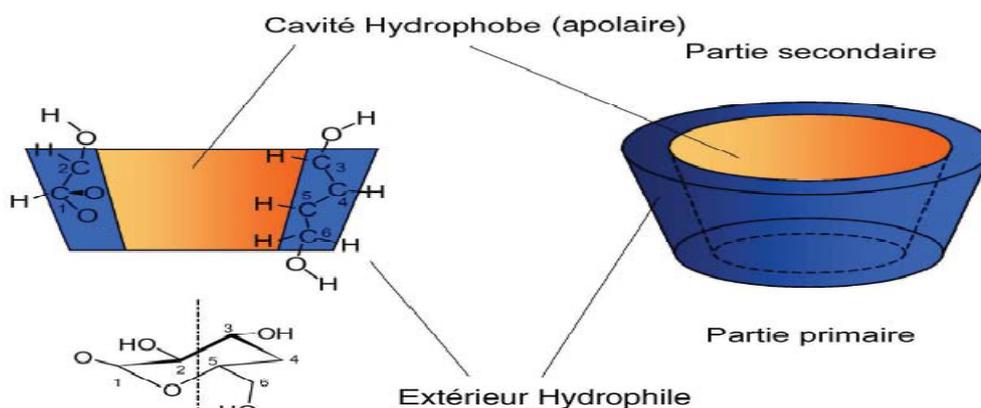


Figure I.2. Structure et propriétés des cyclodextrines [5].

La cavité interne du tore est relativement apolaire car elle est tapissée de deux couronnes de groupes CH (protons H3 près de la face secondaire et protons H5 près de la face primaire), séparées par les oxygènes glucosidiques. On peut distinguer sur la figure I.2 que tous les protons H3 et H5 des différentes unités glucose pointent vers l'intérieur de la cavité des CDs.

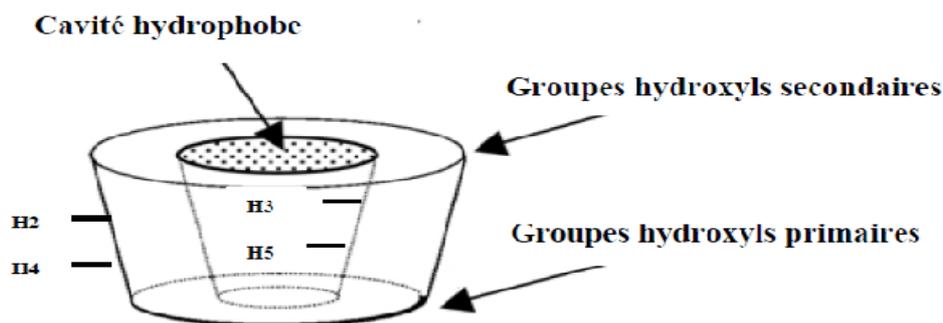


Figure I.3. Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine [6].

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives (figure 1.4). Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens : β - < α - < γ - CD. Grâce, à cette cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en solution aqueuse avec une grande variété de molécules-hôtes hydrophobes [6, 7].

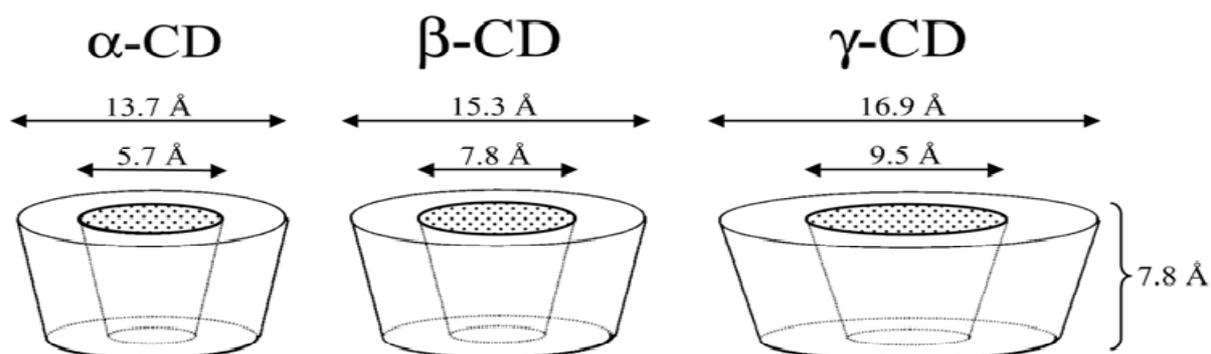


Figure I.4. Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leurs cavités respective [7].

I.3.2. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines :

Les CDs les plus utilisés sont l' α , β - et γ -CD. Se sont des produits cristallins, homogènes et non hygroscopiques, leurs caractéristiques physico-chimiques les plus importantes sont décrites dans le tableau I.1 [8].

Tableau I.1 : Caractéristiques physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines [9]

	α	β	γ
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	972.87	1135.01	1297.1
Diamètre de la cavité (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diamètre externe (Å)	14.6 ± 0.4	15.4±0.4	17.5-0.4
Hauteur du tore (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Volume de cavité (Å ³)	174	262	427
Point de fusion (°C)	275	280	270
Nombre des molécules d'eau	6	12	17

de cristallisation			
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100ml)	12.8	1.8	25.6

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives. Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens : β - < α - < γ -CD. Les cyclodextrines se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. La teneur en eau à l'équilibre dépend des conditions de cristallisation et de la nature de la cyclodextrine [7].

I.4. Stabilité des cyclodextrines en solution

La stabilité des cyclodextrines en solution est relativement peu influencée par les conditions de pH et de température. L'hydrolyse des cyclodextrines peut avoir lieu dans certaines conditions de pH très acides (< 1) et à 80°C. En milieu très basique (pH > pKa), il y a possibilité de former des liaisons alcoolates plus solubles que les cyclodextrines neutres [10].

I.5. Toxicité des cyclodextrines

Les cyclodextrines natives et leurs dérivés hydrophiles traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles. Les dérivés lipophiles de la bêta-cyclodextrine, même s'ils interagissent plus avec les membranes, ne les traversent pas beaucoup plus. Toutes les études ont montré que la toxicité orale des cyclodextrines est presque nulle car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus digestif. De plus, la gamma-cyclodextrine, les 3-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine, sulphobutylether-bêta-cyclodextrine, maltosyl-bêta-cyclodextrine et les bêta-cyclodextrines sulfatées sont suffisamment sûres pour être administrées par voie parentérale [11].

I.6. Modifications sélectives des α , β et γ - cyclodextrines

Les cyclodextrines à l'état natif représentent un intérêt relatif du fait de leur polarité élevée, leur faible solubilité dans les solvants organiques et leur rigidité structurale [12].

Dans la littérature, les principaux types recensés de fonctionnalisations chimiques effectuées sur les CDs, peuvent être classés de la façon suivante :

- Éthérisation (dérivés alkylés et silylés) ;

- Estérfication (dérivés acylés et sulfonylés) ;
- Halogénéation ;
- Substitution nucléophile de groupes partants (tosylates, halogénures) pour donner des dérivés azotures, amines, thioalkyles,... [13].

I.7. Formation de complexe d'inclusion

Les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion hydrosolubles avec un éventail assez large de principes actifs lipophiles (Figure I.5) [14].

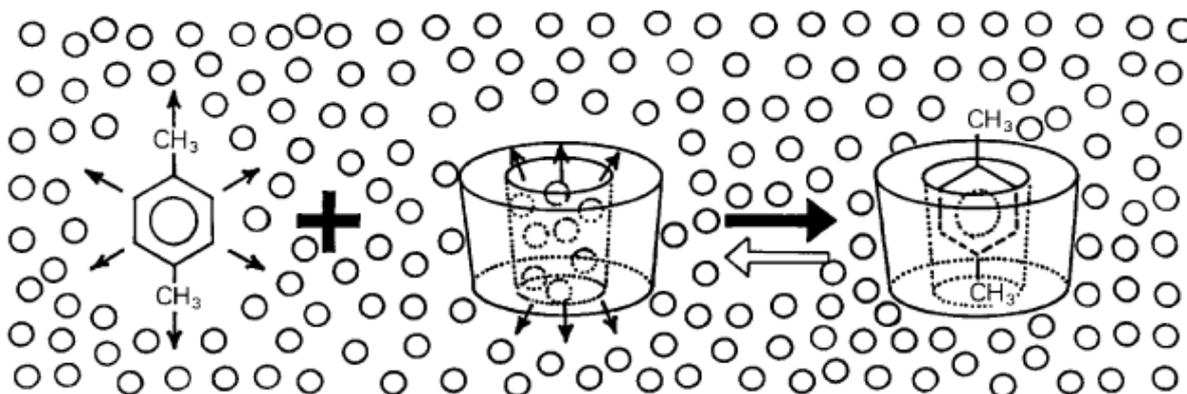


Figure I.5. Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion [15].

La formation du complexe d'inclusion est le résultat de plusieurs effets agissant simultanément. Ces effets comprennent :

- ❖ Des interactions hydrophobes entre l'hôte et l'invité,
- ❖ Des interactions de Van Der Waals (interactions dipôle/dipôle),
- ❖ Des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des cyclodextrines et certaines molécules invitées [16].

Les CDs peuvent ainsi inclure partiellement ou en totalité un composé invité, ce qui donne alors lieu à la formation de complexes comportant éventuellement plusieurs molécules de CDs ou de molécules invitées (figure I.6) [4].

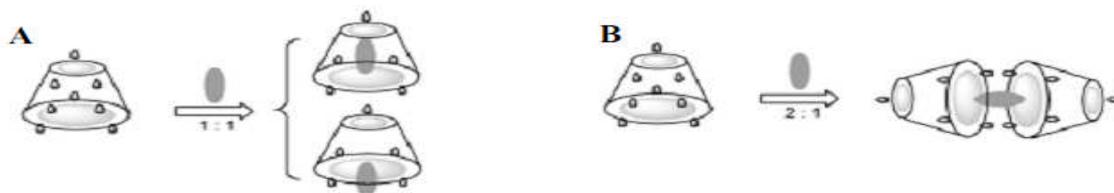
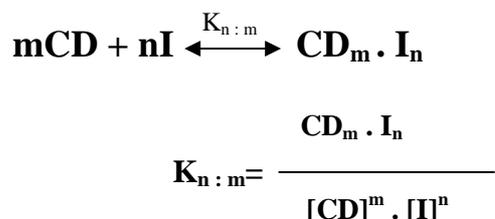


Figure I.6. Description schématique des deux complexes d'inclusions les plus couramment rencontrés [17].

Le plus fréquemment, il s'agit de complexes d'inclusion de type 1:1. En solution, le complexe étant régi par des forces d'interactions faibles, un équilibre s'établit entre les formes dissociées et associées. Cet équilibre thermodynamique s'exprime par une constante d'association K_a . Dans le cas d'une CD et d'une molécule invitée I, on peut écrire les relations suivantes [13] :



Où CD représente la molécule hôte soit la cyclodextrine, I la molécule invitée et $K_{n/m}$ la constante d'équilibre du complexe pour un rapport entre la cyclodextrine et la molécule invitée de m pour n [7,18].

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

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et une molécule invitée confère à ce complexe des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la CD et de la molécule incluse prises séparément :

- ❖ Modification de la solubilité dans l'eau ;
- ❖ Modification des propriétés spectrales ;
- ❖ Modification de la réactivité chimique due à la molécule hôte (protection à l'oxydation, réduction chirale,...) et à la molécule invitée (orientation de la régiosélectivité) ;
- ❖ Diminution de la diffusion et de la volatilité (dans le cas de substances volatiles) ;
- ❖ Modification des propriétés chirales ;
- ❖ Modification des propriétés biologiques (par exemple, le caractère hémolytique) [13].

I.8. Diagramme de solubilité

Les diagrammes de solubilité ou isothermes de solubilité sont réalisés en plaçant un excès de substances en présence de solutions aqueuses de cyclodextrines de concentrations croissantes, à une température donnée. Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre de la complexation (de plusieurs heures à plusieurs jours), on détermine la quantité de substance solubilisée par méthode de dosage appropriée. Un diagramme de solubilité est alors réalisé en reportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe vertical et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe horizontal (figure I.7). Higuchi et Connors en 1965 ont classé les différents types de diagramme caractérisant les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrine-molécule invitée [7].

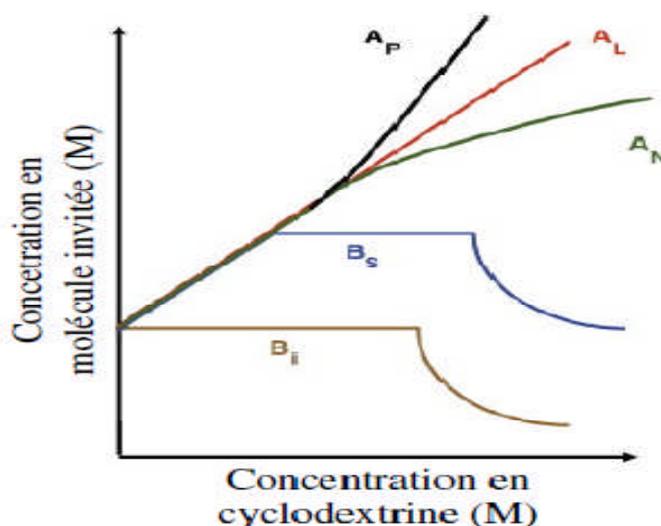


Figure I.7. Diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors [7].

Le type A est obtenu quand la solubilité apparente de la substance augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrine. Une augmentation linéaire de la solubilité est représentée par la courbe A_L alors que les courbures positives et négatives sont représentées respectivement par les courbes A_P et A_N . Les profils linéaires sont généralement attribués à une stœchiométrie 1 : 1. Un diagramme de type A_P traduit la formation simultanée de complexes de stœchiométries différentes (1 : 1 à l'origine, puis 1 : 2 ou 1 : 3,...) [5].

Un profil A_N peut être difficile à interpréter. La chute de solubilité par rapport au profil linéaire peut être liée à des modifications de la solubilité du complexe, de la constante diélectrique du milieu ou à l'association de molécules de cyclodextrines entre elles [7].

Les courbes de type B sont observées lorsque le complexe d'inclusion a une solubilité limitée dans l'eau et sont traditionnellement observés avec des cyclodextrines naturels, particulièrement β -CD. Deux sous-classes ont été décrites comprenant des systèmes B_S et B_I [5,19].

I.9. Préparation des complexes d'inclusion

I.9.1. La méthode de co-précipitation

Le mélange du principe actif et des cyclodextrines est dispersé dans l'eau ou un solvant approprié. La solution est agitée et chauffée pour obtenir un liquide concentré, visqueux et translucide. Le complexe est obtenu par précipitation du mélange réalisé, qui est séparé et séché [20].

I.9.2. La méthode de pétrissage (Kneading)

Dans ce cas les cyclodextrines ne sont pas dissoutes, elles sont mélangées avec une petite quantité d'eau dans laquelle la substance invitée a été rajoutée préalablement. Grâce au fait que le complexe CDs-eau est habituellement moins favorable que le complexe CDs-molécule invitée et parce que leurs structures cristallines sont différentes, l'inclusion peut avoir lieu [8].

I.9.3. Le mélange physique

Certaines molécules invitées peuvent être complexées par simple mélange des deux poudres ensemble. Le temps de mélange nécessaire dépend de l'invité. Généralement, ce protocole est réalisé à température ambiante. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau, sauf pour le rinçage, et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes des poudres, et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante [6].

I.9.4. Lyophilisation

La lyophilisation, appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans le produit par sublimation. La molécule invitée est ajoutée à la solution aqueuse de CDs, après mélange sous agitation, la substance obtenue est congelée puis lyophilisée [21].

I.10. Techniques de caractérisation des complexes d'inclusion

I.10.1. Méthode spectrophotométrique UV-visible

La spectroscopie d'absorption UV/visible est une technique fréquemment utilisée pour la détermination de la constante d'équilibre d'association dans les applications biochimiques. Elle est particulièrement intéressante pour la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion pour les composés qui absorbent dans le domaine UV/visible [8].

C'est une technique assez sensible, elle permet de travailler dans des gammes de concentrations faibles, ce qui peut être intéressant pour des produits peu solubles. Mais il faut que la molécule étudiée absorbe à des longueurs d'onde différentes de celle des CD [22].

I.10.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules biochimiques. La RMN est aujourd'hui considérée comme une méthode de choix dans l'étude des complexes formés par les cyclodextrines. En effet, la RMN, du proton notamment, permet d'observer des changements de déplacements chimiques dus à la complexation. Après inclusion, les protons situés à l'intérieur de la cavité de la β -cyclodextrine (H-3, H-5) voient leur environnement électronique modifié du fait de la présence d'une molécule invitée dans la cavité, tandis que les protons localisés à l'extérieur (H-2, H-4 et H-6) de la cavité restent pratiquement inchangés.

La molécule invitée présente quant à elle, des modifications de déplacements chimiques au niveau de la plupart de ses protons. On peut considérer, en première approximation, que la molécule cage constitue le solvant de la molécule invitée [8].

I.10.3. Spectroscopie infrarouge (IR)

Lors de la formation du complexe d'inclusion, les interactions entre le principe actif et la cyclodextrine vont modifier les modes de vibration. On peut alors observer un déplacement ou une modification de l'intensité des bandes caractéristiques des cyclodextrines et des groupements fonctionnels de la molécule invitée qui s'inclue dans la cyclodextrine par spectrométrie FT-IR [5].

I.10.4. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X permet d'observer un changement du réseau cristallin lors de la formation d'un complexe. En général, on observe la disparition ou la diminution des raies de diffraction du principe actif synonyme, d'une perte de cristallinité et donc d'une possible complexation [5].

I.10.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie à balayage électronique MEB ou SEM en anglais (scanning electron microscopy) est souvent utilisée pour observer le changement de morphologie de la molécule invitée lorsqu'elle est encapsulée dans une cyclodextrine [5].

I.10.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse ATG donne des informations sur la formation de complexe d'inclusion entre les cyclodextrines et certaines molécules invitées [8].

Le spectre d'une molécule en thermogravimétrie présente des points caractéristiques en fonction de la température : point de fusion, d'ébullition et de sublimation, représentant le passage à différents états : état amorphe, état cristallin, état de fusion. Quand deux molécules s'associent pour former un complexe, on observe un déplacement de ces points vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors une disparition dans l'intervalle de température où la CD est décomposée [6].

I.10.7. Test de dissolution

La dissolution est l'un des plus importants tests pharmacotechniques, il simule le comportement (dissolution) du médicament (complexe) *in vitro*, voir l'amélioration de la solubilité du PA. L'essai de dissolution se fait à l'aide d'un appareillage appelé « dissolutest ». Les échantillons sont placés dans des bacs contenant un volume ne dépassant pas 1000 ml du milieu de dissolution et le pH est généralement compris entre 1,2 et 7,4 (pH des différents milieux physiologique).

La vitesse d'agitation est, généralement comprise entre 50 à 100 tr/min, et la température est maintenue à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ [23], après un temps (t) ou/et des temps (t1, t2,..) fixés par la pharmacopée ou la monographie, des prélèvements des échantillons sont effectués, puis quantifiés après filtrations. Ainsi il serait possible de voir *in vitro* si une amélioration de solubilité est obtenue.

I.11. Application des cyclodextrines

I.11.1. Domaine pharmaceutique

Les cyclodextrines sont des molécules intéressantes pour la formulation des médicaments, c'est pourquoi elles sont couramment utilisées dans le domaine de la technologie pharmaceutique. Les principales applications de ces excipients résident dans leur capacité à solubiliser des substances actives peu solubles en milieu aqueux et à améliorer potentiellement la biodisponibilité des molécules hydrophobes. Elles permettent parfois d'augmenter la stabilité, de diminuer la perception du mauvais goût voire les effets indésirables de certains principes actifs. De nombreux complexes à base de cyclodextrines ont été étudiés en solution ou à l'état solide pour être délivrés par différentes voies d'administration [24].

I.11.2. Industrie alimentaire

Les cyclodextrines peuvent notamment être utilisées pour l'encapsulation des arômes. Ces composés volatils peuvent être encapsulés dans le but de limiter leur dégradation ou les pertes durant les étapes de fabrication et de stockage (protection contre l'oxydation, la lumière, la chaleur). On peut également utiliser des cyclodextrines pour enlever ou masquer des composés conférant une odeur ou un goût désagréable mais aussi pour enlever le cholestérol de produits d'origine animale comme les œufs et les produits laitiers [24].

I.11.3. En cosmétique

En cosmétique, elles sont utilisées comme supports et stabilisants de parfums [8]. Les cyclodextrines sont aussi utilisées dans la formulation de produits de beauté, car elles permettent d'augmenter la stabilité de nombreuses substances telles que les huiles essentielles, les acides gras, l'acide ascorbique et les colorants ; en augmentant leur stabilité. Les cyclodextrines peuvent également masquer l'odeur désagréable du gluconate et d'ammonium (utilisé dans des laques), et l'iode (utilisé dans l'antiseptique) [24].

I.11.4. En agriculture

L'inclusion des cyclodextrines avec des insecticides, fongicides, herbicides, peut protéger ces substances de la décomposition rapide par la lumière, l'oxygène, ce qui permet la prolongation des effets de ces produits [24].

I.12. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu récolter des informations sur la structure et l'intérêt des cyclodextrines. Ces données récoltées, nous permettrons d'essayer de résoudre notre problématique ; qui est la faible solubilité de nos deux molécules, à savoir la vitamine E et le cholestérol. Ces derniers feront l'objet d'étude poussée dans les prochains chapitres.

II.1.Introduction

La molécule communément appelée « vitamine E » est en réalité un terme générique qui englobe un grand nombre de molécules de structures chimiques assez proches, mais différentes. Elles sont classées en 2 catégories majeures : les tocophérols et les tocotriénols. Ces substances font partie des antioxydants, qui existent sous formes naturelles ou synthétiques.

Dans ce chapitre, nous proposons d'étudier cette molécule d'un côté chimique (découverte, synthèse, caractères physicochimiques, dérivés..) et biologique (effet sur l'organisme, rôle, dégradation, toxicité...).

II.2. Historique

En 1922, l'embryologiste Herbert Evans et son assistante Katherine Bishop, de l'Université de Californie à Berkeley, constatèrent que chez des rats soumis à un régime essentiellement lacté, les femelles peuvent former un fœtus, sauf que ce dernier ne se développe pas. Cependant, les grossesses arrivent à terme quand le régime est supplémenté avec des feuilles de laitue ou du germe de blé [25, 26].

Les deux scientifiques soupçonnèrent l'existence d'un composé lipophile, qu'ils nommèrent 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, montrèrent qu'un composé retiré d'un régime alimentaire induit la stérilité chez les rats mâles. Bennett surnomma ce composé Vitamine E. Elle reçoit aussi le nom de tocophérol, du grec tokos qui signifie progéniture et pherein: porter. Il désigne l'alcool [27, 28]. Les premières préparations de vitamine E furent réalisées à partir de l'huile de germe de blé par EVANS et Oliver Emerson en 1936 [29] et Erhard Fernholz en détermine la structure en 1938. La même année, le Prix Nobel de chimie Paul Karrer réalise la synthèse de l'alpha- tocophérol en mélange racémique [28, 30].

Les propriétés antioxydantes de la vitamine E sont découvertes plus tard et sont à l'origine d'un grand nombre de travaux. Elle est reconnue comme constituant essentiel dans la nutrition de l'homme en 1968 [30, 31].

II.3. Caractéristiques de la vitamine E

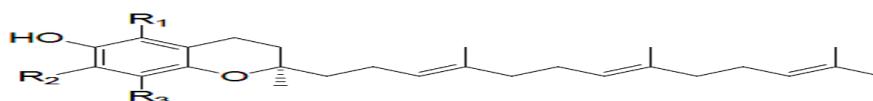
La vitamine E englobe un grand nombre de molécules, elles sont classées en 2 catégories majeures : les tocophérols et les tocotriénols. (Figure II.1). La famille des tocophérols qui comprend 4 substances: l' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol (tableaux II.1) [32,33,34]. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' α -tocotriénol, le β -tocotriénol, le γ -tocotriénol et le δ -tocotriénol [35, 36].

