

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

Faculté des Sciences
Département de Chimie



Domaine : **Science de la matière**

Filière : **Chimie**

Spécialité : **Chimie Pharmaceutique**

Mémoire de Master

Thème

**Etude et optimisation de l'effet synergique de la vitamine C
et de la vitamine E (encapsulée ou seule) sur la
conservation spermatique**

Présenté par :

OUKACI Zahia

BELAID Sadia

Soutenu publiquement, le 13 / 07 / 2022, *devant le Jury composé de :*

MECHOUET Mourad	MCA	UMMTO	Président
BELMAHDI Lila	MAA	UMMTO	Examinatrice
TAOUZINET Lamia	MRB	UAMB	Promotrice
AYATI Fadila	MCA	UMMTO	Co-Promotrice
FATMI Sofiane	MCA	UAMB	Invité

Session 2021 / 2022

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

Nous tenons tous d'abord à remercier Monsieur **Sofiane FATMI** d'avoir accepté de nous encadrer. Nous avons particulièrement apprécié votre confiance et votre patience et les moyens que vous avez mis à notre disposition pendant tout le temps passé au laboratoire.

Nous profonds remerciements à Madame **Lamia TAOUZINET** d'avoir accepté de nous guider tout au long de ce travail, pour tous les moyens mise à notre disposition, pour ses précieux conseils et surtout pour son soutien qui nous a permis d'accomplir ce travail. Ainsi votre dynamisme communicatif, bonne humeur qui nous a toujours apaisés et surtout pour votre patience.

Nous devons tout le respect à Madame **Fadila AYATI**, veuillez trouver madame en ces quelques mots nous sincères et vifs remerciements pour toutes vos conseils et orientations. Nous tenons tout particulièrement à exprimer nous sentiments de gratitude pour votre gentillesse et votre disponibilité, votre compétence, votre claire voyance qui nous a beaucoup appris.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury Mme **Lila BELMEHDI** et Mr **MECHOUET Mourad** pour l'honneur et le plaisir que nous accordent en acceptant de lire et d'évaluer ce travail et de faire partie de notre jury.

Un grand remerciement à Mme. **AMRANI** pour son aide, orientation et soutiens.

Nous remercions infiniment, Mr. **IGUEROUDA** pour nous avoir accordé l'opportunité de travailler dans son laboratoire et un grand remerciement à toute l'équipe qui travaille dans ce laboratoire.

Nous exprimons notre gratitude à toutes les personnes qui nous a aidés de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce travail :

-A mes très chers parents, que dieu vous protège, qui y ont toujours étaient à mes côté.

Pour tous les nobles sacrifices que vous avez imposé pour assurer mon bien être et mon éducation. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous.

-A mon frère

-A ma tante Fariza

-A ma famille

-A mon fiancer Micipsa

-A mes amis

-A mon binôme

Zahia

Dédicace :

A tous ceux que j'aime.

Sadi

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

1 Solubilité	3
1.1 Définition de la solubilité.....	3
1.2 Paramètres influençant la solubilité.....	3
1.3 Importance de la solubilité et impact d'une faible solubilité.....	3
1.4 Techniques pour améliorer la solubilité :.....	3
2 Systèmes de solubilisation et de vectorisation	4
2.1 Cyclodextrines	4
2.1.1 Définition et structure.....	4
2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques	5
2.1.3 Cyclodextrines Modifiées.....	5
2.1.4 Avantages des CDs.....	6
2.1.5 Formation Inclusion – Complexation (en solution)	6
3 Caractérisations	7
3.1 Spectroscopie infrarouge(IR).....	7
3.2 Microscopie électronique à balayage(MEB)	7
3.3 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	7
4 Cryoconservation	8
4.1 Cryoconservation spermatiques.....	8
4.2 Stress oxydatif	8
4.3 Intérêt de la cryoconservation spermatique	8
5 Cryoprotecteurs	9
5.1 Vitamine C	9
5.1.1 Définition et structure.....	9
5.1.2 Caractéristiques physico-chimiques	10
5.1.3 Rôles et importance de la vitamine C	10
5.2 Vitamine E.....	11
5.2.1 Définition et structure.....	11
5.2.2 Caractéristiques physico-chimiques	11
5.2.3 Relation avec l'acide Ascorbique (effet synergique).....	12
6 Optimisation.....	13
6.1 Méthodologie des plans d'expériences.....	13
6.2 Modélisation par les plans d'expériences	13
6.3 Démarche méthodologique à suivre :	14

Chapitre 2 : partie pratique

1	Matériel	15
2	Méthodes	17
2.1	Préparation des complexes	17
2.1.1	Mode opératoire	17
2.1.2	Caractérisation des complexes d'inclusion	18
2.1.2.1	Spectroscopie Infrarouge	18
2.1.2.2	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	18
3	Optimisation	19
3.1	Objectif.....	19
3.2	Facteurs étudiés et leur domaine :	19
3.3	Choix des réponses :	19
3.4	Matrice d'expérience	19
4	Expérimentation	20
4.1	Test de dissolution.....	20
4.2	Test de motilité est de dissolution	22
4.3	Cinétique de dissolution et modélisation de l'optimum.....	24
4.3.1	Cinétique de dissolution.....	24
4.3.2	Modélisation	24

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1	Caractérisation des complexes	28
1.1	Résultats de l'infrarouge (IR) :	28
1.1.1	Observation	30
1.1.2	Interprétation.....	31
1.2	Résultats de la morphologie (MEB)	31
2	Méthodologie des plans d'expériences	32
2.1	Observation	33
2.2	Interprétation	33
2.3	Analyse des effets des facteurs.....	34
2.3.1	Observation.....	34
2.3.2	Interprétation	35
2.4	Influence des effets des facteurs.....	35
2.4.1	Observation.....	36
2.4.2	Interprétation	36
2.5	Détermination de l'optimum.....	37
2.5.1	Observation.....	37
2.5.2	Interprétation	37
2.6	Validation de l'optimum	38

3	Caractérisation de la solution optimale	38
	3.1 Cinétique de libération.....	38
4	Modélisation.....	39
	4.1 Interprétation.....	39
5	Motilité spermatique	40
	5.1 Observation	42
	5.2 Interprétation.....	43
	Conclusion et perspectives	45

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADMET** : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et toxicité
- CASA**: Computer-Aided sperm Analysis
- CDs**: Cyclodextrines
- ERO** : Production d'espèces réactive à l'oxygène
- ESEM** : Microscope électronique à balayage Environnemental
- HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- IFTR** : Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier
- IR** : Infrarouge
- LPO** : Une peroxydation lipidique
- MEB** : Microscopie électronique à balayage
- PH** : Potentiel d'hydrogène
- PM- β -CD** : Per méthyl-bêta-cyclodextrines
- PM- β -CD/Vit E** : Complexes Per méthyl-bêta-cyclodextrines et la vitamine E
- ROS** : Espèces réactives de l'oxygène
- VAP** : Average path velocity (vitesse moyenne)
- VCL** : Curvilinear velocity (vitesse curviligne)
- Vit C** : Vitamine C
- Vit E** : Vitamine E
- VSL** : Straight linear velocity (vitesse linéaire)
- β -CD** : Beta-cyclodextrines
- β -CD/Vit E** : Complexes bêta-cyclodextrines et la vitamine E

Liste des figures

Figure 1. 1: Structure simplifiée montrant la forme tronconique (forme spatiale) des cyclodextrines.....	5
Figure 1. 2 : Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs.....	7
Figure 1. 3: structure chimique de la vitamine C	9
Figure 1. 4: Représentation des formes limites de l'acide ascorbique.....	10
Figure 1. 5: Structure chimique de la vitamine E.....	11
Figure 1. 6: Régénération de la vitamine E.....	12
Figure 2. 1: Montage du rot à vapeur	17
Figure 2. 2: Les complexes obtenus après Co évaporation	18
Figure 2. 3: Les prélèvements effectués à des temps différents	21
Figure 2. 4: La récolte du sperme épидидymaire.....	23
Figure 3. 1: Spectre infrarouge de la vitamine E.....	28
Figure 3. 2: Spectre infrarouge de la PM- β -CD	29
Figure 3. 3: Spectre infrarouge du complexe PM-B-CD/Vit E.....	30
Figure 3. 4: Spectre Infrarouge de la Vitamine E, PM- β -CD, et de leur complexe.....	30
Figure 3. 5: Photographie de microscope électronique à balayage de (a) PM- β -CD (250 \times), (b) PM- β -CD(100 \times), (c) PM- β -CD (50 \times), (d) complexe PM- β -CD/Vit E (500 \times), (e) complexe PM- β -CD/Vit E (250 \times)	32
Figure 3. 6: Facteurs statistique obtenus.	34
Figure 3. 7: Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la solubilité.....	35
Figure 3. 8 : Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la motilité	36
Figure 3. 9 : Cinétique de libération de la PM-B-CD/vit E et vitamine E seul.....	38
Figure 3. 10: Effets des différents traitements sur les paramètres de mobilité spermatiques .	42

Liste des tableaux

Tableau 1. 1 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l' α , β et γ - cyclodextrine ...	5
Tableau 2. 1: L'ensemble du matériel et produits utilisés.	15
Tableau 2. 2: Fixation des facteurs par le logiciel MODDE 6.0.....	19
Tableau 2. 3: Fixation des réponses par le logiciel MODDE 6.0	19
Tableau 2. 4: Plan d'expérience obtenu par le logiciel MODDE 6.0.....	20
Tableau 2. 5: Les conditions opératoires de la HPLC.....	22
Tableau 3. 1: Bande de vibration caractéristique de la vitamine E.....	28
Tableau 3. 2 : Bandes de vibration caractéristique de la PM- β -CD.....	29
Tableau 3. 3: Matrice d'essai obtenu	33
Tableau 3. 4: Valeurs numériques des caractéristiques obtenues de taux de solubilité et de motilité	34
Tableau 3. 5: Détermination de l'optimum	37
Tableau 3. 6: Les valeurs optimales du taux de solubilité et de motilité	38
Tableau 3. 7: Modélisation des données de dissolution.....	39
Tableau 3.8 : Résultats obtenus par CASA.....	41

Introduction générale

Au-delà de la vision moléculaire, où les atomes se combinent pour former des structures déjà complexes, il existe un autre domaine d'association qui implique cette fois des molécules pour donner des assemblages aux multiples applications. Ce champ d'études, s'appelle la nano-encapsulation, il implique des liaisons faibles (forces électrostatiques, liaisons hydrogène, forces de Van der Waals) entre les molécules, et est entre autres, utile pour protéger les antioxydants de la dégradation par contact direct avec les facteurs externes tels que la lumière, l'oxygène, les produits chimiques, la chaleur et la pression. La nanotechnologie sert aussi à augmenter la biodisponibilité dans les membranes et fluides biologiques tels que le sperme. De même, diverses propriétés physico-chimiques des médicaments peuvent être modifiées par la complexation (encapsulation par les cyclodextrines), en particulier la solubilité des médicaments dans les milieux biologiques aqueux (L. Taouzinet *et al.*, 2021).

La membrane plasmique des spermatozoïdes est très sensible, cette dernière subit des modifications chimiques dévastatrices qui minimisent l'espérance de vie des spermatozoïdes (C. Labbé *et al.*, 2003). Dans le but de remédier aux différents problèmes liés à la cryoconservation, de nombreux chercheurs travaillent sur des agents permettant la protection du sperme lors du processus de réfrigération et/ou congélation, ces agents sont appelés cryoprotecteurs. En effet, de nombreuses études ont démontré l'effet protecteur des antioxydants en général et des vitamines en particulier tels que la vitamine E et la vitamine C lors de la cryoconservation (L. Taouzinet *et al.*, 2021; P. Therond *et al.*, 1996).

