

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA – BEJAIA

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 des complexes d'inclusion : CD/vit E et leurs applications sur la congélation du sperme aviaire**

*Réalisé par :*

M<sup>lle</sup> AGUENIOU Fazia

M<sup>lle</sup> DJEMAA Noria

*Soutenue devant le jury composé de :*

M<sup>r</sup> IGUER OUADA

Président du jury

M<sup>me</sup> BELKACEMI

Examinatrice

M<sup>r</sup> FATMI Sofiane

Promoteur

Promotion 2011/2012

# Remerciements

*Nous remercions le Bon Dieu de nous avoir donné la force, la patience et le courage d'avancer en cette période spéciale de notre existence.*

*À notre promoteur Monsieur FATMI Sofiane,*

*Vous avez très gentiment accepté d'encadrer notre travail. Recevez nos plus sincères remerciements pour les moyens mis à notre disposition tout le temps passés au laboratoire pharmaceutique. Votre expérience, vos grandes compétences et vos précieux conseils ont permis l'accomplissement de ce travail. Nous avons particulièrement apprécié votre enthousiasme et votre dynamisme communicatif, votre bonne humeur qui nous a toujours apaisés et surtout pour votre patience. Trouvez ici le témoignage de notre profonde admiration et de nos remerciements les plus sincères.*

*Nous adresserons aussi nos sincères remerciements*

*Au président de jury*

*À Monsieur EGUEROUADA,*

*Nous vous remercions tout d'abord de nous avoir accordé l'opportunité de travailler dans votre laboratoire, nous n'oublierons jamais votre premier accueil, vos encouragements et vos conseils très pertinents. Nous sommes très reconnaissantes pour votre grande contribution. Soyez assuré, de toute notre estime et de notre profond respect. Nous vous remercions également pour l'honneur que vous nous faite d'accepter de présider le jury, d'évaluer et d'examiner ce mémoire .vos remarques et suggestions ne feront que perfectionner ce travail.*

*À l'examinatrice*

*À Madame Belkacemi,*

*À qui nous devons tout le respect, veuillez trouver madame en ces quelques mots nos sincères et vifs remerciements pour toutes vos conseils et orientations.*

*À Madame AMRANI,*

*Nos plus vifs remerciements pour nous avoir permis de travailler dans votre laboratoire et laissée accéder aux matériels disponibles pour la réalisation de différentes manipulations nécessaires à notre travail. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité*

*À Mademoiselle AHNIA,*

*Nous tenons tout particulièrement à exprimer nos sentiments d'infinie gratitude, pour nous avoir procuré la vitamine E, sans laquelle ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Nous lui en sommes infiniment reconnaissantes.*

*Nous remercions tout spécialement Madame BRADAY, Madame RABHI, Monsieur Mamass, Monsieur BENIDIRI pour toutes les caractérisations, sans qui cette partie n'aurait pas existé. Nous vous remercions d'avoir répondu à nos questions, merci pour votre patience.*

*Nous souhaitons également remercier le département biologie alimentaire de l'Université AMIRA de Bejaia, en premier lieu Madame LOUAILACHE de nous avoir permis de bénéficier du lyophilisateur, ainsi que l'ingénieur de ce laboratoire de s'être occupé de la congélation et de la lyophilisation de nos échantillons. Merci de nous avoir accueillis avec le sourire. Merci pour votre générosité.*

*Nous pouvons clôturer cette liste sans remercier très sincèrement toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*



# dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à*

*Ma très chère Maman, qui est la lumière de ma vie. Je n'aurai pas pu arriver à accomplir ce travail sans elle. Tout ce que j'ai fait, c'est grâce à elle et pour elle. Je lui souhaite tout le bonheur du monde .que Dieu me la protège.*

*Mon très cher Papa, qui m'a toujours soutenu tout au long de mes études.  
Qu'Allah vous bénisse*

*Mon unique lune que j'aime beaucoup, merci pour ton soutien, ta gentillesse, pour ton amour, je te souhaite tout le bonheur du monde, **mon frère.***

*Mes deux étoiles qui me donner de la force et éclaire mon chemin : **mes deux sœurs** NAÏMA et YASMINA et leurs maries a qui je dois tout le respect.*

***KHALED** qui ma entouré de son amour et qui a été a mes coté durant toutes ces années.  
Sons oublier mon adorable SAYEF*

*Ma voisine **RABHA** qui ma aidé, merci pour tous, et a ses deux enfants LIZA et ISLEM  
À tata MALIKA et tonton SMAIL.*

***DJOHARA** et son marie **KAMEL** et ces deux adorables filles **RIMA** et **MAYA** que j'aime énormément*

*Mon amie et collègue **FAZIA** et sa famille : les belles paroles sont facile a dire, mais une personne comme toi est difficile a trouvé, merci pour ta patience pour ta compréhensive et pour ton grand cœur, tu mérites tout le bonheur et l'amour du monde*

*mes chers ami(e)s qui mon beaucoup apportée, quelques lignes ne suffisent pas à les remerciez : SONIA, BANIA, DJAOUIDA, WASSILA, SAMIA, MANEL, SOUFIA, AMINE, MOH, HAKIM, MOHAMED, GHANIA, KATIA, FOUZIA, SOUHILA, SOUAD, FELA.*

*Toute la promotion de génie des procédés 2011/2012*

*NORIA*

# dédicaces

*Avec toute mon affection je dédie ce travail à :*

*Mes deux très chers parents à qui je ne manifesterais jamais assez, tout mon amour et ma gratitude envers eux,*

*Mes deux sœurs : Ouzna , Ghania et ses adorables choux ( Linda, Kamel , Aziza, Asma ), a mes deux frères : Lounes , Arezki et sa femme Fatiha et leurs deux enfants ( Inass, Yanis ).*

*Que toutes ces personnes chères trouvent ici l'expression de mon profond amour et gratitude éternelle pour leurs compréhensions.*

*Tous mes ami(e)s : Lidia, Fouzia, Manel, Mina, Noureddine, Salim, Sofiane, Yahia, Idriss, Hamid, Djamel.*

*Bob, celui qui n'aime pas que l'on remercie. Ta générosité m'a été d'une très grande aide.*

*Une personne qui m'est et serais toujours chère pour tout son soutien pour moi à toi SIMA.*

*Fazia*

# Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre I : Généralités sur les cyclodextrines

1.1.Introduction.....	2
I.2. Historique.....	2
I.3. Structure et propriétés des cyclodextrines .....	2
I.3.1. Structure .....	2
I.3.2. Propriétés physico-chimiques .....	4
I.4. Stabilitédes cyclodextrines en solution .....	5
I.5. Toxicité des cyclodextrines.....	5
I.6. Modifications sélectives des $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ - cyclodextrines.....	6
I.7. Formation de complexes d'inclusion .....	6
I.8. Diagramme de solubilité .....	8
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 .....	10
I.10.1. Méthode spectrophotométrique UV-visible .....	10
I.10.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	11

I.10.3. Spectroscopie Infrarouge (IR).....	11
I.10.4. Diffraction des rayons X (DRX).....	11
I.10.5. La microscopie électronique à balayage (MEB).....	12
I.10.6. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	12
I.10.7. Test de dissolution.....	13
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.10.4. Industrie d'agriculture.....	14
I.11.5. Chromatographie.....	14
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.....	18
II.5. Propriétés biochimiques et métaboliques.....	19
II.6. Source.....	19
II.7. Toxicité.....	20
II.8. Les dérivés de la vitamine E.....	20
II.8.1. Synthétique.....	20
II.8.1.1. dl- $\alpha$ -tocopherol.....	20
II.8.2. Estérifiés.....	21
II.8.2.1. D- $\alpha$ tocophérol succinate acide.....	21
II.8.2.2. Alpha-tocophéryl nicotine.....	21
II.8.2.3. Mélange de tocophérol.....	22
II.9. Conclusion.....	22

## **Chapitre III : travaux anterieurs**

III.1. Introduction.....	23
III.2. Travaux antérieurs.....	23

## **Chapitre IV : La congélation su 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. Méthode de récolte du sperme du coq .....	28
IV.5. Conservation de sperme du coq par congélation .....	28
IV.5.1. Dilution .....	28
IV.5.2. Cryoprotecteurs.....	29
IV.6. Les étapes de la technique de congélation de sperme aviaire .....	29
IV.6.1. La Phase de refroidissement .....	29
IV.6.2. Phase de conditionnement.....	29
IV.6.3. La phase de congélation.....	29
IV.6.4. La phase de décongélation .....	29
IV.6. Conclusion .....	30

## **PARTIE EXPRERIMENTALE**

### **Chapitre V : Matériel et méthodes**

V.1. Introduction .....	31
V.2. Pré-développement de la méthode de quantification .....	31
V.2.1. Absorbance de la vitamine E dans l'éthanol et méthanol .....	31
V.2.2. Spécificité.....	31

V.2.3. Linéarité .....	32
V.3. Diagramme d'Higuchi.....	32
V.4. Préparation des complexes d'inclusion .....	33
V.4.1. Le mélange physique.....	34
V.4.2. Méthode de Kneading .....	34
V.4.3. Méthode de lyophilisation.....	35
V.4.4. Méthode Co - évaporation.....	36
V.5. Caractérisation des complexes d'inclusion .....	36
V.5.1. Analyse par spectroscopie IR.....	37
V.5.2. Analyse par microscopie à balayage électronique .....	37
V.5.3. Diffraction de rayon x .....	38
V.5.4. Analyse thermique gravimétrique (ATG) .....	38
V.5.5. Teste de dissolution.....	39
V.5.6. Le dosage (quantification des pertes).....	39
V.6. Étude de l'action des complexes sur les spermatozoïdes .....	40
V.6.1. Congélation du sperme.....	40

## **Chapitre VI: Résultats et discussions**

VI.1. Pré-développement .....	43
VI.2.Linéarité .....	44
VI.3. Le diagramme de solubilité (diagramme d'Higuchi).....	45
VI.4. Caractérisation des complexes d'inclusion.....	47
VI.4.1. Analyse par spectroscopie Infrarouge.....	47
VI.4.1.2. Co-évaporation.....	47
VI.4.1.3. Kneading .....	48
VI.4.1.4. Lyophilisation .....	48
VI.4.2.Analyse par microscopie à balayage électronique .....	50
VI.4.3. Diffraction de Rayon X.....	52
VI.4.4. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	53
VI.4.4.1. Vitamine E .....	53
VI.4.4.2. Beta cyclodextrine .....	54
VI.4.4.3. Kneading .....	54

VI.4.4.4. Lyophilisation .....	55
VI.4.5. Teste de dissolution.....	56
VI.4.6. Dosage (quantification des pertes).....	57
VI.5. Étude de l'action des complexes sur les spermatozoïdes.....	58
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>60</b>
<b>Références bibliographique</b> .....	<b>62</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>71</b>

# Liste des abréviations

<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique.
<b><math>\alpha</math>-CD</b>	: Alpha cyclodextrine.
<b>ATG</b>	: Analyse thermogravimétrique.
<b><math>\beta</math>-CD</b>	: Beta cyclodextrine.
<b>CD</b>	: Cyclodexyrine.
<b>CDs</b>	:Cyclodextrines.
<b>CGTases</b>	: Cyclodextrinesglucosyl transférases.
<b>CMCD</b>	: Carboxymethyl- $\beta$ - cyclodextrine.
<b>DMA</b>	:Diméthylacétamine.
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde.
<b>DRX</b>	: Diffraction des rayons X.
<b><math>\gamma</math>-CD</b>	: Gamma- cyclodextrine.
<b><math>\gamma</math>-T3</b>	: Gamma-tocotrienol.
<b>FT</b>	: Fraction de $\gamma$ -tocotrienol.
<b>FTIR</b>	: Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier.
<b>HPLC</b>	: Chromatographie liquide à haute performance.
<b>IR</b>	: Infrarouge.
<b>KBr</b>	: Bromure de potassium.
<b>MEB</b>	: Microscopie électronique à balayage.
<b>MRI</b>	: Imagerie de résonance magnétique.
<b>NaCl</b>	: Chlorure de sodium.
<b>PA</b>	: Principe actif.
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire.
<b>T3</b>	: Tocotrienol.
<b>UV-vis</b>	: Ultraviolet- visible.
<b>Vit E</b>	: Vitamine E.
<b>Vf</b>	: Vivants frais.
<b>Vn</b>	: Vivants normaux.

# Liste des figures

<b>Figure I.1 :</b> Taille et structure de cyclodextrine.....	3
<b>Figure I.2 :</b> Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine.....	3
<b>Figure I.3 :</b> Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leur cavité respective.....	4
<b>Figure I.4 :</b> Représentation schématique de la formation des complexes d'inclusion de stoechiométries différentes.....	7
<b>Figure I.5 :</b> Type de diagramme de solubilité selon la classification d' Higuchi et Connors..	9
<b>Figure II.1 :</b> Structure des tocophérols et tocotriénols.....	16
<b>Figure II.2 :</b> Structure alpha tocophérol.....	21
<b>Figure II.3 :</b> Structure alpha tocopherylnicotinate.....	21
<b>Figure IV.1 :</b> Ultra structure de spermatozoïde.....	27
<b>Figure VI.1 :</b> Spectre d'absorbance de la vitamine E dans l'éthanol.....	43
<b>Figure VI.2 :</b> Spectre d'absorbance de la vitamine E dans le méthanol.....	43
<b>Figure VI.3 :</b> Courbe de linéarité..... ;;	44
<b>Figure VI.4 :</b> Courbe d'étalonnage.....	45
<b>Figure VI.5 :</b> Courbe d'Higuchi.....	46
<b>Figure VI.6 :</b> Spectre Infrarouge dule mélange physique.....	47
<b>Figure VI.7 :</b> Spectre Infrarouge de la Co-évaporation.....	47

<b>Figure VI.8 :</b> Spectre Infrarouge du Kneading.....	48
<b>Figure VI.9 :</b> Spectre Infrarouge de la lyophilisation.....	48
<b>Figure VI.10 :</b> Micrographie MEB.....	51
<b>Figure VI.11 :</b> Diffraction des rayons X des complexes d'inclusion.....	52
<b>Figure VI.12 :</b> ATG de la vitamine E.....	53
<b>Figure VI.13 :</b> ATG de la $\beta$ -CD.....	54
<b>Figure VI.14 :</b> ATG du complexe obtenu par Kneading.....	54
<b>Figure VI.15 :</b> ATG du complexe obtenu par lyophilisation.....	55
<b>Figure VI.16 :</b> Histogramme montrant les pourcentages de mobilité des spermatozoïdes après décongélation dans les six milieux de congélation ( $\beta$ -cyclodextrine, contrôle, hyperosmotique, kneading, lyophilisat, vitamine E).....	58

# Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Caractéristiques physico-chimiques de $\alpha$ -, $\beta$ - et $\gamma$ -cyclodextrines.....	4
<b>Tableau II.1</b> : Dénomination de différents tocophérols et tocotrienols.....	17
<b>Tableau II.2</b> : Les stéréoisomères des tocophérols et des tocotriénols.....	17
<b>Tableaux II.3</b> : Propriétés physico-chimique de dl- $\alpha$ -tocophérol acétate.....	18
<b>Tableau V.1</b> : Différentes concentrations de vitamine E dans l'éthanol.....	32
<b>Tableau V.2</b> : Différentes quantités de $\beta$ -CD et vitamine E.....	33
<b>Tableau V.3</b> : Les quantités des matières premières pour former les complexes.....	34
<b>Tableau V.4</b> : Quantité de complexe utilisé pour les tests in vivo.....	41
<b>Tableau VI.1</b> : Concentrations en vitamine E dissoute.....	56
<b>Tableau VI.2</b> : Quantification des concentrations en vitamine E dissoute.....	57

# Introduction générale

## **Introduction générale**

---

L'existence d'un nombre élevé d'espèces, races et lignées menacées a souligné le besoin urgent de gestion des ressources génétiques, qui peut être une alternative au maintien des populations, dans ce domaine, plusieurs méthodes de reproduction assistée ont été développées afin de pallier aux problèmes d'infertilité [1].

La conservation à basse température et la congélation des spermatozoïdes sont des méthodes privilégiées [2], la congélation permet en outre la conservation de la diversité génétique des différentes espèces.

La cryopréservation séminale consiste à la congélation et au stockage de spermatozoïdes à des fins de reproduction [3], à la suite à cette technique, plusieurs fonctions cellulaires sont affectées par les méthodes de conservation ou de congélation. La membrane plasmique des spermatozoïdes est une cible majeure, cette dernière subit des modifications chimiques dévastatrices qui minimisent l'espérance de vie des spermatozoïdes [2]. Dans le but de remédier aux différents problèmes liés à la congélation, de nombreux chercheurs travaillent sur des agents permettant la protection du sperme lors du processus de congélation, ces agents sont appelés cryoprotecteurs. En effet, de nombreuses études ont montré un effet bénéfique des antioxydants en général et des vitamines en particulier [4].

Les antioxydants peuvent améliorer la qualité du sperme, dans cette logique, la vitamine E appelée tocophérols est classée en tête de liste des antioxydants compte tenu de son grand pouvoir réducteur. Elle est aussi connue pour être une vitamine liposoluble ce qui ne favorise pas son utilisation seule comme cryoprotecteur vu la nature aqueuse du sperme [5].

Pour pallier à ce défaut, plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des cyclodextrines (CDs). En effet, les CDs naturelles et modifiées ont la très grande propriété de solubiliser les molécules hydrophobes [6].

Depuis plusieurs années, une attention spéciale a donc été portée sur la complexation des tocophérols par les cyclodextrines [7].

Dans ce manuscrit, nous présenterons une revue bibliographique concernant les trois axes principaux de ce projet, à savoir les cyclodextrines, la vitamine E et la congélation du sperme aviaire. Par suite, nous résumerons le travail effectué tout le long de cette thèse, nous exposerons les résultats trouvés et interpréterons ces derniers. Nous terminerons par un bref résumé des acquis obtenus à travers ce projet et les moyens de les optimiser et de les développer.

# Chapitre I

## Généralités sur les cyclodextrines

## I.1. Introduction

Les cyclodextrines (CD) font partie des molécules cages d'origines naturelles ou chimiquement modifiées qui permettent d'encapsuler diverses molécules. Elles sont connues pour leurs aptitudes à accroître la solubilité de nombreuses molécules organiques par formation de complexes d'inclusion.

Dans ce chapitre, nous donnons un aperçu théorique sur l'origine des cyclodextrines, leurs exploitations et les domaines de leurs utilisations.

## I.2. Historique

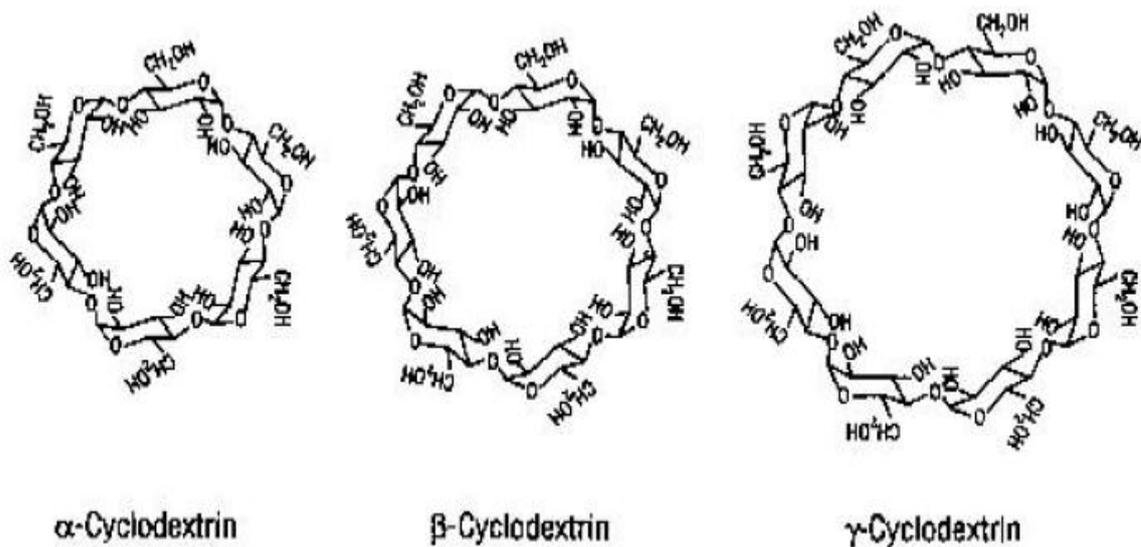
Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides constituée d'unités de glucoses. Ces composés ont été isolés pour la première fois par Villiers en 1891, grâce à l'expérience de la dégradation de l'amidon par une souche de micro-organismes (l'amylase de *Bacillus macerans* : cyclodextrinase) [6,8]. La découverte des cyclodextrines n'est cependant pas attribuée à Villiers, mais à F. Schardinger. C'est ce dernier qui isola au début des années 1900 deux substances cristallines. Le scientifique les appela  $\alpha$ - et  $\beta$ -dextrines, leur exacte architecture moléculaire n'étant pas encore connue à cette époque [9]. Ce n'est qu'en 1936, que Freudenberg et *coll.* arrive à la conclusion que les "dextrines de Schardinger" sont des oligosaccharides constitués d'un enchaînement d'unités maltoses liées par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques, et postule que ces produits sont cycliques [7]. En 1948, ils découvrent la  $\gamma$ -cyclodextrine et élucident sa structure. En 1957, French rapporte l'existence de CDs plus grandes et publie la première revue sur les cyclodextrines.