La structure chimique des tocophérols est constituée d'un noyau hydrochromane qui réduit les radicaux libres par la donation d'un atome d'hydrogène et d'une chaîne phytyle entièrement saturée, cette dernière est hydrophobe de sorte que les molécules puissent pénétrer dans les membranes biologiques. Les différentes formes de tocophérols (α , β , γ et δ) se distinguent entre elles par le nombre et la position des groupements méthyles fixés sur le noyau chromanol (tableaux II.1) [37].

Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. Deux de ces produits possèdent également une certaine activité vitaminique : environ 20% pour l' α -tocotriénol et 5% pour le β -tocotriénol. Les autres sont inactifs.



Tocophérol



Tocotriénol

Figure II.1. Structure des tocophérols et tocotriénols [38].

Tableau II.1. Dénomination des différents tocophérols et tocotriénols [34,39].

R ₁	R ₂	R ₃	Nom	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tocophérol	α -tocotriénol
CH ₃	H	CH ₃	β -tocophérol	β -tocotriénol
H	CH ₃	CH ₃	γ -tocophérol	γ -tocotriénol
H	H	CH ₃	δ -tocophérol	δ -tocotriénol

Chaque tocophérol existe sous huit (08) stéréo-isomères différents, le seul stéréo-isomère de l' α -tocophérol retrouvé dans la nature est le RRR- α -tocophérol [38].

En raison de leur caractère lipophile, des tocophérols sont situés dans les membranes ou avec des lipides de stockage où ce sont immédiatement disponible pour agir l'un sur l'autre avec des hydroperoxydes de lipide. Ils réagissent rapidement d'une façon non-enzymatique à la différence de beaucoup d'autres antioxydants cellulaires, qui dépendent des enzymes, aux radicaux de peroxyde de lipide de balayage, c.-à-d. les espèces de chaîne-transport qui propagent la peroxydation de lipide. Dans les systèmes modèles in vitro, tous les tocophérols ($\alpha > \gamma > \beta > \delta$) et les tocotrienols sont de bons antioxydants, avec les tocotrienols étant les plus efficaces [40].

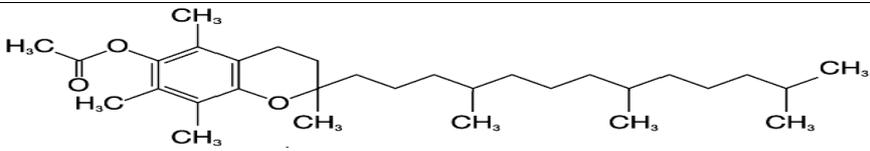
II.4. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

Tous les tocophérols se présentent, à température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle (tableau II.2). Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Ils ont une stabilité élevée en milieu alcalin. Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases [41, 42].

La vitamine E est un exemple d'un antioxydant phénolique. De telles molécules donnent aisément l'hydrogène du groupe d'hydroxyle (l'OH) sur la structure d'anneau aux radicaux libres, qui deviennent alors non réactifs. Au don de l'hydrogène, le composé phénolique lui-même devient un radical libre relativement non réactif parce que l'électron non apparié sur l'atome d'oxygène délocalisé habituellement dans la structure aromatique d'anneau augmentant de ce fait sa stabilité [40].

Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl- α -tocophérol sont relativement stables par rapport à l'oxygène, la lumière ou les U.V [43].

Tableau II.2. Propriétés physico-chimique de dl- α -tocophérolacétate [45, 46, 47, 48].

Nom chimique	2,5,7,8-tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécyloxy)croman-6-ol-acétate
Structure chimique	
Formule chimique	$C_{31}H_{52}O_3$
Masse moléculaire g/ml	472.7
Description	Huiles visqueuses
Spectre d'absorption	max à 284 nm ; min à 254 nm (éthanol)
Viscosité mPas	26600 à 0°C 2120 à 20°C 161 à 60°C
Densité g/m	0.953 à 25°C
Indice de réfraction	n 20/D 1.496
Point d'ébullition	224 °C à 0.3mmHg, 184 °C à 0.01mmHg
Point de fusion	>230 °F
Solubilité en eau g/100 ml	<0.1 à 17 °C

II.5. Propriétés biochimiques et métaboliques de la vitamine E

Le mécanisme d'absorption de la vitamine E est mal connu. Pourtant, on sait qu'il se déroule dans la partie moyenne de l'intestin grêle. Cette absorption est incomplète et seule 50% de la vitamine E alimentaire est absorbée. On sait que les tocophérols sont absorbés en même temps que les acides gras sous la forme de micelles [49].

La fonction naturelle de la vitamine E est d'être antioxydant, elle possède différents rôles au niveau de l'organisme :

- **Vieillessement** : La vitamine E est le meilleur des antioxydants. Elle neutralise les radicaux libres, protégeant ainsi les membranes de nos cellules et assurant un ralentissement du vieillissement de divers organes : les yeux, la peau, la prostate ainsi que les cartilages. La

vitamine E permet également de ralentir l'oxydation des acides gras insaturés participant ainsi au maintien d'un bon état des tissus.

- **Reproduction** : La vitamine E serait un élément obligatoire dans le développement des cellules sexuelles. Indispensable pendant la grossesse, elle participe à l'élaboration des tissus chez le fœtus. Elle exerce une action favorable sur l'activité des glandes génitales et pour cette raison elle fut surnommée « le facteur antisterilitique » [49, 50].
- **Vision** : La vitamine E assure la protection des yeux et donc de la vision.
- **Système immunitaire**: Les tocophérols ont des actions anti-infectieuses en stimulant le système de défense de l'organisme. Ils diminuent le mauvais cholestérol (LDL) et empêchent également les dommages dus à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires. Ils jouent un rôle dans la formation et le maintien des globules rouges dans le sang.

Une carence alimentaire en vitamine E peut provoquer des troubles neuromusculaires ou ophtalmologiques graves [51], elle cause chez le male une stérilité incurable par suite d'une atrophie testiculaire et d'une destruction des cellules germinales et de l'épithélium séminifère. Chez la femelle, il y a mort et résorption des fœtus, mais cette stérilité peut être guérie en administrant à la femelle un supplément riche en vitamine "E" tel que l'huile de germe de blé [50].

II.6. Source de la vitamine E

La vitamine E se retrouve principalement dans les produits végétaux : les huiles, les margarines, les germes des céréales en sont les plus riches, de même que les fruits. Certains produits d'origine animale en contiennent en petite quantité, comme les œufs et la matière grasse du lait. Les apports journaliers recommandés sont de 12 mg / jour. La vitamine E subit de petites pertes (de l'ordre de 20%) lors de la cuisson des aliments.

II.7. Toxicité de la vitamine E

La vitamine E semble ne pas avoir de toxicité et les quantités de 100 à 200 mg d'*all-rac- α -tocophérols* synthétiques sont consommées largement en tant que suppléments.

L'évidence des dommages de pro-oxydant a été associée à l'alimentation de suppléments mais seulement aux doses très élevées (>1000 mg/jour) [52].

II.8. Les dérivés de la vitamine E

Les quatre homologues de tocophérol (d- α -, d- β -, d- γ -, et d- δ -) ont une chaîne latérale saturée de phytyl de 16 carbones, tandis que les tocotrienols (d- α -, d- β -, d- γ -, et d- δ -) ont trois liens doubles sur la chaîne latérale [40].

La forme la plus active est l' α -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les β et γ tocophérols ont une activité vitaminique réduite, respectivement 40 et 15% environ de l'activité de la forme α , alors que le δ est pratiquement inactif. Les tocotrienols ont une activité vitaminique d'environ 20 % pour l' α -tocotrienol et 5% pour le β -tocotrienol, les autres sont inactifs [28]. Les produits que l'on trouve sur le marché sont de trois sortes :

II.8.1. Synthétique

Dans le commerce, la vitamine E se présente généralement soit sous la forme de *RRR*- α -tocophérol, le stéréoisomère naturel, soit sous une forme synthétique, appelée *all-racemic*- α -tocophérol ou *all-rac*- α -tocophérol, qui est un mélange en quantités à peu près égales des huit (08) stéréoisomères de l' α -tocophérol [39,42].

II.8.1.1. Dl- α - tocophérol

Le d-alpha-tocophérol est en effet la première forme de vitamine E synthétique, disponible à partir des années 40 [53] obtenue par une condensation non stéréospécifique entre la triméthylhydroquinone et l'isophytol, au final on a huit stéréoisomères dans des montants approximativement égaux; ces isomères sont différenciés par des rotations de la chaîne de phytyl dans diverses directions qui ne se produisent pas naturellement [54]. Il possède 4 groupements méthyle sur le noyau 6-chromanol (figure II.2). 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 de gel [55].

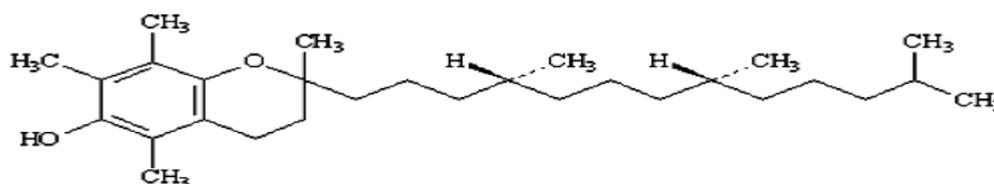


Figure II.2. Structure de l' α tocophérol [56].

II.8.2. Estérifiés

La vitamine E peut exister, sous forme estérifiée. Les esters de cette vitamine s'obtiennent par estérification du groupement hydroxyle en position 6 du cycle chromanol avec de l'acétate, ou encore avec du succinate, du nicotinate ou du phosphate. Ces formes estérifiées ont l'avantage d'être plus stables et moins sensibles à l'oxydation [38].

II.8.2.1. d- α tocophérol succinate acide

La d- α tocophérol succinate acide est une poudre blanche cristalline à blanc cassé, est destiné à être utilisé comme la vitamine E dans : l'industrie alimentaire comme supplément et dans les formulations des produits pharmaceutiques [55].

II.8.2.2. Alpha-tocopherylnicotinate

Le nicotinate d'alpha-tocopheryl est un ester synthétique formé de d1-alpha-tocophérol et d'acide nicotique (figure II.3) [57], il est sous forme d'une poudre blanche, sa formule chimique est $C_{35}H_{53}NO_3$. Ce produit peut-être ajouté dans la majeure partie de produits de beauté, de liquide de rasoir et de shampoing [58].



Figure II.3. Structure de l'alpha tocopherylnicotinate [59].

II.8.3. Mélange de tocophérol

Utilisés comme « antioxydants naturels » sont composés principalement des isomères α , β , γ et δ -tocophérols en des proportions variables [51], ceci a des avantages certains quant à l'efficacité du produit, car les différents composants de la vitamine E ont chacun leur utilité et travaillent en synergie [53]. Ce mélange est disponible sous forme d'huile ou poudre [55].

II.9. Conclusion

Après cette étude, nous voyons bien que le facteur encombrant et gênant pour la vitamine E est sa solubilité, cette carence et le fait que nous voulions étudier son impact sur la congélation et la conservation du sperme (milieux aqueux), nous a poussé à la choisir comme l'un des deux traceurs dans ce travail.

III.1.Introduction

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Dans ce chapitre, nous proposons d'étudier cette molécule d'un côté chimique (découverte, synthèse, caractères physicochimiques, dérivés..) et biologique (effet sur la membrane, rôle, dégradation,...).

III.2. Historique

Le cholestérol fut découvert en 1770 par Poulleter dans les foies putréfiés. Longtemps confondu avec le blanc de baleine, il fut distingué des lipides ou graisse 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, quant on eut reconnu la présence dans ces 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. Des travaux scientifiques spectaculaires, dont certains se poursuivent encore actuellement, ont contribué, principalement après la dernière guerre mondiale, à élucider le mécanisme de sa biogenèse et de sa conversion en acides biliaires et en hormones stéroïdes [60].

III. 3. Caractéristiques du cholestérol

Le cholestérol est le stérol le plus courant dans les membranes. Il est un constituant majeur des membranes plasmiques animales. Selon différentes estimations, 80 à 90% du cholestérol cellulaire total seraient présents dans la membrane plasmique alors que le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales internes en contiennent de très faibles quantités, bien que les proportions relatives varient selon les espèces et les types cellulaires chez les vertébrés, le cholestérol constituerait 30-40 mol% du total des lipides de la membrane plasmique contre 40-60 mol% pour les glycérophospholipides et 10-20 mol% pour les sphingolipides. Un léger caractère amphiphile est conféré au cholestérol par son groupe hydroxyle alors que sa structure cyclique fusionnée lui confère une rigidité supérieure à celle des autres lipides membranaires (FigureIII.1). Il a donc une incidence importante sur les propriétés des membranes [7].

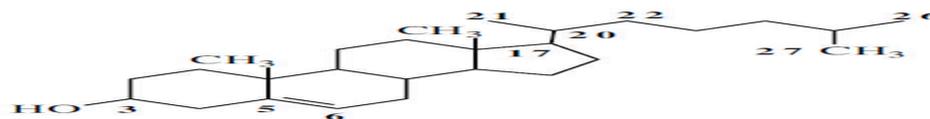


Figure III.1. Structure du cholestérol

Les recherches ont contribué à représenter la structure chimique du cholestérol par une formule développée plane, les principales caractéristiques de cette structure sont : [60]

- La présence de 4 cycles A, B, C, D ;
- Présence d'une fonction alcool en 3 ;
- Présence en 17 d'une chaîne latérale assez longue, à caractère lipophile ;
- Présence d'une double liaison en 5-6.

III.4. Propriétés physico-chimiques du cholestérol

Le cholestérol est sous forme de poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'acétone et dans l'éthanol (Tableaux III.1) Le cholestérol est sensible à l'action de la lumière, ses constantes physiques peuvent varier légèrement avec son origine, à cause de la présence de traces d'impuretés [61].

Tableau.III.1. Propriétés physico-chimiques du cholestérol.

Nom chimique	2,5,7,8-tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécyloxy)propan-6-ol-acétate
Formule chimique	$C_{27}H_{46}O$
Masse moléculaire g/mol	386,7
Description	Poudre cristalline
Masse volumique g/cm^3	1,07 (20 °C)
Point d'éclair °C	250
Point d'ébullition °C	360
Point de fusion °C	147 à 150
Solubilité dans l'eau	Pratiquement insoluble

III.5. Localisation et extraction du cholestérol

Le cholestérol existe chez les animaux supérieurs à sang chaud, mais également chez les reptiles et chez certaines formes inférieures, en particulier chez l'oursin, le ver à soie et même les protozoaires. Mais le cholestérol ne peut plus être considéré comme un stérol

exclusivement animal. Les progrès réalisés en biochimie analytique en permis de détecter de petites quantités de cholestérol chez les végétaux supérieurs, en particulier la pomme de terre. La graisse de laine constitue une matière première industrielle pour son extraction ; elle est saponifiée par les alcalins, le cholestérol libéré est extrait avec un solvant organique dans lequel les savons sont insolubles. Les liqueurs d'épuisement laissent déposer, après distillation, un résidu de cholestérol qui est purifié par cristallisation [60].

III.6. Les produits d'oxydation du cholestérol

Le cholestérol peut s'oxyder par voie enzymatique, par autoxydation ou encore par exposition à la chaleur, à la lumière ou aux radiations. En 1969 plus de 60 produits d'oxydation du cholestérol ont été identifiés (figure III.2), tant dans des milieux naturels comme le plasma sanguin, les extraits de tissus animaux ou les denrées alimentaires que dans les systèmes modèles, plusieurs études ont impliqué les produits d'oxydation du cholestérol (les oxystérols), en particulier le 25-hydroxycholestérol et le 3 β , 5 α , 6 β -cholestanetriol. Lors d'étude expérimentales certains de ses composés ont également montré des activités biologiques indésirables comme des effets inhibiteurs d'enzyme lors de la biosynthèse du cholestérol ainsi que des effets mutagènes et cytotoxiques [62].

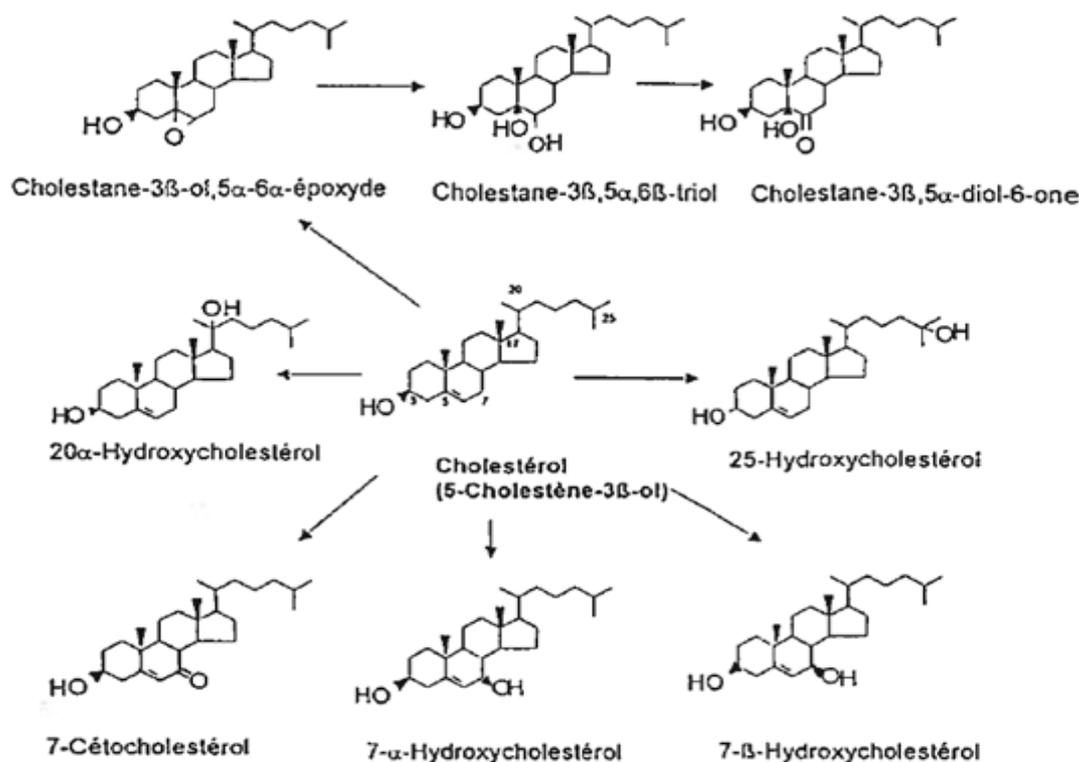


Figure III.2. Structure de quelques produits d'oxydation du cholestérol [62].

L'analyse des oxystérols dans les denrées alimentaires a donc fait l'objet d'une attention toute particulière durant ces quinze dernières années. Ils ont été détectés dans divers aliments d'origine animale, tels que les produits laitiers, poudres d'œuf, viandes et poissons. Certains procédés de fabrication comme un chauffage à haute température et certaines conditions de stockage telles qu'un entreposage de longue durée ou une exposition à la lumière peuvent favoriser leur formation [62].

III.7. Le cholestérol et la membrane

Le cholestérol a des effets multiples sur les membranes, il stabilise la membrane, réduit sa perméabilité et, faciliter des caractéristiques morphologiques de membrane. Il peut aussi permettre des interactions cellule-cellule, influencer la phase de transition de la membrane, fournir les micro-environnements appropriés (produit chimique et/ou examen médical) pour les protéines associées à la membrane et servir d'antioxydant de membrane.

Le rapport du cholestérol au phospholipide est une cause déterminante importante de la fluidité et de la stabilité de membrane à basse température. Le cholestérol module la fluidité des membranes par l'interaction avec des chaînes grasses d'acyle des phospholipides et maintient les phospholipides dans un arrangement aléatoire et lamellaire pendant que la température diminue.

Dans des membranes modèles, l'augmentation du rapport du cholestérol au phospholipide élargit la phase de transition, réduit la fuite de membrane et les séparations de ses phases.

Par conséquent, le traitement du sperme avec du cholestérol avant la cryopreservation pourrait réduire la sensibilité des membranes du sperme aux dommages de refroidissement, en éliminant ou en réduisant la séparation de phase latérale des lipides [1].

III.8. Conclusion

Suite aux différentes fonctions du cholestérol, ainsi que sa faible solubilité en milieux aqueux, on a choisis de l'utiliser comme un deuxième traceur dans ce travail.

IV.1. Introduction

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

IV.2. Historique

La congélation du sperme est une méthode ancienne. En 1776, SPALLANZANI avait réalisé une fécondation artificielle sur des œufs de grenouille et avait démontré le caractère indispensable de la semence mâle [64]. Reprenant les travaux de ce dernier et de MONTEZZA (1866) qui avait découvert que le froid immobilise les spermatozoïdes et que ceux-ci retrouvent une mobilité au réchauffement, Jean ROSTAND (1950) avait montré le rôle cryoprotecteur du glycérol rendant possible la congélation et la conservation sous l'azote des spermatozoïdes d'ovins et de bovins [65].

IV.3. Caractéristiques des spermatozoïdes

IV.3.1. Le sperme

Le mélange des liquides séminal et prostatique, des sécrétions des testicules et de celles des glandes de Cowper compose le liquide spermatique dans lequel baignent les spermatozoïdes lors de l'éjaculation [66].

IV.3.2. Les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes, porteurs de la contribution masculine au génome du nouvel être, sont des cellules ayant pour but unique de féconder l'ovocyte [67]. Les spermatozoïdes se développent, à l'intérieur des tubules séminifères des testicules, à partir de cellules souches lors de la spermatogenèse [64].

IV.3.2.1. La morphologie du spermatozoïde

Les spermatozoïdes sont composés de deux régions hautement spécialisées: la tête et le flagelle (figure IV.1). Ces composantes sont enveloppées de la membrane plasmique [64].

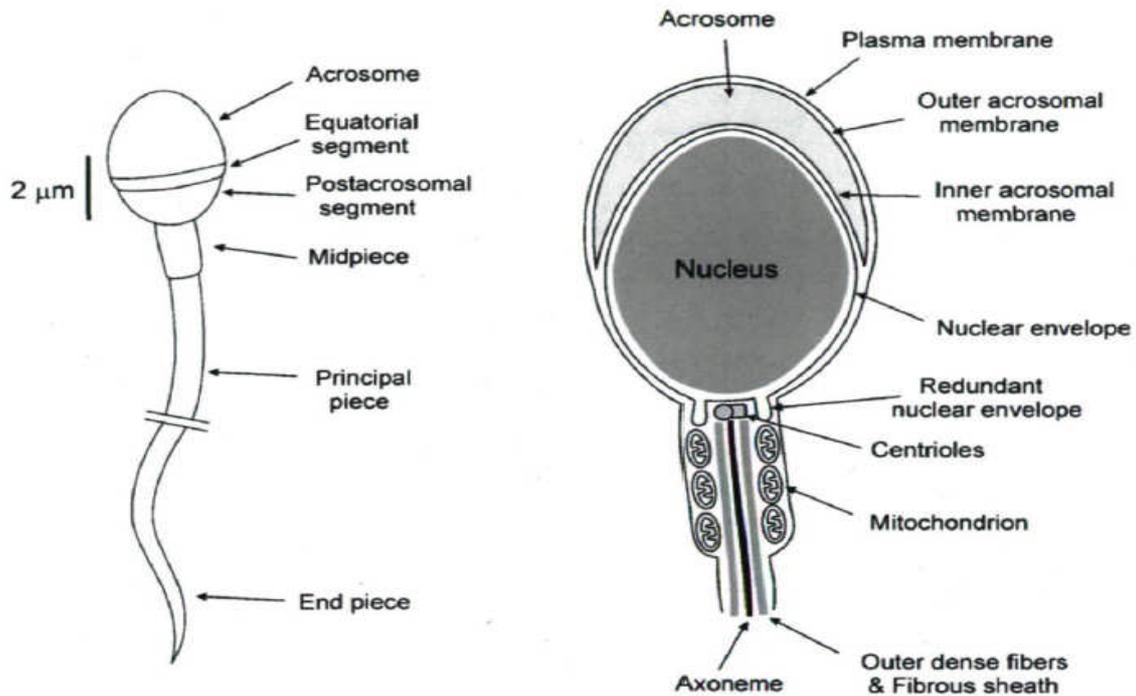


Figure IV.1. Représentation schématique d'un spermatozoïde [64].

La tête est formée d'un noyau, surmonté d'un acrosome conique à structure granuleuse. Sur ce noyau une vésicule acrosomique contenant le stock enzymatique nécessaire à la digestion des membranes de l'œuf au cours de la fécondation [68].