Les vitamines C et E fonctionnent respectivement comme des antioxydants protégeant les lipides, les protéines et les membranes de l'oxydation. Cela dit, la faible solubilité de la vitamine E limite son effet dans les liquides biologiques, ainsi pour pallier à cette contrainte, nombreuses études conseillent l'encapsulation par les cyclodextrines (CDs) (S. Fatmi *et al.*, 2021; L. Taouzinet *et al.*, 2021).

Depuis leur découverte en 1891 par Villiers, les cyclodextrines (CDs) ont reçu une grande attention de la communauté scientifique. Obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon, les CDs sont des oligosaccharides cycliques qui possèdent au sein de leur structure une cavité hydrophobe. Celle-ci leur permet de former des complexes d'inclusion avec la vitamine E.

L'objectif du présent travail est d'étudier à l'aide de la méthodologie des plans

d'expérience l'impact d'un système innovant de vectorisation de principe actif hydrophobe (vitamine E) seul ou en association avec la vitamine C sur la cryoconservation spermatique.

Ce présent mémoire comporte essentiellement trois chapitres. Le premier présente quelques notions essentielles à la compréhension de la thématique, à savoir, les paramètres de solubilité, de biodisponibilité et la stratégie adoptée pour les améliorer (complexation aux cyclodextrines), par la suite, il a été question de conservation spermatique et des deux vitamines C et E. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour préparer et caractériser les complexes CDs/Vit E. La méthodologie des plans d'expériences a été utilisée pour mettre en évidence l'effet de synergie entre les deux vitamines sur la conservation spermatique. Les résultats trouvés suivis de leurs discussions font l'objet du dernier chapitre. La conclusion du mémoire regroupe l'ensemble des résultats obtenus ainsi que quelques perspectives pour poursuivre cette étude.

Chapitre 1 :
Synthèse
bibliographique

1 Solubilité

1.1 Définition de la solubilité

Dans le domaine pharmaceutique, la solubilité est décrite comme une force motrice de l'absorption. Une solubilité acceptable dans le liquide intestinal est une condition préalable pour atteindre des concentrations sanguines de médicament suffisamment élevées pour obtenir un effet thérapeutique lorsque des effets systémiques sont justifiés. (Bergstrom et al, 2016)

1.2 Paramètres influençant la solubilité

Une bonne solubilité est caractérisée par plusieurs paramètres :

- La polarité
- La température
- La pression
- Le pH
- Les sels ...

1.3 Importance de la solubilité et impact d'une faible solubilité

La faible solubilité des médicaments est l'un des principaux obstacles dans le Processus de découverte et de développement de médicaments. Elle a été récemment identifiée comme étant fortement liée au choix de la cible explorée. La solubilité d'un composé affecte tous les profils à savoir, profil d'Absorption, de Distribution, de Métabolisme, d'Excrétion et de Toxicité (ADMET). Ce n'est que lorsque les propriétés ADMET d'un composé médicamenteux sont d'une qualité suffisamment élevée et que la cible a été validée que le composé peut être développé en un nouveau médicament (Cook et al., 2014; Morgan et al.,2012).

Donc l'efficacité thérapeutique d'un médicament dépend de la biodisponibilité et en fin de compte de la solubilité de molécules de médicament. Cette dernière est un des paramètres important pour atteindre la concentration désirée de médicament dans la circulation systémique pour que la réponse pharmacologique soit localisée.

1.4 Techniques pour améliorer la solubilité :

- Réduction de la taille des particules

- Dispersion solide
- Complexation cyclodextrines
- Solubilisation par des tensioactifs
- Changement de pH
- Technologies de polymères fonctionnels
- CO-solvant ...

2 Systèmes de solubilisation et de vectorisation

Afin d'améliorer les caractéristiques des principes actifs, telle que la solubilité, la biodisponibilité et les effets thérapeutiques du médicament, il est fait appel à l'encapsulation par des cyclodextrines (CDs) $(C_6H_{10}O_5)_n$.

2.1 Cyclodextrines

Inclusion complexation : ceux-ci sont formés par l'insertion de la molécule non polaire ou la région non polaire d'une molécule dans la cavité d'une autre molécule ou d'un groupe de molécules. Les molécules d'accueil les plus couramment utilisés sont les cyclodextrines (CDs) $(C_6H_{10}O_5)_n$.

2.1.1 Définition et structure

Les cyclodextrines $(C_6H_{10}O_5)_n$ sont des molécules cycliques naturelles constituées de sous-unités glucopyranose. Ces produits naturels provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon, ont été découverts en 1891 par Villiers. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose de structures chimiques $(C_6H_{10}O_5)_6$, $(C_6H_{10}O_5)_7$ et $(C_6H_{10}O_5)_8$ respectivement, en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -1,4. Elles sont dénommées respectivement α -, β - et γ -cyclodextrine. Les groupements hydroxyle (hydrophile) sont situés vers l'extérieur et les hydrogènes (hydrophobe) sont orientés vers l'intérieur de la cavité (figure 1) donnant ainsi à la cyclodextrine la propriété d'être soluble dans l'eau et de pouvoir contenir des molécules hydrophobes.

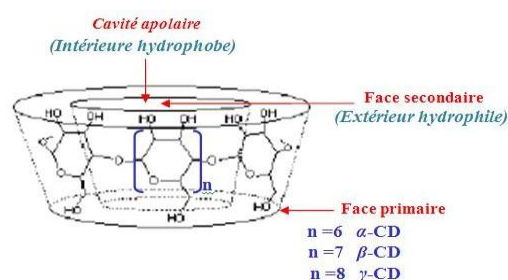


Figure1.1 : Structure simplifiée montrant la forme tronconique (forme spatiale) des cyclodextrines

2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les trois principales cyclodextrines (S. Xing, 2009) natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau suivant :

Tableau 1.1 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'α, β et γ- cyclodextrine (J. Szejtli,1998 ; D. Diaz, C.M. Escobar Llanos, M.J.B, Bernad ,1999 ; P. Mura, F.Maestrelli, M.Cirri, 2003)

Caractéristiques	α-CD	β-CD	γ-CD
Nombre d'unités répétitives de glucose	6	7	8
Formule brute	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Masse moléculaire (kg.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Diamètre interne de la cavité (Å)	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3
Diamètre externe de la cavité (Å)	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4
longueur de la cavité (Å)	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Volume approximatif de la cavité (Å ³)	174	262	427
Solubilité (eau, 25°C), mol.L ⁻¹	0.1211	0.0163	0.168
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6-8	11-12	13-17

2.1.3 Cyclodextrines Modifiées

Pour améliorer les propriétés des cyclodextrines, de nombreux dérivés d'intérêt pharmaceutique ont été modifiées : Hydroxypropyl-beta-CD (HP-b-CD), Per methyl-beta-CD (PM-b-CD), Sulfobutyléther beta-CD(SBE-b-CD), Hydroxypropyl-gamma-CD (HP-g-CD).

Parmi les objectifs visés lors de ces modifications, on peut citer (S. Tian, P.Forgo, 1996):

- L'amélioration de la solubilité de la CD (en particulier celle de la β-CD),

- L'amélioration de la capacité de complexation,
- La fixation d'un groupe spécifique (pour la modélisation enzymatique),
- La formation de polymères de CDs... etc.

2.1.4 Avantages des CDs

- Biocompatibilité, biodégradabilité et non toxicité
- Non volatilité et non inflammabilité
- Faible activité pharmacologique
- Augmentation de la stabilité chimique, physique et thermique de la molécule encapsulée
- Augmentation de la solubilité et la biodisponibilité aqueuse des molécules hydrophobes encapsulée
- Vitesse de libération contrôlée des molécules encapsulées. (Szjetli,1998 ; Nuchuchua et al, 2009)

2.1.5 Formation Inclusion – Complexation (en solution)

La formation du complexe peut se décomposer en cinq étapes :

- L'approche du substrat et l'expulsion des molécules d'eau hors de la cavité de la CD (voir la figure 2).
- La libération de la molécule invitée de ses molécules d'eau, appelée aussi désolvatation ;
- La présentation de la molécule invitée dans la cavité libre de la CD et stabilisation du complexe par des interactions faibles ;
- Le réarrangement des molécules d'eau expulsées ;

- La restauration de la structure d'eau autour de la partie du substrat qui reste en contact avec le solvant. (M.Charoenchaitrakool, Dehghani. N.R. Foster, 2002 ; R.C.Doijad, M. M. Kanakal, F.V. Manvi, 2007).

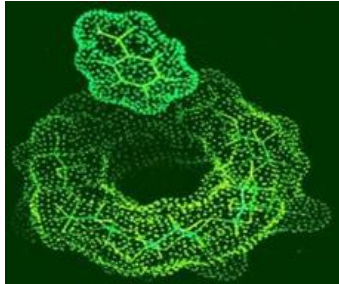


Figure 1.2 : Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs.

Cette nouvelle technologie d'encapsulation est très utilisée pour atteindre plusieurs objectifs et remédier à plusieurs problèmes rencontrés par les galénistes, dans notre étude notre objectif est de faire face aux phénomènes du stress oxydant et du choc thermique qui se manifeste lors de la cryoconservation des cellules spermatique.

3 Caractérisations

3.1 Spectroscopie infrarouge(IR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection de certaines vibrations de déterminer les fonctions chimiques présentes dans le matériau. (J.F. LAMBERT et M.C.MAUREL.,2016).

3.2 Microscopie électronique à balayage(MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons- matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface.

3.3 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique chromatographique utilisée afin d'identifier, de quantifier, de séparer et de purifier les composés individuels présents dans un mélange (Jena A Kumar., 2012)

Qui est considéré comme l'un des plus importants tests de contrôle de la qualité effectués sur les formes galéniques pharmaceutiques. Il s'agit d'un outil qualitatif qui fournit des informations précieuses sur la disponibilité du médicament (pharmacopée européenne.,2004)

4 Cryoconservation

4.1 Cryoconservation spermatis

La cryoconservation du sperme est une méthode efficace pour préserver la fertilité masculine chez les humains, les animaux domestiques et les animaux de laboratoire. La cryoconservation a également été utilisée pour les hommes qui envisagent de subir une chimiothérapie et une radiothérapie pour préserver leur fertilité. Cependant, divers facteurs tels que la formation de cristaux de glace, le stress osmotique et le stress oxydatif influencent négativement la motilité et la viabilité des spermatozoïdes tout au long du processus de congélation-décongélation, ce qui entraîne par conséquent une réduction des taux de fécondation. (M. Hezavehei, et al., 2018).

4.2 Stress oxydatif

Un déséquilibre de la balance entre la surproduction des molécules oxydantes et les antioxydants est un phénomène appelé **stress oxydant** (Pincemail et al.,2002) qui se présente à la production des substances chimiques instables et hautement réactives dites **radicaux libres** qui ont un électron non apparié à la recherche constante d'électrons afin de se stabiliser et ces donneurs d'électron deviennent à leur tour instables et donc reconverties en radicaux libres (Burton et Jauniaux, 2010).

Le stress oxydatif est souvent lié à plusieurs facteurs qui peuvent être soit exogènes ou endogènes et par la suite ce phénomène conduit à beaucoup d'autres pathologies à savoir l'hypertension, le diabète, maladies cardiovasculaires....