À la fin des années 1960, la préparation des CDs, leurs structures, leurs propriétés physicochimiques ainsi que leurs capacités à former des complexes d'inclusion ont été élucidées [10]. Mais la disponibilité des cyclodextrines et des coûts de production élevés a considérablement limité leurs recherches et applications jusqu'aux années 70 [11].

## I.3. Structure et propriétés des cyclodextrines

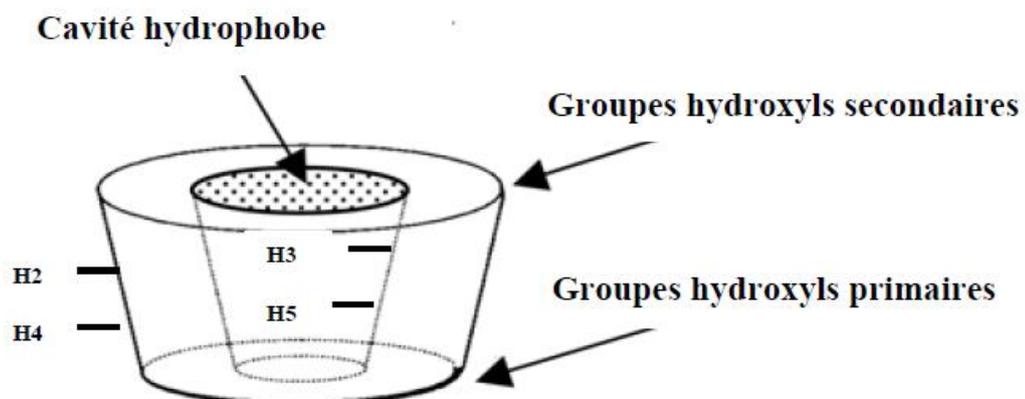
### I.3.1. Structure

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités de glucoses liées par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques. Il y a trois types ;  $\alpha$ -cyclodextrine,  $\beta$ -cyclodextrine,  $\gamma$ -cyclodextrine, qui se compose de 6, 7, et 8 unités glucopyranoses (figure I.1) [12]. Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amidon par les cyclodextrines glucosyl transférases (CGTases), telles que *Bacillus macerans* [13].



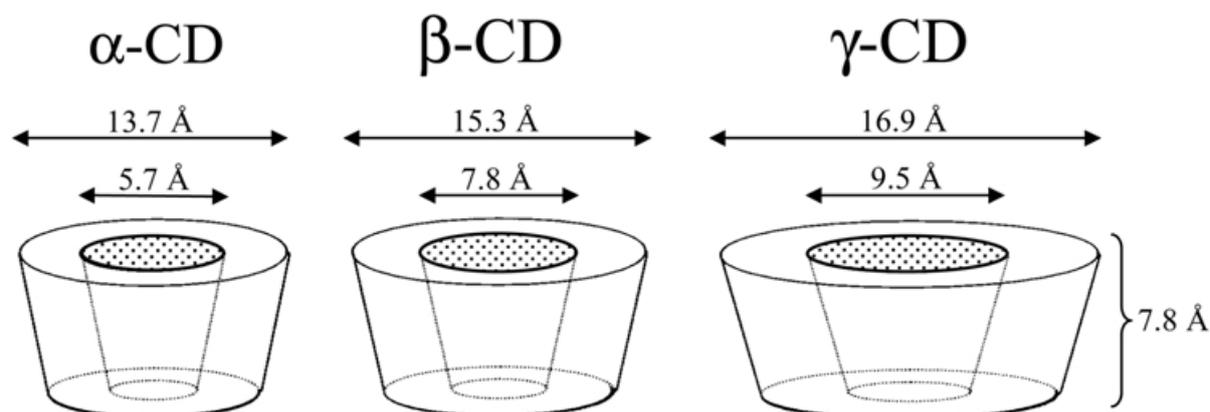
**Figure I.1.** « Taille et structure de cyclodextrine » [14].

Leurs structures en trois dimensions apparaissent sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles. La partie extérieure est donc hautement hydrophile. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire) (Figure I.2). La libre rotation des hydroxyles primaires diminue le diamètre effectif de la cavité du côté où ils se trouvent alors que les hydroxyles secondaires sont en position plus figée. L'intérieur de la cavité est constitué d'atomes d'hydrogène portés par les carbones C3 et C5 ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique ce qui lui confère un caractère apolaire [15].



**Figure I.2.** « Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine » [16].

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 :  $\beta$ - <  $\alpha$ - <  $\gamma$ - 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 [15,16]



**Figure I.3.** « Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leurs cavités respective » [16].

### I.3.2. Propriétés physico-chimiques

Les cyclodextrines les plus communément connues sont l'  $\alpha$ -, la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -CD. Ce sont des produits cristallins, homogènes et non hygroscopiques, leurs caractéristiques physico-chimiques les plus importantes sont décrites dans le tableau I.1 [17].

**Tableau I.1 :** « Caractéristiques physico-chimiques de  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines » [18]

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Nombre d'unités glucose	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Formule brute	<b>C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>30</sub></b>	<b>C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>35</sub></b>	<b>C<sub>48</sub>H<sub>80</sub>O<sub>40</sub></b>
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	<b>972.87</b>	<b>1135.01</b>	<b>1297.1</b>
Diamètre de la cavité (Å)	<b>4.7-5.3</b>	<b>6.0-6.5</b>	<b>7.5-8.3</b>

Diamètre externe (Å)	<b>14.6 ± 0.4</b>	<b>15.4±0.4</b>	<b>17.5-0.4</b>
Hauteur du tore (Å)	<b>7.9±0.1</b>	<b>7.9±0.1</b>	<b>7.9±0.1</b>
Volume de cavité (Å <sup>3</sup> )	<b>174</b>	<b>262</b>	<b>427</b>
Point de fusion (°C)	<b>275</b>	<b>280</b>	<b>270</b>
Nombre des molécules d'eau de cristallisation	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>17</b>
La constante de diffusion à 40°C	<b>3.443</b>	<b>3.224</b>	<b>3.000</b>
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100ml)	<b>12.8</b>	<b>1.8</b>	<b>25.6</b>

Les cyclodextrines sont solubles dans l'eau et leur solubilité augmente avec la température. La  $\beta$ -CD est la moins soluble des cyclodextrines natives, à cause de l'orientation et de l'intensité des liaisons hydrogènes établies entre les groupes hydroxyles (C2-OH) et (C3-OH) des entités glucoses adjacents, car ces derniers interagissent moins avec l'eau [17].

L' $\alpha$ -cyclodextrine possède une unité de glucose en conformation tendue ce qui ne rend possible que l'établissement de 4 liaisons hydrogène sur les six possibles ; la molécule de  $\gamma$ -cyclodextrine est quant à elle non plane et possède une structure moins rigide ce qui lui confère la plus grande solubilité des trois cyclodextrines [6].

#### 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 [19].

#### I.5. Toxicité des cyclodextrines

Les cyclodextrines natives et leurs dérivés hydrophiles traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles. Les dérivés lipophiles de la  $\beta$ -cyclodextrine, même s'ils interagissent plus avec les membranes, ne les traversent pas pour autant. 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 puisqu'elles ne peuvent pas être hydrolysées par les amylases salivaires et pancréatiques humaines. Cependant, la  $\alpha$ -CD et la  $\beta$ -CD peuvent être fermentés par la flore microbienne intestinale. L'administration par voie orale des CDs est, généralement tolérée et n'est pas associée aux effets nuisibles significatifs [20,21].

### **I.6. Modifications sélectives des $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ - 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 [22,23].

Parmi les trois cyclodextrines natives les plus courantes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), la  $\beta$ -CD est de loin la moins couteuse. Toutefois, son utilisation est généralement limitée en raison de sa faible solubilité aqueuse. La modification chimique des cyclodextrines permet d'obtenir des dérivés possédant des propriétés physico-chimiques différentes de celle des CDs natives, et d'élargir ainsi leurs champs d'application, les objectifs de ces modifications sont [19] :

- L'augmentation de la solubilité aqueuse ;
- La modification de la capacité de complexation.

Cette modification chimique porte sur :

- Ethérisation (dérivés alkylés et silylés) ;
- Estérisation (dérivés acylés et sulfonylés) ;
- Halogénéation ;
- Substitution nucléophile de groupes partants (tosylates, halogénures) pour donner des dérivés azotures, amines, thioalkyles,...) [10].

Les CDs les plus utilisées et étudiées sont l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (HP $\beta$ CD), méthyl- $\beta$ - cyclodextrine (MCD), carboxyméthyl- $\beta$ - cyclodextrine (CMCD) [19].

La difficulté des modifications sélectives provient principalement du grand nombre de fonctions hydroxyles portées par la CD (18 pour l' $\alpha$ -CD, 21 pour la  $\beta$ -CD, 24 pour la  $\gamma$ - CD), ainsi que de leur différence de réactivité [24].

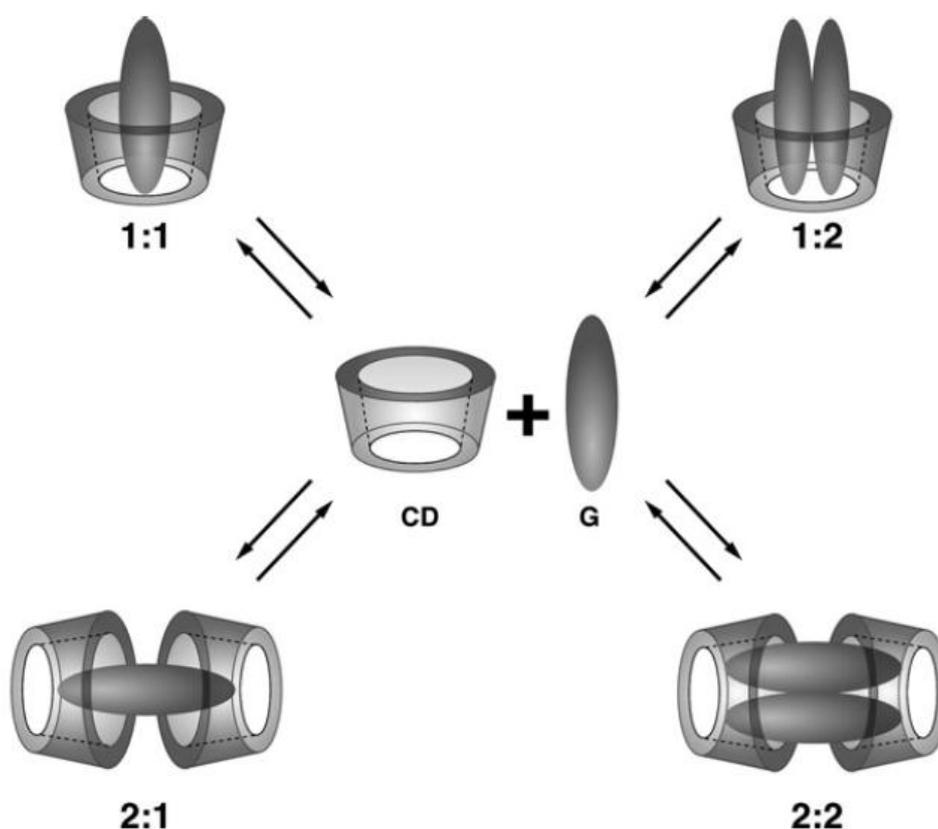
### **I.7. Formation de complexes d'inclusion**

Les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion hydrosolubles avec beaucoup de principes actifs lipophiles [25].

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

- (i) Des interactions hydrophobes entre l'hôte et l'invité,
- (ii) Des interactions de Van Der Waals (interactions dipôle/dipôle),
- (iii) Des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des cyclodextrines et certaines molécules invitées [26].

Les CDs sont, de ce fait, des composés de choix pour l'inclusion de molécules hydrophobes à la condition que la taille de ces invités s'accorde aux dimensions internes de la cavité (figure I.3). 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.4) [27].



**Figure I.4.** « Représentation schématique de la formation des complexes d'inclusion de stœchiométries différentes » [28].

L'association et la dissociation du complexe formé entre la cyclodextrine et l'invité est alors gouvernée par l'équilibre thermodynamique suivant ; dans le cas d'une complexation entre une molécule de cyclodextrine et une molécule invitée [6].

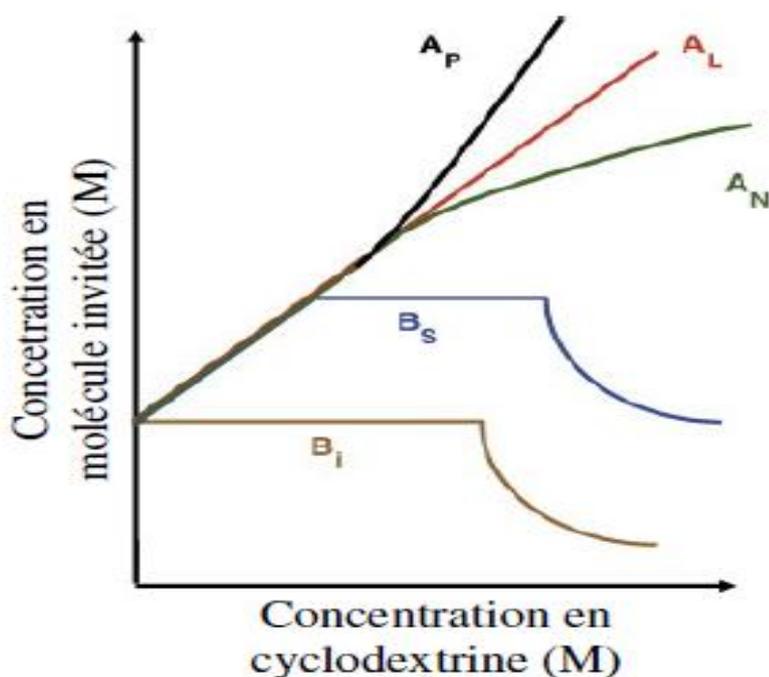


$$K_{n:m} = \frac{\text{CD}_m \cdot \text{I}_n}{[\text{CD}]^m [\text{I}]^n}$$

Où CD représente la molécule hôte soit la cyclodextrine, I la molécule invitée et  $K_{n/m}$  est la constante de stabilité du complexe pour un rapport entre la cyclodextrine et la molécule invitée de m pour n [6,15].

### I.8. Diagramme de solubilité

Pour des études de solubilité ou isotherme de solubilité, un excès de substance est ajouté à des solutions de cyclodextrine à différentes concentrations [29]. Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre (de plusieurs heures à plusieurs jours), on détermine la quantité de substance solubilisée par une méthode de dosage appropriée. Un diagramme de solubilité est alors réalisé en reportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe des abscisses et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe des ordonnées Higuchi et Connors avaient classifié les complexes d'inclusion en se basant sur l'effet de la solubilité du substrat, ce qui a permis de caractériser les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrines-molécules invitées (figure I.5) [15,30].



**Figure I.5.** « Type de diagramme de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors » [15].

Le type A est obtenu quand la solubilité apparente de la substance augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrines. Comme on peut le voir, ce type de diagramme nous donne trois variantes (figure I.5) :

Les profils A<sub>L</sub> (linéaires) sont généralement attribués à la formation de complexes 1:1. S'il y a une courbure positive, comme vue avec A<sub>P</sub>, on a formation simultanée de complexes de stœchiométries différentes (1:1 à l'origine, puis 1:2 ou 1:3...) [31].

Un profil A<sub>N</sub> 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 [15].

Les profils de phase-solubilité de type B sont indicatifs de la formation des complexes d'inclusion avec 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<sub>S</sub> et B<sub>I</sub> [32].

## **I.9. Préparation des complexes d'inclusion**

### **I.9.1. La méthode de précipitation**

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

Le complexe est obtenu par précipitation du mélange réalisé, qui est séparé et séché pour obtenir l'inclusion pleine [33].

### **I.9.2. La méthode de pétrissage (Kneading)**

La cyclodextrine est triturée dans un mortier avec une petite quantité d'eau pour obtenir une pâte homogène. La molécule invitée est alors ajoutée. Préalablement ; une petite quantité de solvant (méthanol, éthanol) peut être ajoutée pour faciliter la dissolution de la molécule invitée [34].

### **I.9.3. Mélange physique**

La méthode est basée sur un mélange homogène des cyclodextrines et du substrat dans un mortier, le mélange s'effectue sans ajout de solvant [35]. Les molécules invitées peuvent être complexées par simple mélange des deux poudres ensemble. Le temps de mélange nécessaire dépend de l'invité. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes des poudres et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante [16].

### **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 [36].

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

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

### **I.10.1. Méthode spectrophotométrique UV-visible**

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution [37].

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 [17].

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 [38].

### **I.10.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La spectrométrie RMN est devenue la méthode la plus importante pour l'élucidation de la structure des composés organiques, particulièrement à l'état liquide. Son utilisation pour l'étude des complexes d'inclusion des CDs repose sur l'idée suivante : si la molécule 'invitée' a pénétré dans la cavité de CD, les atomes d'hydrogène situés à l'intérieur de la cavité (H-3 et H-5) seront considérablement perturbés, tandis que ceux qui se trouvent sur la surface externe (H-2, H-4 et H-6) ne seront pas influencés [18]. En effet, cette méthode permet de déterminer l'ordre local et les conformations à la fois des constituants de l'amidon (conformation hélicoïdale, mobilité locale, éventuellement cristallinité et type polymorphique) et de la molécule complexée ou associée, qui devrait présenter des signatures très spécifiques du complexant [39].

### **I.10.3. Spectroscopie infrarouge (IR)**

La spectroscopie infrarouge mesure l'excitation vibrationnelle des atomes autour des liaisons qui les unissent suite à l'exposition à des radiations électromagnétiques. La position des bandes d'absorption dépend de la nature des groupes fonctionnels qui sont présents dans une molécule. Cette méthode d'analyse permet d'étudier l'arrangement des atomes et les distances interatomiques. Ces mesures sont généralement réalisées avec un échantillon à l'état solide [16].

Dans ce cas, elle est utilisée pour estimer l'interaction entre les cyclodextrines et les molécules invitées. L'application de la spectroscopie infrarouge est limitée aux invités ayant quelques bandes caractéristiques, telles que le carbonyle [40].

### **I.10.4. Diffraction des rayons X (DRX)**

La diffraction des rayons X est utilisée pour étudier les caractéristiques de poudre du principe actif et de ses complexes d'inclusion avec la cyclodextrine [41]. Les solides cristallisés ont la propriété de diffracter les rayons X.

Les diffractogrammes de rayons X informent sur la structure cristalline de l'échantillon et sur l'état de cristallinité : plus les raies de diffraction sont fines, plus le réseau cristallin est organisé à grande échelle [42].

### **I.10.5. La microscopie électronique à balayage (MEB)**

Le microscope électronique à balayage (MEB) est un instrument scientifique permettant de réaliser des images de la surface d'objets en trois dimensions avec une très haute résolution, de l'ordre du nanomètre. La résolution d'un instrument de grossissement est définie par la taille minimale détectable par l'œil humain sur l'image produite par cet instrument. Ceci signifie qu'une image produite par un MEB permet de différencier distinctement deux points séparés de moins d'un nanomètre [43].

Dans un microscope électronique à balayage, l'image est obtenue séquentiellement point par point en déplaçant le faisceau d'électrons primaires sur la surface de l'échantillon. L'image est alors reconstruite en utilisant le signal généré par les différents détecteurs pour moduler la brillance d'un tube cathodique. Le rapport entre le format de l'écran et celui de la zone balayée sur l'échantillon détermine le grossissement [44].

Cette technique est utilisée pour étudier les aspects microscopiques de la CD et de la molécule invitée. La différence d'apparence morphologique, ainsi que la comparaison d'images obtenues pourraient nous donner des informations préliminaires sur la manière dont nos molécules forment leur complexe.

### **I.10.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)**

L'analyse thermogravimétrique consiste à suivre la perte en masse d'un composé en fonction de la température de chauffe [37].

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 décomposé. Toutes modifications structurales de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CD peuvent être évaluées par cette technique [16].

**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* (dissolutest), 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 100tr/min, et la température est maintenue à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  [45], après un temps (t) ou/et des temps (t1, t2,...) fixés par la pharmacopée ou la monographie, des prélèvements des échantillons sont effectués à l'aide des seringues, 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**

Beaucoup de travaux démontrent les nombreuses applications possibles des cyclodextrines comme excipient dans les préparations pharmaceutiques. L'utilisation de cyclodextrines a pour but d'améliorer la solubilité des molécules faiblement hydrosolubles, permettant, ainsi, une délivrance rapide et massive du principe actif ; ce qui accroît sa biodisponibilité [19,21]. En plus de la solubilité et de la disponibilité biologique, les cyclodextrines procurent une meilleure stabilité à beaucoup de molécules [46].

**I.11.2. Industrie alimentaire**

Dans l'industrie alimentaire, les cyclodextrines sont utilisés comme stabilisants pour les arômes et pour améliorer le goût et masquer les odeurs désagréables, mais aussi pour enlever le cholestérol des produits d'origines animales comme les œufs et les produits laitiers [47].

**I.11.3. En cosmétique**

En cosmétique, elles sont utilisées comme supports et stabilisants de parfums [17]. Les cyclodextrines sont aussi utilisées dans la formulation de produit 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) [48].