La pièce intermédiaire se prolonge par un flagelle (queue) est responsable du mouvement et du transport des gamètes mâles. Le flagelle peut être divisé en quatre régions soit la pièce connective (cou), la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale [64].

IV.3.2.2. 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) [69]. Un sperme mobile est nécessairement vivant, mais le contraire n'est pas tout le temps vrai [70].

IV.3.2.3. Viabilité

Le taux de survie est le rapport entre le pourcentage des spermatozoïdes vivants normaux (Vn%) mesuré sur le pourcentage de sperme après décongélation et le pourcentage Vf du sperme frais [71].

IV.4. Récolte du sperme

Comme nous avons eu l'opportunité et la chance de travailler sur 3 model spermatiques différent à savoir, le sperme aviaire, du lapin et du bovin, nous avons décidé de faire un petit rappel sur les différentes méthodes de récolte de ce dernier.

IV.4.1. Méthode de récolte du sperme chez le coq

Chez le coq, l'absence de pénis développé rend en effet difficile la récolte du sperme, de plus la saleté des plumes pendant la collecte menace la capacité de fertilisation [72]. Les coqs doivent être au minimum âgés de 32 semaines [73].

La collecte du sperme du coq implique la méthode de massage abdominale, On frotte doucement sur l'arrière des ailes vers la queue. Le mâle répond par l'érection du phallus, lorsque le traiteur serre doucement, le cloaque sécrète le sperme par les papilles externes [1]. Les semences récoltées sont mélangées et maintenues à la température ambiante jusqu'à traitement [74].

IV.4.2. Méthode de récolte du sperme chez le lapin

Le sperme de lapin est rassemblé à l'aide d'un vagin artificiel rempli d'un liquide chaud (environ 45°C). Une daine est équipée de ce dispositif et présentée au mâle. Quelques auteurs ont rapporté que la stimulation précédente du mâle augmente la concentration de sperme, et elle peut aider à laisser précédemment une daine sur le camp du mâle pendant plusieurs minutes. Le type de vagin artificiel influence l'adaptation du mâle à la collection.

Un vagin avec un orifice plus large de collection facilite l'adaptation. Un vagin artificiel différent devrait être utilisé pour chaque collection. Il y a généralement beaucoup de contamination bactérienne à partir de l'environnement et il est important de rassembler l'échantillon de sperme dans des conditions hygiéniques [75].

IV.4.3. Méthode de récolte du sperme épидidymaire du bovin

Après abattage, les gonades sont transportées au laboratoire en respectant les conditions suivantes :

- Après abattage les gonades doivent être transportées en respectant la plus court durée possible entre l'abattage - récolte de la semence et tous ça une température ambiante.

- Après la collecte on va isoler le testicule du scrotum et l'épididyme du testicule et d'autres tissus.
- Puis on isole l'épididyme
- L'épididyme des deux testicules est disséqué.
- Le tissu conjonctif est soigneusement séparé de l'épididyme.
- L'épididyme est rincé avec l'alcool à 70% 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 efférent et qui va pousser le sperme vers la sortie du canal déférent.
- Les spermatozoïdes récupérés seront placés dans un tube de 15 ml [76].

IV.5. La cryopréservation des spermatozoïdes

La cryopréservation de la semence a l'avantage de conserver et de préserver le pouvoir fécondant de la semence pendant plusieurs jours voire même des années. De plus, une fois congelée la commercialisation et le transport de la semence est grandement facilitée. L'industrie de l'insémination artificielle a mis au point un procédé de congélation limitant les dommages causés aux spermatozoïdes [64]. La congélation du sperme permet le ralentissement des phénomènes biologiques, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées : le temps cellulaire est suspendu [77]. Pour protéger et nourrir les spermatozoïdes durant la congélation, il est très important de prendre en considération les points suivants :

IV.5.1. Dilution

Les diluants sont des solutions salines tamponnées utilisés pour étendre le sperme, maintenir la viabilité de spermatozoïdes *in vitro*, car le sperme de volaille est visqueux et très concentré. Les diluants sont basés sur la composition biochimique du sperme de coq [1].

Il existe de nombreux diluants disponibles pour le sperme de volaille, comme le lait, lactose, saccharose, raffinose, d'autres contenant des agents protecteurs tel que le jaune d'œuf, et d'autres substances comprenant des antioxydants (les vitamines) [78].

IV.5.2. Cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs, sont des composés organiques qui pénètrent dans la cellule pour la protéger pendant la conservation. Ces substances protègent les lipides membranaires et limitent les effets de cristallisation de l'eau [77]. Le choix du type de cryoprotecteur est très important pour avoir une bonne conservation du sperme, il existe plusieurs types de

cryoprotecteurs tels que le glycérol, diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylacétamine (DMA) et les cyclodextrines [79].

IV.6. Les étapes de la technique de congélation de sperme

IV.6.1. La phase de refroidissement

La préparation des spermatozoïdes à la congélation a généralement lieu à 4°C, le sperme étant dilué et additionné d'un ou plusieurs cryoprotecteurs, tels que le glycérol. Ces cryoprotecteurs pénètrent dans les spermatozoïdes et permettent d'évacuer l'eau de l'intérieur des cellules vers l'extérieur, ce qui empêche la formation des cristaux volumineux pendant la congélation [80].

IV.6.2. La phase de conditionnement

Les spermatozoïdes dilués et refroidis sont emballés dans des paillettes de 0,25 ou 0,5 ml. La quantité de spermatozoïdes se situe autour de $10\text{-}20 \times 10^6$ par paillette, ce qui permet d'obtenir des taux de conception acceptables in vivo [64]. Après avoir rempli les paillettes avec la semence, il faut former une bulle d'air à l'intérieur des paillettes pour éviter leur éclatement lors de la décongélation [81].

IV.6.3. La phase de congélation

Les paillettes, sont placées dans un congélateur biologique pour les congelés de 5 à -35 °C à 7 °C/minute, puis plongées dans l'azote liquide de -35 à -140 °C à 20 °C/minute [79]. Tout au long de ce processus, le refroidissement des échantillons est réalisé selon une courbe de refroidissement optimale qui est nécessaire pour la survie cellulaire. Un refroidissement trop rapide risque d'entraîner la formation de micro cristaux (nucléation) de glace intracellulaire dommageable pour la cellule. Tandis qu'un refroidissement trop lent expose les spermatozoïdes à s'équilibrer avec la solution provoquant une augmentation de la concentration en sel, de l'os molarité et du pH [64].

IV.6.4. La phase de décongélation

C'est la phase finale de la technique, elle est également une étape critique pour la survie, la motilité et la capacité à féconder des spermatozoïdes cryopréservés. Une décongélation rapide de la semence est préférable afin de prévenir la possibilité de recristallisation des molécules d'eau pouvant être très dommageable pour la membrane. La décongélation consiste à plonger les paillettes dans un bain d'eau dont la température et la période varie d'une espèce à une autre [64].

IV.6. Conclusion

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

V.1. Introduction

Pour être optimal dans notre travail, nous avons recensé les travaux déjà effectués sur la formation de complexe de cyclodextrines avec le cholestérol et la vitamine E, que nous avons divisé en deux parties.

V.2. Travaux antérieurs

V.2.1. Travaux effectués sur la complexation du cholestérol par les cyclodextrines

En 1999, S. K. Rodal et ses collaborateurs ont étudié l'importance du cholestérol dans l'endocytose en utilisant méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) pour extraire de manière sélective le cholestérol de la membrane plasmique. Le traitement par la M β CD a fortement inhibée l'endocytose de la transferrine et EGF, alors que l'endocytose de la ricine a été moins touchée. L'immunomarquage quantitative a montré que les récepteurs de la transferrine ont été concentré dans les fosses recouvertes au même degré (environ sept fois) après traitement par la M β CD que dans les cellules témoin. Leurs résultats indiquent donc que bien indépendamment de la clathrine endocytose fonctionne toujours après l'élimination de cholestérol [82].

En 2007, E. M. HAN et ses collaborateurs ont réalisé une étude afin d'optimiser les différentes conditions pour la β -cyclodextrine réticulée en utilisant de l'acide adipique pour l'élimination du cholestérol dans la crème. Pour cette étude différents facteurs ont été mis en jeu : la concentration en β -CD, la température de mélange, le temps et la vitesse de mélange. La β -CD réticulée a été préparée avec de l'acide adipique. Lorsque la crème a été traitée avec 10% de la β -CD réticulée, l'élimination du cholestérol était plus élevée à 90,7%, qui n'était pas significativement différente de traitements avec 15% et 20% de la β -CD réticulée. L'élimination du cholestérol a été fortement influencée par la température de mélange, le temps et la vitesse de mélange. Après élimination du cholestérol à partir de crème, la β -CD réticulée utilisée a été lavée pour la dissociation du cholestérol et réutilisation. Par conséquent, l'étude a montré que les conditions optimales pour l'élimination du cholestérol à l'aide β -CD réticulée étaient par l'ajout de 10% de β -CD, avec un temps de mélange de 30 min et une vitesse de 1400 tours par minute à 40°C avec plus de 90% d'élimination de cholestérol [83].

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

sperme traité avec du 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrine préalablement à la congélation donna un plus grand pourcentage de spermatozoïdes mobiles (62%) par rapport au témoin (43%) après décongélation. En outre, les échantillons traités avec de la méthyl- β - Cyclodextrine présentaient des pourcentages de spermatozoïdes mobiles et viable similaires aux échantillons traités avec la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine. La concentration du CLC optimisée dans ce travail, était de 2mg CLC/ 120×10^6 spermatozoïdes. L'ajout de 2mg CLC a non seulement maintenu des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles par rapport aux échantillons de contrôle, mais aussi des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles au cours d'une incubation de 3 h après la décongélation. En conclusion, le traitement du sperme de bélier avec les CLC augmente le taux cryopréservation des spermatozoïdes et de la longévité des spermatozoïdes après décongélation [1].

V.2.2. Travaux effectués sur la complexation de la vitamine E par les cyclodextrines

En 1995, Q. X. Guo et ses collaborateurs, ont travaillé sur le complexe d'inclusion du rétinol et l'acide rétinoïque avec β - cyclodextrine (β -CD) et la méthyl β - cyclodextrine (DM- β - CD). La constante d'association (k) obtenu entre la vitamine A et le DM- β -CD fut plus grande qu'avec β -CD. Des mesures des absorbances UV-vis ont montré que des complexes d'inclusion de la vitamine A avec β -CD et DM- β -CD furent formés. Puisque la cavité de DM- β -CD est plus attractive que celle de β -CD, la vitamine A, a formé des complexes d'inclusion plus stables avec le DM- β -CD [84].

En 1997, Astrid M et ses collègues, ont étudié la séparation et caractérisation des isomères *cis-trans* de l' α -tocotriénol par HPLC en utilisant une phase stationnaire perméthylée de β -cyclodextrine.

Le comportement de α , β , γ et δ -tocotrienols durant l'analyse chromatographique (HPLC) fut étudiée en utilisant comme phase stationnaire la β -cyclodextrine perméthylée.

Chacun des tocotriénols injectés séparément ont montré quatre (04) pics. Les quatre composants d' α -tocotriénol furent identifiés par microscopie à balayage, RMN et FTIR [85].

En 2009, Y. Watanabe et ses collaborateurs ont étudié l'effet suppressif de α -tocophérol complexé avec la β -Cyclodextrine sur l'oxydation du linoléate méthylique.

Le α -tocophérol complexé avec β -cyclodextrine a été préparé et son effet suppressif sur l'oxydation du linoléate méthylique a été cinétiquement examiné en utilisant le model de Weibull. L'effet suppressif des complexes de l' α -tocophérol sur l'oxydation de linoléate méthylique fut justifié par la protection du α -tocophérol par son inclusion par la β -cyclodextrine et au dégagement progressif du l' α -tocophérol du complexe d'inclusion [86].

En 2011, Y. Sueishi et ses collaborateurs ont travaillé sur la caractérisation du complexe d'inclusion (vitamine E/DM- β -CD) et la détermination de l'effet anti-oxydant. Le complexe d'inclusion a été caractérisé par RMN. Les résultats obtenus suggèrent que la DM- β -CD inclut la partie latérale de la chaîne de l' α -tocophérol. En se basant sur les résultats obtenus, le mécanisme de la réaction antioxydante de la vitamine E avec le radical RO• est discuté [87].

En 2011, Yano T et ces collaborateurs ont étudié l'effet sur la disponibilité biologique et l'activité anticancéreuse dutocotriénol (T3) parl'administration orale du complexe d'inclusion de γ -tocotriénol avec γ -cyclodextrine (CD). L'effet de l'inclusion de γ -tocotriénol (T3) par β -cyclodextrine (CD) dans des tissus tumoraux, la croissance de la tumeur et les niveaux relatifs d'ADN messenger ont été examinés, en utilisant les cellules des souris (MSTO-211 H). Le niveau du facteur de croissance endothélial vasculaire d'ADN messengerde la tumeur du groupe γ T3/CD était plus bas que celui dans le groupe T3. Cette étude a démontré que la biodisponibilité biologique du γ T3 est améliorée par une administration orale d'un complexe d'inclusion de γ T3 avec la cyclodextrine. En outre, l'amélioration de la biodisponibilité biologique a contribué in vivo à l'augmentation de l'activité anticancéreuse du γ T3 [88].

VI.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons résumer les protocoles analytiques suivis ainsi que le matériel utilisé durant la partie pratique de notre travail.

VI.2. Pré-développement de la méthode de quantification

Afin de pouvoir quantifier le cholestérol dans notre mélange (complexe d'inclusion), nous avons mis au point une méthode de dosage par UV-visible, que nous avons pré-validée. Pour cela nous avons effectué une suite d'analyse résumée ci-dessous.

VI.2.1. Absorbance du cholestérol dans l'éthanol

VI.2.1.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières premières**

- Cholestérol (Université de Rouen)
- Ethanol (95%) (BioChem).

➤ **Appareillage**

- Balances analytiques (Denver) ;
- Spectroscopie UV-Visible (Optizen).

VI.2.1.2. Méthode

Pour déterminer la longueur d'onde maximale du cholestérol, nous avons fait un scanning (balayage) par UV-visible entre les longueurs d'onde : 200 nm et 500 nm avec un pas de 10 nm. Les échantillons sont de concentration $C = 0,25$ mg/ml préparés de l'éthanol.

VI.2.2. Spécificité

VI.2.2.1. Matières premières et matériel utilisé

➤ **Matières premières :**

- β -CD. (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChemChemopharma);

➤ **Appareillage**

- Balances analytique (Denver) ;
- Spectroscopie UV-Visible (Optizen).

VI.2.2.2. Méthode

Nous avons préparés différentes solutions (CD, Chl et mélange CD-Chl). Puis nous avons fait passer ces échantillons, par un balayage entre les longueurs d'onde : 200 nm et 500 nm avec un pas de 10 nm.

VI.2.3. Linéarité

VI.2.3.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières premières**

- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChemChemopharma).

➤ **Appareillage**

- Balance analytique(Denver) ;

VI.2.3.2. Méthode

Nous avons étudié sept solutions préparées à partir d'une solution mère à 0,25 mg/ml (dans de l'éthanol) (tableau VI.1) ; les absorbances correspondantes à chaque solution sont mesurées à $\lambda = 512\text{nm}$.

Tableau VI.1. Différentes concentrations du cholestérol dans l'éthanol.

Echantillon	C	D	E	F	G	H	I
Volume de A (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Volume de B (ml)	1	1,5	2	3	5	7	9
Concentration de cholestérol g/l	0,20	0,17	0,17	0,16	0,13	0,11	0,12

Tel que :

A : solution mère à C=0,25 mg/ml (15mg de cholestérol dans 60ml d'éthanol).

B : éthanol.

VI.3. Diagramme d'Higuchi

VI.3.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ **Matières premières :**

- Cholestérol (Fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen).
- HPβ-CD (Fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen).

➤ **Appareillage**

- Balance analytique (Denver) ;
- Plaque agitatrice multiposte (VELP scientifica) ;

VI.3.2.Méthodes

Pour réaliser le diagramme de solubilité selon Higuchi et Connors ; nous avons ajouté 20 mg de cholestérol à des solutions de 8 ml de concentrations croissantes de Hpβ-CD (tableau VI.2), puis nous les avons placés sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 jours.

Tableau VI.2. Différentes quantités de Hpβ –CD et cholestérol.

Echantillon N°	Eau	1	2	3	4	5	6
Masse Hpβ-CD (mg)	0	0	357,12	476,16	714 ,24	1428 ,48	3571,2
Masse du cholestérol (mg)	0	20	20	20	20	20	20

- Après 15 jours, nous avons récupéré nos solution, nous les avons laissé décanter pendant une heure environ, puis nous les avons filtré à l'aide de filtres seringues de 0.45 μ m et quantifiées par la méthode enzymatique à longueur d'onde de 512 nm.

VI.4. Préparation des complexes d'inclusion

Nous avons utilisé deux méthodes pour préparer les complexes d'inclusion : le mélange physique, et la Co- évaporation.

Il est important de noter que pour toutes les préparations de complexes nous avons pris comme ratio molaire Chl /CD 1 :2 [1].

VI.4.1. Le mélange physique

VI.4.1.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ Matières premières

- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen);
- Hp β -CD, β CD, M β -CD, PEG 6000 (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).

➤ Appareillage

- Balance analytique (Denver) ;

VI.4.1.2. Méthode

Le mélange physique est préparé comme suit:

- ❖ Peser la masse de cholestérol (voir tableau VI.3) dans un mortier, ensuite ajouter la masse correspondante des différents CDs ;
- ❖ Mélanger délicatement dans un mortier bien sec à l'aide d'un pilon ;
- ❖ Laisser le mélange obtenu se reposer à l'abri de la lumière.

Tableau VI.3. Les quantités des matières premières pour former les mélanges physiques.

CDs	m _{CD} (mg)	m _{Chl} (mg)	Total (mg)
β CD	256.5	175	431.5
M β -CD	300.5	175	475.5
Hp- β CD	336.5	175	511.5
PEG	250	175	425

VI.4.2. Méthode de co-évaporation

VI.4.2.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ Matières premières

- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- HpB-CD (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChemChemopharma).

➤ Appareillage

- Balance analytique (Denver) ;
- Étuve (Binder) ;
- Plaque agitatrice multiposte (VELP scientifica).

VI.4.2.2. Méthode

Le complexe d'inclusion est préparé de la manière suivante:

- ❖ Peser la masse du cholestérol et de la vitamine E dans un bécher (voir tableau VI.4) ;
- ❖ Ajouter la masse des CDs correspondante (voir tableau VI.4) ;
- ❖ Faire dissoudre le mélange dans 50 ml d'éthanol ;
- ❖ Le mélange obtenu est agité pendant 2 heures à l'abri de la lumière ;
- ❖ Placer le bécher dans une étuve pendant 24 heures pour le Chl et 48h pour la Vit E à une température de 90°C ;
- ❖ Récupérer la poudre obtenue et la conserver dans un dessiccateur.

Tableau VI.4. Les quantités des matières premières pour former les complexes d'inclusion.

CDs	β CD	M β -CD	Hp- β CD	PEG (DS)
m _{CD} pour le Chl (mg)	513.0	601.8	673.3	900.0
m _{Chl} (mg)	350.0	350.0	350.0	100.0
Total (mg)	863.0	951.0	1023.0	1000.0
Masse récupérée (mg)	800.1	903.4	960.0	976.3
m _{CD} pour la Vit E (mg)	586.58	794.6	882.34	1350.0
m _{Vit E} (mg)	244.3	282.3	280.3	150.0
Total (mg)	830.88	1076.0	1162.0	1500.0
Masse récupérée (mg)	747.3	937.6	1066.1	1423.3

VI.5. Caractérisation des complexes d'inclusion

Les complexes d'inclusion (Chl/CD) préparés sont caractérisés par : Spectroscopie Infrarouge et diffraction des rayons X (DRX).

VI.5.1. Analyse par spectroscopie IR

VI.5.1.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ Matières premières

- CDs (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- PEG 6000 (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen);
- Quantité suffisante des différents complexes obtenus;
- Bromure de potassium KBr (Biochem).

➤ Appareillage

- Spectroscopie IR (IR Affinity-1) ;
- Presse (SHIMADZU).

VI.5.1.2. Méthode

Les complexes d'inclusion préparés par les différentes méthodes, CDs et cholestérol sont analysés par la spectroscopie IR. Les échantillons à analyser sont préparés sous forme de pastilles KBr.

VI.5.2. Diffraction de rayon X

VI.5.2.1. Matières premières et matériels utilisés

➤ Matières premières

- CDs (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- PEG 6000 (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen);

- Quantité suffisante des différents complexes obtenus ;
- Quantité suffisante des dispersions solides (PEG/chl).

➤ **Appareillage**

- Diffractomètre RX (X-Pert PROPAN analytical).

VI.5.2.2. Méthode

Les échantillons sont mis sous forme de disques de 10 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur. Les enregistrements ont été réalisés à température contrôlée au moyen du diffractomètre RX à 2θ entre 0 et 90°.

VI.6. Application sur model cellulaire (spermatique)

VI.6.1. Conservation et réfrigération du sperme bovin

VI.6.1.1. Matières premières et matériels utilisés

Il est a noté que au cours de notre étude des trois espèces du sperme (aviaire, bovin et.....) on a utilisé les mêmes matières premières et matériels pour la réfrigération et la conservation.

➤ **Matières premières**

- B-CD, Hp-BCD, PM-BCD, PEG (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Vitamine E (Conditionné par Saprothal Ain Benian Alger) ;
- Le cholestérol (Fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Des quantités nécessaires des complexes;
- Tris (Sigma);
- Acide citrique (Sigma);
- D-glucose (Sigma);
- Testicules (bovin) ;

➤ **Appareillage**

- Balance analytique (Adventurer OHAUS) ;
- Réfrigérateur biologique (LG) ;
- Microscope CASA (MiKoneclipse E200) ;

- Plaque agitatrice multiple (VELP scientifica)

VI.6.1.2 Méthode

Le protocole suivi lors de l'utilisation du model spermatique est donné ci-dessous :

- **Préparation du tris buffer (TB):** Dans un bécher nous avons mis 100 ml d'eau distillé avec les quantités correspondantes de tris, acide citrique et de D-glucose qui sont respectivement : 3,025 g, 1,676 g et 1,250 g. Puis nous avons mis le mélange sous agitation jusqu'à dissolution complet de tous les constituants.
- **Préparations des solutions :** Faire les pesées nécessaires pour chacun des échantillons (pour cela nous avons préparé deux séries, la première concerne les complexes à base de cholestérol (tableau VI.5), la deuxième concerne les complexes à base de vitamine E (tableau VI.6) :

Tableau VI.5. Quantités des matières premières et complexes utilisés pour les tests de réfrigération et conservation du sperme bovin.

Echantillon	PMB-CD	B-CD	HpB-CD	PEG 6000	Chl
Masse (mg)	34,5	29,31	38,45	180	20
Echantillon	PEG/Chl	PMB-CD/Chl	B-CD/Chl	HpB-CD/Chl	
Masse (mg)	200	54,34	49,31	58,45	

Tableau VI.6. Quantités des matières premières et complexes utilisés pour les tests de réfrigération et conservation du sperme bovin.

Echantillon	VitE	PMB-CD	B-CD	HpB-CD	PEG 6000
Masse (mg)	1,2	3,37	2,88	3,77	10,8
Echantillon	PMB-CD/VitE	B-CD/VitE	HpB-CD/VitE	PEG/VitE	
Masse (mg)	4,57	4,08	4,97	12	

- ❖ Faire dissoudre chaque échantillon dans un volume $V=5$ ml de TB pour la série à base de Chl et un volume $V=10$ ml de TB pour la série à base de la Vit E
- ❖ Mettre sous agitation jusqu'à dissolution ;

- ❖ Filtrer les solutions à l'aide des micro-filtres (0,45µm).

➤ **Traitement du sperme**

- ❖ Juste après la récolte de la semence, on détermine son volume à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml ;
- ❖ On dilue la semence à 1/5 ;
- ❖ On prélève 0,1 ml de sperme dilué, puis on ajoute 0,1 ml de chaque traitement, au moment de l'analyse on prélève de chacune de ces dernières 10 µl et on lui ajoute 90 µl de tris buffer ;
- ❖ L'analyse s'effectue à l'aide du CASA, à t = 0 min, à 2 heures d'incubation à température ambiante et à 24 heures de réfrigération à T=5°C.