4.3 Intérêt de la cryoconservation spermatis

La cryoconservation vise à :

- Maintenir la viabilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes par un processus séquentiel de réduction de la température (Woods EJ, et al., 2004), de déshydratation de la cellule, de congélation et de stockage ;
- Une faible intensité de stress oxydatif (qui se produit dans le sperme est associée à une augmentation du taux d'oxydation des composants cellulaires et production excessive de ROS (Aitken RJ, et al., 1996 ; Alvarez JG, Storey BT., 1982)

- Améliorer une peroxydation lipidique (LPO) et un déséquilibre tioxydant, provoqué par la survenue d'un stress oxydatif (Aitken RJ, et al., 1996 ; Thuwanut P, et al., 2009) ;
- Obtenir des taux de fertilité similaires avec du sperme cryoconservé qu'avec du sperme frais...

5 Cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs, sont des composés organiques qui pénètrent dans la cellule pour la protéger dans son milieu pendant la cryoconservation, (Guingnot, 2005). Ces substances ont comme rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets nocifs des cristaux d'eau qui altèrent la membrane cytoplasmique et les organites intra cellulaires. Le choix de type de cryoprotecteur est très important pour avoir une bonne conservation des spermatozoïdes. Et pour lutter contre le stress oxydant on a recours à des antioxydants. Les antioxydants les plus utilisés sont la vitamine E et la vitamine C, ils sont classés dans les antioxydants non enzymatiques exogènes.

5.1 Vitamine C

5.1.1 Définition et structure

1.1 L'acide ascorbique ou vitamine C est une vitamine hydrosoluble ayant des propriétés antioxydantes, classé dans le groupe des antioxydants primaires ou naturels (Hamid AA et al., 2010).

De formule chimique générale $C_6H_8O_6$, la vitamine C appartient aux groupes des sucres à 6 atomes et est un dérivé du D-Glucose. Elle est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonction énediol et de deux fonctions alcools : l'une primaire et l'autre secondaire comme montre la figure 3.

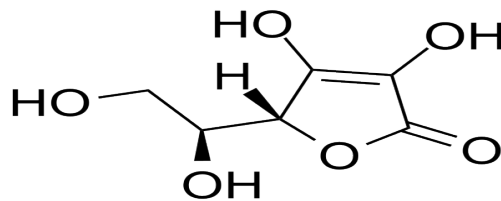


Figure 1.3 : Structure chimique de la vitamine C

5.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique sont liées à sa structure. C'est un composé cristallisé, une poudre blanche, inodore et de saveur acide. Il est stable à l'état anhydre (sous forme réduite), à l'abri de l'humidité, de la lumière et s'assombrit progressivement lorsqu'il est exposé à celle-ci. La vitamine C est très hydrosoluble, peu soluble dans l'alcool et les polyols et insoluble dans l'éther et le chloroforme (Munnich et al., 1987). L'AA est un réducteur très puissant et possède de ce fait un pouvoir antioxydant, qui est au centre de son activité biochimique. (Munnich et al. 1987). La réaction entre la forme réduite et oxydée de l'acide ascorbique est réversible selon le mécanisme suivant :

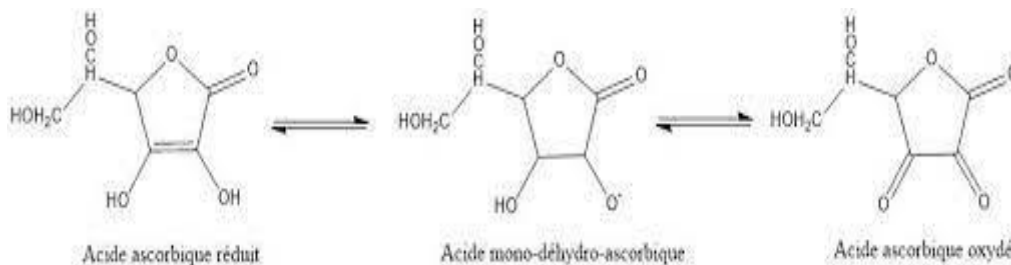


Figure 1.4 : Représentation des formes limites de l'acide ascorbique.

5.1.3 Rôles et importance de la vitamine C

- ✓ L'activité antioxydante : Elle joue un rôle important dans le maintien d'un collagène mature et normal (Saokar Telang, 2013 ; Boyera et al., 1998) ;
- ✓ Elle est essentielle pour stimuler le système immunitaire de l'organisme,
- ✓ Elle est capable de prévenir le cancer à un certain nombre de sites y compris le cancer de la peau, la dysplasie cervicale de l'estomac, des poumons, du côlon, de la prostate et du sein. (Head, 1998)
- ✓ Elle a été utilisée dans la prise en charge de l'infertilité masculine sur des bases empiriques, en particulier en présence d'infections séminales non spécifiques. La supplémentation en vitamine C chez l'homme peut améliorer la qualité du sperme et augmente également les taux de progestérone chez les femmes infertiles présentant un défaut de phase lutéale (Chambial et al., 2013).

5.2 Vitamine E

Plus de 60 ans après sa découverte, la vitamine E reste la moins connue des vitamines liposolubles et fait toujours l'objet de nombreuses recherches et publications en biochimie, pharmacologie, épidémiologie, en clinique et en nutrition. Bien que le rôle antioxydant, piègeur de radicaux libres de l' α -tocophérol soit reconnu par tous à l'heure actuelle, il ne suffit pas pour expliquer l'ensemble des effets de la vitamine E sur les fonctions biologiques (Nadine BusiSzmrszik, 1993)

5.2.1 Définition et structure

La vitamine E est une vitamine liposoluble présente en grande quantité dans les huiles végétales (l'huile de palme, d'olive et de tournesol). La vitamine E est en réalité formée de huit composés chimiques différents regroupés en deux sous-ensembles en fonction de la présence de groupements de substitution et de doubles liaisons. Nous trouvons donc le sous-ensemble des tocopherols (α -, β -, γ -, ou δ -tocopherol) et des tocotrienols (α -, β -, γ -, ou δ -tocotrienol). Les deux types possèdent la structure du 6-chromanol et une chaîne latérale de type phytol mais les triénols ont un degré d'insaturation dans la chaîne avec des doubles liaisons en position 3', 7' et 11'. On différencie plusieurs tocols et triénols selon la présence ou l'absence de groupements méthyle en position C-5, C-7 et C-8 sur le noyau chromane.

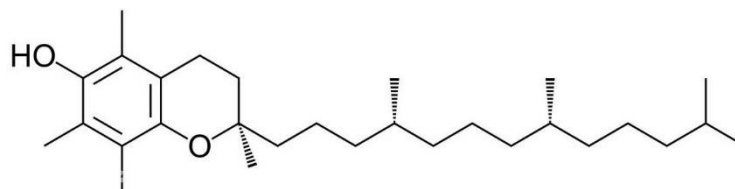


Figure 1.5 : Structure chimique de la vitamine E

5.2.2 Caractéristiques physico-chimiques

- ✓ Se présente sous la forme d'un liquide huileux légèrement visqueux, jaune pâle,
- ✓ Pratiquement insoluble dans l'eau,
- ✓ Soluble dans les huiles, les graisses, l'acétone, l'alcool, le chloroforme, l'éther et les autres solvants des graisses,

- ✓ Stable à la chaleur
- ✓ Lentement oxydée par l'oxygène atmosphérique, rapidement par les sels ferriques et d'argent,
- ✓ Se dégrade rapidement par une exposition à la lumière en prenant une coloration brune,

5.2.3 Relation avec l'acide Ascorbique (effet synergique)

Les effets vitaminiques ne peuvent être considérés isolément, en effet elles influent l'une sur l'autre de différentes manières par le biais des interactions. Lorsque le résultat de cette interaction est supérieur à celle de chaque vitamine seule on parle de l'effet de synergie (Guilland JC, 2011)

Cet effet de synergie n'est plus à démontrer pour la vitamine C et la vitamine E, le radical tocophéroxyl serait réduit par l'acide ascorbique ce qui permettrait la régénération de la vitamine E (voir la figure 6). En effet, l'inhibition coopérative des oxydations par ces deux composés a été observée. La vitamine C n'est pas lipophile comme la vitamine E et ne peut capter les radicaux libres à l'intérieur de la membrane lipidique (d'où le rôle primordial de l' α -tocophérol comme antioxydant majeur de la peroxydation lipidique). L'interaction entre l'acide ascorbique et l' α -tocophérol se ferait à la surface des membranes. Le radical peroxyde de la vitamine C serait réduit à son tour par voie enzymatique (Nadine BusiSzmrszik, 1993).

En bref l'administration de vitamine C et la vitamine E contrecarre plus efficacement l'action délétère du stress oxydatif.

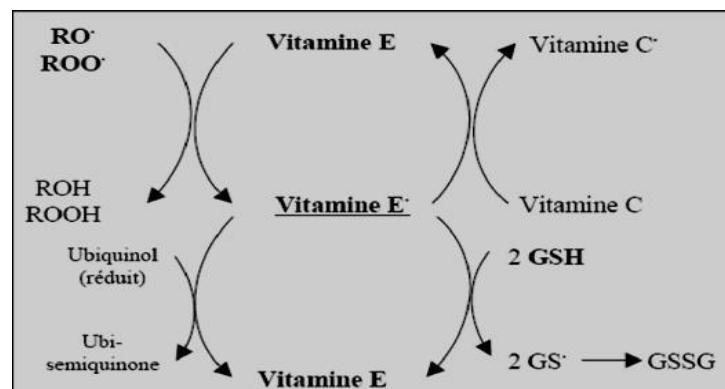


Figure 1.6 : Régénération de la vitamine E (Chan, 1991)

6 Optimisation

L'optimisation consiste à atteindre les spécifications imposées et ce, de façon optimale, il peut être utilisé pour prédire les réponses dans le domaine d'étude ou pour trouver les conditions expérimentales qui conduisent à la réponse optimale. L'optimisation s'intéresse à analyser et modéliser des contraintes d'un problème donné pour trouver une fonction à optimiser ; quand un modèle mathématique est construit pour décrire un phénomène, il peut être aussi utilisé pour prédire les réponses et pour trouver les conditions expérimentales qui conduisent à la réponse optimale. (I. Yahiaoui.,2014)

6.1 Méthodologie des plans d'expériences

La méthodologie de la recherche expérimentale ou « plans d'expériences » regroupe les méthodes qui permettent de structurer le recueil d'informations pour évaluer les liens entre les variables à expliquer Y, appelée réponses, et des variables explicatives X appelées facteurs. Elle est également préconisée afin d'optimiser l'organisation des essais. Cette organisation permet d'obtenir le maximum d'informations avec le minimum d'essais. Dans notre cas on a opté pour le modèle D-optimal.

D-optimal

Dans les méthodes traditionnelles de conception expérimentale comme le plan factoriel complet, le nombre d'essai est élevé et peut avoir besoin de grandes quantités de ressources et de temps, de plus certaines combinaisons de niveaux de facteurs peuvent être trop coûteuse ou impossibles à réaliser. La conception D-optimal est l'une des approches qui a été développée pour répondre aux limites des conceptions traditionnelles. C'est une conception générée par ordinateur qui contient le meilleur sous ensemble de toutes les expériences possibles, il optimise la performance du processus et minimise les coûts, ces conceptions peuvent traiter des facteurs numérique et catégoriques.

6.2 Modélisation par les plans d'expériences

La modélisation est l'objet même des plans d'expériences. Elle permet une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver l'équation ou la fonction qui décrit au mieux les variations du phénomène étudié en fonction de ces facteurs. (I. Yahiaoui.,2014/2015)

6.3 Démarche méthodologique à suivre :

- Définition des objectifs et critères
- Définition des facteurs à étudier et du domaine expérimental
- Choisir les réponses
- Construction du plan d'expériences (matrice d'expérience) avec le modèle qui nous donne le plus petits nombre d'expériences.
- Expérimentation
- Analyse des résultats
- Conduite éventuelle d'essais supplémentaires
- Validation des résultats
- Conclusion de l'étude.