**I.10.4. Industrie d'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 [48].

**I.11.5. Chromatographie**

Les cyclodextrines dans ce domaine sont des produits de luxe et de grandes importances, car elles permettent d'obtenir une séparation chirale. Elles sont fréquemment employées en chromatographie liquide à rendement élevé, électrophorèse capillaire et formation d'image de résonance magnétique (MRI pour la séparation de composés chiraux [49], leur utilisation massive en chromatographie revient à leurs propriétés de reconnaissance (pouvoir sélectif) en particulier de molécules isomères [50].

**I.12. Conclusion**

Ce chapitre est important, car il nous permet en premier lieu de comprendre la particularité des cyclodextrines, l'intérêt de ces dernières, mais aussi leur limite. De plus, toutes les données récoltées nous permettent de faire un choix compte aux tests à effectuer et la manière dont ils doivent être faits.

# Chapitre II

## Généralités sur la vitamine E

## **II.1. Introduction**

La substance couramment nommée « vitamine E » est en réalité un terme générique qui englobe un grand nombre de molécules de structures chimiques 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 [51,53].

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. Ol désigne l'alcool [52,54]. Les premières préparations de vitamine E furent réalisées à partir de l'huile de germe de blé par EVANS et Oliver Emerson en 1936 [55] 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 [54,56].

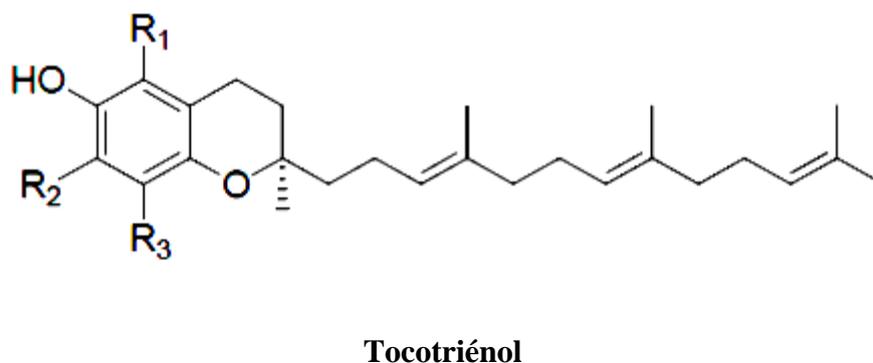
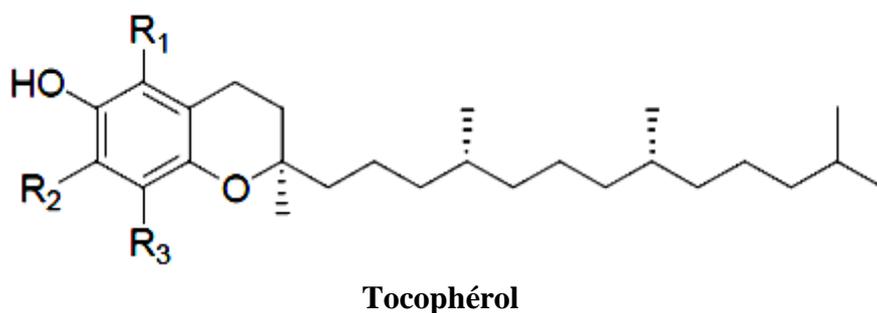
Les propriétés antioxydantes de la vitamine E sont découvertes plus tard et sont à l'origine d'un grand nombre de travaux. Elle est reconnue comme constituant essentiel dans la nutrition de l'homme en 1968 [56, 57].

### II.3. Caractéristiques de la vitamine E

La vitamine E ou tocophérol est une vitamine lipophile, elle regroupe deux grandes familles, la famille des tocophérols qui comprend 4 substances: l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$  tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol (tableaux II.1) [58,59,60]. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' $\alpha$ -tocotriénol, le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénol et le  $\delta$ -tocotriénol [61,62].

La structure chimique des tocophérols est constituée d'un noyau hydroxychromane qui réduira 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) se distinguent entre elles par le nombre et la position des groupements méthyles fixés sur le noyau chromanol (tableaux II.1) [63].

Les tocotriénols sont différents des tocophérols par leurs chaînes carbonées qui contiennent 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' (figure II.1) [65].



**Figure II.1.** « Structure des tocophérols et tocotriénols » [64].

Tableau II.1 « dénomination de différents tocophérols et tocotrienols » [60,65]

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

En revanche, les tocophérols contiennent également une queue de trimethyltridecyl et possèdent trois centres chiraux en positions 2, 4', 8' qui se produisent naturellement dans la configuration R, R, R [52].

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 [64].

Tableau II.2. « Les stéréoisomères des tocophérols et des tocotrienols » [66].

stéréo-isomère	Homologue			
	α	β	γ	δ
Substitution méthyle				
Le nombre	3	2	2	1
a position	C-5, 6,7	C-5,8	C-7,8	C-8
Tocophérol				
1	2R4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R
2	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
3	2R4'S8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
4	2R4'S8'R	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
5	2S4'S8'S	2R4'S8'S	2R4'S8'S	2R4'S8'S
6	2S4'S8'R	2R4'S8'R	2R4'S8'R	2R4'S8'R
7	2S4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R
8	2S4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
Tocotriénol				
1	2R-tr/tr	2R-tr/tr	2R-tr/tr	2R-tr/tr
2	2R-tr/cis	2R-tr/cis	2R-tr/cis	2R-tr/cis
3	2R-cis/tr	2R-cis/tr	2R-cis/tr	2R-cis/tr
4	2R-cis/cis	2R-cis/cis	2R-cis/cis	2R-cis/cis
5	2S-tr/tr	2S-tr/cis	2S-tr/cis	2S-tr/cis
7	2S-cis/tr	2S-cis/tr	2S-cis/tr	2S-cis/tr
8	2S-cis/cis	2S-cis/cis	2S-cis/cis	2Scis/cis

#### II.4. Propriétés physico-chimiques

Tous les tocophérols se présentent, à température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (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 [55,65,66,67].

Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl- $\alpha$ -tocophérol sont relativement stables par rapport à l'oxygène, la lumière ou les U.V (tableau II.3) [69]. La synthèse de l'acétate de tocophérol est basée sur la condensation de la 2, 3,6-triméthyl-hydroquinone sur l'isophytol, après une acétylation à l'anhydride acétique, on obtient de l'acétate de tocophérol [68].

Les esters présents naturellement dans l'alimentation ou rajoutés, comme l'acétate, doivent être hydrolysés par une ester hydrolase pancréatique afin de permettre l'absorption des tocophérols libres [69].

**Tableau II.3** « propriétés physico-chimique de dl- $\alpha$ -tocophérol acétate » [70,71, 72,73]

<b>Nom chimique</b>	2,5,7,8-tetraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridecyl)croman-6-ol-acetate
<b>Structure chimique</b>	
<b>Formule chimique</b>	$C_{31}H_{52}O_3$
<b>Masse moléculaire</b>	472.7
<b>Description</b>	Huiles visqueuses
<b>Spectre d'absorption</b>	max à 284 nm ; min à 254 nm (éthanol)
<b>Viscosité</b>	26600 mPas à 0°C 2120 mPas à 20°C 161 mPas à 60°C
<b>Densité</b>	0.953 g/mL à 25 °C

<b>Indice de réfraction</b>	n 20/D 1.496
<b>Point d'ébullition</b>	224 °C à 0.3mmHg, 184 °C à 0.01mmHg
<b>Point de fusion</b>	>230 °F
<b>Solubilité en eau</b>	<0.1 g/100 ml à 17 °C

### **II.5. Propriétés biochimiques et métaboliques**

La fonction naturelle de la vitamine E est d'être antioxydante. Grâce à ce rôle, elle assure la protection des membranes cellulaires et prévient le durcissement et vieillissement des cellules. Elle aide également à maintenir la santé du système immunitaire en protégeant la vie des globules rouges dans la circulation sanguine [54].

Elle exerce une action favorable sur l'activité des glandes génitales et pour cette raison elle fut surnommée "le facteur antisterilitique" [74].

Une carence alimentaire en vitamine E peut provoquer des troubles neuromusculaires ou ophtalmologiques graves [69], 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 [74].

La vitamine E est détruite par les radicaux libres et l'oxygène ; on admet généralement que lors de la cuisson des aliments, les pertes ne dépassent pas 20 % [69].

### **II.6. Source**

La vitamine E est très répandue dans la nature, on la trouve aussi bien dans les aliments d'origine animale que dans les aliments d'origine végétale :

- Origine animale : la vitamine E est présente dans les viandes, les œufs, le foie, le lait et ces dérivés.
- Origine végétale : la vitamine E est présente en abondance dans les huiles d'origine végétale ainsi que dans les fruits secs tels que les noisettes, arachides et amandes. [67,75, 76].

**II.7. Toxicité**

La vitamine E semble ne pas avoir de toxicité et les quantités de 100 à 200 mg d'*all-rac- $\alpha$ -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 (par exemple >1000mg/jour) [77].

**II.8. Les dérivés de la vitamine E**

La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols ont une activité vitaminique réduite, respectivement 40 et 15% environ de l'activité de la forme  $\alpha$ , alors que le  $\delta$  est pratiquement inactif. Les tocotriénols ont une activité vitaminique d'environ 20 % pour l' $\alpha$ -tocotriénol et 5% pour le  $\beta$ -tocotriénol, les autres sont inactifs [54].

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- $\alpha$ -tocophérol*, le stéréoisomère naturel, soit sous une forme synthétique, appelée *all-racemic- $\alpha$ -tocophérol* ou *all-rac- $\alpha$ -tocophérol*, qui est un mélange en quantités à peu près égales des huit (08) stéréoisomères de l' $\alpha$ -tocophérol [64,66].

**II.8.1.1. dl- $\alpha$ - tocophérol**

Le d-alpha-tocophérol était en effet la première forme de vitamine E synthétique, disponible à partir des années 40 [78] obtenue par une condensation non stéréospécifique entre la triméthyl hydroquinone et une chaîne polyisoprénique de synthèse [79]. 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 [80].

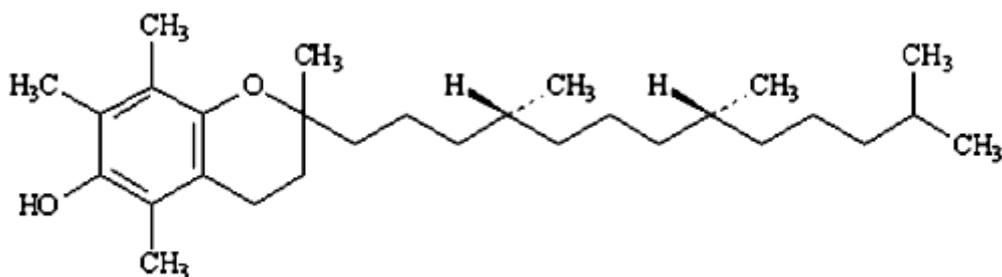


Figure II.2 « structure alpha tocophérol » [81].

### 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 [63].

#### II.8.2.1. d- $\alpha$ tocophérol succinate acide

La d- $\alpha$  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 [80].

#### II.8.2.2. Alpha-tocopheryl nicotinate

Le nicotinate d'alpha-tocopheryl est un ester synthétique formé de d1-alpha-tocophérol et d'acide nicotique (figure II.3), 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 [82].

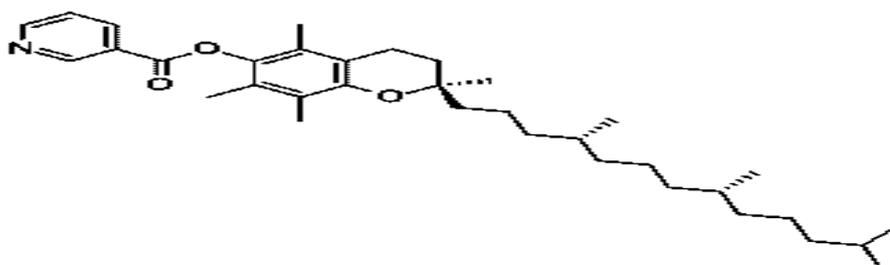


Figure II.3. « Structure alpha tocopheryl nicotinate » [82]

**II.8.3. Mélange de tocophérol**

Utilisés comme « antioxydants naturels » sont composé principalement des isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -tocophérols en des proportions variables, 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. Ce mélange est disponible sous forme d'huile ou poudre [80,83,84].

**II.9. Conclusion**

Dans ce chapitre nous avons vu, que :

- La vitamine E est composée de plusieurs mélanges ;
- La vitamine E joue le rôle d'un antioxydant ;
- La vitamine E avait un rôle assez flou dans la reproduction ;
- La vitamine E présente un problème majeur de solubilité.

Ces conclusions confortent à notre choix de la vitamine E comme :

1. Agent protecteur lors de la congélation du sperme ;
2. Comme molécule invitée lors de la complexation CD-vitE.

# Chapitre III

## Travaux antérieurs

### III.1. Introduction

Pour optimiser notre démarche et mieux cerner notre sujet nous avons fait un bref aperçu des travaux qui ont été déjà effectués allant dans le sens de notre travail (complexation CDs et ces dérivés avec vitamine E et ces dérivés).

### III.2. Travaux antérieurs

En 1987, KANETO UEKAMA et ces collaborateurs ont étudié le complexe d'inclusion du 2,6-di-O-méthyl  $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) avec  $\alpha$ -tocophéryl acétate et  $\alpha$ -tocophéryl nicotinate dans une solution aqueuse.

Les diagrammes de solubilité des complexes retrouvés correspondaient au type Ap et des constantes de stabilité (K) d'ordres élevés étaient estimées.

Le complexe solide de l' $\alpha$ -tocophéryl nicotinate avec la DM- $\beta$ -CD fut préparé par la méthode de Kneading en respectant un ratio molaire de 1 :2.

La solubilité aqueuse des esters de tocophérols était améliorée de  $10^5$  fois grâce à la complexation avec la DM- $\beta$ -CD [85].

En 1995, Qing-Xiang Guo, et ces collaborateurs, ont travaillé sur le complexe d'inclusion du « *all trans* » rétinol et l'acide rétinoïque avec  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) et (DM- $\beta$ -CD), qui ont été ensuite caractérisés par spectroscopie UV-vis.

La constante d'association (k) obtenue entre la vitamine A et le DM- $\beta$ -CD fut plus grande qu'avec  $\beta$ -CD.

Des mesures des absorbances UV-vis ont montré que des complexes d'inclusion de la vitamine A avec  $\beta$ -CD et DM- $\beta$ -CD furent formés. Puisque la cavité de DM- $\beta$ -CD est plus attractive que celle de  $\beta$ -CD, la vitamine A peut former des complexes d'inclusion plus stables avec le DM- $\beta$ -CD [86].

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

Le comportement de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -tocotrienols durant l'analyse chromatographique (HPLC) fut étudié en utilisant comme phase stationnaire la  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée.

Chacun des tocotriénols injectés séparément ont montré quatre (04) pics. Les quatre composants de  $\alpha$ -tocotriénol furent identifiés par microscopie à balayage, RMN et FTIR [87].

En 1999, Yohei HAMANO et ces collaborateurs ont examiné l'effet inhibiteur de la 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine sur la mousse produite par le composé de phosphodiester de vitamine C et E (EPC-K1).

La formation du complexe d'inclusion dans la solution aqueuse est caractérisée par l'ultra-violet (UV), le dichroïsme circulaire (CD) et par l'étude de résonance magnétique nucléaire de proton (H-NMR).

Les résultats avaient indiqué que l'effet inhibiteur d'HP- $\beta$ -CD sur la mousse produite par EPC-K1 pourrait être attribué à la réduction de l'activité superficielle d'EPC-K1 par le complexe d'inclusion avec HP- $\beta$ -CD.

Les données suggèrent que l'HP- $\beta$ -CD soit utile dans la préparation de préparatifs liquides d'actualité comme les lotions d'EPC-K1 utilisé en pharmacie et cosmétique [88].

En 2009, Yoshiyuki Watanabe et ces collaborateurs ont étudié l'effet suppressif de  $\alpha$ -tocophérol complexé avec la  $\beta$ -Cyclodextrine sur l'oxydation du linoléate méthylique.

Le  $\alpha$ -tocophérol complexé avec  $\beta$ -cyclodextrine a été préparé et son effet suppressif sur l'oxydation du linoléate méthylique a été cinétiquement examiné en utilisant le model de Weibull. La constante k, de l'équation de Weibull pour l'oxydation de l' $\alpha$ -tocophérol de linoléate méthylique était presque égal à celle observée avec un mélange de  $\alpha$ -tocophérol et de la  $\beta$ -cyclodextrine. L'effet suppressif de l' $\alpha$ -tocophérol complexé avec la  $\beta$ -cyclodextrine sur l'oxydation de linoléate méthylique est dû à la protection du  $\alpha$ -tocophérol par son inclusion par la  $\beta$ -cyclodextrine et au dégagement progressif du l' $\alpha$ -tocophérol du complexe d'inclusion [89].

En 2010, Noriyuki Miyoshi et ces collaborateurs, ont travaillé sur l'amélioration de la biodisponibilité orale du  $\gamma$ -tocotriénol, chez les souris, en utilisant le complexe d'inclusion  $\gamma$ -tocotriénol avec  $\gamma$ -cyclodextrine

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

L'étude pharmacocinétique a révélé que la concentration plasmatique en  $\gamma$ -tocotriénol été accru six (06) ou trois (03) heures après l'administration par voie orale de FT ou de FT/CD, respectivement.

Pris ensemble, les résultats obtenus suggèrent que l'inclusion par CD a amélioré la biodisponibilité du  $\gamma$ T3 [90].

En 2011, Yoshimi Sueishi et ces collègues ont travaillé sur la caractérisation du complexe d'inclusion de la vitamine E par DM- $\beta$ -CD et la détermination cinétique de la capacité d'éliminer les radicaux.

Le complexe d'inclusion de l' $\alpha$ -tocophérol par DM- $\beta$ -CD été caractérisé par mesures RMN. Les résultats obtenus suggèrent que la DM- $\beta$ -CD inclut la partie latérale de la chaîne de l' $\alpha$ -tocophérol.

Utilisant la méthode concurrentielle de résonance paramagnétique des électrons (EPR), ils ont déterminé la capacité d'élimination du radical de l'oxygène (RO•) par sept (07) composés de la vitamine E (tocophérols et tocotrienols).

Basé sur ces résultats, le mécanisme de la réaction antioxydante des composés de la vitamine E avec le radical RO• est discuté [91].

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

L'effet de l'inclusion de  $\gamma$ -tocotriénol (T3) par  $\beta$ -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 messenger de la tumeur du groupe  $\gamma$ T3/CD était plus bas que celui dans le groupe T3.

Cette étude a démontré que la biodisponibilité biologique du  $\gamma$ T3 est améliorée par une administration orale d'un complexe d'inclusion de  $\gamma$ T3 avec la cyclodextrine. En outre, l'amélioration de la biodisponibilité biologique a contribué in vivo à l'augmentation de l'activité anticancéreuse du  $\gamma$ T3 [92].

# Chapitre IV

## La congélation du sperme

### **IV.1. Introduction**

Dans les chapitres précédant nous avons beaucoup porté sur aspects théoriques des cyclodextrines, la vitamine E et nous avons même parlé des travaux déjà effectués sur la combinaison entre ces derniers ; enfaite comme notre objectif final est d'étudier l'influence du complexe CD/Vit E sur la congélation/décongélation du sperme (sperme du coq en particulier) ; il nous ait paru évident qu'une étude théorique sur le sperme et les méthodes utilisées pour sa congélation s'imposait.

### **IV.2. Historique**

La congélation du sperme est une méthode déjà ancienne. En 1776, SPALLANZANI avait réalisé une fécondation artificielle sur des œufs de grenouille et avait démontré le caractère indispensable de la semence mâle.

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 [93].

### **IV.3. Caractéristique 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 [94].

#### **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 [95].

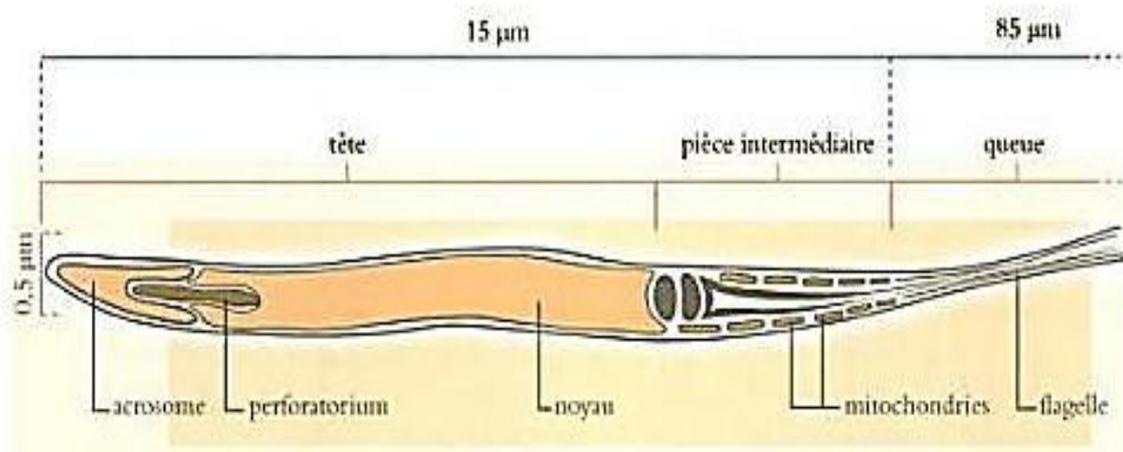
##### **IV.3.2.1. La morphologie du spermatozoïde**

La cellule aviaire se caractérise par son aspect filiforme (de 0,5 à 0,7  $\mu\text{m}$  de large et 90 $\mu\text{m}$  de long) [96].