VI.6.2. Réfrigération et congélation du sperme du lapin et du coq

VI.6.2.1 Méthode de réfrigération du sperme du lapin et du coq

- **Préparations des solutions :** On a fait les pesés nécessaires des différents traitements (tableau.VI.7)
 - Faire dissoudre chaque échantillon dans des volumes correspondant de tris buffer ;
 - Filtrer les solutions à l'aide des micro-filtres (0,45µm).

Tableau VI.7. Quantités des complexes et matières premières utilisés pour la réfrigération et congélation du sperme du lapin et du coq.

	1	2	3	4	5
Echantillons	PMB-CD	PMB-CD/vitE	PMB-CD/Chl	VitE	Chl
Masse (mg)	34,5	9,2	54,34	1,2	20
Volume du TB (ml)	5	10	2,5	10	5
Concentrations équivalentes (mg/ml)	6,9	0,92	21,73	0,12	4

NB : On a préparé aussi une 6^{ème} solution qui contient (PMB-CD/VitE) et (PMB-CD/Chl) en mélangeant 2,5 ml de la solution (2) et 2,5 de la solution (3).

➤ **Réfrigération du sperme**

- ❖ Juste après la récolte de la semence, on détermine son volume à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml ;
- ❖ On dilue la semence à 1/5 ;
- ❖ L'analyse s'effectue à l'aide du CASA, à $t = 0$ min, à 2 heures d'incubation à température ambiante et à 24 heures de réfrigération à $T = 5^{\circ}\text{C} \pm 1$.

➤ **Congélation du sperme**

❖ **Matériels**

- Les paillettes de 0,25ml ;
- Une boîte polyester ;
- Azote liquide ;
- Réfrigérateur ;
- Bain-marie.

❖ **Méthode**

- Juste après la récolte on met la semence dans le réfrigérateur pendant 90 minutes à 5°C ;
- Avant utilisation on dilue la semence à 1/5 ;
- On mélange un volume de chaque traitement avec un volume de la semence dilué ;
- On charge les paillettes de 0,25 ml par aspiration à travers le bouchon de l'extrémité ;
- On obture les paillettes par une poudre polyvinylique ;
- On met les paillettes dans le réfrigérateur pendant 45 min à $5^{\circ}\text{C} \pm 1$;
- On analyse la semence qui reste dans le tube à T_0 ;
- Par suite, on place les paillettes horizontalement, sur un support, à une hauteur de 5cm au dessus du niveau de l'azote liquide pendant 10 min, ensuite on les plonge directement dans l'azote liquide à -196°C ;
- On décongèle des paillettes dans un bain d'eau à 50°C , pendant 10 à 12 secondes ;
- A la fin on analyse la semence décongelée à l'aide du SCA.

VII.1. Pré-développement

VII.1.1. Résultats

La figure VII.1, représente le spectre UV-vis du cholestérol dans l'éthanol effectué par balayage (200 à 500 nm).

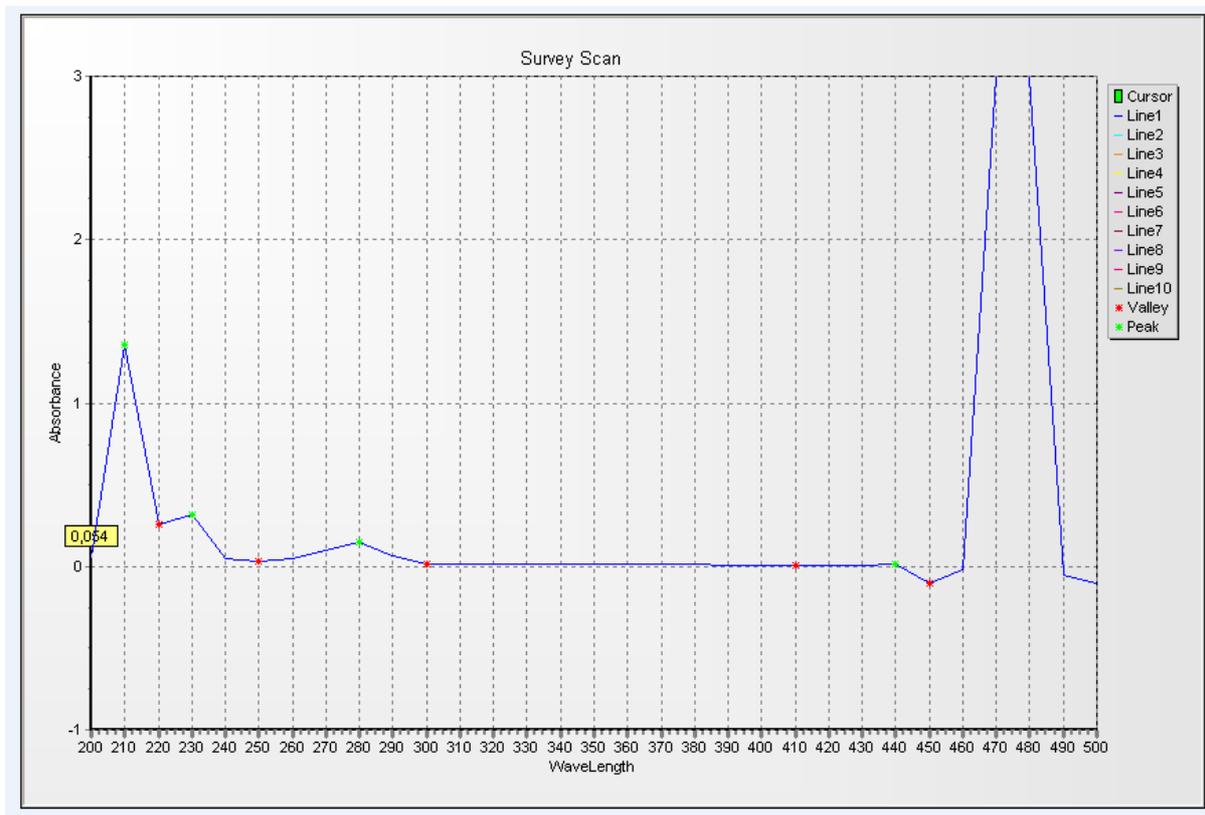


Figure VII.1. Spectre d'absorbance du cholestérol dans l'éthanol.

VII.1.2. Observations

Le cholestérol dans l'éthanol possède trois (03) optimums à $\lambda_1 = 210\text{nm}$, $\lambda_2 = 230\text{nm}$ et $\lambda_3 = 280\text{nm}$ dans la partie UV.

VII.1.3. Interprétations

D'après les résultats obtenus et d'après les longueurs d'ondes recensées dans la bibliographie, notre choix c'est porté sur l'utilisation de l'éthanol comme solvant de base et λ_{max} pour cholestérol = 210 nm.

VII.2. Linéarité

VII.2.1. Résultats

La courbe obtenue lors de l'essai de linéarité est représentée dans la figure VII.2.

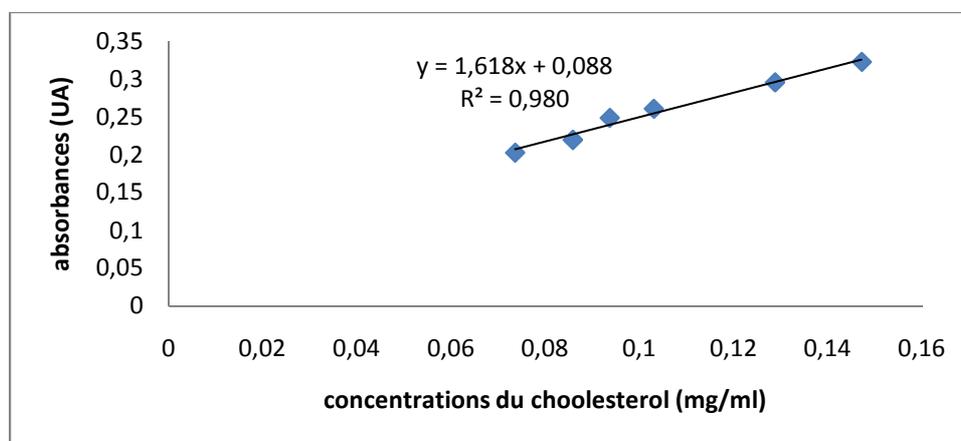


Figure VII.2. Courbe de linéarité du cholestérol.

VII.2.1. Observations

Nous remarquons que la droite des moindres carrés, donnée par le logiciel Excel, donne une équation : de forme $y = ax + b$; Ou : $a = 1,618$, $b = 0,088$. Avec un coefficient de corrélation R^2 acceptable.

VII.2.2. Interprétations

La courbe $Abs = f(C)$ montre qu'il y a une relation proportionnelle entre les absorbances et les concentrations du cholestérol dissoutes. Ceci est justifié par le coefficient de corrélation R^2 qui est égale à 0,980 étant proche de 1.

VII.3. Le diagramme de solubilité (diagramme d'Higuchi)

VII.3.1. Résultats

Tout d'abord, nous avons tracé la courbe d'Higuchi $C_{Chl} = f(C_{CD})$ (figure VII.3) obtenu par la méthode spectrophotométrique UV visible à $\lambda_{max} = 210$ nm.

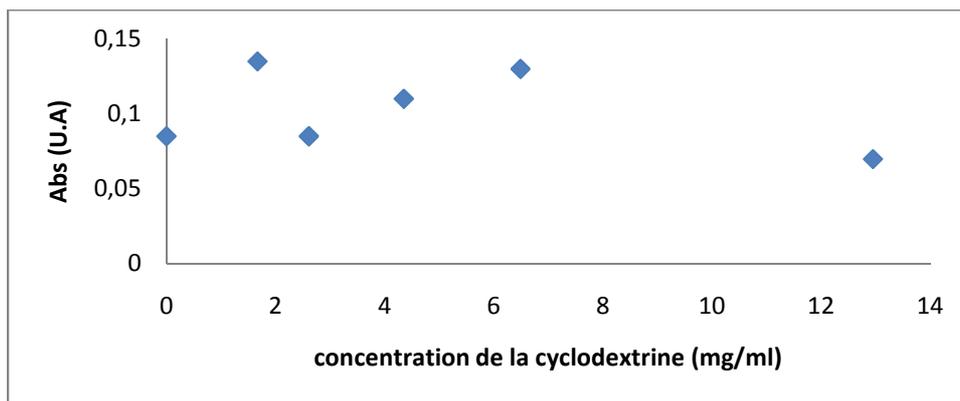


Figure VII.3. Courbe d'Higuchi (Chl /Hp β -CD) par UV- visible.

VII.3.2. Observations

Nous remarquons que les résultats obtenus ne suivent aucune logique. Ce qui nous a poussés à faire un dosage par la méthode enzymatique effectuée en sous-traitance qui est une méthode utilisée avec colorimétrie ou y'a une succession de réaction avec une coloration mesurant par la suite les absorbances. Les résultats obtenus par cette méthode sont représentés dans les figures VII.4.

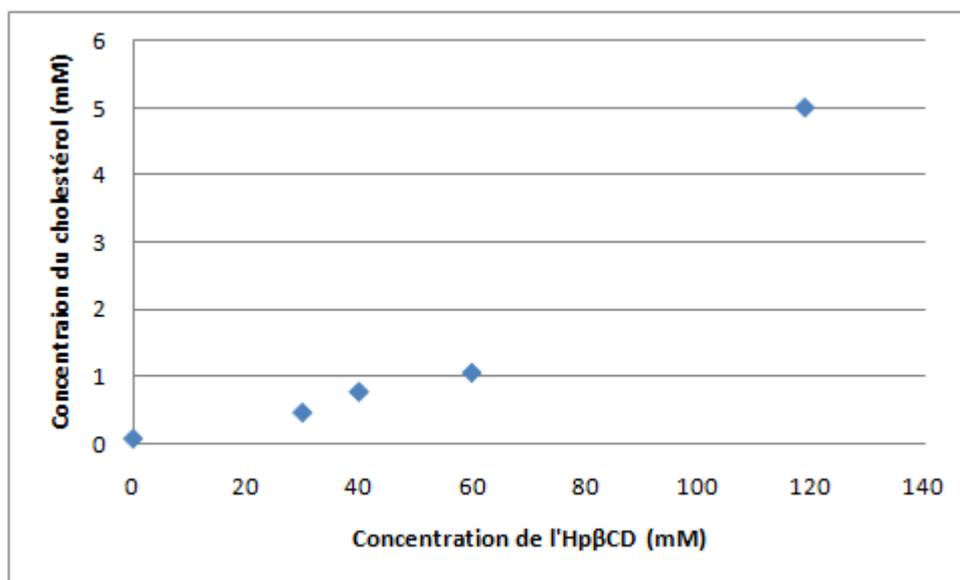


Figure VII.4. Diagramme d'Higuchi (Chl /Hp β -CD).

VII.3.2. Observations

Nous remarquons que nous avons au départ une augmentation linéaire de la concentration du cholestérol en fonction de la concentration de l'Hp β CD qui par la suite, à $C_{\text{Hp}\beta\text{CD}} \geq 60$ mM présente une déviation positive par rapport au profil linéaire.

VII.3.3. Interprétations

Selon Higuchi et Connors, le profil obtenu indique que l'on est en présence d'un profil A_p . Qui est généralement attribué à la formation de complexe 1 :1 en premier lieu et de 2 :1 ou plus en second lieu [5]. En comparant ces résultats à la littérature, on voit bien qu'ils sont similaires [5]. Ainsi pour la suite de nos travaux, nous avons choisi d'utiliser un ratio molaire de 2 :1 (CD : Chl).

La constante de solubilité calculée dans la partie linéaire du diagramme d'Higuchi est de $318,82 \text{ M}^{-1}$. Cette valeur indique qu'il y'a une interaction entre le Chl et Hp β CD, elle est en accordance avec les valeurs moyenne retrouvées dans la littérature (entre 100 et 20000 M^{-1}) [89].

VII.4. Caractérisation des complexes d'inclusion

VII.4.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

VII.4.1.1. Cholestérol

VII.4.1.1.1. Résultats

Les spectres infrarouges des matières premières, complexes d'inclusion, mélanges physique et dispersion dans le PEG sont représentés dans les figures VII.5, VII.6, VII.7, VII.8.

VII.4.1.1.1.1. Complexes β -CD/Chl

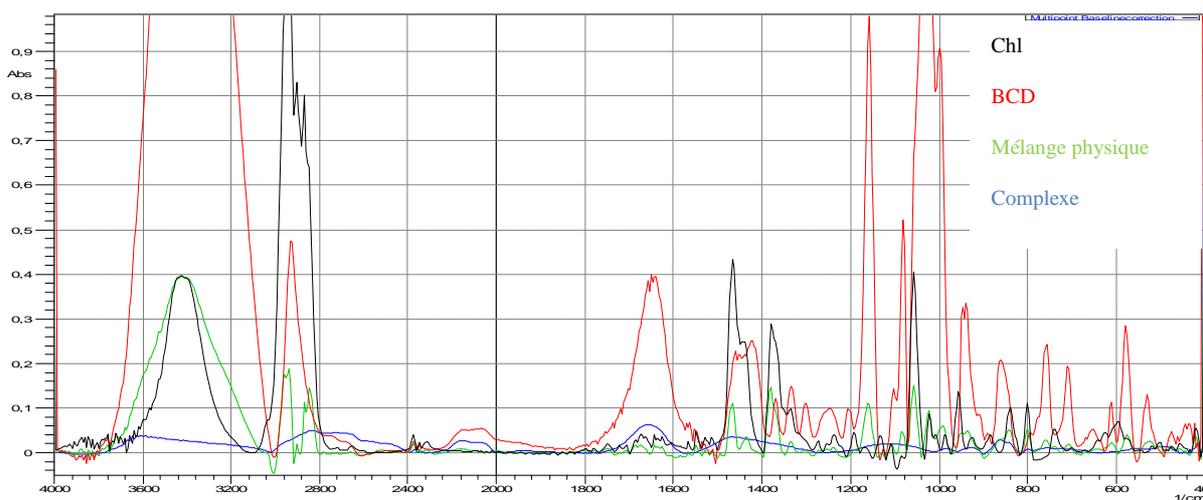


Figure VII.5. Spectre Infrarouge du Chl, β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.

Observations (a)

Pour le cholestérol, on remarque qu'il y'a trois pics caractéristiques $\lambda_1= 3400 \text{ cm}^{-1}$ (liaison O-H liée (liaison hydrogène) qui représente une vibration forte et une bande large), $\lambda_2= 2950 \text{ cm}^{-1}$ (liaison C-H qui représente une vibration de forte intensité de plusieurs bandes), et $\lambda_3= 2850 \text{ cm}^{-1}$ (liaison C-H représentant une forte vibration de plusieurs bandes) qui apparaissent dans le mélange physique, et qui diminuent dans les complexes [90].

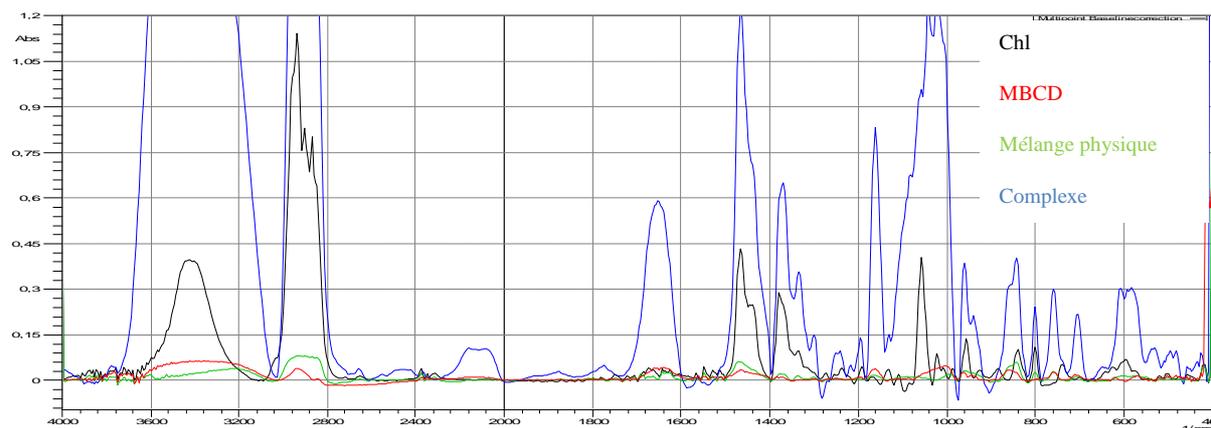
VII.4.1.1.1.2. Complexes M β -CD/Chl

Figure VII.6. Spectre Infrarouge du Chl, M β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.

Observations (b)

Pour le complexe M β CD/Chl on remarque que les deux pics caractéristiques du cholestérol $\lambda_1= 3400 \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_2= 2850 \text{ cm}^{-1}$ persiste, mais qui diminuent dans le cas du mélange physique.

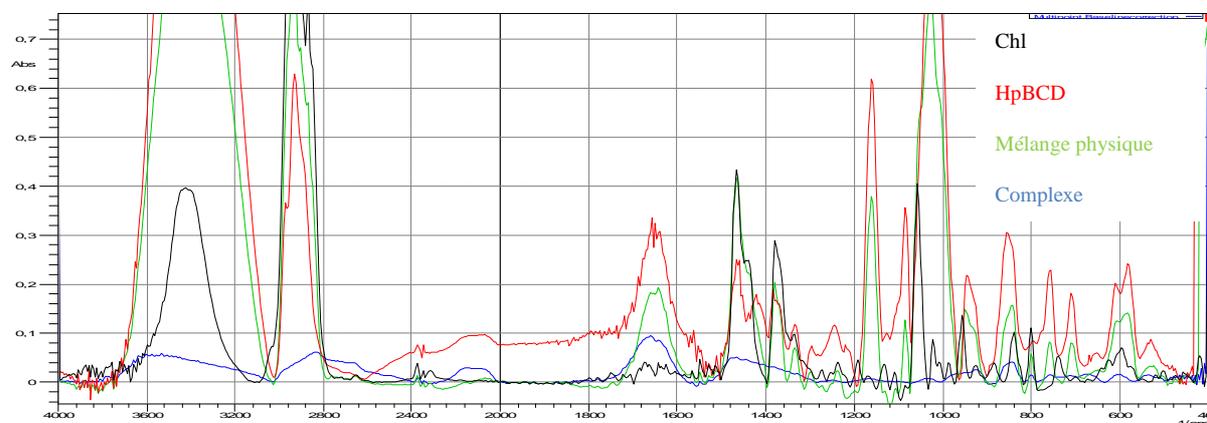
VII.4.1.1.1.3. Complexes H β -CD/Chl

Figure VII.7. Spectre Infrarouge du Chl, H β -CD, de leur mélange physique et de leur complexe.

Observations (c)

On remarque bien que le spectre du mélange physique donne trois pics caractéristiques $\lambda_1=3400\text{ cm}^{-1}$ (O-H), $\lambda_2=2950\text{ cm}^{-1}$ (C-H), et $\lambda_3=1600\text{ cm}^{-1}$ (C-C), qui diminuent en intensité dans le cas du complexe.

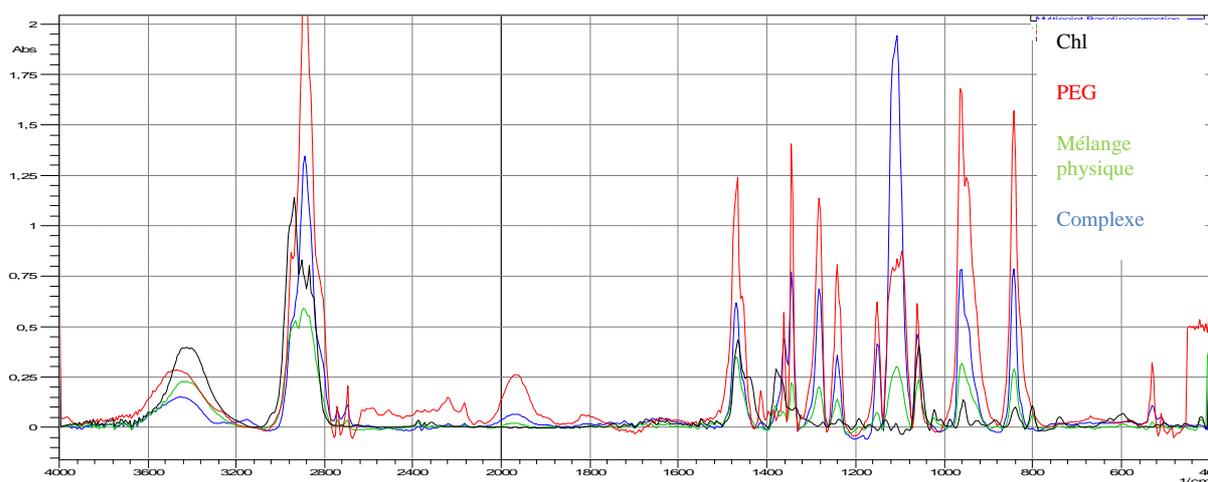
VII.4.1.1.4. Dispersion Chl/PEG

Figure VII.8. Spectre Infrarouge du Chl, PEG, leur mélange physique et leur dispersion.

Observations (d)

On remarque à $\lambda_1=2850\text{ cm}^{-1}$ dans le cas du complexes un pic d'une intensité plus grandes que celui du mélange physique.

Interprétations

Finalement, comme déjà soulevé dans la littérature, l'IR n'est pas la meilleure méthode qui nous permet de prouver l'inclusion, surtout lorsque la molécule invitée présente presque les mêmes groupements que les CDs [90].

VII.4.1.2. Vitamine E**VII.4.1.2.1. Résultats**

Les spectres infrarouges des complexes d'inclusion sont représentés dans les figures VII.9, VII.10, VII.11, VII.12.