Chapitre 2 :

Partie Pratique

Résumé

La partie pratique de notre mémoire consiste à préparer, par la méthode de Co-évaporation, deux complexes :

- Le complexe de la vitamine E avec β -CD,
- Le complexe de la vitamine E avec PM- β -CD

Le résidu obtenu est utilisé pour la conservation du sperme.

Au préalable, l'inclusion de la vitamine E dans les CDs est caractérisée par spectroscopie infra rouge(IR) et microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour déterminer les concentrations adéquates en vitamine C et en complexe permettant d'assurer une meilleure conservation spermatique, la méthodologie des plans d'expériences, plan de surface D-optimal, a été utilisée. L'influence de la vitamine C et la vitamine E complexée aux cyclodextrines (β -CD ou PM- β -CD) sur la conservation spermatique a été mise en évidence et a été quantifiée.

1 Matériel

L'ensemble du matériel et produit utilisée est présenté dans le tableau 2.1

Tableau 2. 1: Ensemble du matériel et produits utilisés.

Etapes	Equipements	Verrerie	Produits	Outils logistiques
Préparation des complexes	- Rot à vapeur - Balance analytique Agitateur	- Bêchers - Eprouvette gradué - Spatules - Verre de montre - Ballon 250mL - Barreau magnétiques	- Vitamine E (C ₂₉ H ₅₀ O ₂) -Per methyl-beta-cyclodextrines (PM- β -CD) -Beta cyclodextrines β -CD -Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	
Optimisation				Logiciel MODDE 6.0
Solution tampon (solution)	-PH mètre.	-Fiole jaugée 1L -Bêchers -Eprouvette 500ml et 250ml	-Hydroxyde de sodium (NaOH à 0.1M)	

Chapitre 2 : Partie pratique

phosphate PH=7.4)			-Phosphate mono potassique (KH ₂ PO ₄ à 0.2M) -L'eau distillé	
Cinétique de libération	-Appareil HPLC -Agitateur -Balance analytique	-Béchers -Barreau magnétique -Eprouvette -Verre de montre -Spatule -Seringues (5ml) - Filtres -Micropipette -Vials	-Vitamine C (C ₆ H ₈ O ₆) -complexes préparés (PM- β-CD/vit E) et (β-CD/vit E) -Solution phosphate	
Préparation du <i>tris</i>	-Balance analytique	-verre de montre -spatule -Fiole jaugé 50mL	-fructose - <i>Tris</i> -pénicilline -acide acétique -L'eau distillé	
Teste de motilité (préparations des traitements)	-Balance analytique -Réfrigérateur -Microscope CASA (analyseur de classe de Spermatozoïdes, SCA Microptic, SL, version 3.2.0, Barcelone, Espagne).	-Spatule -Verre de montre -Becher -Micropipette -Tubes à essais -Eppendorfs	-Vitamine C (C ₆ H ₈ O ₆) -complexes préparés (PM- β-CD/vit E) et (β-CD/vit E)	
Caractérisation	-Spectroscopie infra rouge (IR) infrarouge à transformée de Fourier de la marque IRAAffinity-s -HPLC de la marque Thermo, Dionex 3000 -MEB : ESEM (Microscope électronique à balayage Environnemental) de marque Philips Electroscan			

- Les propriétés et la provenance des produits utilisés, sont résumées dans annexe (1).

2 Méthodes

2.1 Préparation des complexes

Pour la préparation des complexes nous avons utilisé la méthode de Co-évaporation. Cette méthode est basée sur la préparation d'un mélange de cyclodextrines et de principe actif (vitamine E) destinée à être encapsulé avec l'ajout d'un solvant approprié. Puis éliminé le solvant par évaporation et condensation dans un ballon d'évaporation par rotation sous-vide afin de récupérer un complexe d'inclusion sous forme d'une poudre sèche.



Figure 2.1: Montage du rot à vapeur

2.1.1 Mode opératoire

Le complexe d'inclusion CD/vit E a été préparé dans un rapport (1 : 1 M) :

- Complexe de la vitamine E avec β -CD

Peser une masse équivalente à 0,27g de vit E et 0,73g de β -CD ;

Dissoudre dans 50mL d'éthanol (95%) et laisser sous agitation pendant 24h ;

- Complexe de la vitamine E avec PM- β -CD

Peser des masses équivalentes à 0,38g de vit E et 1,15g de PM- β -CD ;

Dissoudre dans 50mL d'éthanol (95%) et laisser sous agitation pendant 24h (a été optimiser par L.Taouzinet)

Les solvants des deux préparations ont été évaporés sous vide à 45°C par évaporation rotative. Le résidu obtenu a été conservé dans un dessiccateur jusqu'à son utilisation pour la conservation du sperme. (Taouzinet Let al.,2020)

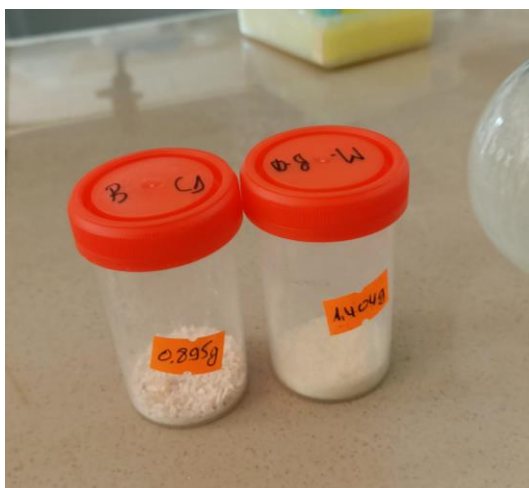


Figure 2.2: Complexes obtenus après Co évaporation

2.1.2 Caractérisation des complexes d'inclusion

2.1.2.1 Spectroscopie Infrarouge :

Elle est utilisée pour étudier l'interaction qui a lieu entre le principe actif et le support en faisant correspondre les pics du spectre. Lors de la formation du complexe d'inclusion les interactions entre le principe actif et la cyclodextrines vont modifier les modes de vibrations. On peut alors observer un déplacement ou une modification de l'intensité des bandes caractéristiques des cyclo dextrines et des groupements fonctionnels de la molécule invité (vitamine E). (V.V. Axel-Castelli.,2008)

2.1.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour pouvoir observer la taille et la morphologie de (PM- β -CD) et du complexe (PM- β -CD/vit E) la microscopie électronique à balayage a été utilisé. Cette méthode est souvent utilisée pour observer le changement de morphologie de la molécule invitée lorsqu'elle est encapsulée dans une cyclodextrines (M.M.AL Omari et all.,2009). Le MEB utilisé est un ESEM (Microscope électronique à balayage Environnemental) de marque Philips Electroscan avec des

grossissements différent 50, 100, 200,500 μm et a une pression de 0.4 torr, une accélération du faisceau d'électron de 20 kV à la température ambiante.

3 Optimisation

3.1 Objectif

Le choix du plan d'expériences à mettre en œuvre dépend du problème posé, dans notre cas il s'agit de trouver les concentrations adéquates en vitamine C et en complexe permettant d'assurer une meilleure conservation spermatique. Pour cela nous avons privilégié un plan de surface de réponse. Afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs est organisée (Hancco V et al.,2011).

3.2 Facteurs étudiés et leur domaine :

- La concentration de la vitamine C (facteur quantitative) nous la varions dans l'intervalle [1 ; 4] mg/ml,
- Le deuxième facteur c'est la nature du complexe CDs/Vit E (facteur qualitative), la masse de la vitamine E reste constante, la masse choisie est 2mg.

Tableau 2. 2: Fixation des facteurs par le logiciel MODDE 6.0

	Name	Abbr.	Units	Type	Use	Settings
1	Concentration Vit C	VitC	mg/ml	Quantitative	Controlled	1 to 4
2	Complexe CD/Vit E	CD		Qualitative	Controlled	PMBCD; BCD

3.3 Choix des réponses :

Concernant les réponses, nous avons optée pour le taux de solubilité (cinétique de libération) et la motilité.

Tableau 2. 3: Fixation des réponses par le logiciel MODDE 6.0

	Name	Abbr.	Units	Transform	MLR Scale
1	Taux de solubilité	Drug		None	None
2	Taux de motilité	moty		None	None

3.4 Matrice d'expérience

La génération de la matrice d'expérience ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été fait par le logiciel MODDE 6.0. Pour le type de placement « D-optimal » des points d'expériences pour lequel l'erreur sur les réponses prédites est le plus faible possible a été choisi.

Après introduction de toutes les données le tableau suivant est généré :

Tableau 2. 4: Plan d'expérience obtenu par le logiciel MODDE 6.0

	1	2	3	4	5	6
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Concentration Vit C	Complexe CD/Vit E
1	1	N1	1	Incl	1	PMBCD
2	2	N2	11	Incl	1	PMBCD
3	3	N3	15	Incl	4	PMBCD
4	4	N4	10	Incl	4	PMBCD
5	5	N5	12	Incl	2, 5	PMBCD
6	6	N6	7	Incl	2, 5	PMBCD
7	7	N7	14	Incl	1	BCD
8	8	N8	8	Incl	1	BCD
9	9	N9	9	Incl	4	BCD
10	10	N10	2	Incl	4	BCD
11	11	N11	4	Incl	2, 5	BCD
12	12	N12	6	Incl	2, 5	BCD
13	13	N13	3	Incl	2, 5	BCD
14	14	N14	13	Incl	2, 5	BCD
15	15	N15	5	Incl	2, 5	BCD

Les réponses obtenues permettent l'identification des facteurs influents, et ainsi trouver la fonction (Y) qui décrit au mieux les variations du phénomène étudié en fonction de ces facteurs.