Elle se divise grossièrement en deux parties; la tête et le flagelle (Figure IV.1). La tête est formée d'un noyau, surmonté d'un acrosome conique à structure granulaire. Sur ce noyau une

vésicule acrosomique contenant le stock enzymatique nécessaire à la digestion des membranes de l'œuf au cours de la fécondation.

La pièce intermédiaire se prolonge par un flagelle (queue) et généralement formée de deux centrioles, l'un proximal et l'autre distal, ce dernier étant lui-même entouré d'un nombre variable de mitochondries (une trentaine chez le coq) en position hélicoïdale et qui assure le métabolisme énergétique nécessaire à la production d'énergie pour l'entretien cellulaire et la mobilité [97].



**Figure IV.1.** « Ultra structure de spermatozoïde du coq » [97].

#### 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) [98]. Un sperme mobile est nécessairement vivant, mais le contraire n'est pas tout le temps vrai [99].

La technique la plus utilisée pour l'analyse de la mobilité spermatique chez les volailles est la spectrophotométrie à l'aide d'une solution accudenz (milieu de séparation de cellules biologiquement inerte et non ionique), la densité optique est déterminée à 550 nm [100].

**IV.3.2.3. Viabilité**

Le taux de survie est le rapport entre le pourcentage des spermatozoïdes vivants normaux ( $V_n$  %) mesuré sur le pourcentage de sperme après décongélation et le pourcentage  $V_f$  du sperme frais [101].

**IV.4. Méthode de récolte du sperme du 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 [102]. Les coqs doivent être au minimum de l'âge de 32 semaines [103].

La collecte du sperme de 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 traicteur serre doucement, le cloaque sécrète le sperme par les papilles externes [104].

Les semences récoltées sont mélangées et maintenues à la température ambiante jusqu'à traitement [105].

**IV.5. Conservation de sperme du coq par congélation**

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 [106]

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 [104].

Il existe de nombreux diluants disponibles pour le sperme de volaille, comme le lait, lactose, saccharose, raffinose, d'autre contenant des agents protecteurs tel que le jaune d'œuf, et d'autres substances comprenant des antioxydants (les vitamines) [107].

**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 [106].

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 [108].

**IV.6. Les étapes de la technique de congélation de sperme aviaire****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 [109].

**IV.6.2. Phase de conditionnement**

La congélation proprement dite a lieu dans les vapeurs d'azote, le sperme étant conditionné soit en ampoules, en paillettes ou en pellets. Les meilleurs résultats semblent être obtenus en paillettes avec une vitesse de refroidissement voisine de 40 °C/minute [109].

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 [110].

**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 [108].

**IV.6.4. La phase de décongélation**

C'est la phase finale de la technique, elle doit être rapide pour limiter la croissance des microcristaux [109].

Cette phase consiste à mettre les paillettes dans un bain marie a +5 °C pendant 3 minutes [2]. Au cours de cette étape, il faut éviter tout contact de la semence avec l'eau, car celle-ci est dangereuse pour les spermatozoïdes.

#### **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 : complexe (CD-Vit E).

# Chapitre V

## Matériels et méthodes

## **V.1. Introduction**

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

## **V.2. Pré-développement de la méthode de quantification**

Afin de pouvoir quantifier la vitamine E 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.

### **V.2.1. Absorbance de la vitamine E dans l'éthanol et méthanol**

#### **V.2.1.1. Matières premières et matériel utilisé**

##### **➤ Matières premières**

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Ethanol (95%) (BioChemChemopharma).
- Méthanol (BioChemChemopharma).

##### **➤ Appareillage**

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

#### **V.2.1.2. Méthode**

Pour déterminer la longueur d'onde maximale de la vitamine E, nous avons fait un scanning (balayage) par UV-visible entre les longueurs d'onde : 200 nm et 500 nm avec un pas de 5nm. Les échantillons sont de concentration  $C = 2.5$  mg/ml préparés dans deux milieux; éthanol et méthanol.

### **V.2.2. Spécificité**

#### **V.2.2.1. Matières premières et matériel utilisé**

##### **➤ Matières premières :**

- $\beta$ -CD. (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'université de Rouen) ;
- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Ethanol (95%) (BioChem Chemopharma);
- Méthanol (BioChem Chemopharma).

### ➤ Appareillage

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

#### V.2.2.2. Méthode

Nous avons préparés différentes solutions (CD, Vit E et mélange CD-Vit E). Puis nous avons fait passer ces échantillons, d'éthanol, de méthanol et d'eau par un balayage entre les longueurs d'onde : 200 nm et 500 nm avec un pas de 5 nm.

### V.2.3. Linéarité

#### V.2.3.1. Matières premières et matériel utilisé

##### ➤ Matières premières

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprothal Ain Benian Alger) ;
- Ethanol (95%) (BioChem Chemopharma).

##### ➤ Appareillage

- Balance analytique (Denver) ;
- spectroscopie UV-Visible (Optizen).

#### V.2.3.2. Méthode

Nous avons étudié cinq solutions préparées à partir d'une solution mère à 0,428 mg/ml (dans de l'éthanol) (tableau V.1) ; les absorbances correspondantes à chaque solution sont mesurées à  $\lambda = \lambda_{\max}$ .

**Tableau V.1** : « différentes concentrations de vitamine E dans l'éthanol ».

Echantillon	1	2	3	4	5
Concentration de vitamine E mg/ml	0.285	0.321	0.356	0.392	0.428

### V.3. Diagramme d'Higuchi

#### V.3.1. Matières premières et matériel utilisé

##### ➤ Matières premières :

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprothal Ain Benian Alger) ;
- $\beta$ -CD. (fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen).

### ➤ Appareillage

- Balance analytique (Denver) ;
- Plaque agitatrice multiposte (VELP scientifica) ;
- spectroscopie UV-Visible (Optizen).

### V.3.2.Méthodes

Pour réaliser le diagramme de solubilité selon Higuchi et Connors ; nous avons ajouté de la vitamine E à des solutions de (7 ml) de concentrations croissantes de  $\beta$ -CD (tableau V.2), puis placées sous agitation à température ambiante et a labri de la lumière pendant 7 jours.

**Tableau V.2 :** « différentes quantités de  $\beta$  –CD et vitamine E »

Echantillon N°	eau	1	2	3	4	5	6
Masse $\beta$ - CD (mg)	0	0	16.2	26.1	43.1	64.8	129.5
Masse de vitamine E (mg)	0	13	12.2	12.7	12.1	12.5	11.5

Après sept jours, les solutions sont mises dans des ampoules à décanter pendant une journée, puis filtrées à l'aide de filtres seringues de porosité de 0.45  $\mu$ m et quantifiées par spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde  $\lambda = \lambda_{\max}$ .

### V.4. Préparation des complexes d'inclusion

Nous avons utilisé quatre (04) différentes méthodes pour préparer les complexes d'inclusion : le mélange physique, le Kneading, la lyophilisation et la Co- évaporation. Il est important de noter que pour toutes les préparations de complexes nous avons pris comme ratio molaire vit E /CD 1 :2 [83].

Les quantités des matières premières correspondantes sont regroupées dans le tableau suivant :

**Tableau V.3 :** « les quantités des matières premières pour former les complexes »

Complexe	Mélange physique	Kneading	lyophilisation	Co-évaporation
$m_{vit E}$ (gr)	0.1388	0.1256	0.4889	0.12
$m_{\beta-CD}$ (gr)	0.666	0.603	2.343	0.5762

#### V.4.1. Le mélange physique

##### V.4.1.1. Matières premières et matériel utilisé

###### ➤ Matières premières

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- $\beta$ -CD. (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).

###### ➤ Appareillage :

- Balance analytique (Denver) ;

##### V.4.1.2. Méthode

Le mélange physique est préparé comme suit:

- ❖ Peser la masse de vitamine E (voir tableau V.3) dans un mortier, ensuite ajouter la masse de  $\beta$ -CD correspondante,
- ❖ mélanger délicatement dans un mortier bien sec à l'aide d'un pilon pendant 45min. Laisser le mélange obtenu se reposer à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

#### V.4.2. Méthode de Kneading

##### V.4.2.1. Matières premières et matériel utilisé

###### ➤ Matières premières

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- B-CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChem Chemopharma).

**➤ Appareillage**

- Balance analytique (Denver) ;
- Étuve. (Binder) ;

**V.4.2.2. Méthode**

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

- ❖ Préparer un solvant contenant 40% d'éthanol et 60% d'eau,
- ❖ Pesé la masse de vitamine E et la mettre dans un mortier en porcelaine,
- ❖ ajouter la masse de  $\beta$ -CD correspondant,
- ❖ ajouter quelque goutte du solvant préparé,
- ❖ mélanger les constituants avec le pilon durant 45 min tout en ajoutant quelque goutte du solvant jusqu'à l'obtention d'une pâte,
- ❖ placer le mortier dans une étuve jusqu' à séchage total de la pâte,
- ❖ récupérer la poudre obtenue et conservée dans un dessiccateur.

**V.4.3. Méthode de lyophilisation****V.4.3.1. Matières premières et matériel utilisé****➤ Matières premières**

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- B-CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChem Chemopharma).

**➤ Appareillage**

- Balance analytique (Denver instrument) ;
- Plaque agitatrice multiposte (VELP scientifica) ;
- Dessiccateur (DURAN) ;
- Lyophilisateur (Christ Alpha 1-4 LO plu).

**V.4.3.2. Méthode**

Le complexe d'inclusion sous forme de lyophilisat est préparé comme suit:

- ❖ Peser la masse de vitamine E dans un bécher,
- ❖ Ajouter la masse de  $\beta$ -CD correspondante,
- ❖ Faire dissoudre le mélange dans un volume d'eau adéquat,

- ❖ Le mélange obtenu est agité pendant 72 heures à température ambiante et l'abri de la lumière,
- ❖ repartir la suspension obtenue en petite quantité puis congeler à 6°C pendant 3 jours,
- ❖ Le produit congelé est lyophilisé sous une pression de 27 bars durant 24 heures, le lyophilisat obtenu est conservé dans un dessiccateur.

#### **V.4.4. Méthode Co - évaporation**

##### **V.4.4.1. Matières premières et matériel utilisé**

###### **➤ Matières premières**

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- $\beta$ -CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Ethanol (95%) (BioChem Chemopharma).

###### **➤ Appareillage**

- Balance analytique (Denver) ;
- Agitateur (VELP scientifica) ;
- Bain-marie (GFL).

##### **V.4.4.2. Méthode**

- ❖ Peser la masse de vitamine E dans un grand bécher,
- ❖ Ajouter la masse de  $\beta$ -CD correspondante,
- ❖ Verser 100ml de solvant contenant 20% éthanol et 60% d'eau,
- ❖ mettre sous agitation jusqu'à dissolution complète de la  $\beta$ -CD,
- ❖ placer le bécher contenant la solution dans un bain-marie à 70 à 90 °C jusqu'à évaporation complète du solvant,
- ❖ récupérer le complexe sous forme de poudre et conserver dans un dessiccateur.

#### **V.5. Caractérisation des complexes d'inclusion**

Les complexes d'inclusion (vit E/ $\beta$ CD) préparés sont caractérisés par : le test de dissolution, spectroscopie Infra rouge, diffraction des rayons X (DRX), microscopie à balayage électronique (MEB) et finalement l'analyse thermogravimétrique (ATG).

### V.5.1. Analyse par spectroscopie IR

#### V.5.1.1. Matières premières et matériel utilisé

##### ➤ Matières premières

- $\beta$ -CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Quantité suffisante des différents complexes obtenus;
- Bromure de potassium KBr (Biochem).

##### ➤ Appareillage

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

#### V.5.1.2. Méthode

Les complexes d'inclusion préparés par les différentes méthodes  $\beta$ -CD et vitamine E sont caractérisés par la spectroscopie IR en utilisant un spectrophotomètre IR. Les échantillons à analyser sont préparés sous forme de pastilles KBr.

À noter que pour la vitamine E, nous avons mis une goutte du produit pur sur une plaque de KBr, puis nous l'avons analysé.

### V.5.2. Analyse par microscopie à balayage électronique

#### V.5.2.1. Matières premières et matériel utilisé :

##### ➤ Matières premières

- $\beta$ -CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Quantité suffisante des différents complexes obtenus;

##### ➤ Appareillage :

- Microscopie à balayage électronique (FEI quanta 200).

#### V.5.2.2. Méthode

Les échantillons à analyser sont déposés sous forme d'un film très fin et caractérisé par le microscope à balayage électronique, avec des grossissements allant de 10 à 50 $\mu$ m.

**V.5.3. Diffraction de rayon x****V.5.3.1. Matières premières et matériel utilisé****➤ Matières premières**

- $\beta$ -CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Quantité suffisante des différents complexes obtenus.

**➤ Appareillage :**

- Diffractomètre RX (X-Pert PROPAN analytical, X Pert Data collector « User .1 »)

**V.5.3.2. Méthode**

Les échantillons à analyser sont préparés sous forme de poudre ou de liquide visqueux. 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.

**V.5.4. Analyse thermique gravimétrique (ATG)****V.5.4.1. Matières premières et matériel utilisé****➤ Matières premières**

- $\beta$ -CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen) ;
- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Quantité suffisante des différents complexes obtenus.

**➤ Appareillage :**

- Analyseur thermique gravimétrie (SETARAM).

**V.5.4.2. Méthode**

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée à une montée en température de 10 °C/min entre 20 et 500 °C. La masse des échantillons introduite est de l'ordre de 10 mg.

### V.5.5. Teste de dissolution

#### V.5.5.1. Matières premières et matériel utilisé

➤ **Matières premières**

- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- le complexe sous forme de lyophilisat.

➤ **Appareillage :**

- Balance analytique (Denver) ;
- spectroscopie UV-Visible (Optizen).
- Plaque agitatrice multiposte (VELP scientifica).

#### V.5.5.2. Méthode :

- ❖ Peser une quantité de vit E et de complexe équivalent à 37.1mg et mettre dans 5ml d'eau,
- ❖ mètre les solutions sous agitation pendant 1 heures,
- ❖ laisser décanter pendant 4 heures dans des ampoules à décanter,
- ❖ filtrer les solutions avec des filtres seringues de 0.45 µm et analyser par UV-visible.

**NB1 :** Vu les petites quantités obtenues de complexes, nous ne pouvons pas utiliser le dissolutest

**NB2 :** Pour étudier la répétabilité des essais et pour se rapprocher le plus des dissolutions des monographies nous avons étudié 6 pesées du même complexe (lyophilisat).

### V.5.6. Le dosage (quantification des pertes)

Lors de cette étape, nous allons quantifier les pertes issues de la préparation des complexes ; cela nous permettra de corriger les écarts qui pourraient apparaitre lors de la vérification de l'activité biologique *in vivo* des complexes formés.

#### V.5.6.1. Matières premières et matériel utilisé

➤ **Matières premières**

- Quantité suffisante complexe,
- Éthanol (95%) (BioChem Chemopharma).

**➤ Appareillage :**

- Balance analytique (Denver instrumente) ;
- spectroscope UV-Visible (Optizen).

**V.5.6.2. Méthode**

- ❖ Pesé 0.014 mg de chaque complexe et leur équivalent en vit E;
- ❖ Ajoutés 25ml d'éthanol ;
- ❖ Mettre sous agitation jusqu'à dissolution complète, puis doser par UV-visible.

**V.6. Étude *in vivo* des complexes****V.6.1. Congélation du sperme****V.6.1.1. Matières premières et matériel utilisé****➤ Matières premières**

- B-CD (fournie généreusement par le Laboratoire de Pharmacie Galénique de l'Université de Rouen).
- Vitamine E (pharco-pharmaceuticals conditionné par Saprohal Ain Benian Alger) ;
- Une quantité nécessaire du complexe de lyophilisation, et le complexe de Kneading ;
- Sérums glucosés à 5% ;
- Sérum salé à 9% ;
- Coq adulte ;
- Chlorure de sodium (NaCl).

**➤ Appareillage :**

- Balance analytique (adventurer OHAUS) ;
- Réfrigérateur biologique (LG) ;
- Microscope (MiKoneclipse E200) ;
- Plaque agitatrice multiple (VELP scientifica)
- Centrifugeuse

**V.6.1.2. Méthode**

Les expériences ont été effectuées au niveau du laboratoire de biologie-physiologie animale à l'Université A-Mira. Le protocole opératoire suivi est résumé ci-dessous :

- **Préparations des solutions** : faire les pesées nécessaires pour chacun des échantillons (tableau V.4) :

**Tableau V.4** : « quantités des complexes utilisés pour le test *in vivo* »

Echantillon	B-CD	Complexe Kneading	Complexe lyophilisation	Vitamine E	NaCl
Masse (g)	0.0018	0.0023	0.0023	0.0008	0.45

- ❖ Faire dissoudre chaque échantillon dans 45 ml de sérum salé ;
  - ❖ Ajouter 8 ml de sérum glucosé à chaque solution ;
  - ❖ Mettre sous agitation pendant 1 heure ;
- **Récolte du sperme** : Deux opérateurs sont nécessaires, l'un supposé droitier, effectuée avec sa main le massage dans la région dorso-lombaire du coq, en maintenant celui-ci à travers sa cuisse. Au bout de deux ou trois passages de main, voire un seul, le coq redresse la queue et se présente alors avec le cloaque bien apparent et semi-éversé.
- ❖ Comprimer de la main droite la région latérale du cloaque où s'insèrent les vésicules spermatiques. Cette compression doit être ferme, mais non brutale afin d'expulser le sperme sans faire saigner le coq. Elle se poursuit vers les replis arrondis de façon à bien récupérer le sperme.
  - ❖ Le second opérateur maintient les pattes du coq à hauteur de l'articulation et récolte le sperme par aspiration dans un tube, tout en évitant de récolter soit l'urine soit les fèces, soit encore le fluide transparent (provenant des replis lymphatiques et arrondis du cloaque).
  - ❖ Juste après la récolte de la semence, on détermine le volume de chaque éjaculat à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml.
  - ❖ On centrifuge le sperme pendant 10 minutes à la température ambiante.
  - ❖ Après centrifugation, on enlève le plasma séminal à l'aide d'une micropipette après détermination de son volume et on le remplace par du sérum glucosé.
  - ❖ On prélève 1ml de volume du sperme dilué, puis on ajoute 3.5 ml de chaque solution à l'aide d'une micropipette en mélangeons.

- ❖ On conditionne les mélanges dans des paillettes et on les met dans le congélateur biologique à 5°C.
- ❖ On place les paillettes horizontalement sur un support de 5-7 centimètres au-dessus de la vapeur d'azote liquide pendant une minute ;
- ❖ On décongèle les paillettes directement dans un bain-marie à +5°C pendant 3 minutes ;
- ❖ Après la décongélation on récupère les mélanges dans des tubes en plastique ;
- ❖ À l'aide d'une micropipette, on prélève une quantité de chaque mélange dans des lamelles puis on analyse par le microscope avec un grossissement de ( $\times 10$ ).

# Chapitre VI

## Résultats et discussions

## VI.1. Pré-développement

## Résultats

Les figures VI.1 et figures VI.2, représentent les spectres UV-vis de la vitamine E à C=2,5(mg/ml), effectués par balayage (de 200 à 500 nm) respectivement dans l'éthanol et dans le méthanol.

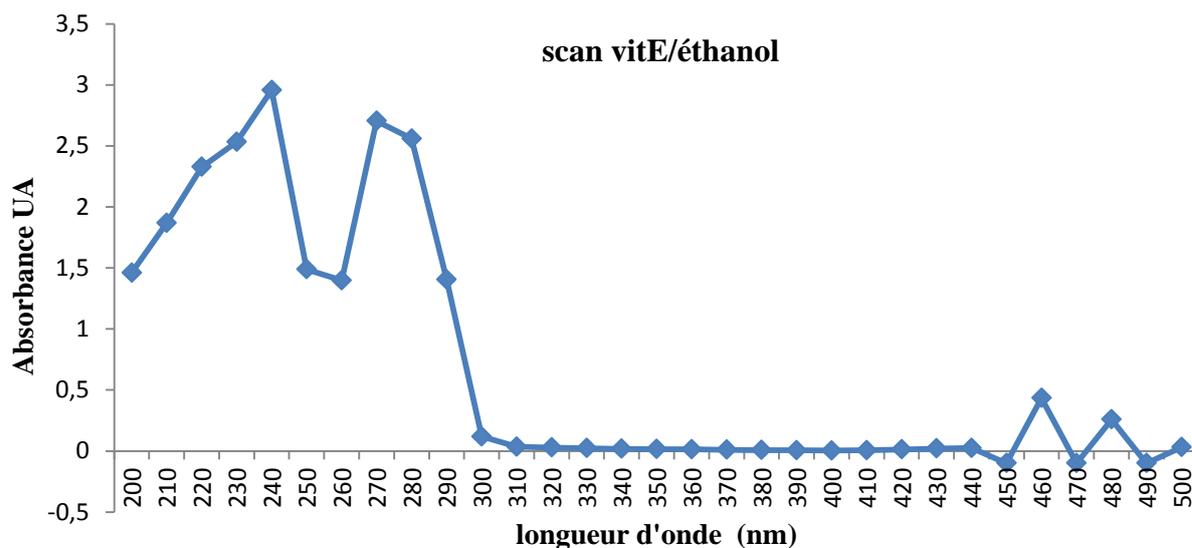


Figure VI.1. « Spectre d'absorbance de la vitamine E dans l'éthanol ».