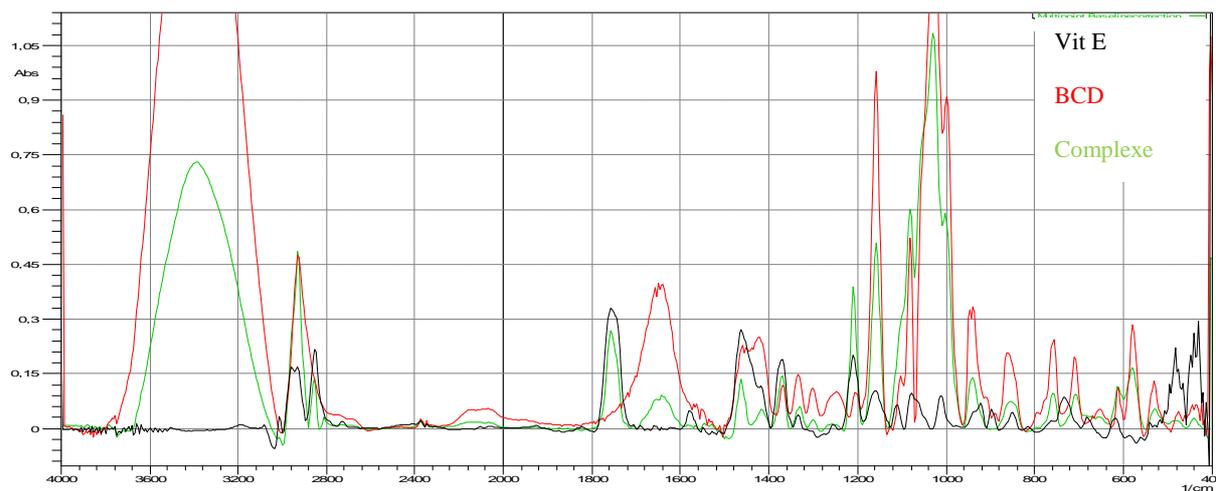


Figure VII.9. Spectre Infrarouge de la Vit E, β -CD et leur complexe.

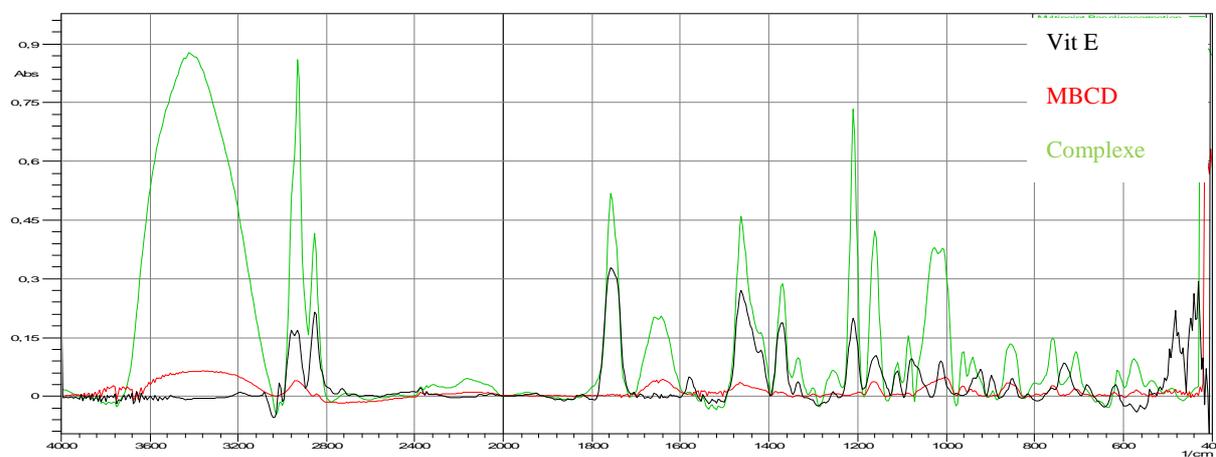


Figure VII.10. Spectre Infrarouge de la Vit E, $M\beta$ -CD et leur complexe.

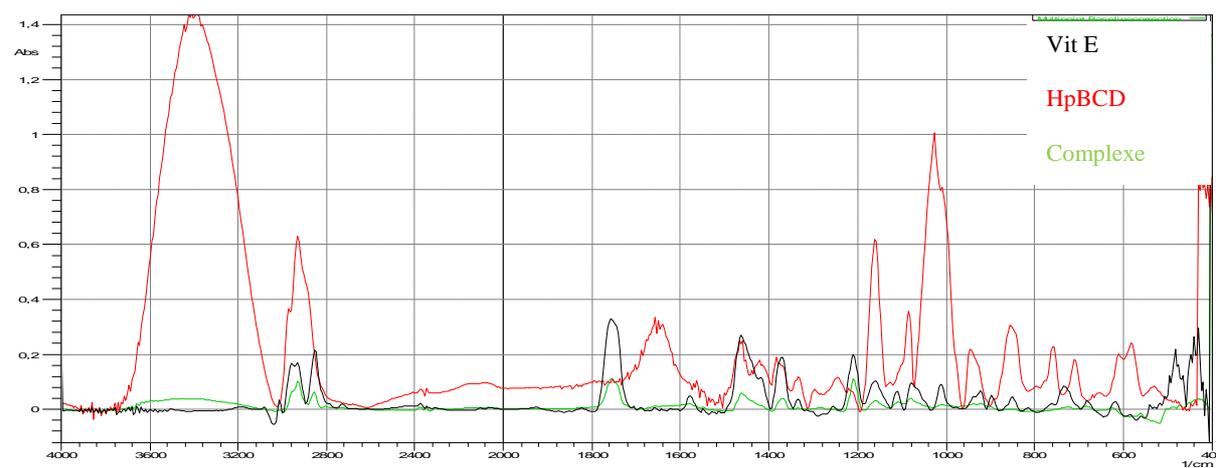


Figure VII.11. Spectre Infrarouge de la Vit E, $H\beta$ -CD et leur complexe.

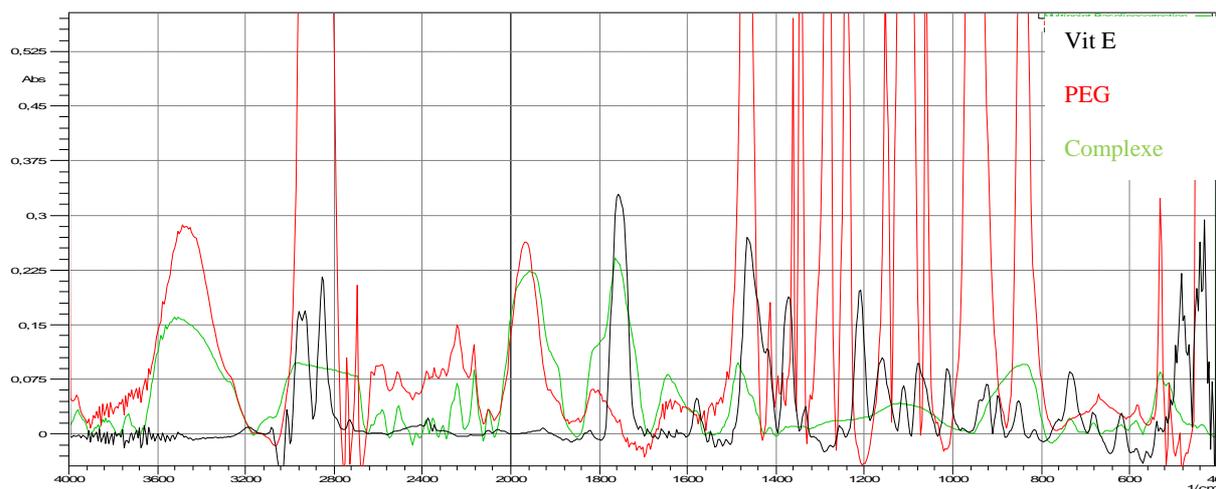


Figure VII.12. Spectre Infrarouge de la Vit E, PEG et de leur dispersion.

VII.4.1.2.2. Observations

Pour le spectre de la vitamine E, on remarque trois (03) bandes caractéristiques à : $\lambda_1 = 2910 \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_2 = 2850 \text{ cm}^{-1}$ (λ_1 et λ_2 représentent des liaisons C-H de forte vibration), et $\lambda_3 = 1750 \text{ cm}^{-1}$ (liaison C=O e forte vibration).

Les spectres des CDs possède trois (03) bandes caractéristiques à $\lambda_1 = 2910 \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_4 = 3350 \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_5 = 1650 \text{ nm}$.

VII.4.1.2.3. Interprétations

On remarque que les molécules hôtes ainsi que la molécule invité, présente globalement les même bandes caractéristiques, ce qui rend l'exploitation des résultats ainsi que leurs interprétations presque impossible.

VII.4.2. Diffraction des Rayons X

VII.4.2.1. Cholestérol

VII.4.2.1.1. Résultats

Les diffractogrammes obtenus sont représentés dans les figures VII.13, VII.14, VII.15, VII.16.

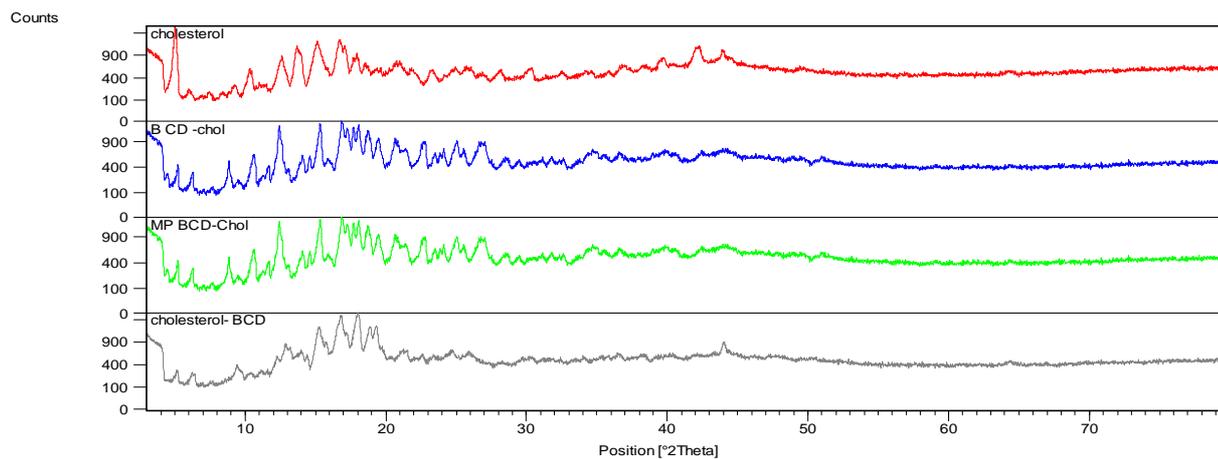


Figure VII.13. Diffractogrammes du Chl, β -CD, leur mélange physique et leur complexe d'inclusion

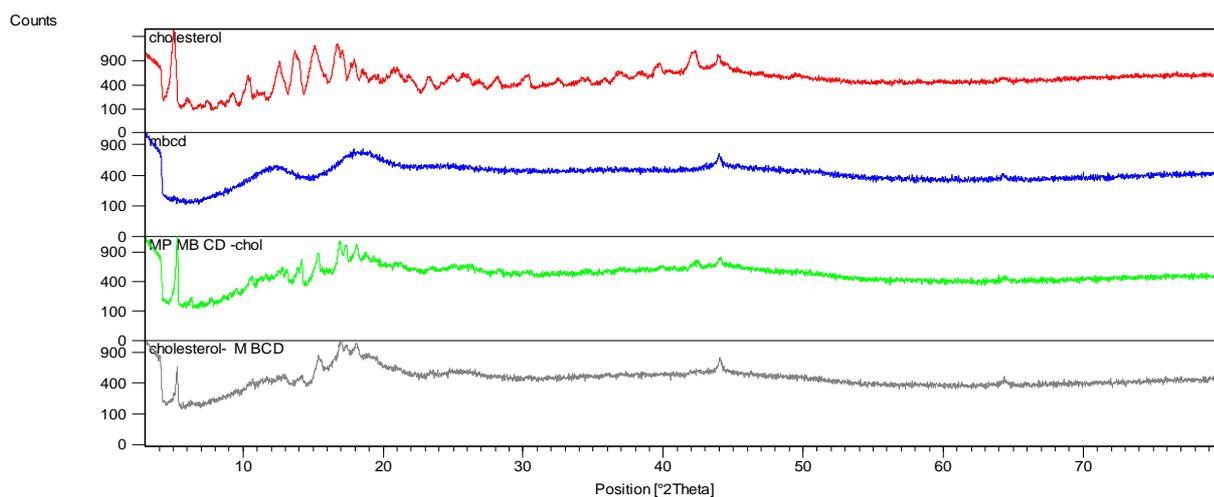


Figure VII.14. Diffractogrammes X du Chl, $M\beta$ -CD, leur mélange physique et leur complexe d'inclusion

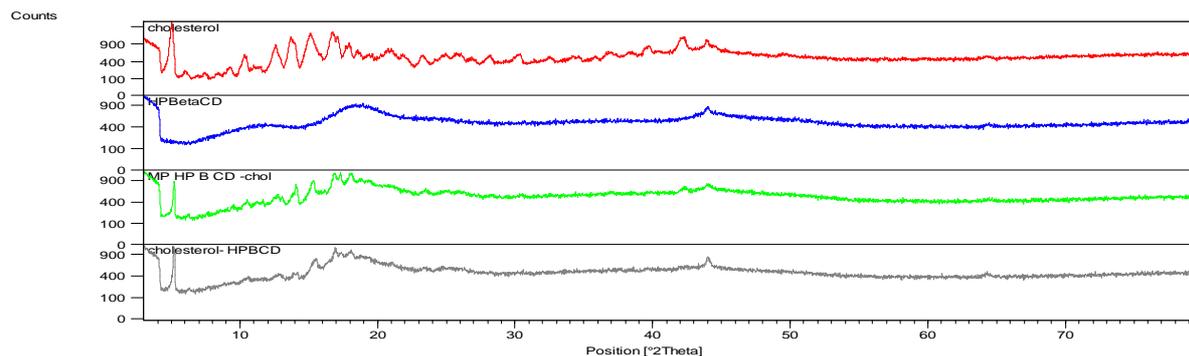


Figure VII.15. Diffractogrammes du Chl, Hpβ-CD, leur mélange physique et leur complexe d'inclusion

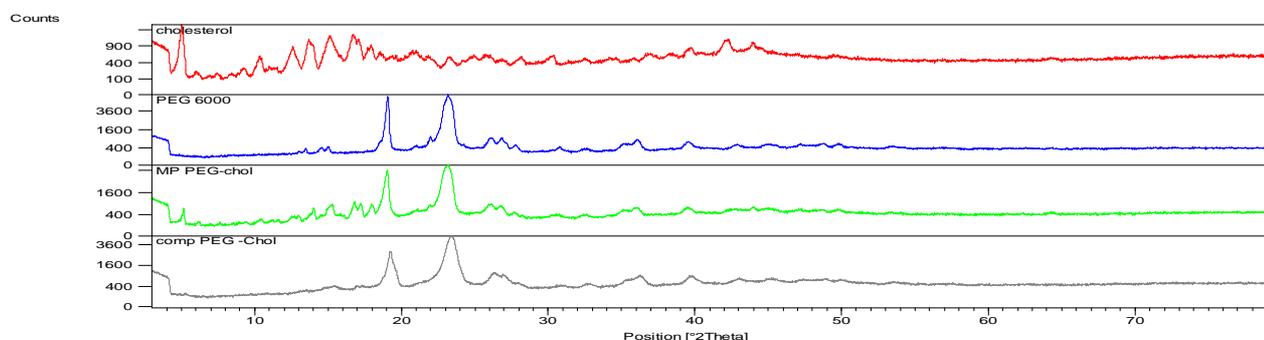


Figure VII.16. Diffractogrammes du Chl, PEG, leur mélange physique et leur dispersion solide

VII.4.2.1.2. Observations

On remarque que pour les trois complexes et pour la dispersion solide il y'a soit une diminution ou/ et une disparition de quelques pics du cholestérol, qui sont par contre présents dans les mélanges physiques.

VII.4.2.1.3. Interprétations

D'après la littérature [91], la disparition ou la diminution de ces pics, correspondrait à une diminution dans l'état cristallin et par conséquent indiquerait le passage des molécules invitées à un état amorphe, qui toujours selon la littérature améliorerait la solubilité de ses dernières.

Le fait que dans les dans les MP on retrouve tous les pics de la molécule invitée, prouve qu'il y a bien interaction entre la cavité des cyclodextrines et le cholestérol. Par ailleurs, le même

phénomène dans le cas de la dispersion dans le PEG est observé, prouvant, que les molécules de cholestérol sont bien dispersées dans le polymère utilisé.

VII.4.2.2. Vitamine E

VII.4.2.2.1. Résultats

Les diffractogrammes obtenus, sont représentés dans les figures VII.17, VII.18, VII.19, VII.20.

VII.4.2.1.1. Complexes β -CD/Vit E

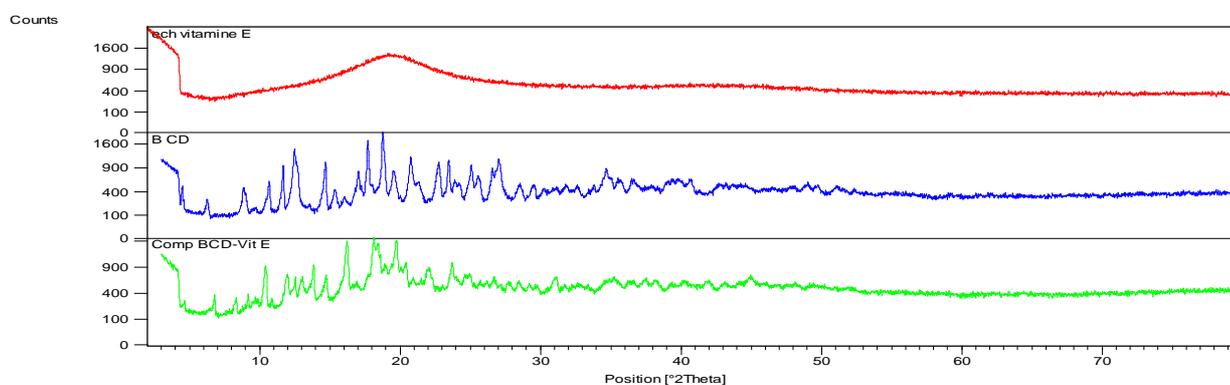


Figure VII.17. Diffractogrammes de la Vit E, β -CD et leur complexe

VII.4.2.1.2. Complexes M β -CD/Vit E

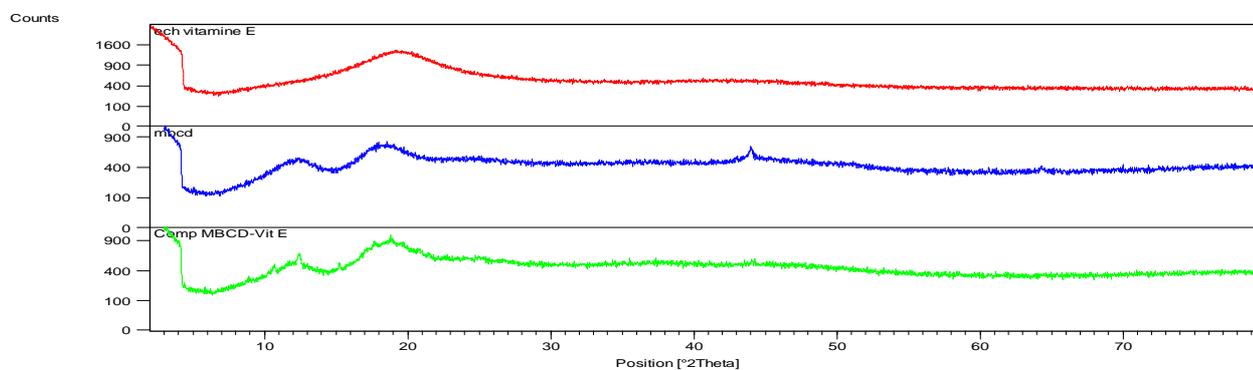
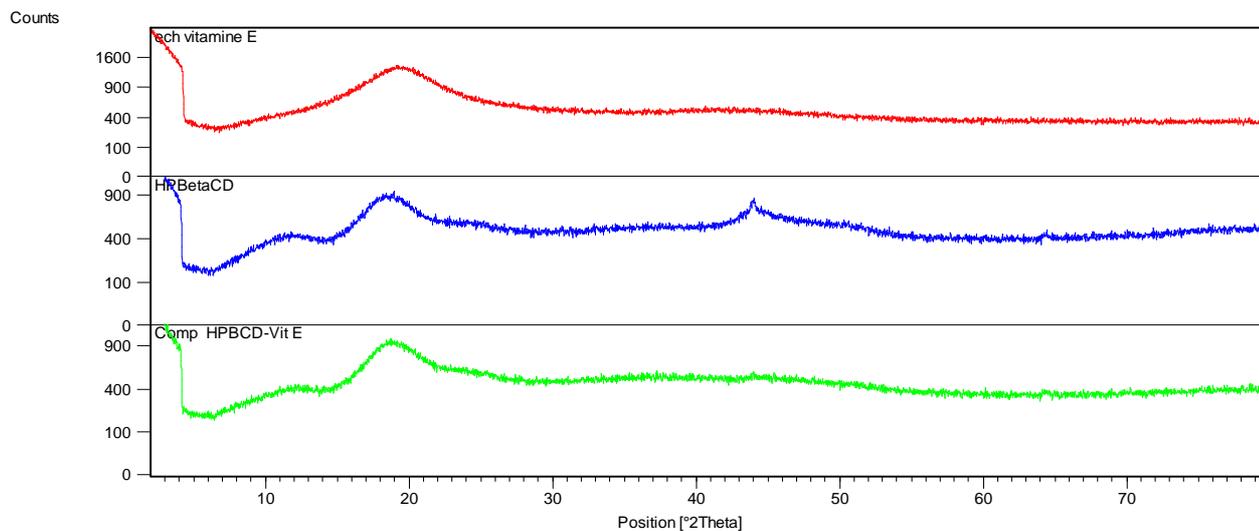


Figure VII.18. Diffractogrammes de la Vit E, M β -CD et leur complexe

VII.4.2.1.3. Complexes Hp β -CD/Vit EFigure VII.19. Diffractogrammes de la Vit E, Hp β -CD et leur complexe

VII.4.2.1.4. Dispersion solide PEG/Vit E

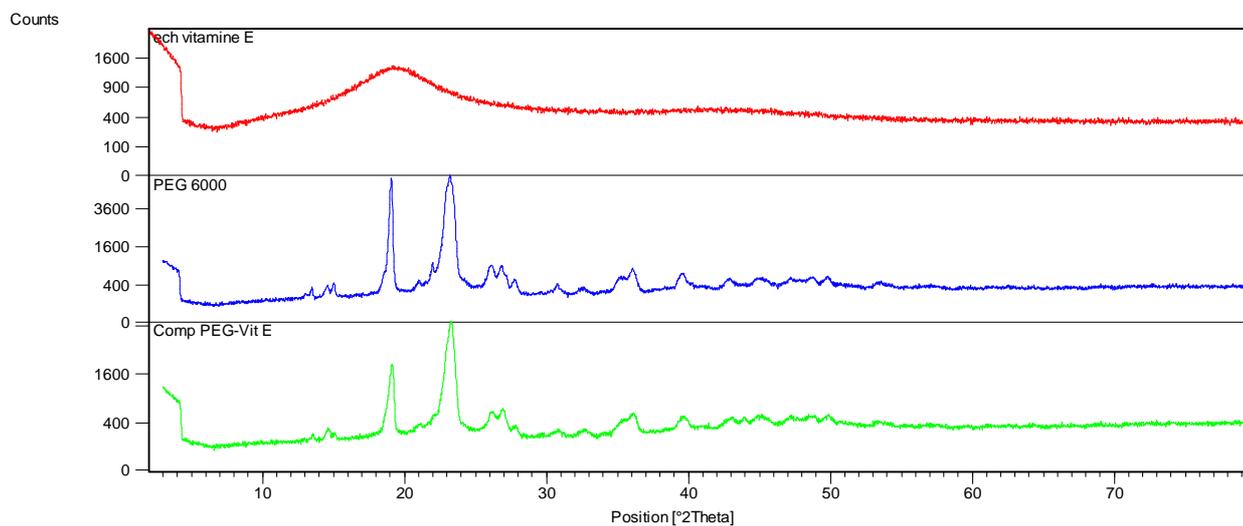


Figure VII.20. Diffractogrammes de la Vit E, PEG et leur dispersion solide

VII.4.2.2.2. Observations

Nous remarquons qu'il n'y a pas une différence entre les spectres obtenus pour les trois (03) complexes d'inclusion et la dispersion solide et les CDs seules.