Toute réponse expérimentale à deux facteurs peut être écrite sous la forme suivante :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Y : la réponse (taux de dissolution, motilité)

x₁x₂ : les niveaux des facteurs 1,2

b_{ij} : sont les coefficients du modèle avec **i** :0,1,2 et **j** :1,2

4 Expérimentation

4.1 Test de dissolution

- Préparation de dilueur (solution tampon phosphate pH = 7,4)

Pour 1L de solution phosphate

- Préparer un volume équivalent de 393,4mL d'hydroxyde de sodium de NaOH à 0,1M,
- Ajouter 250mL de phosphate mono potassique KH₂PO₄ à 0,2M,

- Ajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge (1000 mL)
 - Protocole opératoire
- Peser des masses équivalentes de 2mg en vitamine E dans différents complexes obtenus par Co évaporation avec les différentes masses de la vitamine C obtenus par les plans d'expériences,
- Dissoudre dans 50 mL de tampon phosphate,
- Laisser sous agitation et procéder à plusieurs prélèvements (1mL) pendant 2 heures (0, 5, 10, 15, 20 ,30 ,40 ,50, 60, 120 min)
- Mettre dans des vials. Les prélèvements sont caractérisés par HPLC (Taouzinet L.et al.,2020)

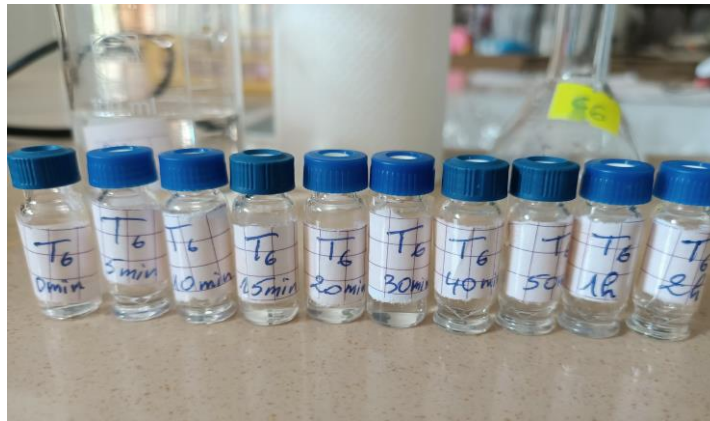


Figure 4.1.1 : Prélèvements effectué à des temps différents

Pour caractériser les prélèvements par HPLC il faut travailler dans des conditions opératoires bien définies selon la composition de nos échantillons. Dans notre cas les conditions sont résumées dans le tableau 2.5

Tableau 2. 5 : Conditions opératoires de la HPLC

6.3.1.1 Mode	6.3.1.2 Isocratique
6.3.1.3 Phase mobile	6.3.1.4 68% méthanol,28% acétonitril,4% eau pure
6.3.1.5 Type de colonne	6.3.1.6 C18
6.3.1.7 Température d'analyse	6.3.1.8 35°C
6.3.1.9 Volume d'injection	6.3.1.10 20µL
La longueur d'onde : 280 nm	6.3.1.11 280 nm
6.3.1.12 Temps de rétention	6.3.1.13 10 min
Débit : 1,5 mL /min	6.3.1.14 1,5 mL /min

4.2 Test de motilité est de dissolution

- **Préparation de milieux de conservation**

- a) **Protocole de préparation du *TRIS*** (hydroxyméthylaminométhane)

Le sperme est dilué dans le milieu *Tris*. Dans 100 mL d'eau distillée on ajoute :

- 1,21 g du Tris pour avoir des solutions tampon ;
- 0,69 g d'acide acétique pour régulariser le pH et l'osmolarité ;
- 0,5 g de fructose comme élément nutritif pour éviter l'épuisement des spermatozoïdes ;
- 0,059 g de pénicilline (antibiotique) destinés à contrôler la flore microbienne, et lutter contre la contamination. (khelouf.A et al.,2018)

- b) **Préparation du contrôle (sans traitement)**

Prendre 100µL du sperme avec 900µL de la solution *tris*

- c) **Préparation des traitements**

- Peser dans des vials des masses équivalentes de la vitamine E seule ou encapsuler avec cyclodextrines,
- Peser des différentes masses de la vitamine C selon les résultats obtenus par les plans d'expériences,
- Ajouter 3 mL de tampon Tris à chaque traitement. (khelouf A et all. ;2018)

- **Récolte du sperme épидидymaire**

- Après abattage de l'animal (bovin), les gonades sont transportées dans une glacière au laboratoire dans les plus courts délais ;
- Après nettoyage de la matrice, on commence par isoler l'épididyme ;
- Le tissu conjonctif est soigneusement séparé de l'épididyme ;
- Récupération du sperme ; les spermatozoïdes récupérés ont été placés dans un eppendorf, En évitant toute perte. (Khelouf.A et al.,2018).

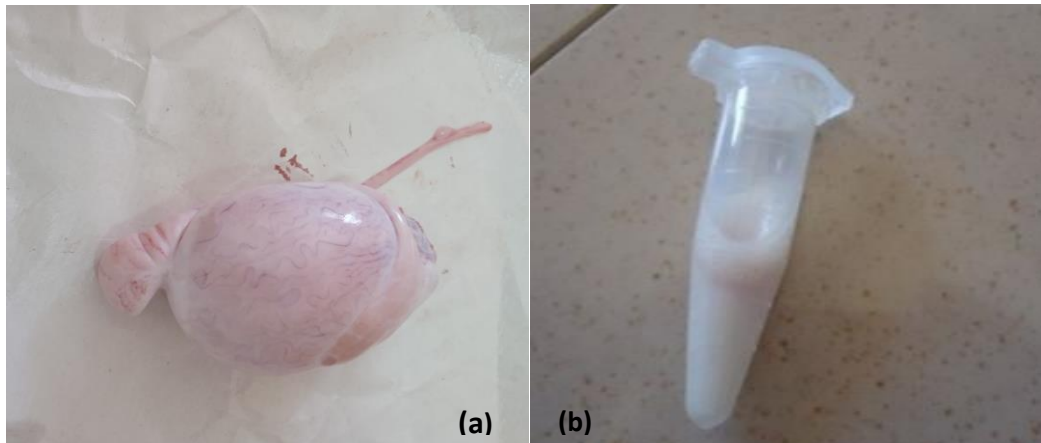


Figure 4.2.1: Récolte du sperme épидидymaire (a)gonade du bovin, (b) sperme récolté

- **Réfrigération du sperme**

- Juste après la récolte de la semence, le volume et la motilité massale sont évalués,
- La semence est diluée afin de déterminer la concentration,

- Ensuite on dilue le sperme dans 900 μL de traitement (c'est à dire 100 μL de semence et 900 μL de Tris) pour avoir une concentration finale de 10^8 spz/mL ;
- L'analyse s'effectue à l'aide du CASA (Computer-Aided sperm Analysis), à des temps différents, 0min, 1h, 24 heures de réfrigération à $T=4^\circ\text{C}$

CASA : L'analyse du sperme assisté par ordinateur (CASA) permet une évaluation du mouvement et de la morphologie des spermatozoïdes de manière plus précise et objective les systèmes CASA peuvent fournir un excellent outil pour comparer objectivement la motilité des spermatozoïdes. La motilité des spermatozoïdes est l'un des indicateurs les plus évalués avant et après cryoconservation vis-à-vis de la qualité et du pouvoir fécondant.

4.3 Cinétique de dissolution et modélisation de l'optimum

4.3.1 Cinétique de dissolution

Le test de dissolution consiste à suivre l'évolution de la quantité de la vitamine E dissoute en fonction du temps ; pour cela, nous avons suivi les étapes suivantes :

Préparation du milieu tampon phosphate pH = 7,2

- Peser la masse équivalente en vitamine C et E obtenues dans l'optimum,
- Dissoudre dans 50mL de tampon phosphate,
- Laisser sous agitation et procéder à plusieurs prélèvements pendant 2 heures (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120 min)
- Filtrer et mettre dans des vials. Les prélèvements sont caractérisés par HPLC (Taouzinet L.et al., 2020)

4.3.2 Modélisation

Dans la littérature, de nombreux modèles théoriques ou empiriques sont décrits et la plupart d'entre eux prennent en compte les phénomènes physico-chimiques tels que le processus de transfert de masse par diffusion et /ou par réactions chimiques. (N. Faisant et al.,2002)

Dans notre étude nous avons choisi quatre d'entre eux pour la modélisation du mécanisme dominant la libération de la vitamine E à partir des cyclodextrines. Les modèles choisis sont semi empirique à savoir : Le modèle d'ordre zéro, le modèle du premier ordre, le modèle d'Higuchi et le modèle de Korsmeyer-Peppas. Ils sont définis comme suit : (S. Dash et al.,2010)

➤ **Modèle d'ordre zéro : $F = K_0 * t$**

Où F : représente la fraction du médicament libérée au temps t

K_0 : est la constante de vitesse de libération apparente ou la constante de libération d'ordre Zéro.

➤ **Modèle du premier ordre :** $\ln(1 - F) = -K_0 t$

Où F : représente la fraction du médicament libérée au temps t ,

K_0 est la constante de libération du premier ordre.

➤ **Modèle d'Higuchi:** $F = K_H * t^{1/2}$

Où F : représente la fraction du médicament libérée au temps t ,

K_H : est la constante d'Higuchi.

Modèle de Korsmeyer-Peppas: $F = K_p * t^n$

Où F : représente la fraction du médicament libérée au temps t ,

K_p : est la constante de vitesse et n est l'exposant de diffusion, il indique le mécanisme de libération du PA.

Chapitre 3 :
Résultats et
discussion

1 Caractérisation des complexes

1.1 Résultats de l'infrarouge (IR) :

Les interactions entre la cavité des cyclodextrines et la molécule invitée, la vitamine E sont caractérisées par des forces faibles entre les molécules telles que des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes.

La spectroscopie IRTF a été appliquée pour la caractérisation de la vitamine E, de la PM- β -CD puis le complexe formé par les deux PM- β -CD /Vit E.

Le spectre IR de la vitamine E est illustré dans la figure 3.1.

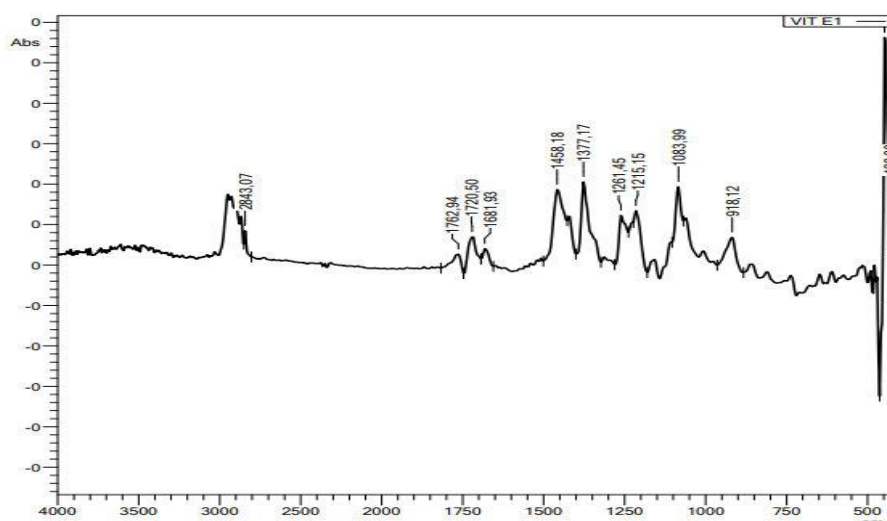


Figure 3. 1:Spectre infrarouge de la vitamine E

L'ensemble des résultats et bandes caractéristiques de la vitamine E observée sont résumés dans le tableau 3.1 :

Tableau 3. 1: Bande de vibration caractéristique de la vitamine E

Groupements fonctionnels	Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Intensité de l'absorption
C-H dans CH ₃	2900	Forte
C-H dans phényle	2850	Moyenne
C=O du cycle lactone	1762	Moyennement faible

C=C du noyau benzenique	1680	Moyennement faible
C-O aromatique	1458	Forte
C-C dans CH ₂	1261-1083	Forte

La figure 3. 2 illustre le spectre IR de la PM-β-CD

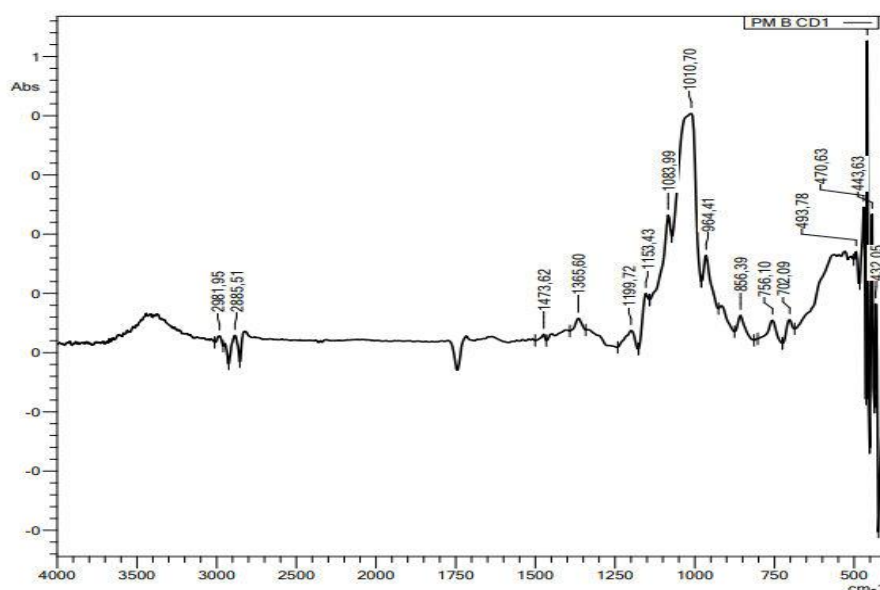


Figure 3. 2 : Spectre infrarouge de la PM-β-CD

L'ensemble des bandes caractéristiques de PM-β-CD observés sont résumés dans le tableau 3.2 :