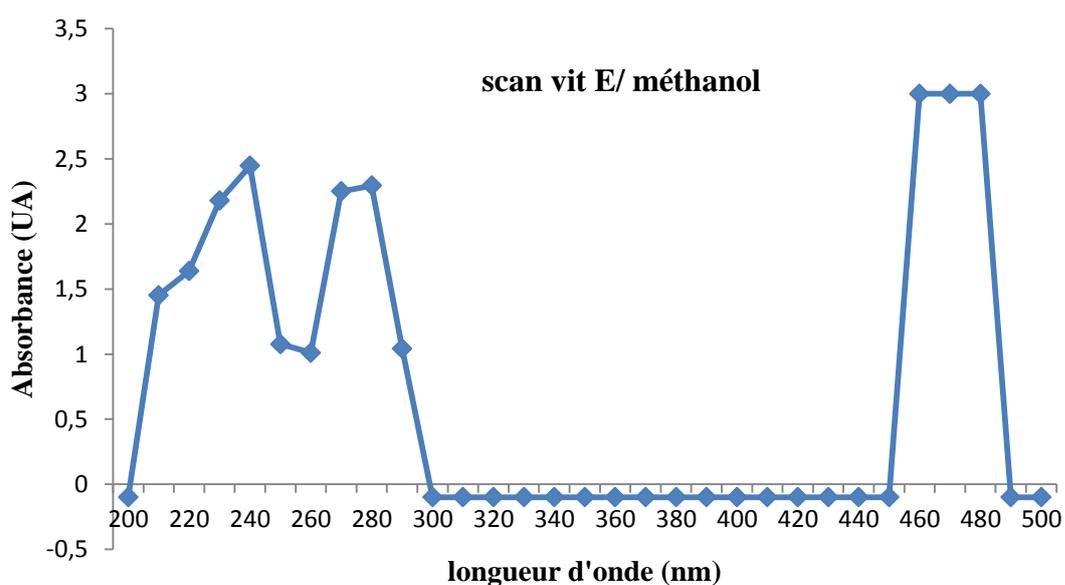


Figure VI.2. « Spectre d'absorbance de la vitamine E dans le méthanol »

### Observation

La vitamine E dans l'éthanol possède trois (03) optimums à  $\lambda_1=240\text{nm}$ ,  $\lambda_2=260\text{nm}$  et  $\lambda_3=270\text{nm}$ .

Pour la vitamine E dans le méthanol, on retrouve aussi trois (03) optimums  $\lambda_{\text{max}}= (\lambda_1=240\text{nm}, \lambda_2=260 \text{ nm}, \lambda_3=280 \text{ nm})$ .

### Interprétation

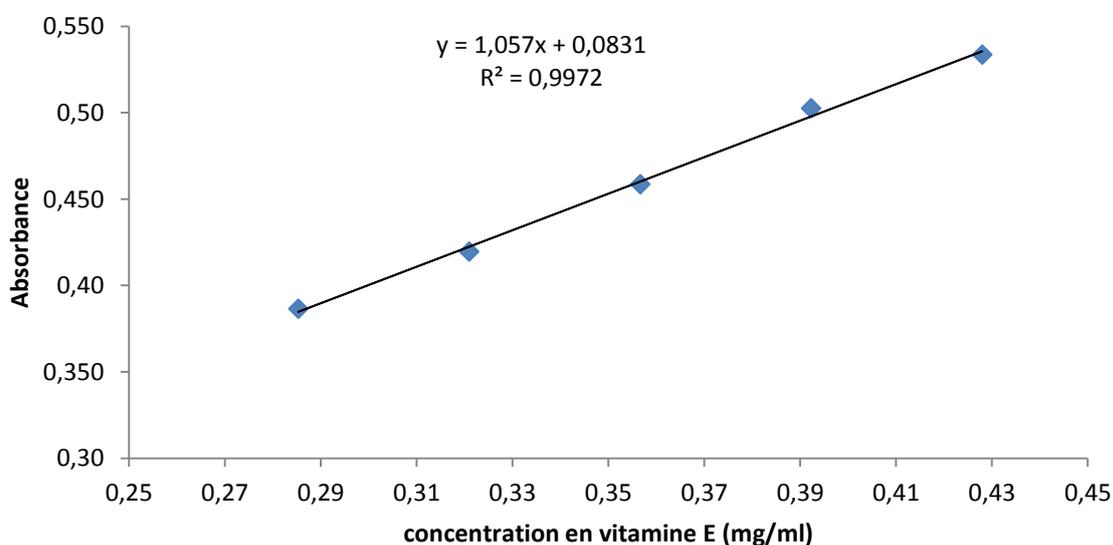
Après une comparaison avec la bibliographie, notre choix c'est porté sur l'utilisation de l'éthanol comme solvant de base et  $\lambda_{\text{max}}=270\text{nm}$  [68].

Il est aussi à noter qu'au préalable des essais sur  $\beta\text{-CD/eau}$ , vitE/eau, furent aussi réalisés et une spécificité fut démontrée (voir Annexes 1).

## VI.2.Linéarité

### Résultats

La courbe obtenue lors de l'essai de linéarité est représentée dans la figure VI.3.



**Figure VI.3.** « Courbe de linéarité »

### Observation

Nous remarquons que la droite des moindres carrés, donnée par le logiciel Excel, passe par la majorité des points, celles-ci nous fournit une droite dont l'équation est de la forme  $y= ax+b$  ;

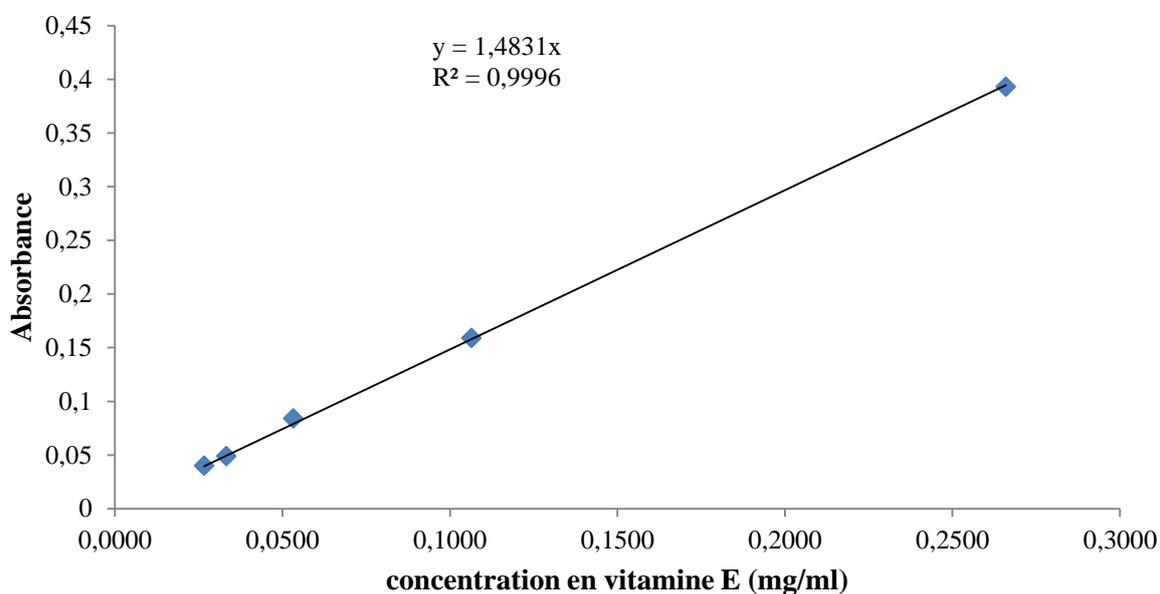
Ou :  $a= 1,0569$ ,  $b= 0,0837$ .

**Interprétation**

La courbe  $Abs=f(C)$  montre qu'il y a une relation directement proportionnelle entre les absorbances et les concentrations de la vitamine E dissoute. Ceci est justifié par le coefficient de corrélation  $R^2$  égale à 0,9972 qui est proche de 1.

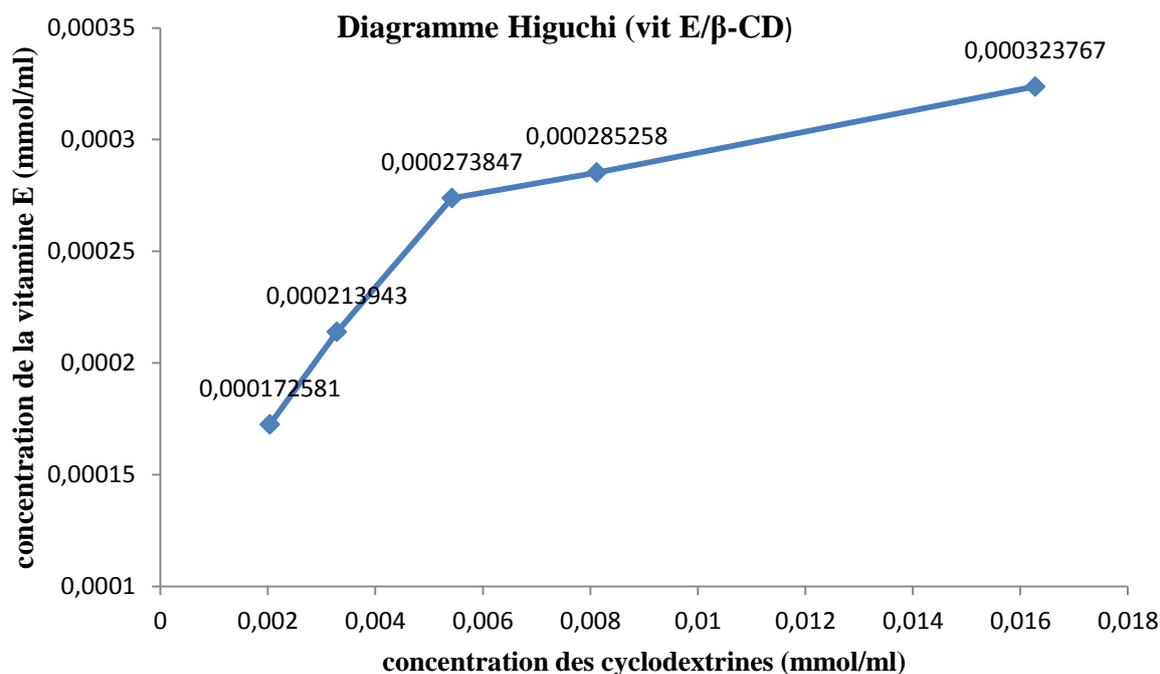
**VI.3. Le diagramme de solubilité (diagramme d'Higuchi)****Résultats**

Tout d'abord, nous avons tracé la courbe d'étalonnage, voir (figure VI.4). Par suite, nous avons tracé la courbe d'Higuchi  $C_{vit E} = f(C_{CD})$  voir figure (VI.5).



**Figure VI.4.** « Courbe d'étalonnage »

:



**Figure VI.5.** « Courbe d'Higuchi (vit E/ $\beta$ -CD) »

Ps : les résultats bruts sont reportés dans l'Annexes 2.

### Observations

Nous remarquons que pour des concentrations de 0 à  $5,424 \cdot 10^{-3}$  mM de CD nous avons une augmentation linéaire. À partir de  $C_{CD} > 5,424 \cdot 10^{-3}$  mM, nous avons une augmentation de  $C_{vitE}$  en fonction des concentrations de CD, mais moins importante (pente plus petite par rapport à la première partie).

### Interprétations

Le profil obtenu, classé selon Higuchi et Connors indique que l'on est en présence d'un profil  $A_N$ . En comparant ces résultats à la littérature, on voit bien qu'ils sont complètement différents (dans la littérature, le diagramme de solubilité de la vitamine E en fonction des cyclodextrines donne un profil  $A_P$ ) [85].

La seule explication logique est que la méthode de quantification n'est pas exacte et précise. Pour détecter l'origine de ce problème, nous avons filtré nos solutions avec des filtres  $0,45\mu\text{m}$  et  $0,2\mu\text{m}$  avant et après décantation. Nous avons vu que les absorbances obtenues changeaient après chaque filtration ce qui indique que les quantités de vitamine E dissoute et non dissoute sont quantifiées simultanément (pas de séparation). Ainsi pour la suite de nos travaux, nous

avons choisi d'utiliser un ratio molaire décrit dans la littérature qui est de 2 :1 (CD : vit E) [85].

## VI.4. Caractérisation des complexes d'inclusion

### VI.4.1. Analyse par spectroscopie Infrarouge

#### Résultats

L'analyse infrarouge des complexes d'inclusion nous a donné les spectres représentés dans les figures VI.6, VI.7, VI.8, VI.9.

#### VI.4.1.1. Mélange physique

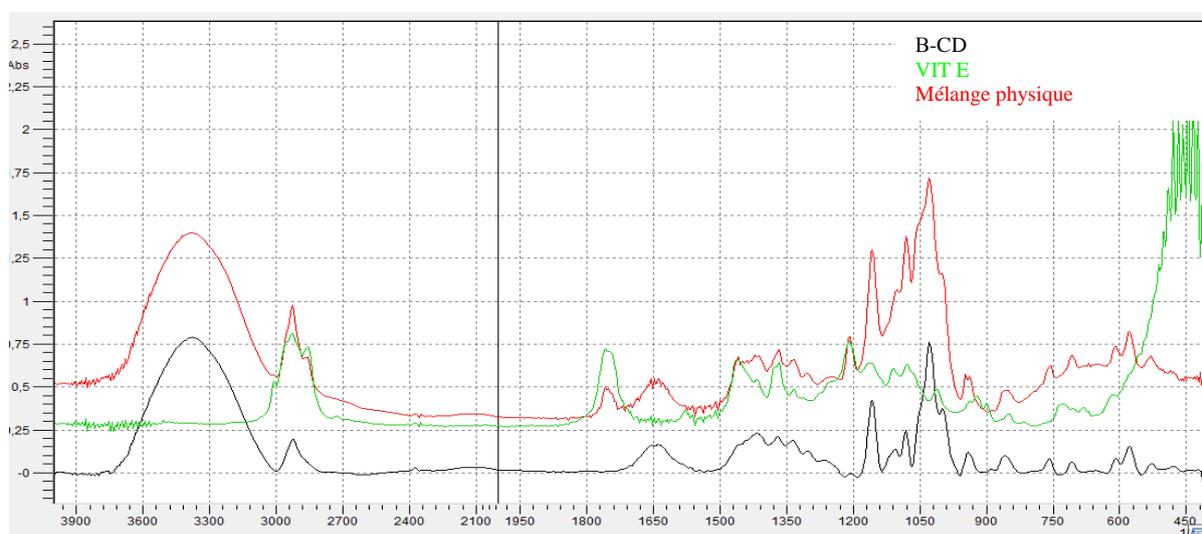


Figure VI.6. « Spectre Infrarouge du mélange physique »

#### VI.4.1.2. Co-évaporation

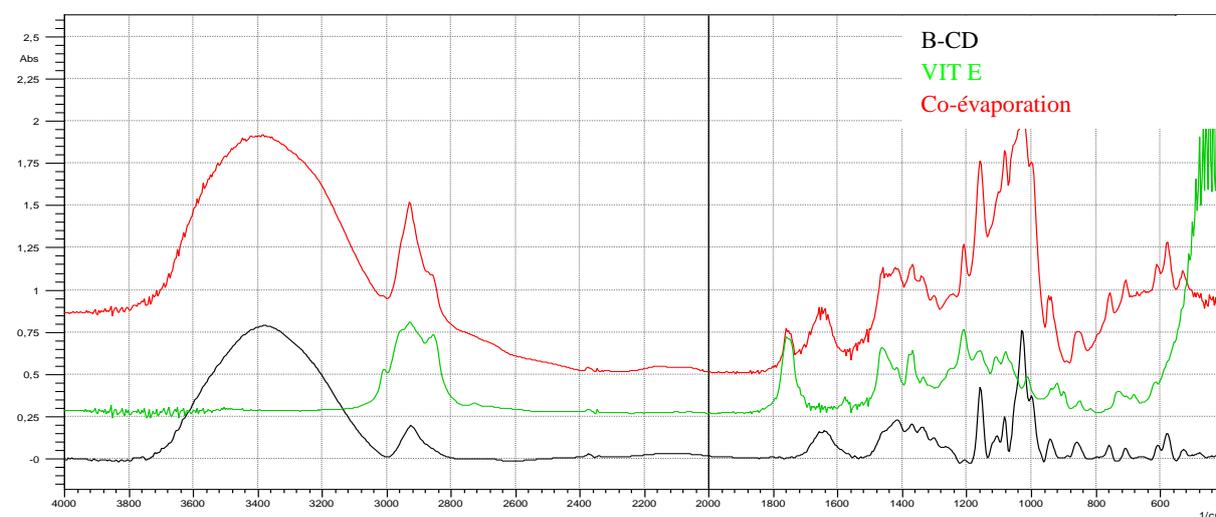


Figure VI.7. « Spectre Infrarouge de la Co-évaporation »

## VI.4.1.3. Kneading

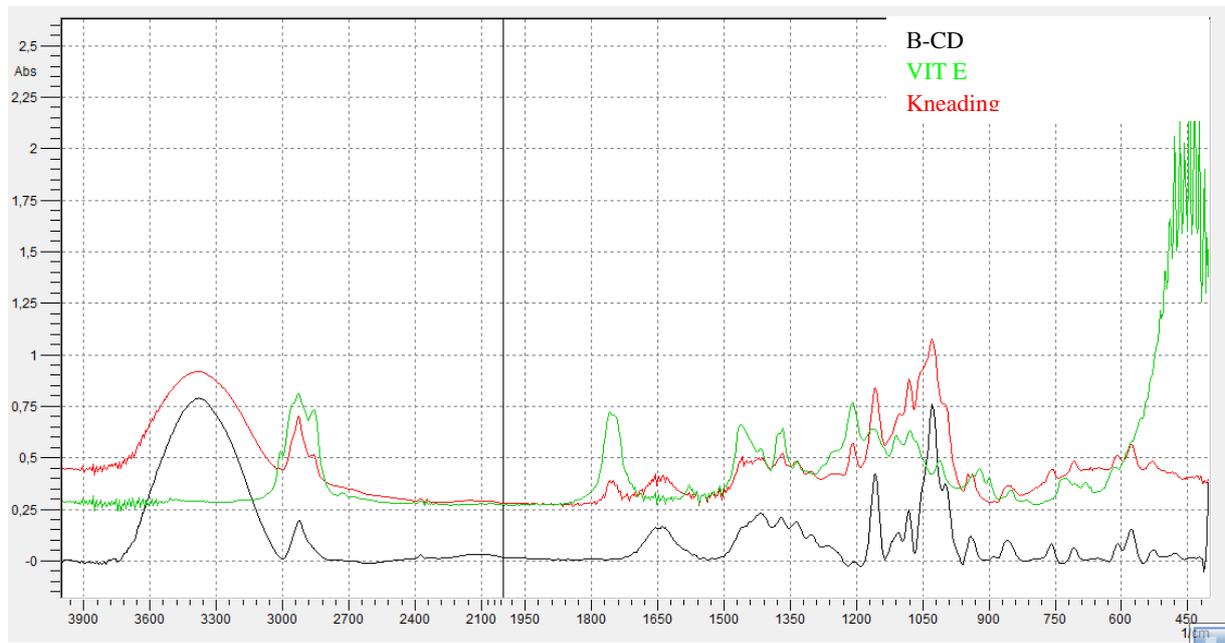


Figure VI.8. « Spectre Infrarouge du Kneading »

## VI.4.1.4. Lyophilisation

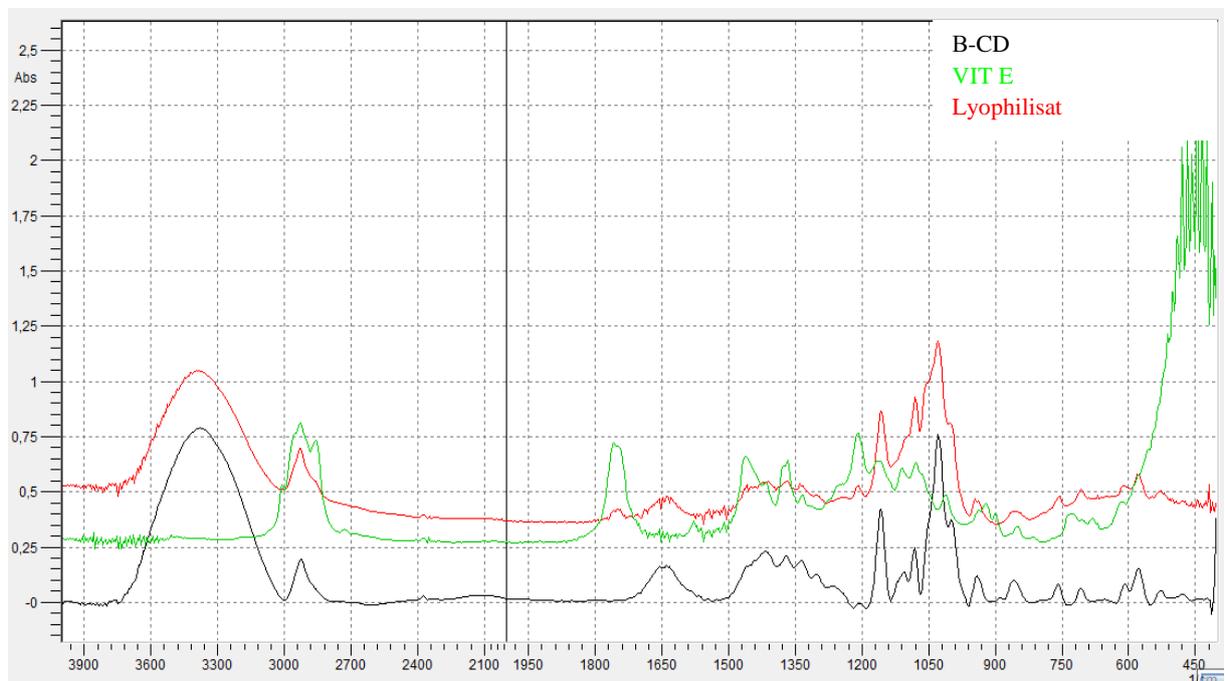


Figure VI.9. « Spectre Infrarouge de la lyophilisation »

### Observations

Pour le spectre de la vitamine E, on remarque trois (03) bandes caractéristiques à :  $\lambda_1= 2910 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_2=2850 \text{ cm}^{-1}$ , et  $\lambda_3= 1750 \text{ cm}^{-1}$ .