VII.4.2.2.3. Interprétations

La Vit E est sous forme semi-solide donc nous pouvons dire que la diffraction des rayons X n'est pas la méthode la plus adaptée pour prouver la formation ou non des complexes d'inclusion.

Remarque

Il aurait été judicieux de compléter ces études par des analyses d'imagerie MEB et thermogravimétrie ATG ce qui, initialement était prévu. Sauf, que les deux appareils existants à l'université n'étaient pas fonctionnels durant la période de réalisation de ce travail. Cela dit, nous avons opté pour une étude cellulaire qui pourra nous donner une idée sur l'efficacité des complexes préparés.

VII.5. Etude de l'action des complexes à base de Vit E et Chl sur les spermatozoïdes

VII.5.1. Etude sur le sperme du bovin

VII.5.1.1. Résultats après incubation de deux heures à température ambiante

Les pourcentages des spermatozoïdes (SPZ) progressif rapide et statique en fonction des différents traitements sont représentés dans le diagramme en bâton de la figure VII.21.

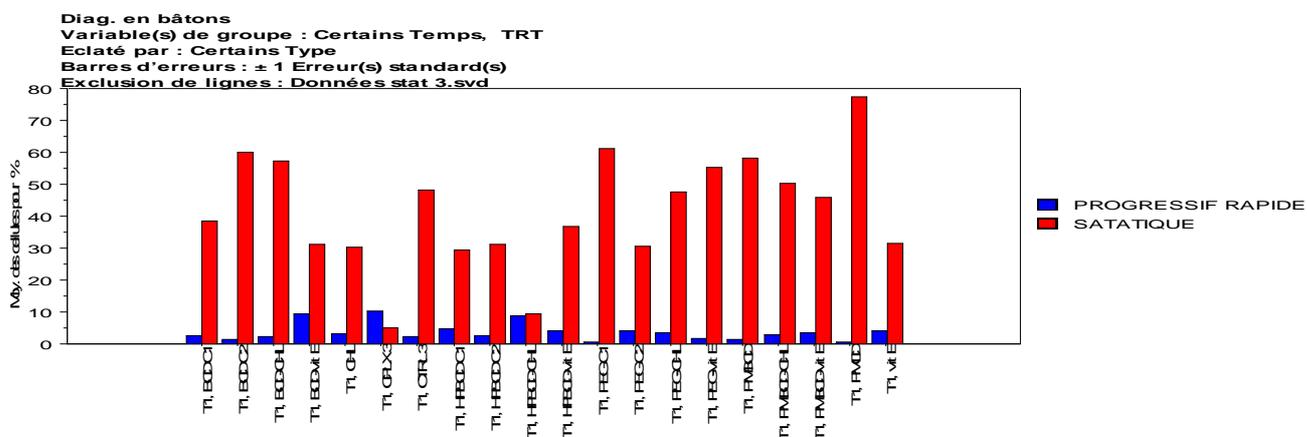


Figure VII.21. Diagramme en bâton des SPZ progressif rapide et statique en fonction des traitements.

VII.5.1.1.1. Observations

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que les progressifs rapides ceci dans tout les traitements et contrôles.
- Pour les statiques, on remarque trois valeurs maximales obtenues pour la PM β CD, PEG et β CD, atteignant de 77,4% pour la PM β CD.
- Pour les SPZ progressifs rapides on remarque également des valeurs maximales, obtenues pour la β CD-Vit E, Hp β CD-Chl et le mélange des trois (c'est à dire Vit E, CD, Chl), atteignant 10,4% avec le mélange de (Vit E, CD et Chl) (VCDC).
- En comparant le pourcentage des SPZ progressif rapide par rapport au contrôle, on voit bien que pour la β CD-Vit E, Hp β CD-Chl et le VCDC il est supérieur. Sinon pour les autres traitements il est pratiquement inférieur.

VII.5.1.1.2. Interprétations

Le VCDC apparaît comme étant le traitement le plus satisfaisant en terme de SPZ statiques et mobiles, ceci, pourrait être expliqué par un phénomène de synergie entre les deux molécules Chl et Vit E mises à disposition du SPZ à l'aide des CDs.

Le fait d'avoir plus de mobilité à base de Vit E prouve que cette molécule a joué son rôle d'antioxydant.

Le fait d'avoir plus de mobilité par rapport au contrôle prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires cellulaires du SPZ.

En ce qui concerne la comparaison individuelle i.e. les différents complexes entre eux, elle est difficile à faire car il y'a trop de facteur (temps, nombre de SPZ, champs de lecture,...) qui doivent être figés pour avoir des résultats fiables. Ainsi, nous pouvons dire que ces résultats pris dans l'ensemble (par catégorie) prouvent sans équivoque l'amélioration de la solubilité du Chl et de la Vit E après piégeage par les CDs et le PEG. Mais dans condition de travail et selon les protocoles utilisés, la conservation du sperme bovin à température ambiante ne peut servir de modèle fiable pour quantifier le degré de solubilisation des deux molécules Chl et Vit E.

VII.5.1.2. Résultats après réfrigération pendant 24h heures à température de 5°C

Les pourcentages des SPZ progressif rapide et statique en fonction des différents traitements sont représentés dans le diagramme en bâton (figure VII.22).

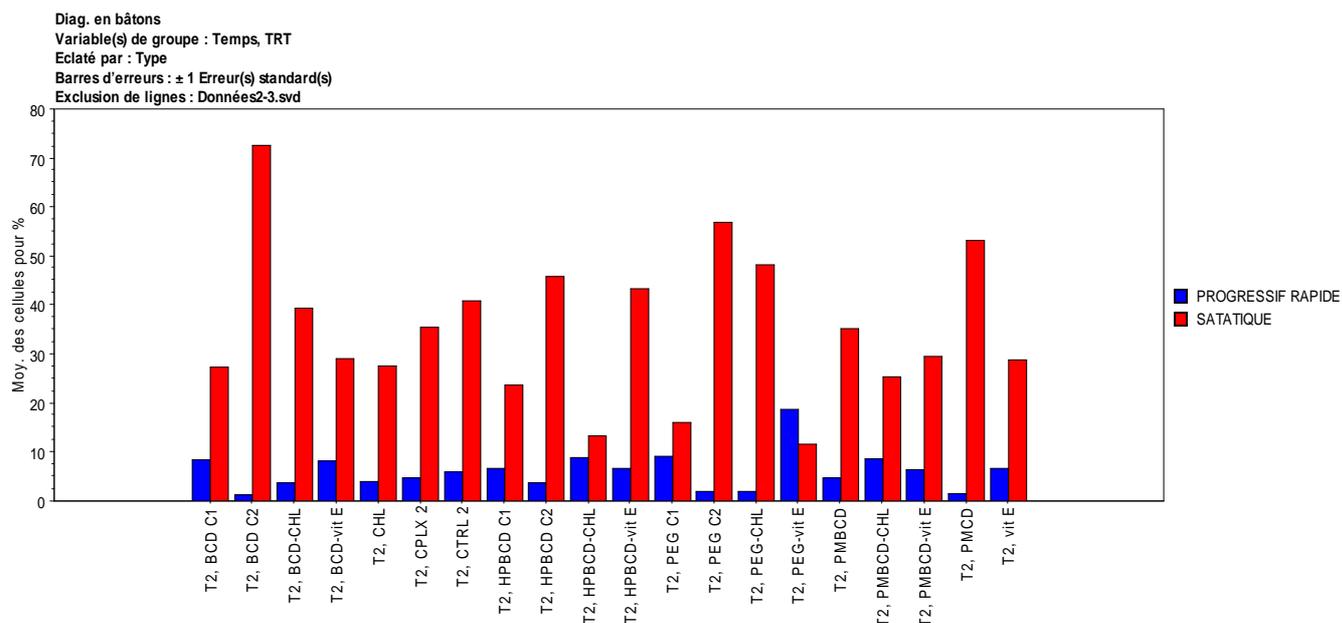


Figure VII.22. Diagramme en bâton des SPZ progressif rapide et statique en fonction des traitements.

VII.5.1.2.1. Observations

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que les progressifs rapides ceci dans tout les traitements et contrôle.
- Pour les statiques, on remarque trois valeurs maximales obtenues pour la β CD, PEG et PM β CD, atteignant 72,73% pour la β CD.
- Pour les SPZ progressifs rapides on remarque également des valeurs maximales, obtenues pour le PEG-Vit E, PEG et M β CD-Chl atteignant de 18,81% avec le PEG-Vit E.
- En comparant le pourcentage des SPZ progressifs rapides par rapport au contrôle, on voit bien que pour le PEG-Vit E, l'Hp β CD-Chl, le PEG, la PM β CD-Chl et la Vit E il est supérieur. Sinon pour les autres traitements il est pratiquement égal.

VII.5.1.2.2. Interprétations

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Vit E prouve que cette molécule a joué un rôle aidant la préservation et la protection des SPZ, comme la Vit E est connu pour son rôle antioxydant [86], nous émettons l'hypothèse que la présence de la Vit E protège le SPZ de l'oxydation.

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Chl par rapport aux contrôles prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires du SPZ.

VII.5.1.3. Résultats des vitesses des SPZ après incubation de deux heures à température ambiante

Les vitesses linéaires des SPZ en fonction des différents traitements sont représentées dans le diagramme en bâton (figure VII.23).

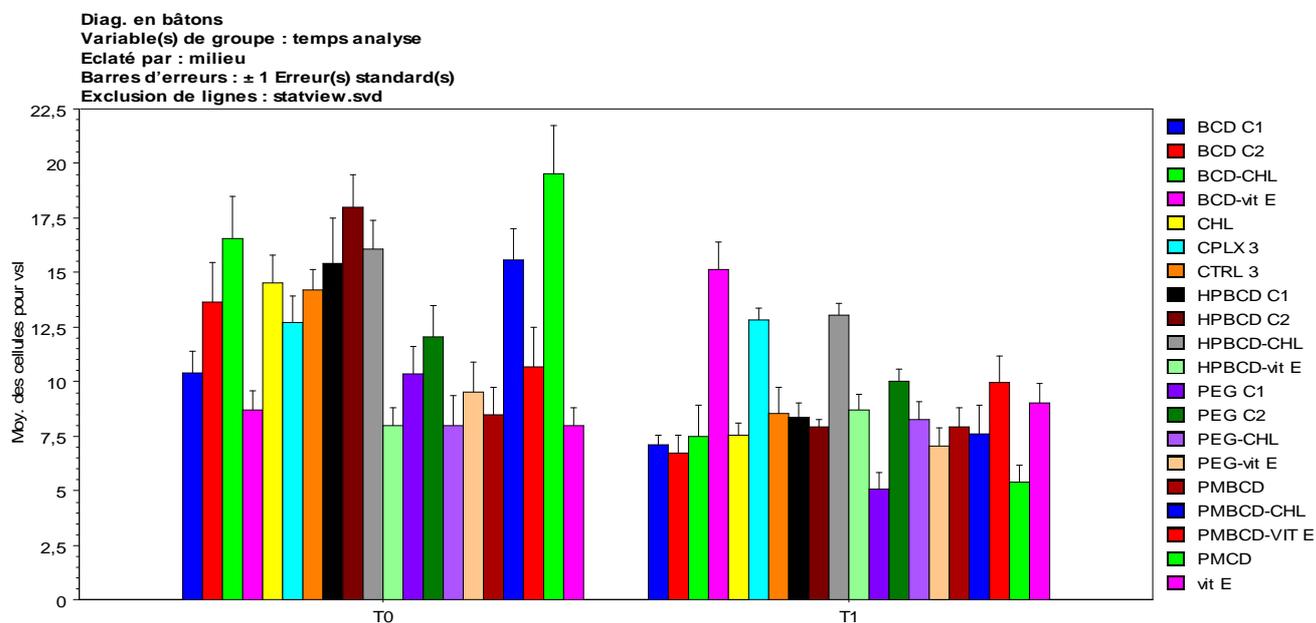


Figure VII.23. Diagramme en bâton des vitesses linéaires des SPZ en fonction des traitements.

VII.5.1.3.1. Observations

- En comparant T1 (après deux heures d'incubation à température ambiante) à T0 (premier temps d'analyse) on remarque que les vitesses des SPZ traités par la β CD-Vit E, l'Hp β CD-Vit E et la Vit E a augmenté d'une part, d'autre part les vitesses des SPZ traités avec le VCDC et avec la PM β CD-Vit E sont presque les mêmes. Sinon pour les autres traitements elles ont diminué.

- Au même temps T1 les vitesses des SPZ des échantillons traités par les complexes et dispersion sont plus grandes que celle de leurs contrôles respectifs.

VII.5.1.3.2. Interprétations

Le fait d'avoir des vitesses plus élevées pour les SPZ traités avec des échantillons à base de Vit E prouve que cette molécule a joué un rôle aidant la préservation et la protection des SPZ, comme la Vit E est connue pour son rôle antioxydant [86], nous émettons l'hypothèse que la présence de la Vit E protège le SPZ de l'oxydation.

Le fait d'avoir des vitesses plus élevées des SPZ dans les échantillons à base de Chl par rapport aux contrôles prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires du SPZ.

VII.5.1.4. Résultats des vitesses des SPZ après réfrigération de 24 heures à température de 5°C

Les vitesses linéaires des SPZ en fonction des différents traitements sont représentées dans le diagramme en bâton (figure VII.24).

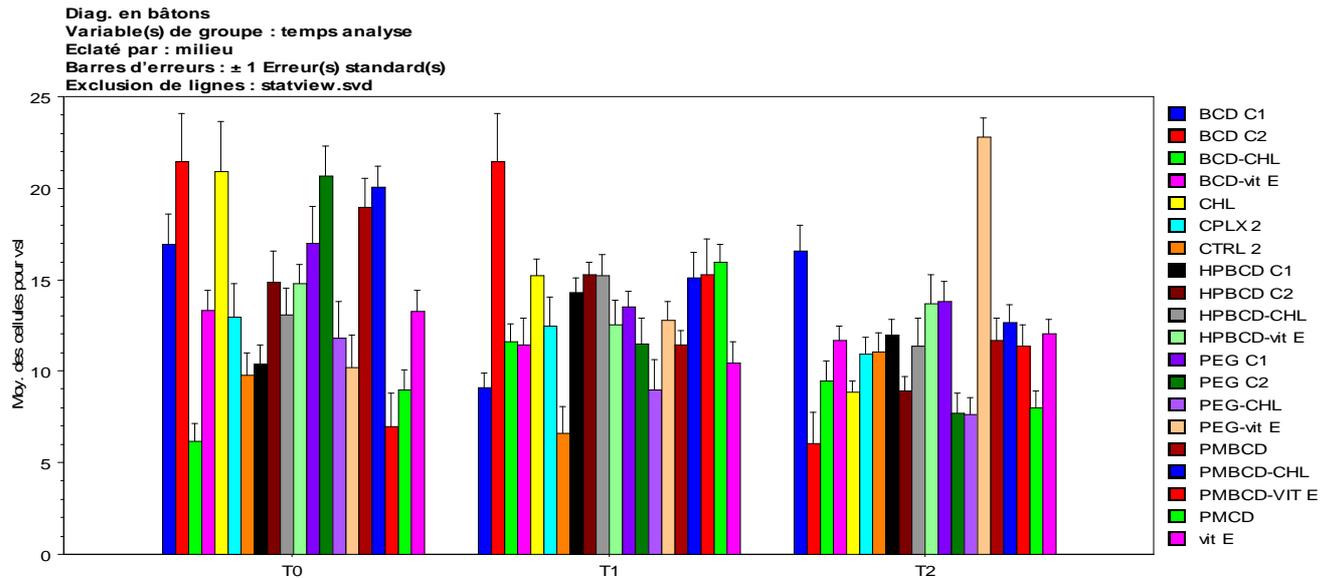


Figure VII.24. Diagramme en bâton des vitesses linéaires des SPZ en fonction des traitements.

VII.5.1.4.1. Observations

- En comparant T2 (après 24 heure de réfrigération à une température de 5°C) à T0 (premier temps d'analyse) on remarque que les vitesses des SPZ traités par la β CD-Chl, la PEG-Vit E et la PM β CD-Vit E a augmenté, on remarque aussi que les vitesses des SPZ traités avec le VCDC et la β CD-Vit E et avec la Vit E seule sont presque les même. Sinon pour les autres traitements elles ont diminué.

- Au même temps T2 les vitesses des SPZ des échantillons traités par les complexes et dispersion sont plus grandes que celle de leurs contrôles respectivement.

VII.5.1.4.2. Interprétations

Le fait d'avoir des vitesses plus élevées des SPZ dans les échantillons à base de Chl par rapport aux contrôles prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires du SPZ.

VII.5.1.5. Graphe regroupant les SPZ statiques et progressifs rapide partagés en deux catégories

Les pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités par les contrôles et les complexes sont représentés dans le diagramme en bâton de la figure VII.25 (après incubation de deux heures à température ambiante).

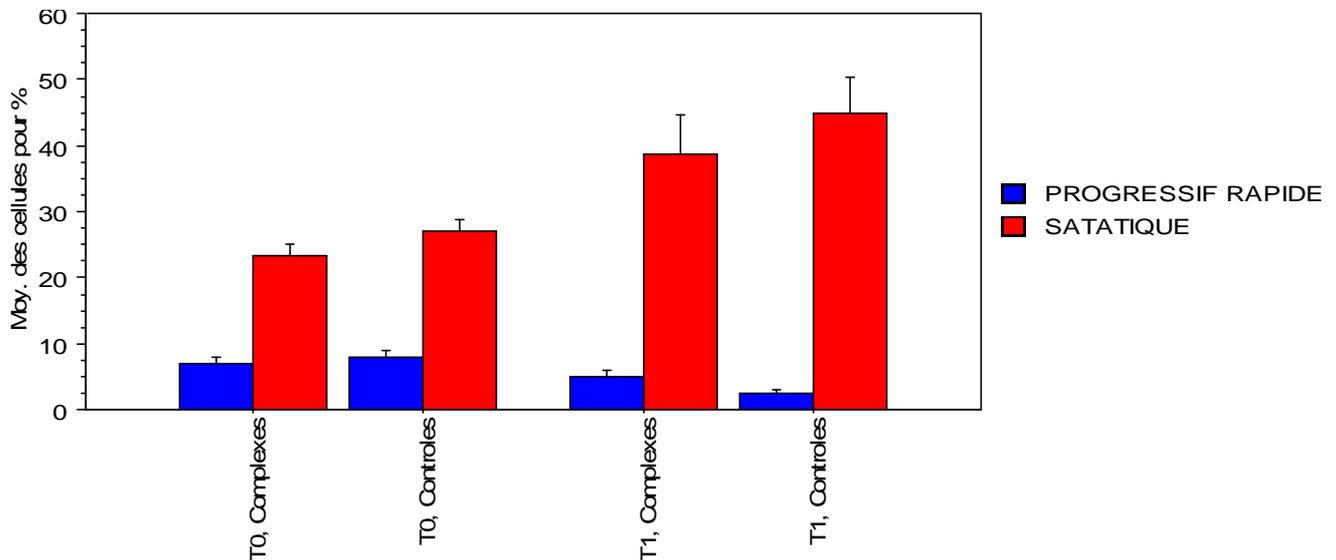


Figure VII.25. Diagramme en bâton des pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités par les contrôles et complexes.

VII.5.1.5.1. Observations

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que les progressifs rapides ceci dans les complexes et contrôle.
- Au temps T1, on remarque que le pourcentage des SPZ progressifs rapides par rapport au contrôle est supérieur.

VII.5.1.5.2. Interprétations

Le fait d'avoir plus de mobilité des SPZ des échantillons traités par rapport au contrôle pourrait être expliqué par un phénomène de synergie entre la Vit E et le Chl, il prouve que la Vit E a joué un rôle aidant la préservation et la protection des SPZ, comme la Vit E est connu pour son rôle antioxydant [86], nous émettons l'hypothèse que la présence de la Vit E protège le SPZ de l'oxydation.

VII.5.1.6. Graphe regroupant les SPZ statiques et progressifs rapide partagés en deux catégories

Les pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités par les contrôles et les complexes sont représentés dans le diagramme en bâton de la figure VII.26 (après réfrigération de 24h à 5°C).

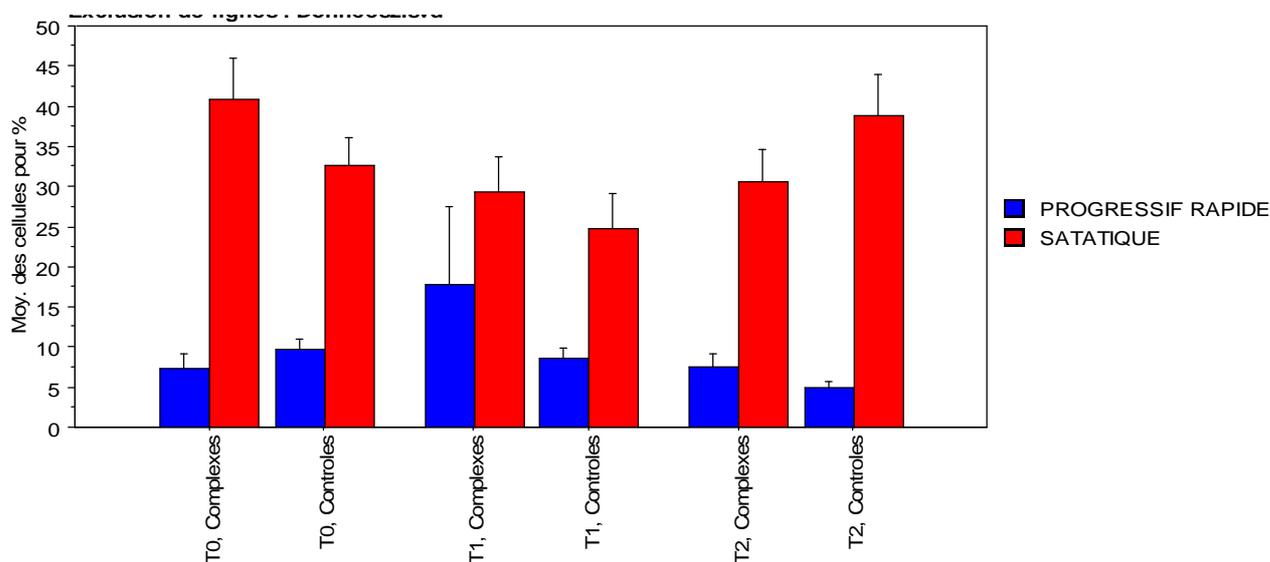


Figure VII.26. Diagramme en bâton des pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques traités par les contrôles et complexes.

VII.5.1.6.1. Observations

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que les progressifs rapides ceci dans les complexes et contrôle.
- En comparant à T2 le pourcentage des SPZ progressifs rapides par rapport au contrôle, on voit bien qu'il est supérieur.

VII.5.1.6.2. Interprétations

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Vit E prouve que cette molécule a joué un rôle aidant la préservation et la protection des SPZ, comme la Vit E est connu pour son rôle antioxydant [86], nous émettons l'hypothèse que la présence de la Vit E protège le SPZ de l'oxydation.

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Chl par rapport aux contrôles prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires du SPZ.

NB

Les diagrammes par groupe montrent très clairement que les deux traceurs Vit E et Chl ont un meilleur effet lorsqu'ils sont sous forme complexée et dispersée.

Par contre, comme le modèle spermatique est un modèle vivant il est sujet à plusieurs paramètres qui font qu'il est presque à notre niveau et avec les moyens dont on dispose impossible d'obtenir des résultats individuels fiables et comparables. C'est pour cela, que l'analyse par groupe et par tendance nous paraît la plus appropriée.

VII.5.2. Etude sur sperme du lapin

VII.5.2.1. Résultats obtenus après conservation, réfrigération à 5°C et congélation

Les moyennes de mobilité des SPZ à température ambiante, le pourcentage des SPZ progressifs rapides, les moyennes de mobilité des SPZ après 24 heures de réfrigération ainsi que les vitesses linéaires des SPZ avant et après la congélation tous en fonction des traitements sont représentées par les diagrammes en bâton des figures VII.27, VII.28, VII.29, VII.30, respectivement.