Tableau 3.2 : Bandes de vibration caractéristique de la PM-β-CD

Groupements fonctionnels	Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Intensité de l'absorption
O-H alcool primaire	3300	Moyenne large
C-H du cycle	2981 - 1473	Faible
C-H	2885	Faible
C-C	1199	Faible
C-O aromatique	1083-1010	Forte

Le spectre infrarouge du complexe PM-B-CD/Vit E est donné par la figure 3. 3

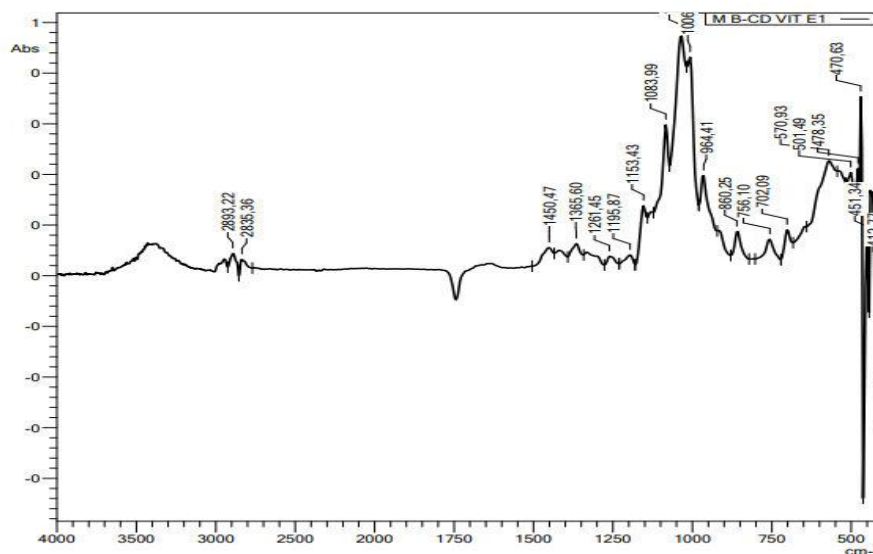


Figure 3. 3: Spectre infrarouge du complexe PM-B-CD/Vit E

La figure 3. 4 regroupe les spectres Infrarouge de la Vitamine E, PM-β-CD, et de leur complexe

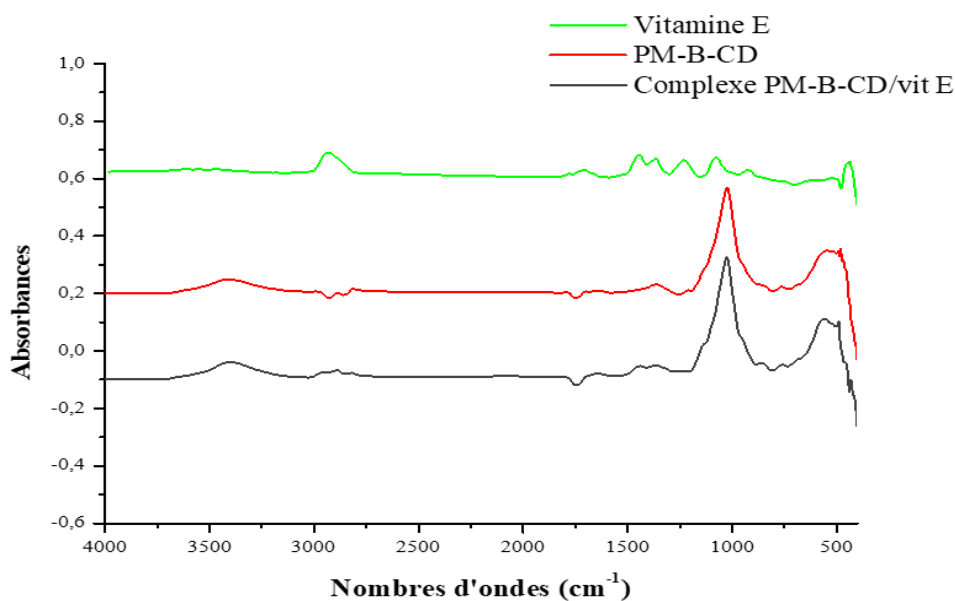


Figure 3. 4 : Spectre Infrarouge de la Vitamine E, PM-β-CD, et de leur complexe

1.1.1 Observation :

La bande O-H présente dans la PM-β-CD aux environs de 3400 cm^{-1} s'est décalée aux environs de 3350 cm^{-1} , elle est moins large c'est la bande de la liaison hydrogène responsable des liaisons

intramoléculaires dans le complexe d'inclusion. On peut aussi observer la liaison C-H aromatique de la vitamine E à 2843cm^{-1} qui s'est décalée dans le complexe aux environs 2893cm^{-1} et elle est moins intense. Les bandes caractéristiques de la vitamine E aux environs $1762, 1720$ et 1681cm^{-1} sont toutes absentes dans le spectre du complexe.

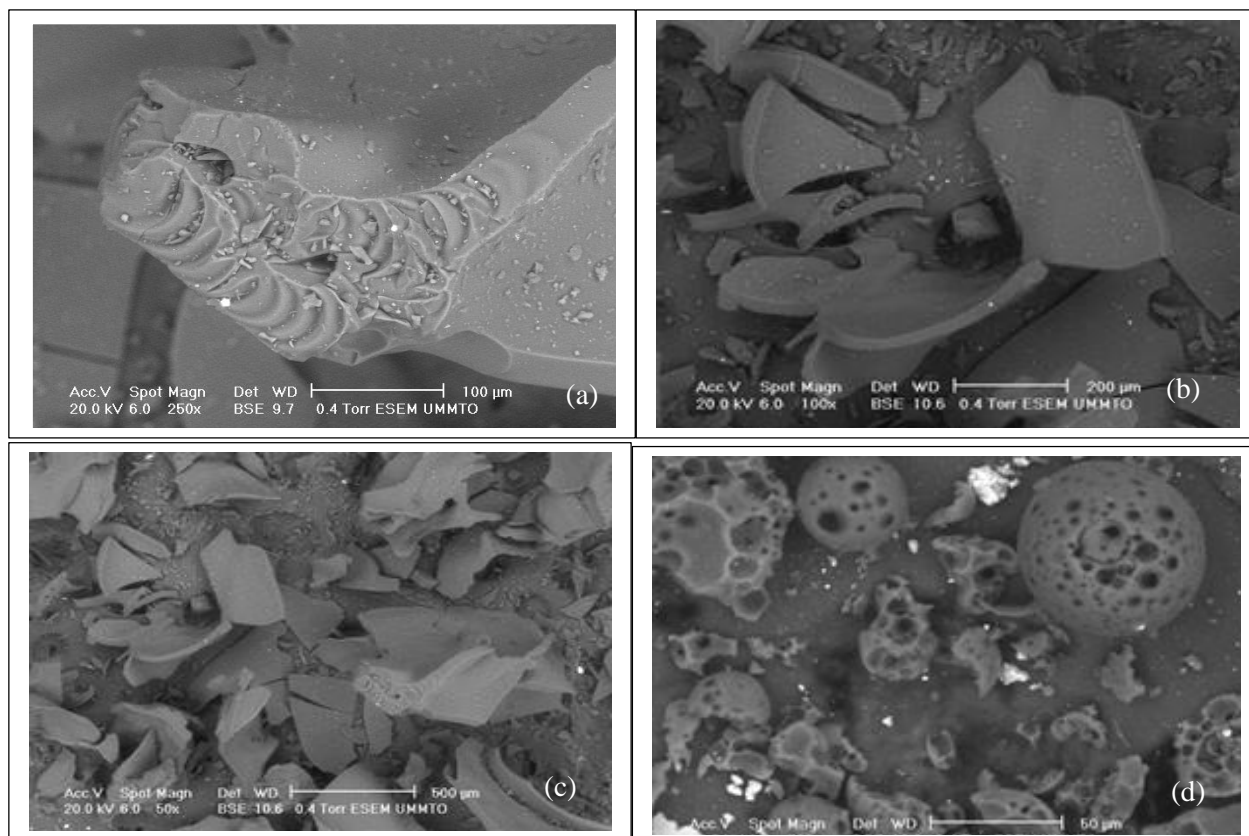
1.1.2 Interprétation :

La variation de la forme, du décalage et de l'intensité des pics d'absorption IR de l'invité ou de l'hôte peut fournir suffisamment d'information pour la survenance de l'inclusion. C'est le cas des résultats trouvés donc on peut dire que le complexe CD/Vit E s'est formé.

1.2 Résultats de la morphologie (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour la matière première (la PM- β -CD) et le complexe obtenu (PM- β -CD/Vit E) afin d'étudier la modification de la morphologie.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.5. Les images ont, clairement élucidé la différence dans chaque cas. La structure du complexe d'inclusion (PM- β -CD/VitE) est différente de celle du PM- β -CD seul. La modification de ces matières peut être considérée comme une preuve de la formation d'un nouveau composé (complexe d'inclusion).



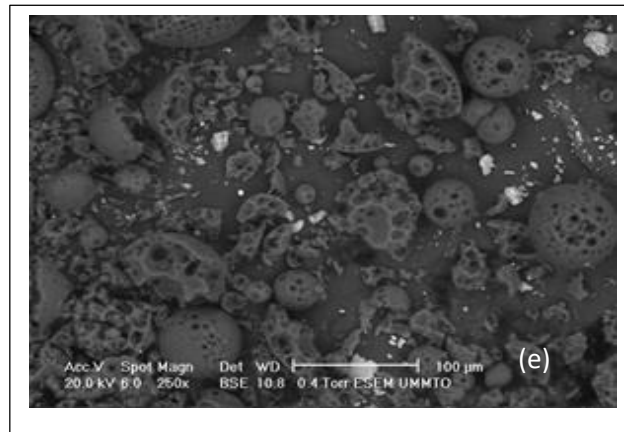


Figure 3. 5: Photographie de microscope électronique à balayage de (a) PM- β -CD (250 \times), (b) PM- β -CD(100 \times), (c) PM- β -CD (50 \times), (d) complexe PM- β -CD/Vit E (500 \times), (e) complexe PM- β -CD/Vit E (250 \times)

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.

- Sur la base des résultats obtenus, nous concluons que les techniques de caractérisation (IR et MEB) proposées dans ce travail sont efficaces pour obtenir un complexe (PM- β -CD/Vit E), l'IR confirmant la formation d'un complexe d'inclusion. La vitamine E libre a modifié la taille et la morphologie cristalline par l'introduction du PM- β -CD. Ce résultat permet de considérer les CDs comme un important excipient pharmaceutique pour les systèmes d'encapsulation.