Le spectre de la  $\beta$ -CD possède trois (03) bandes caractéristiques à  $\lambda_1=2910 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_4= 3360 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_5= 1650 \text{ nm}$ .

- a) On remarque très bien que le spectre du mélange physique est une superposition des deux spectres  $\beta$ -CD et vit E, d'ailleurs on retrouve toutes les bandes caractéristiques :  $\lambda_1=2910 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_2=2850 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_3=1750 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_4= 3360 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_5= 1650 \text{ cm}^{-1}$ , cela signifie que le spectre obtenu est la superposition (additions) des deux spectres  $\beta$ -CD et vitamine E.
- b) Le spectre Co-évaporation donne aussi une superposition, car on retrouve toutes les bandes caractéristiques des deux composés avant la complexation sauf que celle-ci sont moins intense.
- c) Dans les deux derniers (Kneading et lyophilisa) on voit bien qu'il y a disparition de quelques bandes ( $\lambda = 1755 \text{ cm}^{-1}$  bandes C=O  $\text{cm}^{-1}$ ), ( $\lambda = 2850 \text{ cm}^{-1}$  bandes CH<sub>2</sub>)
- d) Pour les autres pics vu qu'ils sont communs entre les deux composés ( $\beta$ -CD et vit E) on ne pourra rien en conclure.

### Interprétation

D'après l'observation (a), on peut dire qu'il n'y a pas eu inclusion proprement dite ; car la présence de toutes les bandes caractéristiques sans changement notable indique fortement la présence de deux composés de départ à l'état libre ( $\beta$ -CD et vit E).

- L'observation (b), nous indique que :

- D'une part nous avons toujours des composés non complexés (existence de bandes caractéristiques de départ).
- D'une autre part, formation de complexes ou du moins inclusion de certains groupements dans la cavité de la CD (diminution de l'intensité de certaines bandes  $\lambda = 2850 \text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) et  $1750 \text{ cm}^{-1}$  (groupement C=O)). Cela est logique, car ces groupements sont plutôt de nature apolaire, ce qui les poussera à interagir et à être attiré vers la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD.

De l'observation C, on peut dire : que nous sommes en présence d'un complexe d'inclusion, car les bandes caractéristiques correspondantes aux groupements de nature hydrophobe C=O et CH<sub>2</sub> ont pratiquement disparue surtout dans le cas de la lyophilisation.

En résumé, on peut dire qu'on a peut-être inclusion dans les deux mélanges préparés par Kneading et lyophilisation.

Le cas le plus défavorable est celui du mélange physique, cela était finalement attendu, car le procédé de complexation comme vu en théorie repose sur :

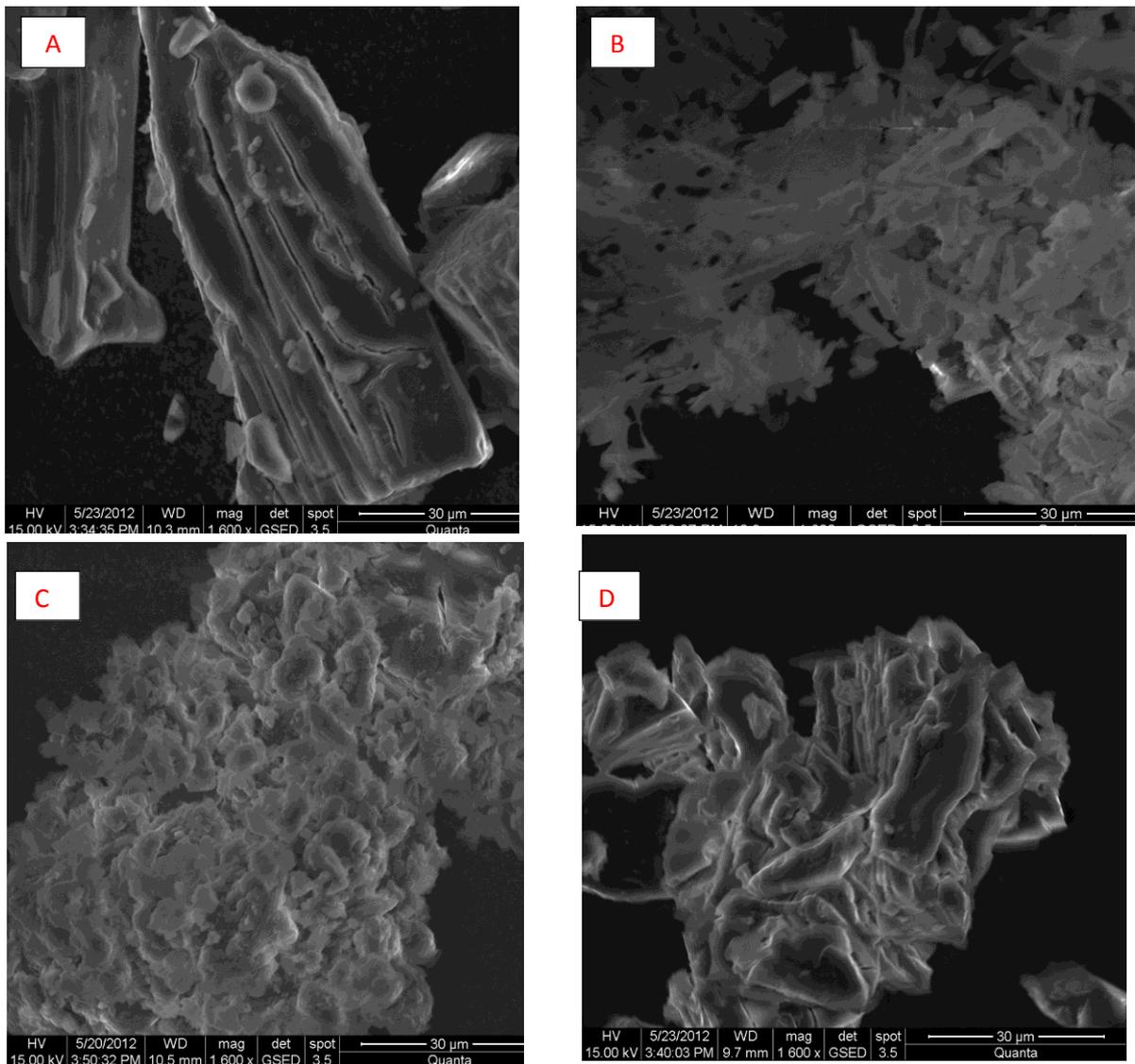
- L'interaction hydrophobe (cavité)-hydrophobie (invité) mais aussi sur la répulsion hydrophile (solvant)-hydrophobie (invité).

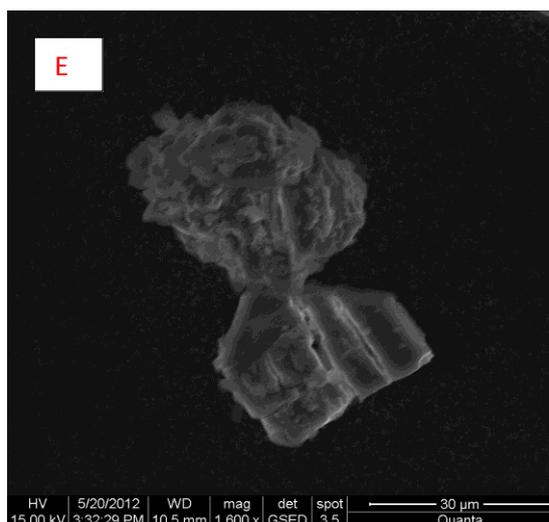
Dans la littérature, on parle dans ce cas de complexe d'association.

#### VI.4.2. Analyse par microscopie à balayage électronique

##### Résultats

Les images représentées en figure VI.10 sont les résultats obtenus par microscopie à balayage électronique





A:  $\beta$ -CD; B: lyophilisat, C: Kneading; D: co-évaporation; E: mélange physique.

**Figure VI.10.** « Micrographie MEB »

### Observations

Il est à noter que l'analyse de la vitamine E par MEB n'a pas été faite, cela est dû au fait que cette dernière est de nature semi-solide, par conséquent son analyse nécessite un changement d'une partie de l'appareil.

Sous le même grossissement (x1600), l'image de la  $\beta$ -CD montre que cette dernière est sous forme de cristaux irréguliers.

Pour la Co-évaporation, on remarque la destruction des cristaux et l'apparition d'une nouvelle forme (agglomérats).

Dans la micrographie donnée par le Kneading, on remarque la formation d'agglomérats tout autour des cristaux.

Pour la lyophilisation, on remarque le réarrangement des cristaux en bâtonnets. On voit aussi formation de pores.

Pour le mélange physique, on voit l'apparition des cristaux et des agrégats mais cela d'une façon séparée.

### Interprétation

Dans le cas de la Co-évaporation, la destruction des cristaux en fragment peut être due à la température utilisée dans la méthode de complexation. Aussi, les agglomérats tout autour peuvent représenter la vitamine E, on peut dire d'après ce nouveau réarrangement qu'il y a une interaction entre ces molécules.

Dans le mélange physique on voit bien que les deux molécules sont présentes (agglomérats et cristaux) cela indique qu'il n'y a pas d'inclusion proprement dite, mais juste quelques interactions surfaciques (formation de complexe d'association).

Pour le résultat obtenu lors de l'analyse du complexe Kneading, on peut expliquer les agglomérats obtenus par le fait d'avoir de la vitamine E fixée tout autour de la cyclodextrine, sauf que cette micrographie ne nous permet pas de juger l'inclusion proprement dite.

Pour le lyophilisat obtenu, la restructuration obtenue peut être expliquée par :

- Extraction brutale des molécules d'eau piégées (adsorbée en surface et à l'intérieur) des cyclodextrine
- Existences d'interaction ; d'une part de ; répulsion entre eau et la vit E (lors de la préparation de complexe) et d'une autre part ; d'attraction entre la cavité hydrophobe des CD et la vit E.

De ces résultats on peut dire avec prudence que l'inclusion est vérifiée dans le cas de la lyophilisation et qu'une formation d'un complexe d'association pour le mélange physique est probable.

### VI.4.3. Diffraction de Rayon X

#### Résultats

La combinaison des spectres obtenus par diffraction des rayons X nous donne les diffractogrammes dans la figure VI.11.

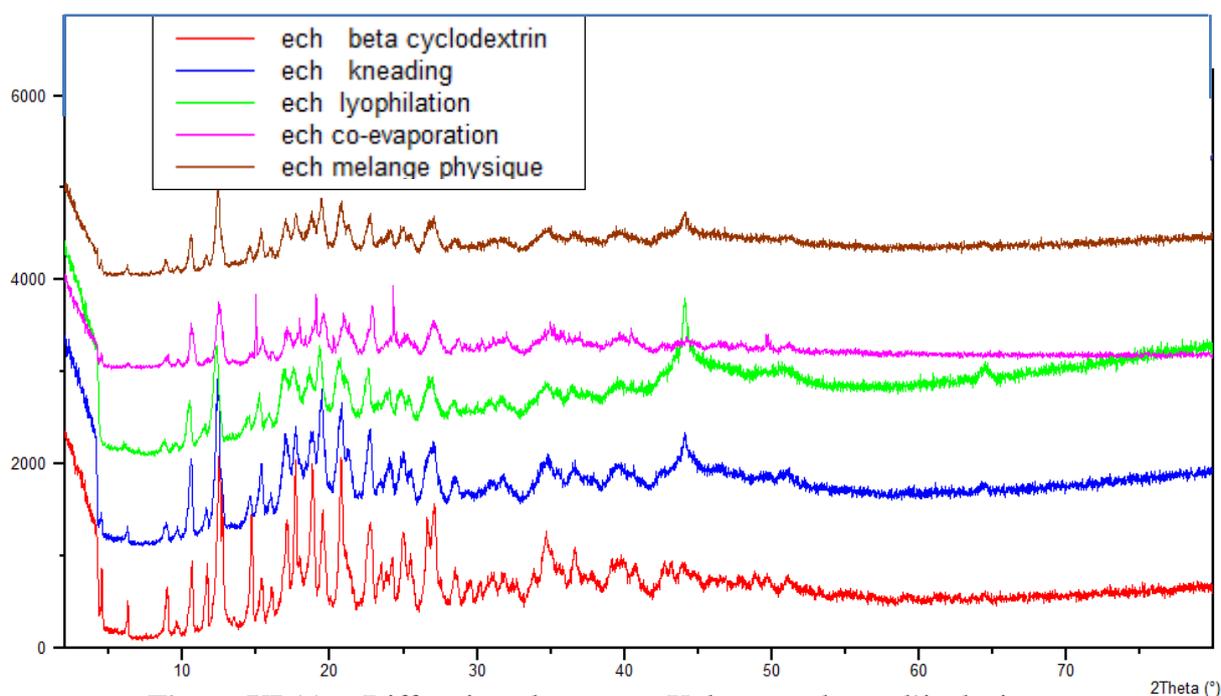


Figure VI.11. « Diffraction des rayons X des complexes d'inclusion »

### Observations

On ne voit pas une différence entre les spectres obtenus pour les quatre (04) complexes d'inclusion et le spectre de la  $\beta$ -CD seule.

### Interprétations

La diffraction des rayons X n'est pas la méthode la plus adaptée pour prouver la formation ou non des complexes d'inclusion, car la vit E est sous forme semi-solide par contre on peut dire qu'il n'y a pas de formation d'une nouvelle molécule (après complexation), donc finalement pas d'interactions chimiques.

#### VI.4.4. Analyse thermogravimétrique (ATG)

##### Résultats

Les résultats obtenus par analyse thermogravimétrique sont représentés dans les figures VI.12, VI.13, VI.14 et VI.15.

##### VI.4.4.1. Vitamine E

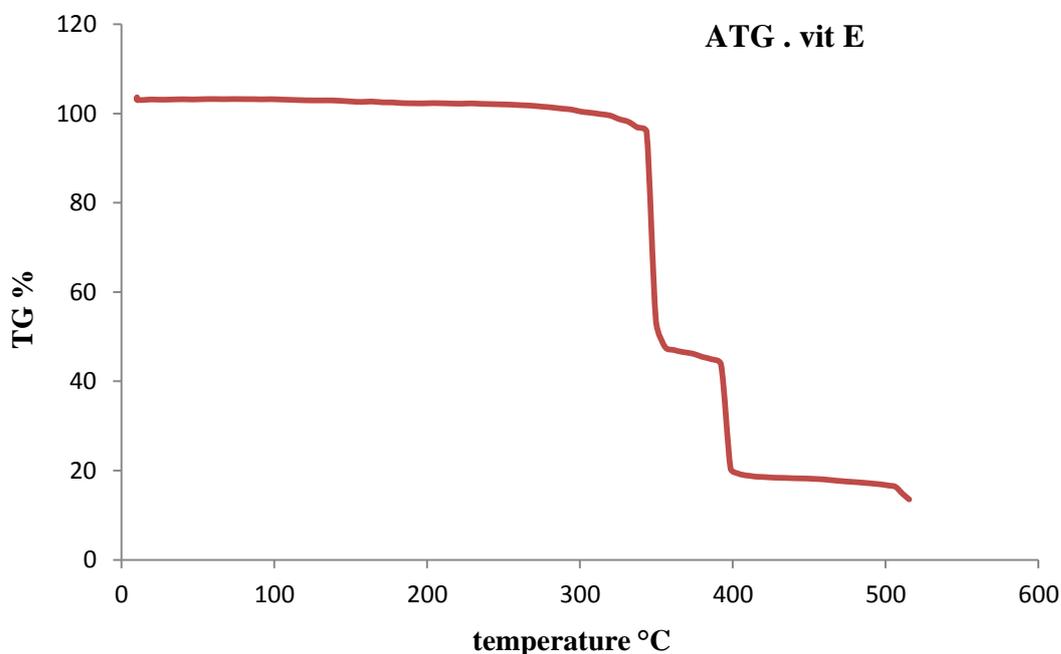
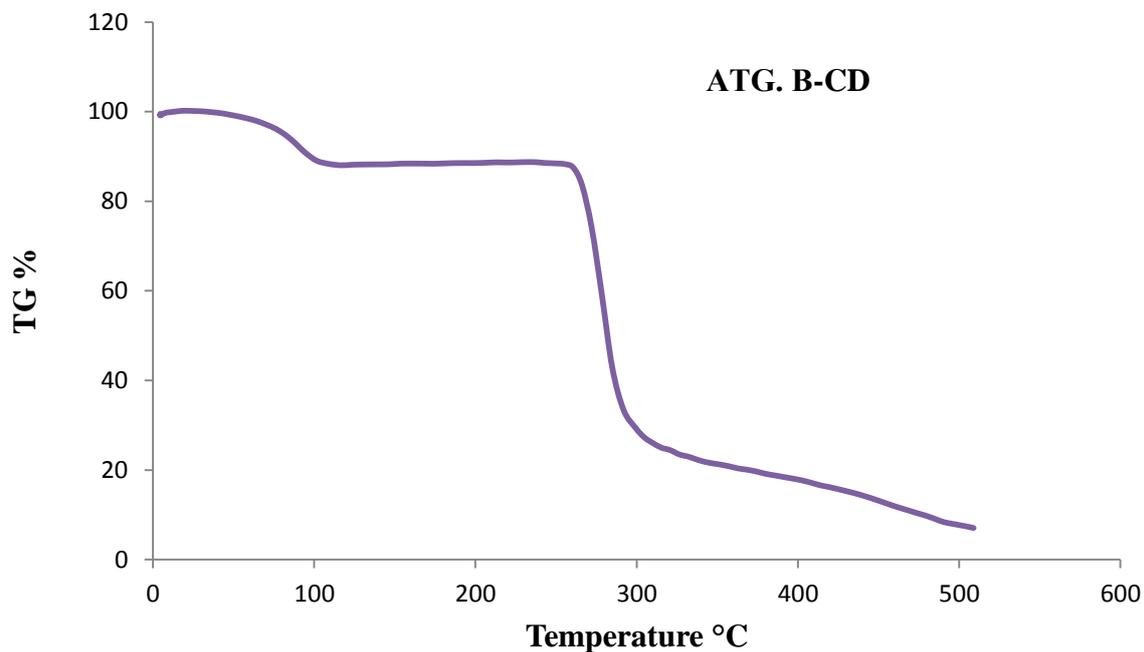


Figure VI.12. « ATG de la vitamine E »

## VI.4.4.2. Beta cyclodextrine

Figure VI.13. « ATG de la  $\beta$ -CD »

## VI.4.4.3. Kneading

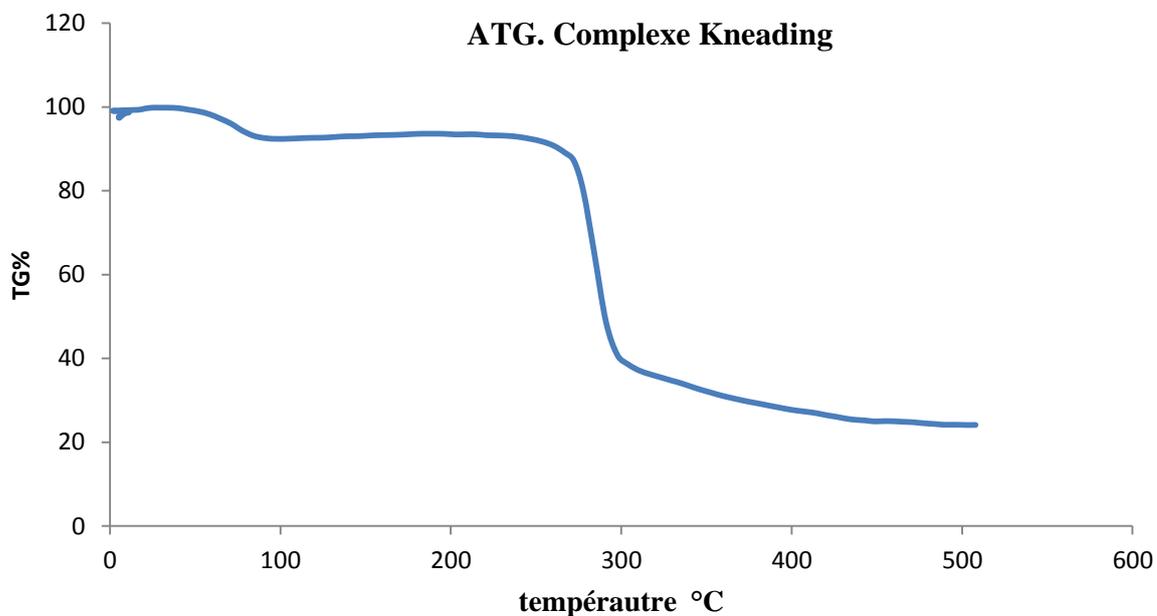


Figure VI.14. « ATG du complexe obtenu par Kneading »