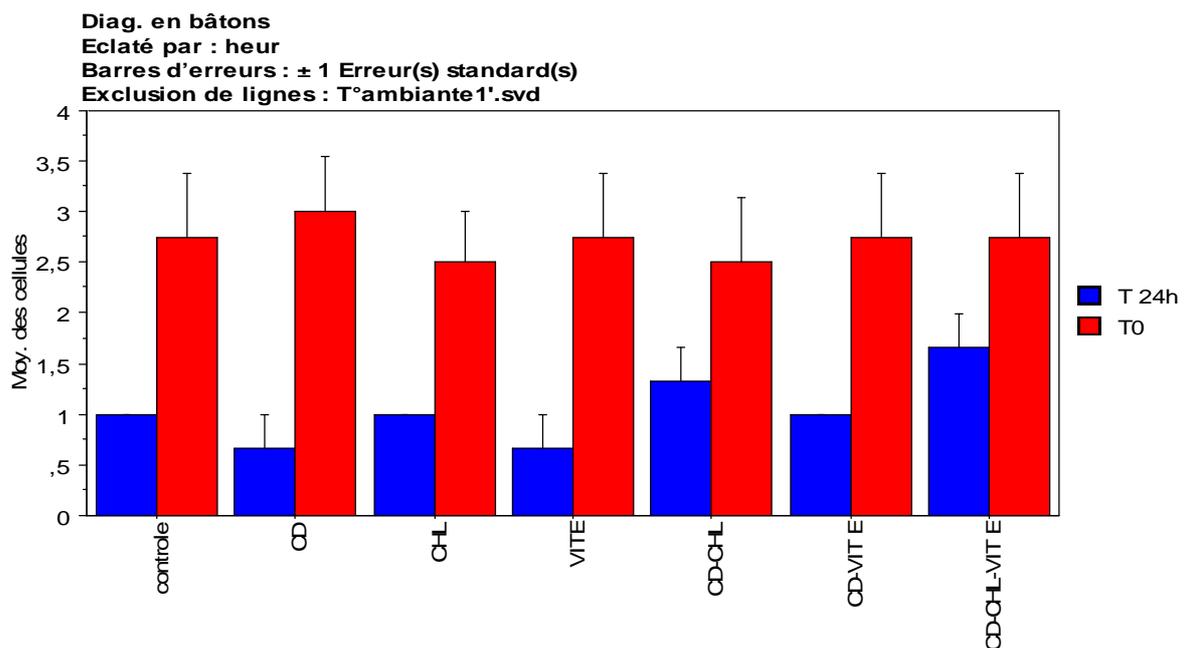


Figure VII.27. Diagramme en bâtons de la mobilité des SPZ à température ambiante en fonction des traitements.

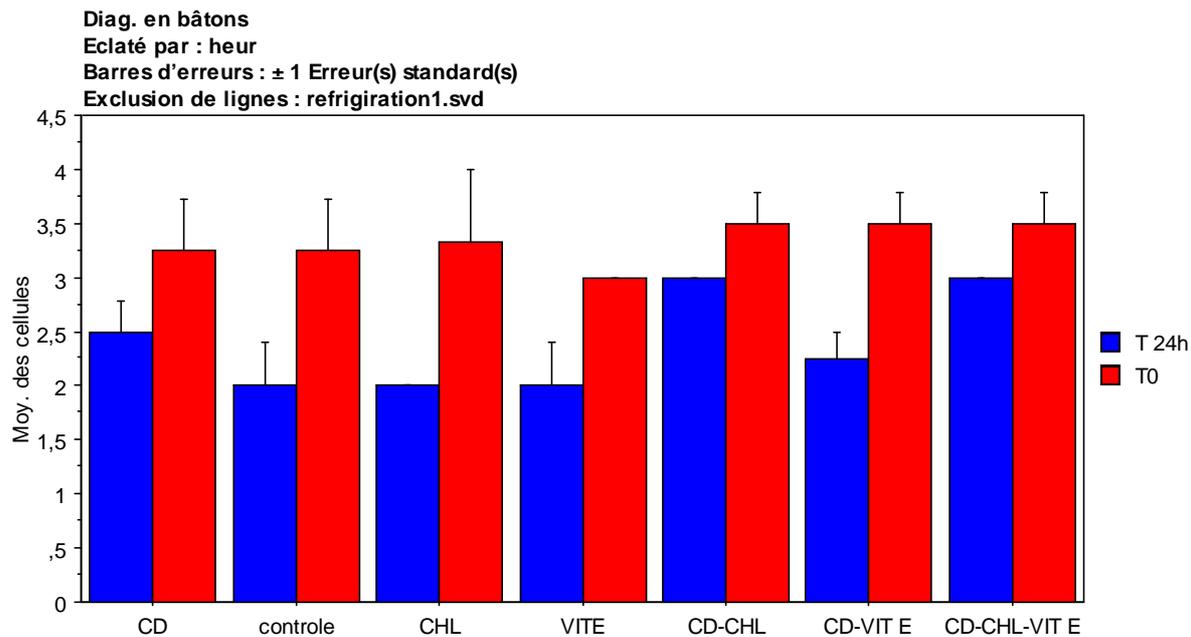


Figure VII.28. Diagramme en bâtons de la mobilité des SPZ après réfrigération en fonction des traitements.

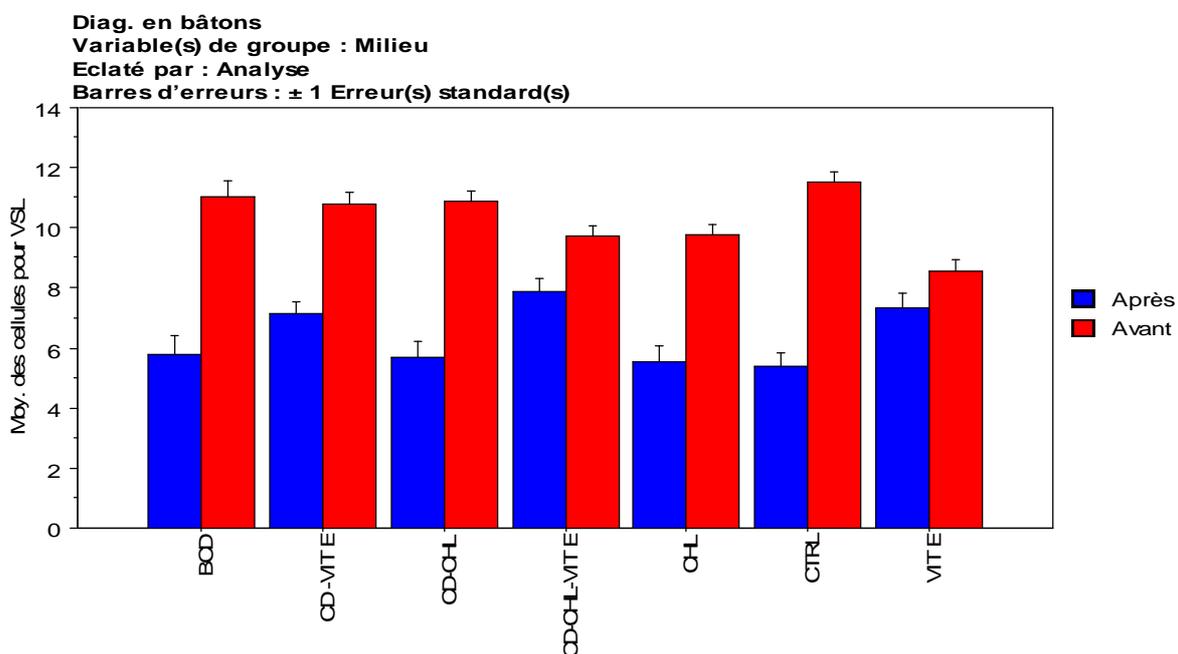


Figure VII.29. Diagramme en bâtons des vitesses linéaires des SPZ avant et après congélation en fonction des traitements.

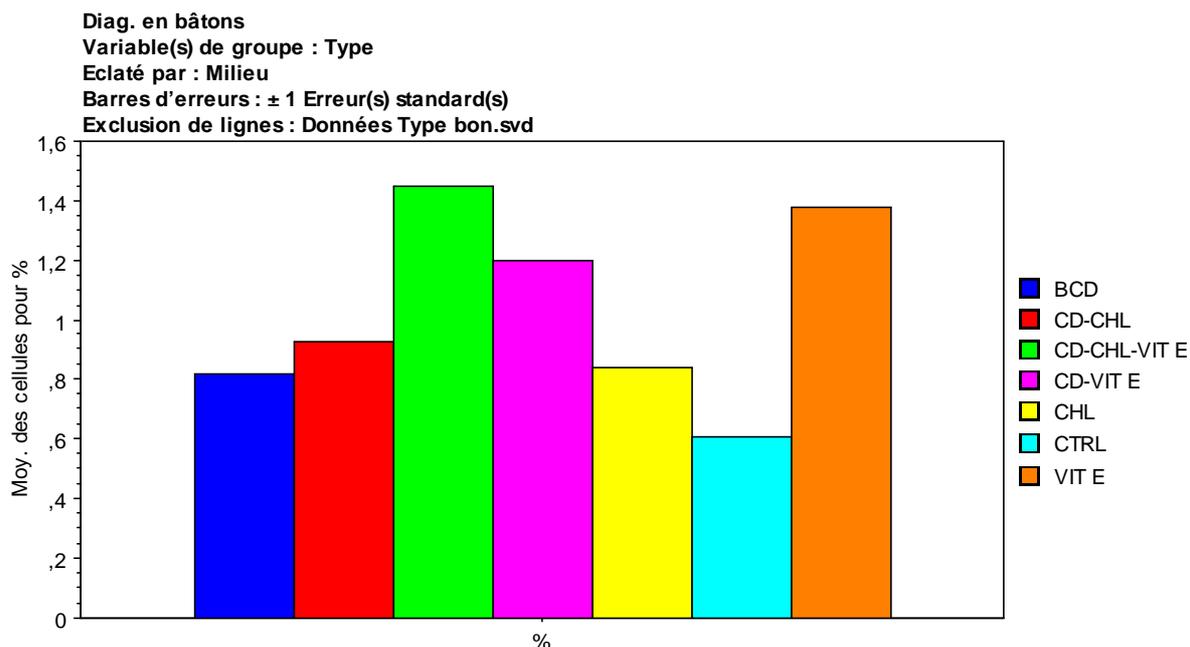


Figure VII.30. Diagramme en bâtons des SPZ progressifs rapides après congélation en fonction des traitements.

VII.5.2.1.1. Observations

En cas général les SPZ des échantillons traités avec les contrôles sont moins mobile et se conservent mal (nombre de statique) que les SPZ traités avec les complexes préparés.

VII.5.2.1.2. Interprétations

Le VCDC apparait comme étant le traitement le plus satisfaisant en termes de SPZ statiques et mobiles, ceci, pourrait être expliqué par un phénomène de synergie entre les deux molécules Chl et Vit E mises à disposition du SPZ à l'aide des CDs.

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Vit E prouve que cette molécule a joué un rôle aidant la préservation et la protection des SPZ, comme la Vit E est connu pour son rôle antioxydant [86], nous émettons l'hypothèse que la présence de la Vit E protège le SPZ de l'oxydation.

Le fait d'avoir plus de mobilité du SPZ dans les échantillons à base de Chl par rapport aux contrôles prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires du SPZ.

Ces résultats renforcent et consolident les résultats obtenus lors de l'étude des même complexes et contrôles sur du sperme d'une autre espèce ; le bovin.

NB

Le même travail fut effectué sur le sperme du coq, les diagrammes en bâtons obtenus sont joints en Annexe 5.

Ces diagrammes montrent quasiment la même tendance, à savoir que le mélange [(Vit E-CD) (Chl-CD)] donne le meilleur résultat.

Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons fixé comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme de certaines espèces à savoir : Le bovin, l'aviaire et le lapin. Ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E et du cholestérol en milieu aqueux. Pour cela, nous avons d'abord étudié le comportement du complexe Chl-HP β CDs, par un test d'Higuchi (Diagramme de solubilité), obtenant un profil de type A_p. Par suite, nous avons préparés plusieurs complexes VitE-CDs et Chl-CDs, que nous avons caractérisé par FTIR et DRX, les résultats obtenus, prouvent qu'il ya complexation entre les CDs et les molécules invitées.

Afin de valoriser et de compléter les caractérisations déjà effectuées, l'étude de l'impacte de ces préparations sur un model cellulaire reconnu ; le spermatozoïde fut effectuée.

Cette étude, montre clairement que la formation de complexes favorise la conservation de sperme de différentes espèces. De plus, nous avons obtenu de meilleurs résultats en termes de mobilité, vitesse et viabilité de SPZ lorsque les deux complexes (VitE-CD et Chl-CD) sont associés.

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

Ce travail, pourrait être enrichit par des caractérisations plus poussées (RMN, MEB, ATG...) et par un traitement statistique des données récoltées plus rigoureux.

Références bibliographiques

- [1] E. Mocé, P.H. Purdy, J. K. Grahama, Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V, 2009.
- [2] T. Takeo, T. Hoshii, Y. Kondo, H. Toyodome, H. Arima, K. Yamamura, T. Irie et N. Nakagata, Methyl-Beta-Cyclodextrine improves fertilizing 57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from cells, *Biology of reproduction*, Japan, 2008.
- [3] A. Iborra, M. Companyo, P. Martinez et A. Morros, Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa, *Biology of reproduction*, Spain, 2000.
- [4] S.WEISSE, Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée, Thèse de Doctorat, l'Université Paris XI, 2002.
- [5] J. V-Dufaure, Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires, Thèse de Doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier, 2011.
- [6] C. B-Boutelliez, *Desulfovibrio spp* dans la maladie parodontale, Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires, Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy-1, 2009.
- [7] D. Castagne, Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomes ou biologiques, Thèse Doctorat, Université de Liège, 2009-2010.
- [8] S. Benhadi, Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux celluloses, Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré Nancy 1, 2010.
- [9] C. G. Floare, Dynamique réactionnelle dans des environnements restreints, Thèse de Doctorat, Université de Joseph-Fourier - Grenoble 1, 2005.
- [10] H. Khalil, Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules cage dans la dépollution des sols, Solubilité et extraction de polluants organique par les cyclodextrines, Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 2004

Références bibliographiques

[11] H. JEULIN, Impact virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine aux cyclodextrines sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse, Thèse de Doctorat, Université Henry Poincaré, 2008.

[12] M. Tharin, Les cyclodextrines à l'état natif représentent un intérêt relatif du fait de leur polarité élevée, leur faible solubilité dans les solvants organiques et leur rigidité structurale, Thèse de Doctorat, Université de Neuchatel, 2002.

[13] S. MOUTARD, Relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles, Thèse de Doctorat, Université de Picardie Jules Verne.

[14] S. V. Kurkov, E. V. Ukhatskaya, T. Loftsson, Drug/cyclodextrin, Beyond inclusion complexation, J Incl Phenom Macrocycl Chem, Iceland 2011.

[15] P. Bonnet, Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion, Thèse de Doctorat, Université d'Orleans, 2001.

[16] C. GALANT, Nouveaux complexes polyelectrolytes impliquant un polymère de β -cyclodextrine, en tensioactif cationique et un polyanion, Thèse de Doctorat, Université Paris XII-Val de Marne, 2003.

[17] E. Deunf, Préparation, Caractérisation et Activation électrochimique de nouveaux complexes métallos-cyclodextrines, Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2010.

[18] G. FLEURY, Des polyrotaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique, les gels à points de réticulation glissants, Thèse de Doctorat en chimie et science des matériaux, Université Louis Pasteur – Strasbourg I, 2005.

[19] M. E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007.

[20] N. Maski, A. Kumaran, K. Girhepunje, P. Ghode, S. Randive et R. Pal, Studies on the preparation, characterization and solubility of β -cyclodextrin-Diacerein inclusion complexes, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2009.

Références bibliographiques

- [21] M. Marin, Lalyophilisation pour des produitsde haute qualité, Thiverval – Grignon, 2003.
- [22] K.A. Connors, The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. Chem. Rev, 1997.
- [23] M.N. Reddy, T. Rehana, S. Ramakrishna, K.P. Chowdhary, P.V. Diwan, β -cyclodextrincomplexes of celecoxib: Molecular-modeling, characterization, and dissolution studies, Pharmacology Division, Hyderabad, India, 2004.
- [24] D. Ghadiali, Aminolysis of the 4-acetoxybenzoate anion cataiyised by cyclodextrins, Thèse de Doctorat, Université Montréal. Québec. Canada, 2000.
- [25] A. Bjorneboe, G.E. Bjorneboe, C.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, 1989.
- [26] K. Pehr, MD. R. Roy Forsey: Why don't we use vitamin E in dermatology, Current review-actualites, Université Montréal, 1993.
- [27] E. Der Würde Eines, Diastereoselective synthesis of α -tocopherol, These de Doctorat, Université Basel, 2008.
- [28] J. Texier, Les vitamines, Editions JIBENA, pages 99 à 106, 1989.
- [29] M-C. KIBANGADI, Beta-carotène et vitamines A et E chez l'enfant, Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, 1998.
- [30] Unlimited DSM, Vitamine E.
- [31] C. Gagnon, la vitamine E : fertilité et combativité, 2005.
- [32] M. E. Escuderos, A A. Sayago, B M. T. Moralesband et R. Aparicio, Evaluation of α -tocopherol in virgin olive oil by a luminiscent method, GRASAS Y ACEITES, 2009.

Références bibliographiques

- [33] B. Karunanandaa, Q. Qia, M. Hao, S. R. Baszis, P. K. Jensen, Y. H. Wong, J. Jiang, M. Venkatramesh, K. J. Gruys, F. Moshiri, D. Post-Beittenmiller, J. D. Weissa et H. E. Valentin, Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol, Science direct Metabolic Engineering, 2005.
- [34] C. M. Sabliov, C. Fronczek, C. E. Astete, M. Khachatryan, L. Khachatryan, C. Leonard, Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. J Am OilChem, 2009.
- [35] H. Lassaad, Les antioxydants dans les aliments, Agence Universitaire de phranchophonie ; IPEIN de Nabeu, TINISIE.
- [36] M. L. Colombo, An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-Perspectives. Review Molécule, Université Torino, Italie, 2010.
- [37] C. Chanforan, Stabilité de microconstituants 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 stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate, Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2010.
- [38] P. E. Pidou, La vitamine E chez le cheval, Synthèse bibliographique, Thèse Doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse. 2010.
- [39] V. 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.
- [40] William W.Christie. Tocopherols and Tocotrienol: Structure, composition biologique and analysis, Scotland, 2011.
- [41] C. C. Dotreppe, O. Istasse, Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E, Université de Liège, Belgique, 2003.
- [42] J. L. Guéant, Coenzyme et vitamine, Babarnab – PROD.

Références bibliographiques

- [43] Lareal. Vitamine E et tocophérols. Note scientifique N°1.
- [44] C. F. Bourgeois, les vitamines dans l'industrie agroalimentaires, Editions Tec-Doc 2003.
- [45] K. Hakko Europe GmbH, DL-alpha tocopheryl acetate, Daiichi Fine Chemical Division, Germany.
- [46] Making cosmetics: Vitamine E tocopheryl acetate. PO Box, Rentou , 2008.
- [47] BASF Aktiengesellschaft: Vitamin E acétate. Fine Chemicals Division-Cosmetic Solutions, Limburgerhoft, 2006.
- [48] J.-D. Nadeau, La relation des vitamines à la nutrition animale, Canadian journal of comparative Médecine, 1943.
- [49] J-C. Guillard et B. De Laqueu, Encyclopédie des vitamines du nutriment aux médicaments, livre, Volume 1. Edition Lavoisier.
- [50] J. Hillan, Facts about vitamin E. IFAS Extension, Université de Florida, 2006.
- [51] DL-alpha Tocopheryl Acetate, Zhejiang Medicine CO. Ltd, China.
- [52] J. Pincemail, J. O. Defraigne, M. Meurisse, R. Limet, Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. Medi-Sphere, 1998.
- [53] DL-alpha-tocopherol, Products for the Dietary Supplement, Beverage and Food Industries – Technical Information, 2005.
- [54] J-P. Helme, J-B. Chazan, J-L. Perrin, M-C. Martini, M. Seiller Coordonnatrices, Les antioxydants, Extraits de livre et articles. Éditions Tec & Doc.
- [55] ADM Natural Health and Nutrition, Netherlands.

Références bibliographiques

[56] dl- α -tocopherol. Prepared at the 30th JECFA (1986), published in FNP 37 (1986) and in FNP 52 (1992). Metals and arsenic specifications revised at the 61stJECFA (2003). A group ADI of 0.15-2 mg/kg bw for dl- α -tocopherol and d- α -tocopherol, concentrate, singly or in combination, was established at the 30th JECFA (1986).

[57] A. S. DURMUŞ, N. AKPOLAT, E. ÜNSALDI, Effect of dl-alpha-tocopherol-acetate on the fracture healing of experimental radial diaphysis fracture in dogs, ARAŞTIRMA, 2008.

[58] Tocopherol nicotinate, Official Monographs for part I, JP XIV.

[59] Dl- α –tocopherol, Prepared at the 30th JECFA (1986), published in FNP 37 1986.

[60] H. PACHECO. Livre, Le Cholestérol. Deuxième édition : Presses universitaires de France. Paris. 1969.

[61] Pharmacopée Européenne.

[62] R. SIEBER, C. ROSE-SALLIN, J. OLIVIER BOSSET, Le cholestérol et ses produits d'oxydation dans les produits laitiers : aspects analytiques, technologiques et conséquences nutritionnelles. Station fédérales de recherches laitières. Liebefeld, Berne, Suisse. 1997.

[63] L. L. Smith. Another cholesterol hypothesis, CHOLESTEROL AS ANTIOXYDANT. Free Radical Biology and Medicine, USA.1991.

[64] M. FORTIER, La cryométrie en flux comme outil pour caractériser et évaluer le potentiel de fertilité des spermatozoïdes bovins, Thèse pour l'obtention du grade de maître en science. Faculté de médecine. Université Laval. Québec, 2010.

[65] M. Grégoire, évolution des pratiques d'autoconservation de sperme et de garde des embryons avant et après les lois de bioéthique de Juillet: 1994 : Incidences sur l'organisation des centres d'assistance médicale à la procréation, 1997.

[66] S. Pinsonneault, G. Ouellette : fertilité et milieux de travail. Fédération du Québec pour le planning des naissances, 1997.

Références bibliographiques

- [67] J. Lefebvre, Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain, Clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques. Thèse de Doctorat. Université de Montréal, 2009.
- [68] Educagri, Reproduction des animaux d'élevage, 2005.
- [69] D.P. Forman, J.D Kirby, Sperm mobility, phenotype in rooster (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of reproduction*, 2005.
- [70] DP. Froman, AJ. Feltman, Sperm mobility, a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Repro*, 1998.
- [71] E. Tukaszewicz, Wroclaw, Poland, Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa, 2001.
- [72] J. Peláez, D. C. Bongalhardoet, J. A. Long, Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poult*, 2011.
- [73] A.M. Donoghuea, G.J. Wishartb, Storage of poultry semen, 2000.
- [74] TG. Groothuis, C. Carere, avian personalities, characterization and epigenesis. *NeurosciBiobehav Rev*, 2005.
- [75] J. M. MORRELL, Artificial insemination in rabbits. Review, European molecular biology laboratory, Germany, 1995.
- [76] F. Turri, Developing the use of epididymal semen for farm animal cryobanks and some field applications, Thèse de Doctorat, Université de Milan, 2011.
- [77] S. Salamon, W.M.C. Maxwell, Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, 1995.