2 Méthodologie des plans d'expériences

Dans notre étude, les préparations des complexes CDs/Vit E a été optimisée en utilisant un plan d'expérience D-optimal, en considérant la concentration de la vitamine C et le type de complexes comme facteurs et la motilité (en $\mu\text{m/s}$) ainsi que le taux de solubilité (en pourcentage %) comme réponses. C'est ainsi, que nous avons obtenu la matrice d'expérience à 15 essais (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Matrice d'essai obtenue

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Concentration Vit C	Complexe CD/Vit E	Taux de solubilité	Motilité
1	1	N1	1	Incl	1	PMBCD	52,7265	21,32
2	2	N2	11	Incl	1	PMBCD	52,004	20
3	3	N3	15	Incl	4	PMBCD	78,8912	26,56
4	4	N4	10	Incl	4	PMBCD	78,1245	26
5	5	N5	12	Incl	2,5	PMBCD	76,001	23,89
6	6	N6	7	Incl	2,5	PMBCD	76,6987	23
7	7	N7	14	Incl	1	BCD	6,02098	19,04
8	8	N8	8	Incl	1	BCD	6,56871	19
9	9	N9	9	Incl	4	BCD	12,2134	22,79
10	10	N10	2	Incl	4	BCD	12,9943	22
11	11	N11	4	Incl	2,5	BCD	19,1317	22,91
12	12	N12	6	Incl	2,5	BCD	19,9768	22
13	13	N13	3	Incl	2,5	BCD	19,4678	22,97
14	14	N14	13	Incl	2,5	BCD	19,0239	22
15	15	N15	5	Incl	2,5	BCD	19,7564	21

2.1 Observation :

Les résultats obtenus montrent que la motilité et le taux de solubilité de la vitamine E dépend du type de complexe utilisé et la concentration de la vitamine C. Parmi les deux types des CDs que nous avons testés, les valeurs les plus petites (19 et 6,0209 respectivement) sont obtenue avec la CD native (β -CD) et les valeurs les plus grandes (26,56 et 78,8912) sont obtenues avec les CDs modifiés (PM- β -CD).

2.2 Interprétation :

D'après les résultats obtenus, parmi les deux types des CDs utilisé la plus efficace en termes d'amélioration de solubilité et de motilité est la PM- β -CD, son utilisation nous a permis d'obtenir une augmentation par rapport à la solubilité et la motilité. Ceci peut être attribué à la présence des groupements méthyle de la PM- β -CD modifié, qui perturbent les liaisons hydrogènes, mais aussi agrandissent la cavité et augmentent la solubilité intrinsèque de la β -CD native (Y. Jiang et al.,2010) et par extension à améliorer la solubilité des complexes qu'elle forme.

Ces résultats suggèrent que la PM- β -CD est l'agent solubilisant le plus efficace pour la vitamine E ; par conséquent il a été sélectionné pour la suite de nos travaux.

2.3 Analyse des effets des facteurs

- Les paramètres statistiques R^2 et Q^2 traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus. Lorsque ces deux derniers tendent vers 1, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse totalement. En revanche lorsque R^2 ou Q^2 tendent vers 0, alors le modèle ne peut être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses.
- Lorsque la barre de la validité du modèle est plus grande que 0,25, il n'y a pas de manque d'ajustement du modèle (l'erreur du modèle est dans la même plage que l'erreur pure). Une barre de la validité du modèle de 1 représente un modèle parfait.

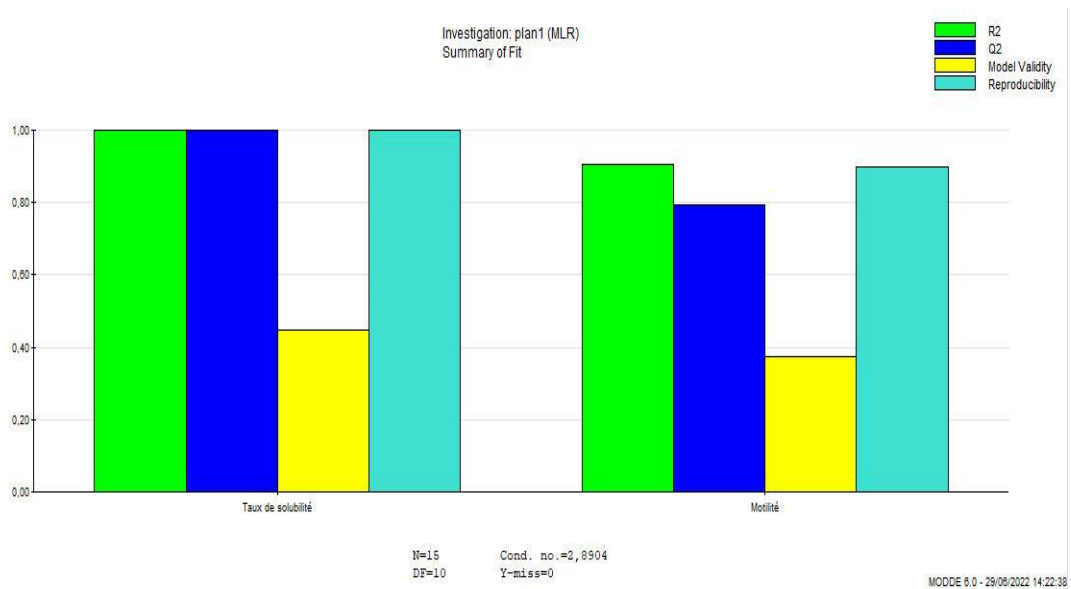


Figure 3. 6 : Facteurs statistique obtenus.

2.3.1 Observation

Pour mieux exploiter ces résultats, les valeurs numériques de ces caractéristiques statistiques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 3.4 : Valeurs numériques des caractéristiques obtenues de taux de solubilité et de motilité

	R^2	Q^2	Validité du modèle	Reproductibilité
Taux de solubilité	1	0,999	0,449	1

Motilité spermatique	0,795	0,905	0,372	0,896
----------------------	-------	-------	-------	-------

2.3.2 Interprétation

- Les valeurs de R^2 et Q^2 respectivement tendent vers 1 (1 et 0,999 pour le taux de solubilité) et (0,795 et 0,905 pour la motilité) par conséquent on peut dire que le modèle explique l'effet des facteurs sur la réponse choisit.
- La validité du modèle est supérieure à 0,25, par conséquent, il n'y a pas un manque d'ajustement du modèle.
- Pour la reproductibilité, nous avons une valeur à 100% pour le taux de solubilité et une valeur de 89% pour la motilité ; cela signifie que dans les mêmes conditions, les valeurs de la réponse sont identiques.

2.4 Influence des effets des facteurs

Pour la PM- β -CD :

Taux de solubilité = $47,79 + 8,11 * VitC + 28,17 * PM-\beta-CD - 10,35 * VitC^2 + 4,95 * VitC * PM-\beta-CD$

Pour la β -CD :

Taux de solubilité = $47,79 + 8,11 * VitC - 28,17 * \beta-CD - 10,35 * VitC^2 - 4,95 * VitC * \beta-CD$

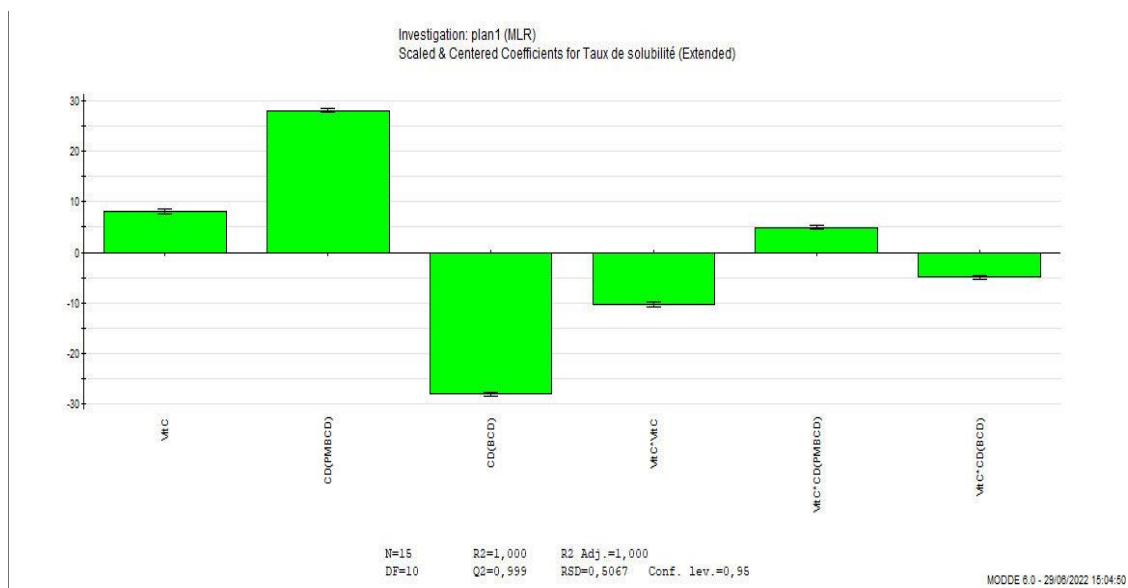


Figure 3. 7: Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la solubilité

Pour la PM-β-CD :

$$\text{Motilité} = 22,99 + 2,24 * \text{VitC} + 1,07 * \text{PM-}\beta\text{-CD} - 0,9 * \text{VitC}^2 + 0,56 * \text{VitC} * \text{PM-}\beta\text{-CD}$$

Pour la β-CD :

$$\text{Motilité} = 22,99 + 2,24 * \text{VitC} - 1,07 * \beta\text{-CD} - 0,9 * \text{VitC}^2 - 0,56 * \text{VitC} * \beta\text{-CD}$$

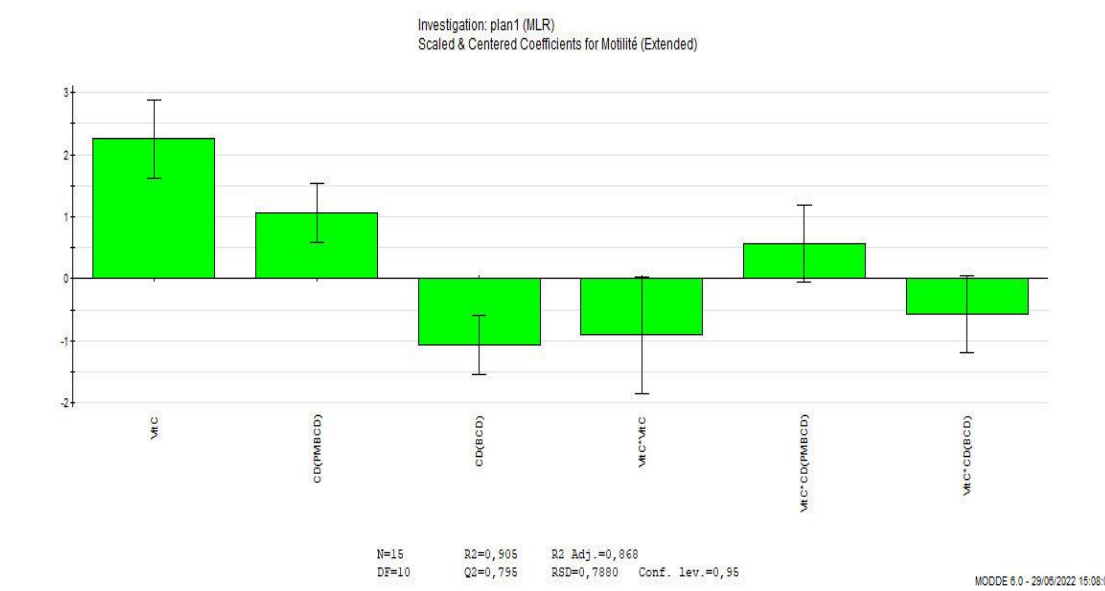


Figure 3. 8 : Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la motilité

2.4.1 Observation

On remarque que les deux facteurs (vitamine C et le complexe de type PM-β-CD/VitE) et l'interaction entre eux (PM-β-CD/VitE /VitC) influent positivement (barre dirigée vers le haut), et le facteur (complexe de type β-CD/VitE) influe négativement (barre dirigée vers le bas).