## VI.4.4.4. Lyophilisation

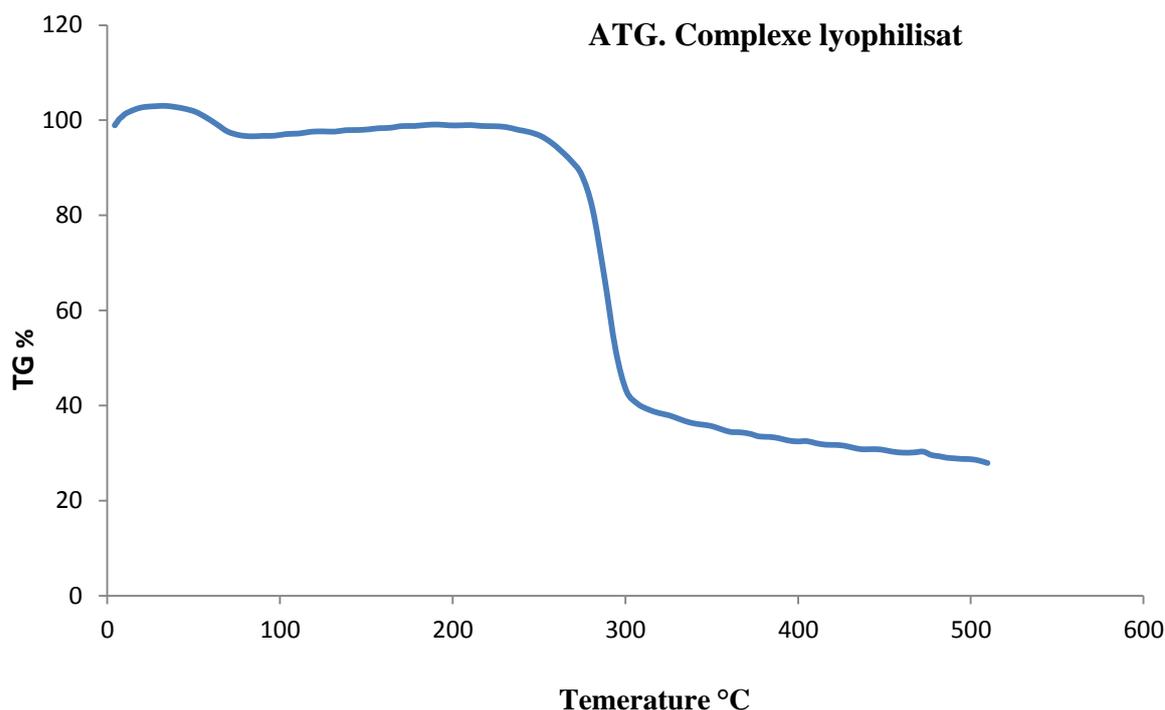


Figure VI.15. « ATG du complexe obtenu par lyophilisation »

**Observations**

Le graphe de la vitamine E montre qu'il y a une chute brusque à  $T=340^{\circ}\text{C}$ ,  $400^{\circ}\text{C}$ .

Pour la  $\beta$ -CD, Kneading et lyophilisé, on observe une diminution brusque en taux de TG(%) à  $T=280^{\circ}\text{C}$ .

**Interprétations**

Théoriquement la chute ou diminution brusque en taux de TG(%) indique un changement d'état de la molécule ou molécules analysées.

- Pour la vit E, la chute peut être attribuée au point éclair de cette vitamine.
- Pour la  $\beta$ -CD la chute en taux de TG(%) est observée à  $280^{\circ}\text{C}$ , cela indique la température de fusion de la  $\beta$ -CD [voir tableau I.1].
- Pour les complexes d'inclusion, on trouve qu'on a le même profil de TG%, que celui de la  $\beta$ -CD, cela peut être expliqué par le fait que dans les complexes étudiés il y a des interactions entre la vit E et la CD ; est donc par suite on peut avec prudence en déduire qu'il y a inclusion.

**VI.4.5. Teste de dissolution****Résultats**

En utilisant la courbe d'étalonnage dont l'équation est  $Abs = 1,4831C$ , nous avons pu calculer les concentrations massiques (mg/ml) en vitamine E dissoute.

Les résultats obtenus sont les suivants :

**Tableau VI.1.** « Concentrations en vitamine E dissoute ».

Echantillon	Blanc	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/ml)	0,097768	0, 21037	0, 11799	0, 19553	0, 13485	0, 11799	0, 13013

Blanc : Vitamine E seule.

**Observations**

D'après le tableau VI.1, nous remarquons que les concentrations trouvées ne sont pas identiques pour les six échantillons sauf que ces dernières sont supérieures à la concentration de la vitamine E seule.

**Interprétations**

La faible concentration de la vitamine E seule est justifiée par la non-solubilité de celle-ci dans l'eau.

Ces résultats montrent une non-homogénéité ; ceci vient du fait que la méthode de dosage et plus exactement la méthode de filtration n'arrivent pas à quantifier de manière fidèle et fiable la quantité de vitamine E dissoute, de ce fait ne nous pouvons pas exploiter ces résultats.

**VI.4.6. Dosage (quantification des pertes)****Résultats**

La quantification des concentrations en vitamine E dissoute nous a donné le tableau ci-dessous :

**Tableau VI.2.** « Quantification des concentrations en vitamine E dissoute ».

<b>Complexe</b>	<b>Mélange physique</b>	<b>Kneading</b>	<b>lyophilisat</b>	<b>Co-évaporation</b>
<b>Concentrations pratiques (mg/ml)</b>	0,1267	0,128	0,091	0,1078
<b>Concentrations théorique (mg/ml)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1

**Observations**

Les concentrations obtenues pratiquement sont complètement différentes de celles calculées théoriquement, ces dernières sont supérieures aux résultats pratiques sauf pour le lyophilisat dont la concentration pratique est inférieure à 0,1 mg/ml.

**Interprétations**

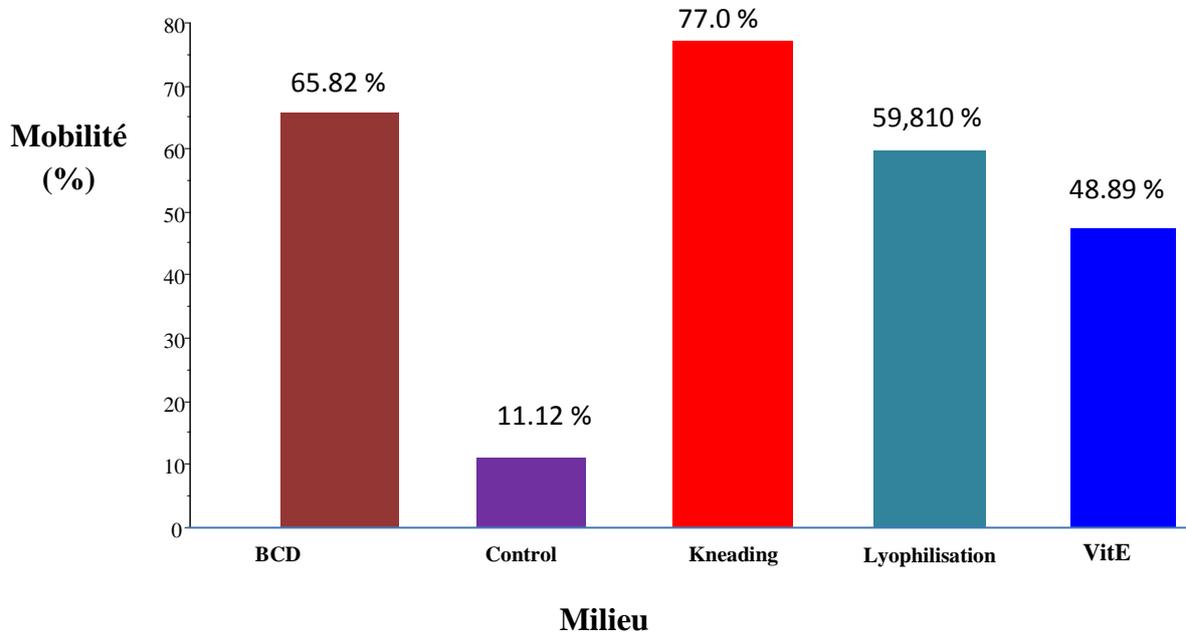
La différence entre les résultats théorique et pratique est justifiée par la non-homogénéité des complexes obtenus, sauf pour la lyophilisation.

Pour le lyophilisat, la concentration pratique trouvée prouve que la lyophilisation n'a été pas complète. La présence des molécules d'eau dans le complexe lyophilisé avait faussé la masse initiale de ce dernier.

## VI.5. Etude de l'action des complexes sur les spermatozoïdes

### Résultats

Le pourcentage de mobilité des spermatozoïdes mesuré pour l'ensemble des milieux de congélation est représenté sous forme d'histogramme (figure VI.16).



**Figure VI.16.** « Histogramme montrant les pourcentages de mobilité des spermatozoïdes après décongélation dans les six milieux de congélation ( $\beta$  – cyclodextrine, contrôle, hyper-osmotique, Kneading, lyophilisat, vitamine E) »

### Observations

Pour le contrôle le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après la congélation décongélation est de 11,12%

La  $\beta$ -CD seule et la vitamine E seule donnent un pourcentage de mobilité supérieur à celui obtenu par le contrôle, respectivement 65,820 % et 48,890 %.

Le taux de mobilité obtenu en utilisant le lyophilisat (59,810 %) et le Kneading (77,000 %) est supérieur à celui du contrôle.

### Interprétations

Les résultats obtenus prouvent que la vitamine E est un puissant antioxydant qui protège la cellule spermatique au cours des processus de congélation décongélation. D'ailleurs son usage est courant pour la protection du sperme de plusieurs espèces animales, comme décrit dans la littérature [57].

Mais pour des raisons de solubilité, cet effet n'est pas optimal.

Il est cependant intéressant de constater que la  $\beta$ -cyclodextrine seule présente un effet protecteur et qui est même supérieur à la vitamine E. les cyclodextrines pourraient donc avoir un effet cryoprotecteurs pour le sperme aviaire (ce qui est conforté par « M<sup>me</sup> Marianne VIDAMENT et ces collaborateurs dans leur article : « effet de différents cryoprotecteurs sur la mobilité et la fertilité du sperme dans les espèces asines et équines).

Le succès observé dans le Kneading concernant le pourcentage de mobilité est le résultat d'un mélange entre la  $\beta$ -cyclodextrine et la vitamine E qui se comporte comme un cryoprotecteur dans le milieu de congélation, mais aussi par son aptitude à augmenter la solubilité de la vitamine E, ce résultat peut être expliqué par le fait que :

- La CD a un effet cryoprotecteur.
- La vit E a un effet antioxydant.
- La complexation a pour but d'améliorer la solubilité de la vitamine E seul.

En dernier, on voit bien que les résultats obtenus par lyophilisation confirment le fait qu'il existe encore de l'eau à l'intérieur de notre complexe, ce qui explique une amélioration de la mobilité moins importante que dans le cas d'utilisation du complexe préparé par Kneading ou même la  $\beta$ -CD seul.

## Conclusion générale

---

Dans cette étude, nous avons fixé comme objectif d'améliorer la congélation du sperme aviaire. Ceci en passant par un objectif intermédiaire ; l'amélioration de la solubilité de la vitamine E en milieu aqueux. Pour cela, nous avons d'abord étudié le comportement du complexe vit E/ CD en solution à travers un test d'Higuchi (Diagramme de solubilité), ce dernier ne fut pas exploitable ; car la méthode d'analyse (de quantification) posait problème.

Cela nous a poussés à utiliser des données de la littérature qui indiquaient que :

- ✓ Le profil d'Higuchi vit E /  $\beta$ -CD est de type  $A_p$ .
- ✓ Le ratio molaire de complexation est de (2 :1).

Par suite, nous nous sommes attelés, à préparé plusieurs complexes  $\beta$ -CD / vit E, ceci à travers plusieurs méthodes : mélange physique, Kneading, Co-évaporation et lyophilisation.

Bien sûr avant d'utiliser ces complexes obtenus et afin de trouvé la meilleure méthode de complexation nous avons effectué, une série de caractérisation (IR, DRX, ATG, MEB), nous avons pu ressortir avec les conclusions suivantes :

- ✓ Il est probable qu'il y ait la formation de complexe d'association entre  $\beta$ -CD/ vit E dans le cas d'un mélange physique.
- ✓ Il est fortement probable que dans le cas des complexes préparés par lyophilisation, Kneading et Co-évaporation présente le phénomène d'inclusion.

Enfaite comme vu dans la littérature, le moyen qui pourrait indiquer une inclusion sans équivoque est bien l'RMN.

Ceci dit, nous avons pu à travers une étude *in vitro* ; étude de la mobilité du sperme aviaire après congélation prouvé l'amélioration de la solubilité aqueuse de la vitamine E, d'une part, et d'autre part, nous avons amélioré la qualité du sperme congelé (viabilité et mobilité), en passant de 11,12 % à (77 % et 59,81 %) dans le cas de Kneading et lyophilisation.

Ainsi, on peut dire que nous avons atteint les objectifs tracés au départ même si beaucoup de travail reste à faire ;

- ✓ Trouver une méthode de quantification plus exactement de filtration ou séparation qui pourrait séparer la vit E complexé (dissoute) de celle qui ne l'est pas, ainsi un test d'Higuchi et une cinétique de dissolution pourront être effectués, et l'amélioration de la solubilité de la vitamine E sera prouvée analytiquement.

## **Conclusion générale**

---

- ✓ Il serait judicieux de faire une étude comparative entre la complexation de la vit E par  $\beta$ -CD et ces dérivés tels que Hp-  $\beta$ -CD, Me-  $\beta$ -CD, et voir leurs influences sur la solubilité de la vit E.
  
- ✓ Finalement, il serait intéressant de faire des études statistiques (fiabilité, reproductivité et exactitude) afin de prouver sans équivoque la pertinence de cette découverte et originalité.

# Références bibliographiques

## References Bibliographiques

---

- [1] C.M.O. Medeiro, F. Forell, A.T.D. Oliveira, and J.L. Rodrigues: Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, University Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 9 150 1-970 Brazil. 2001.
- [2] Catherine Labbé, Elisabeth Blesbois, Bernard Leboeuf, Alain Martoriati, Philippe Guillouet, Guiseppe Stradaioli et Michèle Magistrini: Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques : protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes. Les Actes du BRG, 4 143-157 BRG, Article original. 2003.
- [3] Girexx Genecologia Reproduccia : Cryoconservation d'échantillons de sperme. Société espagnole de fertilité.
- [4] P.Therond, J.Auger, A.Legrand et P.Jouannet:  $\alpha$ -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. Molecular Human Reproduction vol.2 no.10 pp. 739-744. 1996.
- [5] Jamieson : Vitamine E équilibrée 400 UI avec tocophérols mélangés.CUP 0 646420 4234 7.DIN 00399515. 9 novembre 2009.
- [6] Guillaume 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. 1er décembre 2005.
- [7] Stéphane MOUTARD : relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles. Thèse de Doctorat. Université de Picardie Jules Verne.
- [8] Pascal BONNET : étude par modélisation moléculaire de dimers de cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion. Thèse de Doctorat. Université d'Orléans, Université de Barcelone. 23 mai 2001.
- [9] Castagne, D., B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel : Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, Relationship with their cholesterol extraction capacities. J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem. 67:369-376. 2010.
- [10] Romain JACQUET : Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énanti-sélective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. These de Doctorat. University d'Orléans. 22 November 2006.
- [11] Haitao Yang:  $\beta$ -cyclodextrin complexation and formulation as an anti-HIV microbicide, China Pharmaceutical University. 1996.
- [12] Usha Rashmi Bhaskara-Amrit, Pramod B. Agrawal and Marijn M.C.G. Warmoeskerken: Applications of  $\beta$ -cyclodextrins in textiles. Autex Research Journal. Vol. 11, No4. Décembre 2011.
- [13] M. Manuel THARIN : Synthèse de polyéthers linéaires cycliques substitués par des cyclodextrines. Application en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel. Mai 2002.

## References Bibliographiques

---

- [14] Phillip H. Madison: Carbohydrate mediation of aqueous polymerizations: Cyclodextrin mediation of aqueous polymerizations of methacrylates. Masters in Chemistry. Institut polytechnique de la Virginie. Juin 2001.
- [15] Castagne Delphine: Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomes ou biologiques. Thèse Doctorat. Université de Liège, 2009-2010.
- [16] Bisson-Boutelliez Catherine: *Desulfovibrio spp* dans la maladie parodontale : Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-1. 5 novembre 2009.
- [17] Benhadi Siham : Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux cellulosiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré Nancy 1. 10 novembre 2010.
- [18] Câlin Gabriel Floare : Dynamique réactionnelle dans des environnements restreints. Thèse de Doctorat. Université de Joseph-Fourier - Grenoble 1. Le 18 novembre 2005.
- [19] Khalil Hanna : Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules cage dans la dépollution des sols. Solubilité et extraction de polluants organique par les cyclodextrines. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 18 novembre 2004.
- [20] Marcus E. Brewster, Thorsteinn Loftsson: Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, Science Direct, Advanced Drug Delivery Reviews 59 645–666. 2007.
- [21] Sarah Gould, Robert C. Scott: 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review. Science Direct. Food and Chemical Toxicology 43 1451–1459. Reviews. 2005.
- [22] József Szejtli : Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure Appl. Chem, Vol. 76, No. 10, pp. 1825–1845. 2004.
- [23] Manuel THARIN : Synthèse de polyéthers linéaires cycliques substitués par des cyclodextrines. Application en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel, Mai 2002.
- [24] Zahra ESKANDANI : Canaux symétriques à base de cyclodextrines amphiphiles : Polymérisation divergente d'oxirane. Thèse de Doctorat. Université Evry Val d'Essonne. 24 Janvier 2011.
- [25] Sergey V. Kurkov, Elena V. Ukhatskaya, Thorsteinn Loftsson: Drug/cyclodextrin: Beyond inclusion complexation, J Incl Phenom Macrocycl Chem 2011.
- [26] Céline GLANT : Nouveaux complexes polyelectrolytes impliquant un polymère de  $\beta$ -cyclodextrines : un tensioactif cationique et un polyanion. Thèse de Doctorat. Université de PARIS XII. 13 Décembre 2003.

## References Bibliographiques

---

- [27] Sandrine WEISSE : Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée. These de Doctorat. University PARIS XI, 2001-2002.
- [28] Giani Andrea Linde, Antonio Laverde Jr, and Nelson Barros Colauto: Changes to Taste Perception in the Food Industry: Use of Cyclodextrins. Springer Science, Business Media, LLC. Chapitre 8. 2011.
- [29] Chandrakant D.S, Lingaraj S. Danki, Abdul Sayeed, Mallikarjun B. Kinagi: Preparation and Evaluation of Inclusion Complexes of Water Insoluble Drug. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Vol. 2(4). Oct - Dec 2011.
- [30] Thorsteinn Loftsson : Cyclodextrin. Journal of pharmaceutical Sciences, vol. 93, NO. 5. Mai 2004.
- [31] Ludmilla Lumholdt Riisager: The influence of complex formation on the degradation of  $\gamma$ -cyclodextrin by  $\alpha$ -amylase, University Aalborg. 2010.
- [32] Marcus E. Brewster, Thorsteinn Loftsson: Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews 59. 2007.
- [33] Nitin Maski, Arulkumar, Kundlik Girhepunje, Prashant Ghode, Surajkumar Randive and Ranju Pal: Studies on the preparation, characterization and solubility of  $\beta$ -cyclodextrin-Diacerein inclusion complexes. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 1, Issue 2. Oct-Dec. 2009.
- [34] Mukesh Chandra Sharma<sup>1</sup>, Smita Sharma: Preparation, physicochemical characterization, dissolution, formulation and spectroscopic studies of  $\beta$ -cyclodextrins inclusion complex. International Journal of ChemTech Research Vol.3, No.1, pp 104-111. Jan-Mar 2011.
- [35] Ana Figueiras, Laura Ribeiro, J. J. Torres-Labandeira, Francisco J. B. Veiga: Evaluation of host-guest complex formation between a benzimidazolic derivative and cyclodextrins by UV-vis spectrophotometry and differential scanning calorimetry. J Incl Phenom Macrocycl Chem. 2007.
- [36] Michel Marin : La lyophilisation pour des produits de haute qualité. CBAI, INRA /INA P-G78850. Thiverval – Grignon. 2003.
- [37] Protocole expérimental et techniques d'analyse. Chapitre II.
- [38] Kenneth A. Connors : The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. Chem. Rev., 97, 1325-1357. 1997.
- [39] Complexes amylose-arôme. INRA Nantes – Plateforme Biopolymères - Interactions - Biologie Structurale (BIBS) -RMN du solide.

## References Bibliographiques

---

[40] Ramnik Singh, Nitin Bharti, J yotsana Madan, S. N. Hiremath: Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes. Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 2 (3). 2010.