Références bibliographiques

- [78] K. Tselutin, F. Seigneurin and E. Blesbois: Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. Poultry Science, 1999.
- [79] M. Réviers et B. Sauveur : Reproduction des volailles et production d'œufs, INRA paris, 1988.
- [80] P.V. Fuertes, Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée: Etude expérimentale, 2008.
- [81] M. VIDAMENT, P. VINCENT, J-M. YVON, B. BRUNEAU, J-L. LARRY, L. DEFOIN, B. BITEAU, Effet de différents cryoprotecteurs sur la mobilité et la fertilité du sperme dans les espèces asine et équine, Les Actes du BRG, 2006.
- [82] S.K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. Van Deurs and K. Sandvig, Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. Molecular Biology of the Cell. Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Montebello, Oslo, Norway; and Structural Cell Biology Unit, Department of Medical Anatomy, The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen N, Denmark, 1999.
- [83] E-M. HAN, S-H. KIM, J. AHN and H-S. KWAK, Optimizing cholesterol removal from cream using β -cyclodextrin cross-linked with adipic acid, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Journal of Dairy Technology, Seoul, Korea, 2007.
- [84] Q.X. Guo, T. Ren, Y.P. Fang AND Y.C. Liu, Binding of vitamin A by β - cyclodextrin and hepatis (2,6- Odimethyl)- β cyclodextin, Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry, 1995.
- [85] A.M. Drotleff, W. Terns, Separation and characterization of cis-trans isomers of α -tocotrienol by HPLC using a permethylated β -cyclodextrin phase, Springer-Verlag, 1998.
- [86] Y. Watanabe, T. Yamashita, M. Yamashita¹ and S. Adachi, Suppressive Effect of α -Tocopherol Complexed with β -Cyclodextrin on the Oxidatio of Methyl Linoleate. Food Sci. Technol, 2009.

Références bibliographiques

[87] Y. Sueishi, M. Hori, N. Inazumi, Characterization of inclusion complex of vitamin E compound with 2,6-di-O-methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer and its kinetic determination for radical scavenging ability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2012.

[88] T. Yano, A. Sato, M. Sekine, K.O. Kashiwagi, The enhancing effect of γ -cyclodextrin inclusion on γ -Tocotrienol-dependent negative growth control of mesothelioma cells in a xenograft model. *Functional Foods in Health and Disease*, 2011.

[89] W. Li, P. Zhan, E. Decluq, H. Lin et X. Lin, current drug research on PEGylation with small molecular agent, *J.J.P.S*, 2012.

[90] R. O. Williams III, V. Mahaguna, M. Sriwongjanya, Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, ELSEVIER, 1998.

[91] M.M. Yallapu, M. Jaggi, S.C. Chauhan, Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. Elsevier, 2010.

ANNEXE 1

1. Diagramme d'Higuchi

	1	2	3	4	5
Echantillons	Chl /CD	Chl /CD	Chl/CD	Chl/CD	Chl/CD
Concentration de l'Hp β CD (mM)	0	30	40	60	119
Concentration du cholestérol (mM)	0,077	0,465	0,776	1,06	5,02

ANNEXE 2

1. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme bovin à 2H à température ambiante

	Moy.
Certains %, Total	22,75
Certains %, BCD C1, PROGRESSIF RAPIDE	2,53
Certains %, BCD C1, SATATIQUE	38,39
Certains %, BCD C2, PROGRESSIF RAPIDE	1,33
Certains %, BCD C2, SATATIQUE	60
Certains %, BCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	2,27
Certains %, BCD-CHL, SATATIQUE	57,39
Certains %, BCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	9,52
Certains %, BCD-vit E, SATATIQUE	31,22
Certains %, CHL, PROGRESSIF RAPIDE	3,2
Certains %, CHL, SATATIQUE	30,3
Certains %, CPLX 3, PROGRESSIF RAPIDE	10,4
Certains %, CPLX 3, SATATIQUE	5,09
Certains %, CTRL 3, PROGRESSIF RAPIDE	2,28
Certains %, CTRL 3, SATATIQUE	48,29
Certains %, HPBCD C1, PROGRESSIF RAPIDE	4,71
Certains %, HPBCD C1, SATATIQUE	29,41
Certains %, HPBCD C2, PROGRESSIF RAPIDE	2,6
Certains %, HPBCD C2, SATATIQUE	31,17
Certains %, HPBCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	8,83
Certains %, HPBCD-CHL, SATATIQUE	9,29
Certains %, HPBCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	4,25
Certains %, HPBCD-vit E, SATATIQUE	36,72
Certains %, PEG C1, PROGRESSIF RAPIDE	0,55
Certains %, PEG C1, SATATIQUE	61,2
Certains %, PEG C2, PROGRESSIF RAPIDE	4,11
Certains %, PEG C2, SATATIQUE	30,59
Certains %, PEG-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	3,55
Certains %, PEG-CHL, SATATIQUE	47,73
Certains %, PEG-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	1,86
Certains %, PEG-vit E, SATATIQUE	55,28
Certains %, PMBCD, PROGRESSIF RAPIDE	1,47
Certains %, PMBCD, SATATIQUE	58,33
Certains %, PMBCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	2,84
Certains %, PMBCD-CHL, SATATIQUE	50,24
Certains %, PMBCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	3,55
Certains %, PMBCD-vit E, SATATIQUE	45,94
Certains %, PMCD, PROGRESSIF RAPIDE	0,68
Certains %, PMCD, SATATIQUE	77,4
Certains %, vit E, PROGRESSIF RAPIDE	4,15
Certains %, vit E, SATATIQUE	31,34

ANNEXE 2

2. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme bovin après 24H de réfrigération à 5°C

	Moy.
%, Total	20,6
%, BCD C1, PROGRESSIF RAPIDE	8,49
%, BCD C1, SATATIQUE	27,41
%, BCD C2, PROGRESSIF RAPIDE	1,14
%, BCD C2, SATATIQUE	72,73
%, BCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	3,66
%, BCD-CHL, SATATIQUE	39,27
%, BCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	8,05
%, BCD-vit E, SATATIQUE	29,02
%, CHL, PROGRESSIF RAPIDE	3,98
%, CHL, SATATIQUE	27,59
%, CPLX 2, PROGRESSIF RAPIDE	4,62
%, CPLX 2, SATATIQUE	35,33
%, CTRL 2, PROGRESSIF RAPIDE	5,79
%, CTRL 2, SATATIQUE	40,91
%, HPBCD C1, PROGRESSIF RAPIDE	6,61
%, HPBCD C1, SATATIQUE	23,72
%, HPBCD C2, PROGRESSIF RAPIDE	3,69
%, HPBCD C2, SATATIQUE	45,74
%, HPBCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	8,93
%, HPBCD-CHL, SATATIQUE	13,21
%, HPBCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	6,6
%, HPBCD-vit E, SATATIQUE	43,23
%, PEG C1, PROGRESSIF RAPIDE	9,17
%, PEG C1, SATATIQUE	16,06
%, PEG C2, PROGRESSIF RAPIDE	1,94
%, PEG C2, SATATIQUE	56,77
%, PEG-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	2
%, PEG-CHL, SATATIQUE	48,13
%, PEG-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	18,81
%, PEG-vit E, SATATIQUE	11,55
%, PMBCD, PROGRESSIF RAPIDE	4,76
%, PMBCD, SATATIQUE	35,24
%, PMBCD-CHL, PROGRESSIF RAPIDE	8,72
%, PMBCD-CHL, SATATIQUE	25,34
%, PMBCD-vit E, PROGRESSIF RAPIDE	6,28
%, PMBCD-vit E, SATATIQUE	29,47
%, PMCD, PROGRESSIF RAPIDE	1,58
%, PMCD, SATATIQUE	53,16
%, vit E, PROGRESSIF RAPIDE	6,57
%, vit E, SATATIQUE	28,69

ANNEXE 2

3. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme bovin à 2H à température ambiante

	Moy.	Dév. Std
vsl, Total	10,88	15,06
vsl, T0, BCD C1	10,39	13,58
vsl, T0, BCD C2	13,66	16,88
vsl, T0, BCD-CHL	16,57	19,02
vsl, T0, BCD-vit E	8,72	10,89
vsl, T0, CHL	14,53	16,32
vsl, T0, CPLX 3	12,71	16,34
vsl, T0, CTRL 3	14,21	17,88
vsl, T0, HPBCD C1	15,38	21,92
vsl, T0, HPBCD C2	18	20,64
vsl, T0, HPBCD-CHL	16,07	18,24
vsl, T0, HPBCD-vit E	7,99	8,97
vsl, T0, PEG C1	10,36	13,37
vsl, T0, PEG C2	12,04	15,09
vsl, T0, PEG-CHL	7,99	14,47
vsl, T0, PEG-vit E	9,54	15,48
vsl, T0, PMBCD	8,45	10,77
vsl, T0, PMBCD-CHL	15,56	19,02
vsl, T0, PMBCD-VIT E	10,68	21,17
vsl, T0, PMCD	19,54	29,17
vsl, T0, vit E	7,96	10,51
vsl, T1, BCD C1	7,08	7,88
vsl, T1, BCD C2	6,72	10,83
vsl, T1, BCD-CHL	7,47	12,35
vsl, T1, BCD-vit E	15,13	14,52
vsl, T1, CHL	7,56	9,11
vsl, T1, CPLX 3	12,83	15,41
vsl, T1, CTRL 3	8,55	13,98
vsl, T1, HPBCD C1	8,34	10,13
vsl, T1, HPBCD C2	7,92	9,38
vsl, T1, HPBCD-CHL	13,02	16,71
vsl, T1, HPBCD-vit E	8,7	14,42
vsl, T1, PEG C1	5,04	6,52
vsl, T1, PEG C2	10	11,32
vsl, T1, PEG-CHL	8,24	11,32
vsl, T1, PEG-vit E	7,04	9,64
vsl, T1, PMBCD	7,94	8,14
vsl, T1, PMBCD-CHL	7,59	13,51
vsl, T1, PMBCD-VIT E	9,97	17,3
vsl, T1, PMCD	5,39	6,3
vsl, T1, vit E	9	11,21

ANNEXE 2

4. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme bovin après 24H de réfrigération à 5°C

	Moy.	Dév. Std
vsl, Total	13,77	18,37
vsl, T0, BCD C1	16,91	20,96
vsl, T0, BCD C2	21,42	25,55
vsl, T0, BCD-CHL	6,18	8,39
vsl, T0, BCD-vit E	13,3	12,78
vsl, T0, CHL	20,9	34,42
vsl, T0, CPLX 2	12,95	12,68
vsl, T0, CTRL 2	9,78	13,79
vsl, T0, HPBCD C1	10,4	10,89
vsl, T0, HPBCD C2	14,85	15,97
vsl, T0, HPBCD-CHL	13,1	18,48
vsl, T0, HPBCD-vit E	14,78	17,77
vsl, T0, PEG C1	16,98	16,19
vsl, T0, PEG C2	20,67	21,94
vsl, T0, PEG-CHL	11,79	14,67
vsl, T0, PEG-vit E	10,21	15,91
vsl, T0, PMBCD	18,95	22,28
vsl, T0, PMBCD-CHL	20,03	23,02
vsl, T0, PMBCD-VIT E	6,95	10,68
vsl, T0, PMCD	8,96	6,78
vsl, T0, vit E	13,26	15,09
vsl, T1, BCD C1	9,1	11,61
vsl, T1, BCD C2	21,42	25,55
vsl, T1, BCD-CHL	11,61	14,85
vsl, T1, BCD-vit E	11,42	17,83
vsl, T1, CHL	15,22	15,92
vsl, T1, CPLX 2	12,45	16,76
vsl, T1, CTRL 2	6,61	7,72
vsl, T1, HPBCD C1	14,3	17,19
vsl, T1, HPBCD C2	15,27	16,39
vsl, T1, HPBCD-CHL	15,21	20,01
vsl, T1, HPBCD-vit E	12,54	23,19
vsl, T1, PEG C1	13,48	17,55
vsl, T1, PEG C2	11,49	18,1
vsl, T1, PEG-CHL	8,98	13,37
vsl, T1, PEG-vit E	12,77	16,05
vsl, T1, PMBCD	11,41	11,88
vsl, T1, PMBCD-CHL	15,09	19,3
vsl, T1, PMBCD-VIT E	15,26	31,58
vsl, T1, PMCD	15,93	20,81
vsl, T1, vit E	10,46	17,13
vsl, T2, BCD C1	16,58	19,05
vsl, T2, BCD C2	6,04	8,37
vsl, T2, BCD-CHL	9,45	11,92
vsl, T2, BCD-vit E	11,66	12,24
vsl, T2, CHL	8,84	10,78
vsl, T2, CPLX 2	10,95	14,98
vsl, T2, CTRL 2	11,04	13,01
vsl, T2, HPBCD C1	11,96	13,8
vsl, T2, HPBCD C2	8,9	11,09
vsl, T2, HPBCD-CHL	11,4	13,82
vsl, T2, HPBCD-vit E	13,68	20,58
vsl, T2, PEG C1	13,79	15,34
vsl, T2, PEG C2	7,69	9,24
vsl, T2, PEG-CHL	7,62	13,69
vsl, T2, PEG-vit E	22,77	22,69
vsl, T2, PMBCD	11,65	17,91
vsl, T2, PMBCD-CHL	12,67	16,12
vsl, T2, PMBCD-VIT E	11,37	14,18
vsl, T2, PMCD	8,01	8,76
vsl, T2, vit E	12,05	14,86

ANNEXE 3

1. Résultats brut regroupant les SPZ statiques et progressifs rapides partagés en deux catégories obtenus lors de l'analyse du sperme bovin à 2H à température ambiante

	Moy.	Dév. Std
%, Total	19,54	17,92
%, T0, Complexes, PROGRESSIF RAPIDE	6,93	3,44
%, T0, Complexes, SATATIQUE	23,22	5,59
%, T0, Controles, PROGRESSIF RAPIDE	8,04	2,92
%, T0, Controles, SATATIQUE	27,12	5,18
%, T1, Complexes, PROGRESSIF RAPIDE	4,94	3,31
%, T1, Complexes, SATATIQUE	38,72	18,37
%, T1, Controles, PROGRESSIF RAPIDE	2,53	1,5
%, T1, Controles, SATATIQUE	44,81	17,65

2. Résultats brut des regroupant les SPZ statiques et progressifs rapidespartagé en deux catégories obtenus lors de l'analyse du sperme bovin après 24H de réfrigération à 5°C

	Moy.	Dév. Std
%, Total	20,93	17,88
%, T0, Complexes, PROGRESSIF RAPIDE	7,33	5,53
%, T0, Complexes, SATATIQUE	40,78	15,44
%, T0, Controles, PROGRESSIF RAPIDE	9,62	4,75
%, T0, Controles, SATATIQUE	32,53	11,52
%, T1, Complexes, PROGRESSIF RAPIDE	17,75	29,19
%, T1, Complexes, SATATIQUE	29,32	13,29
%, T1, Controles, PROGRESSIF RAPIDE	8,65	3,9
%, T1, Controles, SATATIQUE	24,8	14,49
%, T2, Complexes, PROGRESSIF RAPIDE	7,52	4,84
%, T2, Complexes, SATATIQUE	30,51	12,56
%, T2, Controles, PROGRESSIF RAPIDE	4,88	2,72
%, T2, Controles, SATATIQUE	38,91	16,87

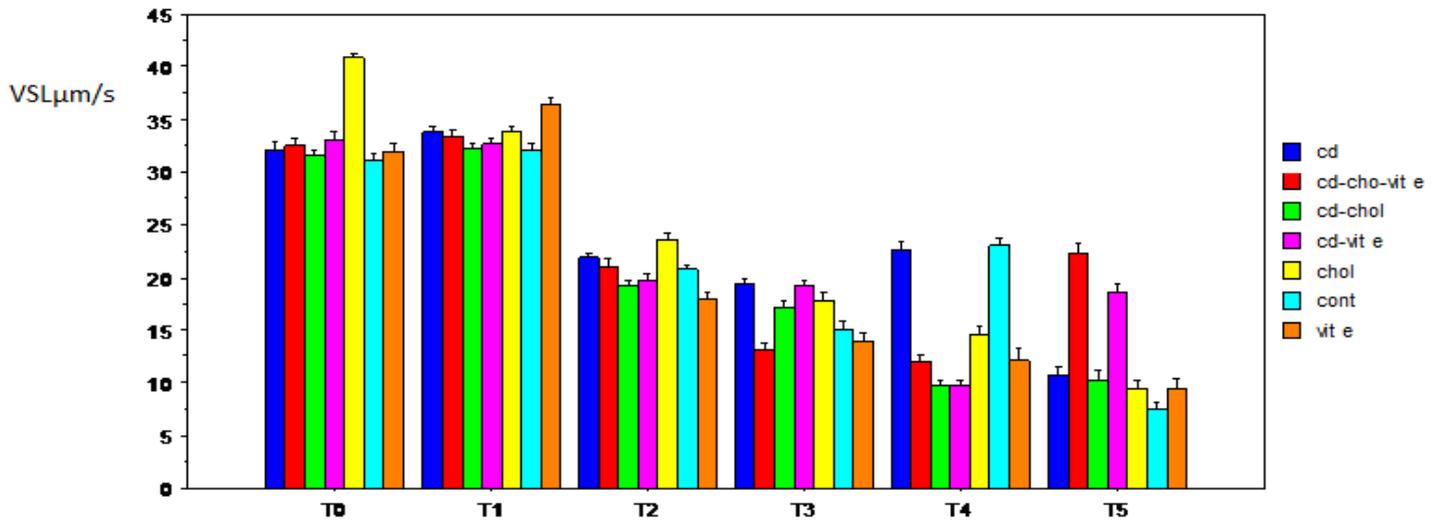
ANNAEXE 4

1. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme du lapin après 24H de congélation

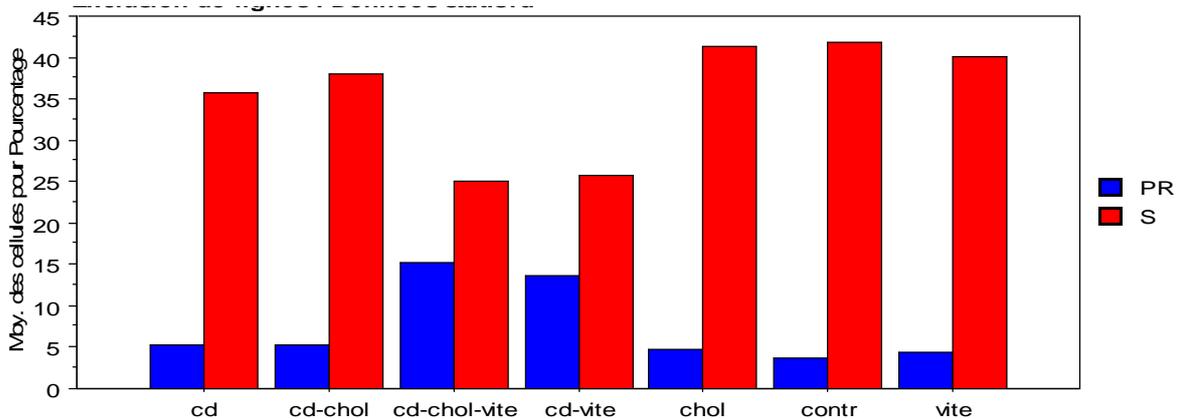
	Moy.	Dév. Std
VSL, Total	9,35	12,54
VSL, BCD, Après	5,79	11,67
VSL, BCD, Avant	11,05	15,48
VSL, CD -VIT E, Après	7,13	10,07
VSL, CD -VIT E, Avant	10,77	13,65
VSL, CD-CHL, Après	5,68	11,01
VSL, CD-CHL, Avant	10,87	14,6
VSL, CD-CHL-VIT E, Après	7,86	11,07
VSL, CD-CHL-VIT E, Avant	9,71	11,25
VSL, CHL, Après	5,55	9,93
VSL, CHL, Avant	9,77	11,14
VSL, CTRL, Après	5,37	9,74
VSL, CTRL, Avant	11,53	13,14
VSL, VIT E, Après	7,36	10,71
VSL, VIT E, Avant	8,55	10,49

ANNEXE 5

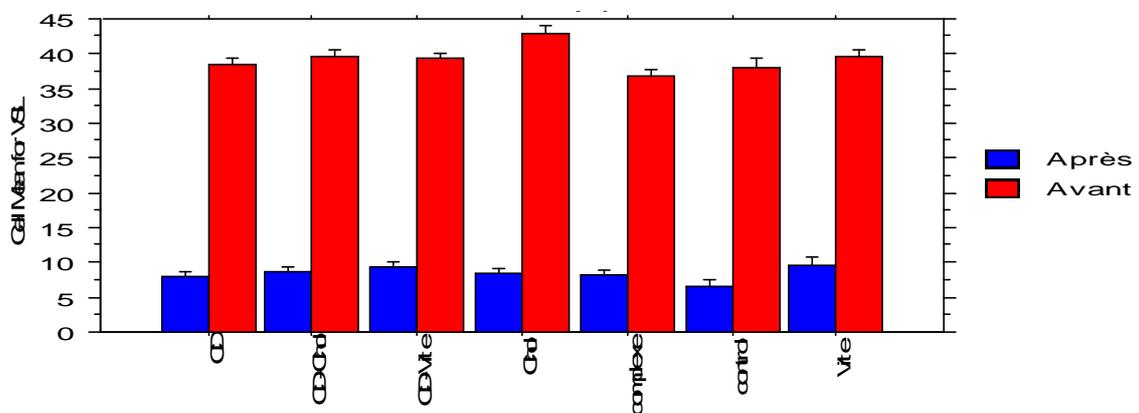
1. Diagramme en bâton des VSL des SPZ après réfrigération de 5°C



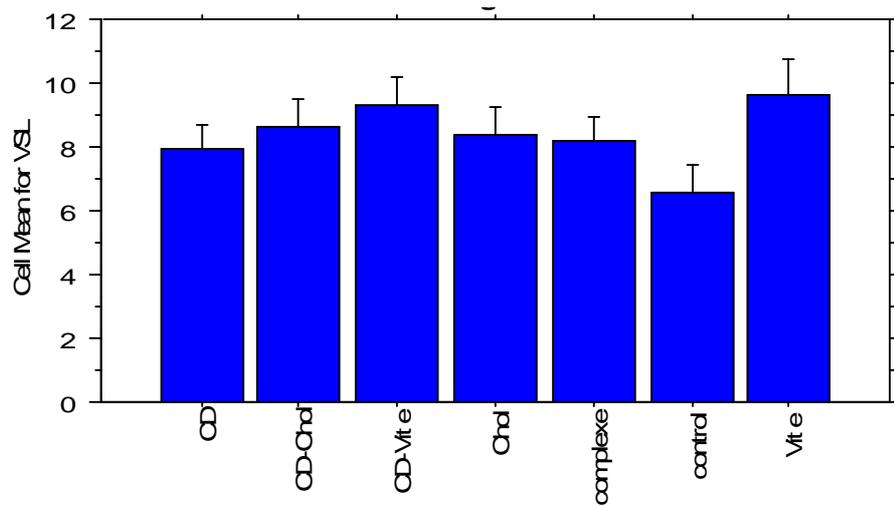
2. Diagramme en bâton des pourcentages des SPZ statiques et progressifs rapides après réfrigération de 5°C



3. Diagramme en bâton des VSL des SPZ avant et après congélation



4. Diagramme en bâton des VSL des SPZ après congélation



5. Résultats brut obtenus lors de l'analyse par SCA du sperme aviaire après 24H de congélation

VSL, Total	8,434	15,884
VSL, CD, Après	7,924	13,779
VSL, CD-Chol, Après	8,651	15,549
VSL, CD-Vit e, Après	9,312	17,876
VSL, Chol, Après	8,380	15,464
VSL, complexe, Après	8,177	15,981
VSL, control, Après	6,561	13,724
VSL, Vit e, Après	9,655	17,493

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes fixé comme objectif l'amélioration de la conservation du sperme de certaines espèces à savoir : Le bovin, l'aviaire et le lapin, ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E et du cholestérol en milieu aqueux.

Pour cela nous avons préparé plusieurs complexes que nous avons caractérisé par IR et DRX, et que nous avons appliqué à un model cellulaire (spermatozoïde).

Les résultats obtenus montrent que nous avons pu améliorer la solubilité de la vitamine E et de cholestérol, en utilisant les cyclodextrines et le PEG 6000 d'une part, et découvert un effet synergique entre la vitamine E et le cholestérol sous leurs formes complexées et dispersées sur la conservation du sperme d'autre part.

Mots clés : cholestérol, cyclodextrines, sperme, vitamine E

Abstract

In this work, our aim was the improvement of the sperm conservation of certain specimen namely: Cattle, avian and rabbit. By solubility improvement of the vitamin E and the cholesterol in aqueous environment.

We prepared several complexes which we characterized by FTIR and XRD, and which we applied on a cellular model (spermatozoa).

The obtained results demonstrated that we improved vitamin E and cholesterol solubility, by using cyclodextrins and PEG 6000 on one hand, and discovered a synergic effect between the vitamin E and cholesterol in their complexed and dispersed form on the sperm conservation on the other hand.

Key words: cholesterol, cyclodextrins, spermatozoa, vitamin E