[41] Ajaykumar Patil, Shaik Majahar, Gulam Irfani : Floating tablets of Nimodipine and its inclusion complex with  $\beta$ -Cyclodextrin for controlled release. International Journal of PharmTech Research CODEN (USA): IJPRIF ISSN: 0974-4304 Vol. 3, No.2, pp 619-625. Avril-juin 2011.

[42] Benjamin RONDEAU : Matériaux gemmes de référence du muséum national d'histoire naturelle : Exemples de valorisation scientifique d'une collection de minéralogie et gemmologie. 2003.

[43] J. GHANBAJA : microscopie électronique à transmission et ses techniques d'analyses, thèse de Doctorat, Université de Nancy.

[44] Wafae IRAQI : biomarqueurs du remodelage cardiaque chez des patients ayant une insuffisance cardiaque modéré à sévère due a une dysfonction du ventricule gauche compliquée par un asynchronisme cardiaque : données de l'étude CARE-HF, thèse de Doctorat, Université d'HENRI POINCARÉ - Nancy I, 2008.

[45] M. Narender Reddy, TasneemRehana,S. Ramakrishna, K. P. R. Chowdary et Prakash V. Diwan :  $\beta$ -cyclodextrin complexes of celecoxib: Molecular-modeling, characterization, and dissolution studies. AAPS Pharm Sci; 6 (1) Article 7. 2004.

[46] Enhancement in susceptibility of cancer cells to Carb and 5-FU by MCD. Involvement of Akt, NF- $\kappa$ B and Bcl-2.

[47] Hélène JEULIN : Impact virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine aux cyclodextrines sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincare. 17 décembre 2008.

[48] Delna Ghadiali : Arninolysis of the 4-acetoxybenzoate anion catalysed by cyclodextrins. Thèse de Doctorat. Université Montréal Québec canada. Aout 2000.

[49] Zhaofeng Li, Miao Wang, Feng Wang, ZhengbiaoGu, Guocheng Du, Jing Wu, Jian Chen:  $\gamma$ -Cyclodextrin: A review on enzymatic production and applications. Mini- Review. Appl Microbiol Biotechnol 77:245–255. 2007.

[50] H. Eddaoud I, A. DeratanI, S. Tingry, P. Seta : Séparation membranaire basée sur la reconnaissance moléculaire par les cyclodextrines. Polym. Internat. 52. 1390-95. 2003.

[51] Anders Bjorneboe, Gåoenn- Ellnaa. Bjorneboe Andchristian a. Drevoh: 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. 7 Avril 2012.

[52] Erlangung Der WürdeEines: Diastereo selective synthesis of  $\alpha$ -tocopherol. These de Doctorat. Universität Basel. 11 November 2008.

## References Bibliographiques

---

- [53] Kevin Pehr, MD; R. Roy Forsey, MD, FRCPC: Why don't we use vitamin E in dermatology? Current review-actualites. Université Montréal. 1 novembre 1993.
- [54] Jean Texier : Les vitamines. Editions JIBENA, pages 99 à 106. juillet 1989.
- [55] Marie-Céline KIBANGADI: Beta-carotène et vitamines A et E chez l'enfant. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie. 7 janvier 1998
- [56] Unlimited DSM : Vitamine E.
- [57] Claude Gagnon : la vitamine E : fertilité et combativité. Avril 2005.
- [58] M. E. Escuderos, A. A. Sayago, B. M. T. Morales and R. Aparicio : Evaluation of  $\alpha$ -tocopherol in virgin olive oil by a luminescent method. GRASAS Y ACEITES, 60 (4), 336-342. ISSN: 0017-3495, DOI: 10.3989/gya.108308. Juillet- September 2009.
- [59] Balasulojini Karunanandaa, Qungang Qia, Ming Hao, Susan R. Baszis, Pamela K. Jensen, Yun-Hua H. Wong, Jian Jiang, Mylavarapu Venkatramesh, Kenneth J. Gruys, Farhad Moshiri, Dusty Post-Beittenmiller, James D. Weiss, Henry E. Valentin: Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. Article du press. Science direct. Metabolic Engineering. 30 janvier 2005.
- [60] Cristina M. Sabliov C. Fronczek C. E. Astete M. Khachatryan L. Khachatryan C. Leonard : Effects of Temperature and UV Light on Degradation of  $\alpha$ -Tocopherol in Free and Dissolved Form. J Am Oil Chem Soc 86:895-902. DOI 10.1007/s11746-009-1411-6. 21 juin 2009.
- [61] Hedhill Lassaad : Les antioxydants dans les aliments. Agence Universitaire de phrancophonie ; IPEIN de Nabeu TINISIE. 7 Novembre a Carthage.
- [62] Maria Laura Colombo : An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol- Perspectives. Review. Molécule doi:10.3390/molecules 15042103. ISSN 1420-3049. Université Torino Italie. 24 Mars 2010.
- [63] Céline Chanforan : Stabilité de micro constituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechiométrique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 17 septembre 2010.
- [64] Pauline Elisabeth Pidou : La vitamine E chez le cheval : Synthèse bibliographique. Thèse Doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. 2010.
- [65] Vincent Gembus : Sur quelques utilisations d'époxydes en synthèse organique ; nouvelles voies d'accès au tocophérol et synthèse formelle de la borrelidine. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur. 11 mai 2006.
- [66] Cuvelier C, Dotreppe O., Istasse I : Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. Université de Liège B43, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique. 20 juillet 2003.

## References Bibliographiques

---

- [67] Jean Louis Guéant : Coenzyme et vitamine. Babarnab – PROD.
- [68] Claude Fernand Bourgeois : les vitamines dans l'industrie agroalimentaires. ISSN: 0243-5624. ISBN: 2-7430-0524-6. Editions Tec-Doc 2003.
- [69] Lareal. Vitamine E et tocophérols. Note scientifique N°1.
- [70] DL-alpha Tocopheryl Acetate, Zhejiang Medicine CO. Ltd., China.
- [71] Kyowa Hakko Europe GmbH: DL-alpha tocopheryl acetate. Daiichi Fine Chemical Division. Am Wehrhahn 50. 40211 Düsseldorf / Germany.
- [72] Making cosmetics: Vitamine E tocopheryl acetate. PO Box 3372, Rentou WA 98056. Tel: 425-427-9116. 14 février 2008.
- [73] BASF Aktiengesellschaft: Vitamin E acétate. Fine Chemicals Division-Cosmetic Solutions - 67117 Limburgerhoft. MEMC 041113e-0; Page 1 -16. Janvier 2006.
- [74] J.-D. Nadeau : La relation des vitamines a la nutrition animale. Canadian journal of comparative Médecine. Vol. VII-N°. 11. Novembre 1943.
- [75] Michèle Ake : Vitamines A, E et fer: statut de l'enfant d'âge préscolaire en Côte D'ivoire. Apports en nutriments de l'alimentation traditionnelle. Thèse de Doctorat. Université Montpellier-I. 26 Mars 1999.
- [76] Jennifer Hillan : Facts about vitamin E. IFAS Extension. FCS8641. Université de Florida. Avril 2006.
- [77] J Pincemail, JO Defraigne, M Meurisse, R Limet : Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. Medi-Sphere. MS 90. Décembre 1998.
- [78] DL-alpha-tocopherol, Products for the Dietary Supplement, Beverage and Food Industries – Technical Information May 2005.
- [79] Jean-Paul Helme, Jean-Bernard Chazan, Jean-Louis Perrin, Marie-Claude Martini, Monique Seiller Coordonnatrices : Les antioxydants. Extraits de livre et articles. Éditions Tec & Doc. ISBN : 2-7430-0191-7 (2ième édition). Pages 337 à 352 du chapitre 18.
- [80] ADM Natural Health and Nutrition, P.O. Box 2 • 1540 AA Koogaan de Zaan. The Netherlands.
- [81] dl-  $\alpha$  -tocopherol. Prepared at the 30th JECFA (1986), published in FNP 37 (1986) and in FNP 52 (1992). Metals and arsenic specifications revised at the 61<sup>st</sup> JECFA (2003). A group ADI of 0.15-2 mg/kg bw for dl- $\alpha$ -tocopherol and d- $\alpha$ -tocopherol, concentrate, singly or in combination, was established at the 30th JECFA (1986).
- [82] ] Ali Said DURMUŞ, Nusret AKPOLAT, Emine ÜNSALDI, Effect of dl-alpha-tocopherol-acetate on the fracture healing of experimental radial diaphysis fracture in dogs, ARAŞTIRMA: 22 (3): 141 – 146, 2008.

## References Bibliographiques

---

- [83] Tocopherol nicotinate, Official Monographs for part I, JP XIV.
- [84] DL-  $\alpha$ -tocopherol, Prepared at the 30th JECFA (1986), published in FNP 37 1986.
- [85] Kaneto Uekaa, Yashide Horiuchi, Masahiko Kikchi et Fmitoshi Hirayama: Enhanced dissolution and oral bioavailability of  $\alpha$ - tocophryl esters by dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation. Journal of inclusion phenomena (6) 167-174. Faculty of pharmaceutical Sciences, Komamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Komamoto 862, Japan. (1988).
- [86] Qing Xiang Guo, Tan Ren, Yi Ping Fang AND yo Cheng Liu: Binding of vitamin A by  $\beta$ - cyclodextrin and hepatis (2,6- Odimethyl)-  $\beta$ cyclodextrin. Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry 22:251- 256, 1995.
- [87] Astrid m. Drotleff .Waldemar Terns: Separation and characterization of cis-trans isomers of a-tocotrienol by HPLC using a permethylated b-cyclodextrin phase. Z Lebensm Unters Forsch A (1998) 206: 9±13. Springer-Verlag. 1998.
- [88] Yohei Hamano, aKenzo ITO, Hajime Matsuda, Hideyuki Sumiyoshi, Hidetoshi Arima, Fumitoshi Hirayama and Kaneto Uekama : Inhibitory effect of 2-Hydroxypropyl-b - cyclodextrin on the Foaming Generated by the Phosphodiester Compound of Vitamin C and E, EPC-K1. Chem. Pharm. Bull. 47(6) 828—832 (1999) Vol. 47, No. 6. 1999.
- [89] Yoshiyuki Watanabe, Takashi Yamashita, Marie Yamashita<sup>1</sup> and Shuji Adachi: Suppressive Effect of  $\alpha$ -Tocopherol Complexed with  $\beta$ -Cyclodextrin on the Oxidatio of Methyl Linoleate. Food Sci. Technol. Res., 15 (5), 479 – 482, 2009.
- [90] Noriyuki MiyoshiYoheiWakaoa, Susumu Tomonoa, Masayuki Tatemichia,b, Tomohiro Yanoa,c, Hiroshi Ohshimaa : The enhancement of the oral bioavailability of  $\gamma$ -tocotrienol in mice by $\gamma$ -cyclodextrin inclusion. Science Direct. Journal of Nutritional Biochemistry 22- 1121–1126. 2010.
- [91] Yoshimi Sueishi, Masashi Hori, Naoya Inazumi: Characterization of inclusion complex of vitamin E compound with 2,6-di-O-methylated b-cyclodextrin as the solubility enhancerand its kinetic determination for radical scavenging ability. J Incl Phenom Macrocycl Chem 72:467–472. DOI 10.1007/s10847-011-0018-3. 2012.
- [92] Yano T, Sato A, Sekine M, KashiwagiK, Ota : The enhancing effect of  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion on  $\gamma$ -Tocotrienol-dependent negative growth nontrol of mesothelioma cells in a xenograft model. Functional Foods in Health and Disease, 1(12):508-515 Page 508 of 5155. 2011.
- [93] Moutel Grégoire : évolution des pratiques d'autoconservation de sperme et de garde des embryons ava– nt et après les lois de bioéthique de Juillet: 1994 : Incidences sur l'organisation des centres d'assistance médicale à la procréation. 1997.
- [94] Sylvie Pinsonneault, Gail Ouellette : fertilité et milieux de travail. Fédération du Québec pour le planning des naissances, ISBN 2-9802393-1-3. 1997.

## References Bibliographiques

---

- [95] Jasmine Lefebvre : Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : Clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques. Thèse de Doctorat. Université de Montréal. Avril 2009.
- [96] J. A. Long: Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? Poultry Science- 85:232-236P.2006.
- [97] Educagri : Reproduction des animaux d'élevage. 361-362P. 2005.
- [98] Forman D.P, Kirby J.D: Sperm mobility: phenotype in rooster (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of reproduction* 72, 562-567. 2005.
- [99] Froman, DP et AJ Feltman: Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Repro.* 58:379-384.1998.
- [100] Elisabeth Blesbois, François Dubos, Isabelle Grasseau, Marie-Madeleine Richard, Yannick Roman, Michel Saint-Jalme, François Seigneurin : Recherche d'indicateurs d'aptitude à la congélation de la semence chez les oiseaux et mise au point de la cryopréservation du sperme de jars landais. *Les Actes du BRG*, 6 415-431P. 2006.
- [101] E. Tuskaszewicz, Wroclaw, Poland: Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa.55:1819-1829 p. 2001.
- [102] J. Peláez, D. C. Bongalhardo et J. A. Long : Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poult.Sci*435-443. 2011.
- [103] A.M. Donoghuea, G.J. Wishartb: Storage of poultry semen. 213-232P. 2000.
- [104] E. Mocé, I. Grasseau , E. Blesbois : Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome réaction. 359-366 p. 2010.
- [105] Groothuis TG et CarereC : avian personalities: characterization and epigenesis. *NeurosciBiobehav Rev.* 29(1):137-50. 2005.
- [106] S. Salamon, W.M.C. Maxwell: Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination .185-249P.1995.
- [107] K. Tselutin, F. Seigneurin and E. Blesbois: Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Poultry Science* 78: 586-590.1999.
- [108] Réviers Min Sauveur Bernard : Reproduction des volailles et production d'œufs, INRA paris 219-449 P. 1988.
- [109] Paméla, Virginie Fuertes : Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée: Etude expérimentale. 2008.

## **References Bibliographiques**

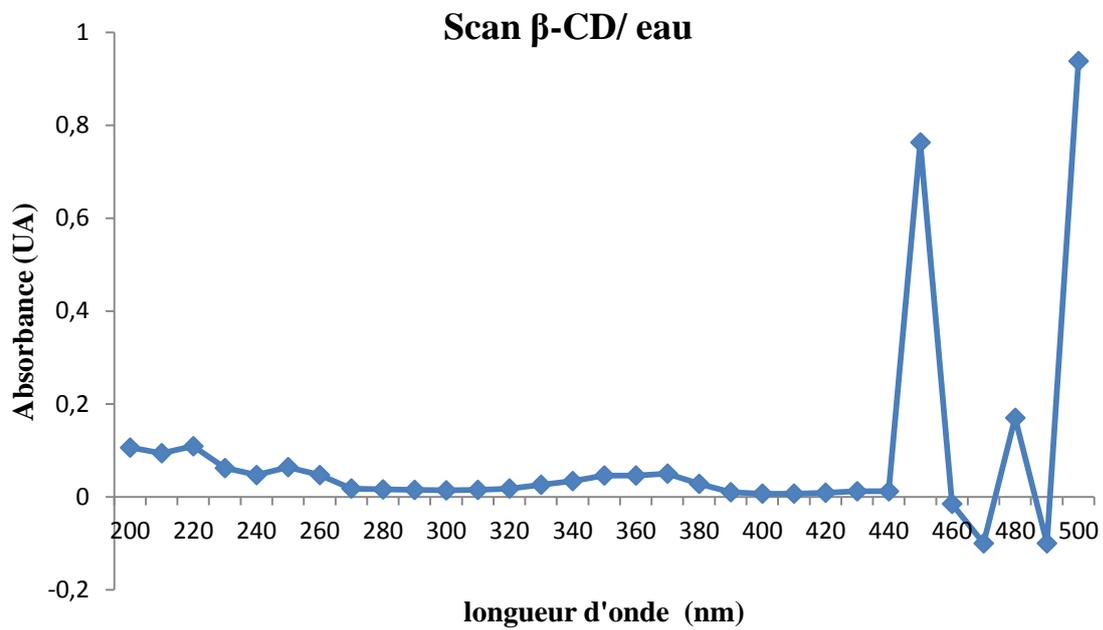
---

[110] Marianne Vidament, Pierrick Vincent, Jean-Marie YVON, Bernard Bruneau, Jean-Louis LARRY, Laurence DEFOIN, Benoît BITEAU, Effet de différents cryoprotecteurs sur la mobilité et la fertilité du sperme dans les espèces asine et équine, Les Actes du BRG, 6 469-481, 2006.

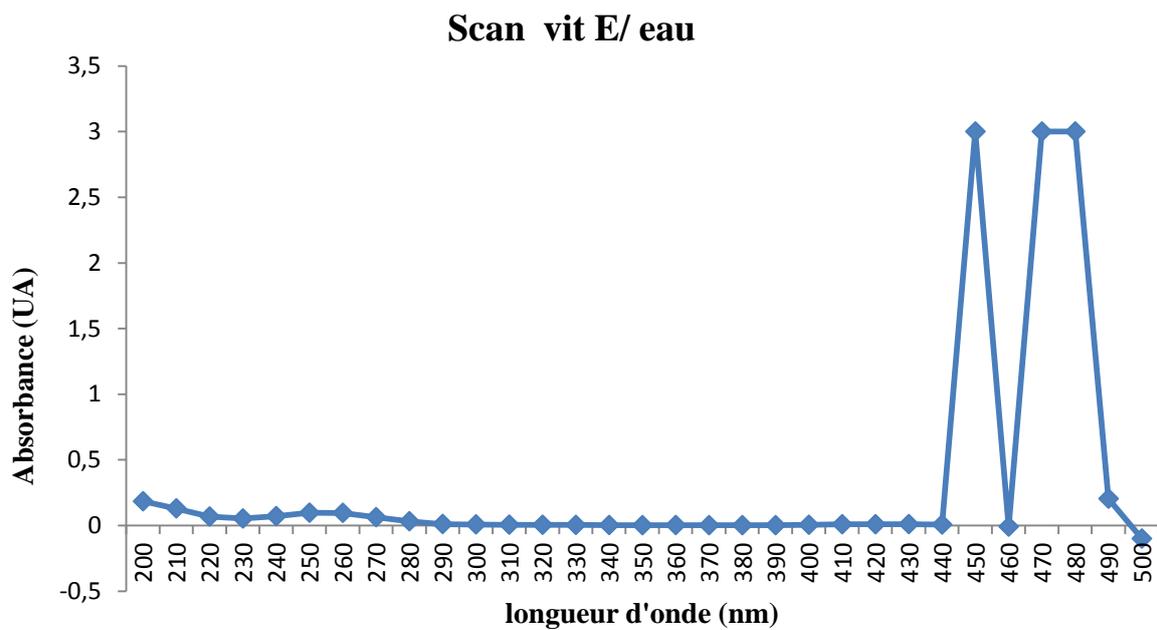
# Annexes

## Annexe 1

1)- Spectre UV de  $\beta$ -CD dans l'eau.



2)- Spectre UV de la vitamine E dans l'eau.



## **Annexe 2**

---

### **1)- Courbe d'étalonnage.**

<b>Absorbance</b>	0,393	0,159	0,084	0,049	0,04
<b>Concentrations (mg/ml)</b>	0,2660	0,1064	0,0532	0,0333	0,0266

### **2)- Courbe d'Higuchi.**

<b>concentration de CD (mmol/ml)</b>	0,002039	0,003285056	0,005424748	0,008118242	0,016274243
<b>concentration de la vitamine E (mmol/ml)</b>	0,000172581	0,000213943	0,000273847	0,000285258	0,000323767

## **Résumé**

Il est connu que la conservation du sperme aviaire présente plusieurs problèmes, afin de pallier à ces dernières, des cryoprotecteurs et diluants sont utilisés.

Parmi ces agents protecteurs, la vitamine E occupe une place de choix compte tenu de son pouvoir antioxydant. Par contre, cette dernière présente une faible solubilité aqueuse ; qui engendre de grands problèmes de formulation.

Dans l'optique de régler ce problème, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'une molécule amphiphile : la cyclodextrine.

Nous avons utilisé plusieurs méthodes afin de préparer les complexes :

vitamine E/cyclodextrine; mélange physique, Kneading, Co-évaporation et lyophilisation.

Par suite, nous avons caractérisé ces derniers par : IR, DRX, MEB et ATG. Ces tests nous ont permis de sélectionner les complexes formés par Kneading et lyophilisation comme étant les meilleurs.

En dernier, nous avons étudié l'influence des deux complexes (Kneading et lyophilisation) sur la congélation du sperme aviaire, ainsi, nous avons obtenu une augmentation marquée de la mobilité du sperme avec les deux complexes par rapport au témoin (sperme congelé seul).

## **Abstract**

It is known that the conservation of avian sperm presents several problems, in order to mitigate these last, cryoprotectors and thinners are used.

Among these protective agents, the vitamin E occupies a choice place taking into account its antioxidant capacity. On the other hand, the latter has a low aqueous solubility; that generates major problems of formulation.

As solution to solve this problem, we were interested in the use of an amphiphilic molecule: cyclodextrin.

We used several methods in order to prepare the complexes: vitamin E/cyclodextrin; physical mixture, Kneading, Co-evaporation and freeze-drying.

Consequently we characterized the latter by: IR, DRX, MEB and TGA. These tests enabled us to select the complexes formed by Kneading and freeze-drying as being the best.

Finally, we studied the influence of the two complexes (Kneading and freeze-drying) on the congelation of avian sperm, thus, we obtained a marked increase in the mobility of sperm with the two complexes compared to blank (sperm frozen only).