2.4.2 Interprétation

L'influence positive des deux facteurs (vitamine C, type PM-β-CD/VitE) sur la réponse, montre que la PM-β-CD donne une meilleure solubilité à la vitamine E, cela peut être expliqué par la

présence des groupements méthyle de la PM-β-CD. Contrairement à la β-CD native qui a une mauvaise solubilité donc elle influe négativement.

2.5 Détermination de l'optimum

En introduisant les valeurs obtenues dans la matrice d'expérience, on obtient l'optimum présenté dans le tableau 3.5 :

Tableau 3.5 : Détermination de l'optimum

Factor					Response						
	Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit	Response	Criteria	Weight	Min	Target	Max
1	Concentration Vit C	Free		1	4	1	Taux de solubilité	Maximize	1	75,0643	82,3228
2	Complexe CD/Vit E	Free				2	Motilité	Maximize	1	25,637	26,3007

Iteration: 128		Iteration slider:				
	1	2	3	4	5	6
	Concentration Vit C	Complexe CD/Vit E	Taux de solubilité	Motilité	iter	log(D)
1	3,8875	PMBCD	79,2084	25,8893	122	-0,5464
2	4	PMBCD	78,6935	25,9689	17	-0,6021
3	4	PMBCD	78,6936	25,9689	128	-0,6021
4	4	PMBCD	78,6935	25,9689	17	-0,6021
5	4	PMBCD	78,6935	25,9689	17	-0,6021
6	4	PMBCD	78,6936	25,9689	128	-0,6021

2.5.1 Observation

On remarque que l'optimum (PM-β-CD/Vit E ratio massique 2 :1) est obtenu lorsque les facteurs prennent les valeurs suivantes :

- La concentration de la vitamine C est de 4 mg/mL
- Le type de complexe des cyclodextrines /vitamine E il s'agit de la PM-β-CD/Vit E

2.5.2 Interprétation

D'après ces résultats, la PM-β-CD est la plus efficace en termes d'amélioration de solubilité, et la motilité spermatique, cela peut être expliqué par le fait du greffage des groupements méthyle sur les CDs, leurs conférant ainsi une solubilité intrinsèque plus importante (A I. Glazar, et al .,2009)

2.6 Validation de l'optimum :

Afin de valider l'optimum obtenu, nous avons préparé une solution dans les conditions optimales, la motilité spermatique a été évaluée, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.6 : Valeurs optimales du taux de solubilité et de la motilité

Réponse	Optimum théorique	Optimum expérimental	Ecart-type
Taux de solubilité	78	78,69	±0,69
Motilité	26	25,96	±0,04

3 Caractérisation de la solution optimale

3.1 Cinétique de libération :

La cinétique de libération de la vitamine E encapsulée en cyclodextrines a été réalisée par la méthode de HPLC (présente dans la partie expérimentale) l'ensemble des résultats obtenus sont établis dans l'annexe. Le profil de libération du complexe PM- β -CD/Vit E (l'optimum) dans le milieu de cryoconservation est présenté dans la Figure 3.9.

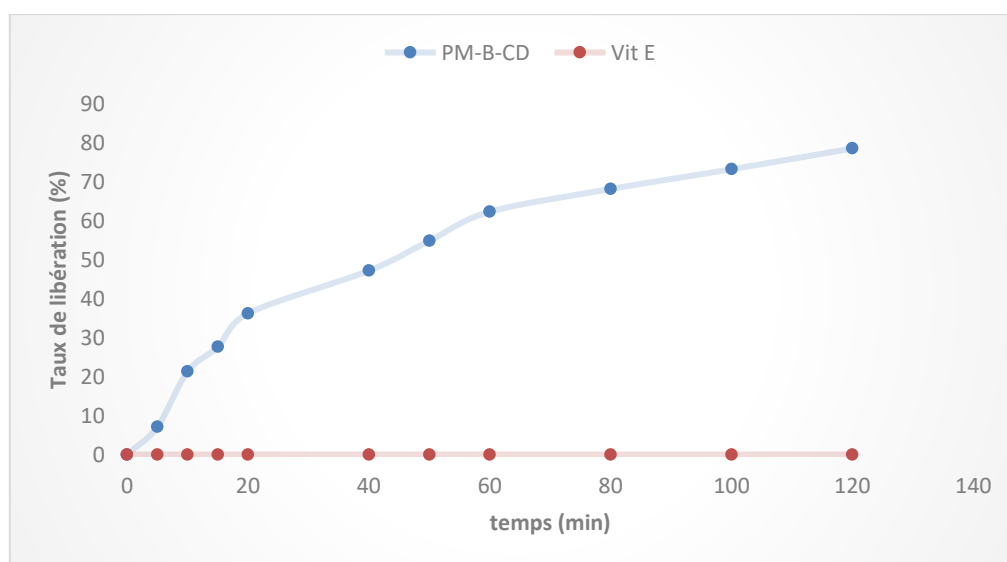


Figure 3.9 : Cinétique de libération de la PM-B-CD/vit E et vitamine E seul

La vitamine E seule présente une dissolution limitée (aucune solubilité dans le milieu de cryoconservation). La formulation PM- β -CD/Vit E présente un profil de libération.

Dans la première partie, une libération rapide de la vitamine E a été obtenue, se stabilisant au cours du temps à environ 40 %. Cela peut être dû à la libération du médicament libre et du médicament adsorbé (par une faible force de liaison),

Dans la deuxième partie, la dissolution de la Vit E s'est considérablement améliorée pour atteindre 78%, ceci est probablement dû au piégeage de la Vit E dans la PM- β -CD.

4 Modélisation

Afin de déterminer le meilleur modèle qui représente le mieux la libération de vitamine E à partir de la PM- β -CD, la comparaison du coefficient d'ajustement R^2 a été adopté comme critère de sélection. Ainsi, le modèle avec le R^2 le plus proche de l'unité sera considéré comme celui expliquant le mieux la diffusion de la Vitamine E.

Après avoir effectué les calculs présentés dans les annexes 3, 4, 5 et 6, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3.8 :

Tableau 3.7 : Modélisation des données de dissolution

Ordre zéro	K_0	0,8158
	R^2	0,9420
Premier ordre	K_0	0,014
	R^2	0,9585
Higuchi	K_0	7,4620
	R^2	0,9908
Korsemeier-Peppas	K_0	6,9211
	R^2	0,9904
	N	0,5

4.1 Interprétation

La cinétique de libération du médicament a été étudiée. De nombreux modèles existent pour décrire la libération des médicaments, certains d'entre eux peuvent être appliqués aux nano-

encapsulation, tels que Korsmeyer-Peppas et Higuchi, etc (Jain et al.,2016). Dans notre cas, quatre modèles d'ajustement différents ont été étudiés : le modèle de Korsmeyer-Peppas, le modèle de Higuchi, le modèle cinétique de premier ordre et l'ordre zéro. D'après les valeurs R^2 présentées dans le tableau 3.8, on peut déduire que le modèle d'Higuchi était le plus précis ($R^2=0,9908$). De plus, les paramètres cinétiques correspondant aux modèles de Korsmeyer-Peppas ont été extraits, notamment la constante de vitesse de libération (K) et l'exposant de libération (n). La valeur de (n=0,5) qui a été obtenu correspond à un comportement de diffusion Fickien. Ce résultat confirme que la libération de la vit E dans la PM- β -CD suit une libération par diffusion, favorisée par le gradient de concentration (c'est à dire la diffusion se fait du milieu le plus concentré au le moins concentré).

5 Motilité spermatique

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

Afin d'étudier l'impact de PM- β -CD/VitE durant la cryoconservation spermatique, la motilité après cryoconservation du sperme a été évaluée (avec les traitements préparés et sans les traitements c'est-à-dire le contrôle qui contient juste le sperme et le *TRIS*).

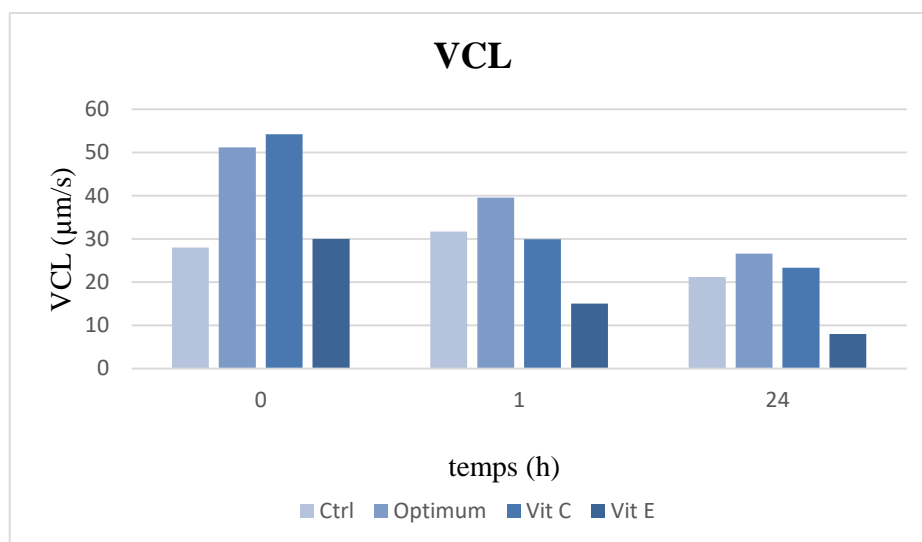
Les traitements à base des complexes d'inclusion VitE /Cyclodextrine, se sont avérés efficaces sur les paramètres de la motilité du sperme après cryoconservation. En effet, plusieurs études avaient déjà relevé l'effet cryoprotecteur des complexes de cyclodextrines/vitamine E chez différentes espèces animales (khellouf et al,2018 ; Amokran et al , 2020). Cela dit, comme on peut le voir sur la figure 3.10, l'effet le plus significatif sur la motilité spermatique a été retrouvé lors de l'utilisation du complexe PM- β -CD/VitE optimal.

L'analyse du sperme assisté par ordinateur (CASA) donne les valeurs des différentes vitesses VCL (Vitesse Curviligne), VAP (vitesse moyenne), VSL (vitesse linéaire) des spermatozoïdes (Figure 3.10).

Les résultats obtenus de contrôle (comme témoin), optimum (complexe PM- β -CD/VitE ratio 2 :1), la vitamine E et la vitamine C seules présentes dans le tableau 3.8 :

Tableau 3.8 : Résultats obtenus par CASA

Type d'échantillon	Temps (h)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)
Contrôle	0	27,97	12,53	7,43
	1	31,67	12,81	5,29
	24	21,15	7,42	3,80
Optimum	0	51,15	24,24	15,76
	1	38,44	18,27	6,57
	24	26,56	11,89	4,21
Vitamine C	0	54,16	24,50	12,90
	1	29,87	10,70	3,36
	24	23,27	9,21	2,70
Vitamine E	0	30	24	20
	1	15	10	6,13
	24	8	4	3



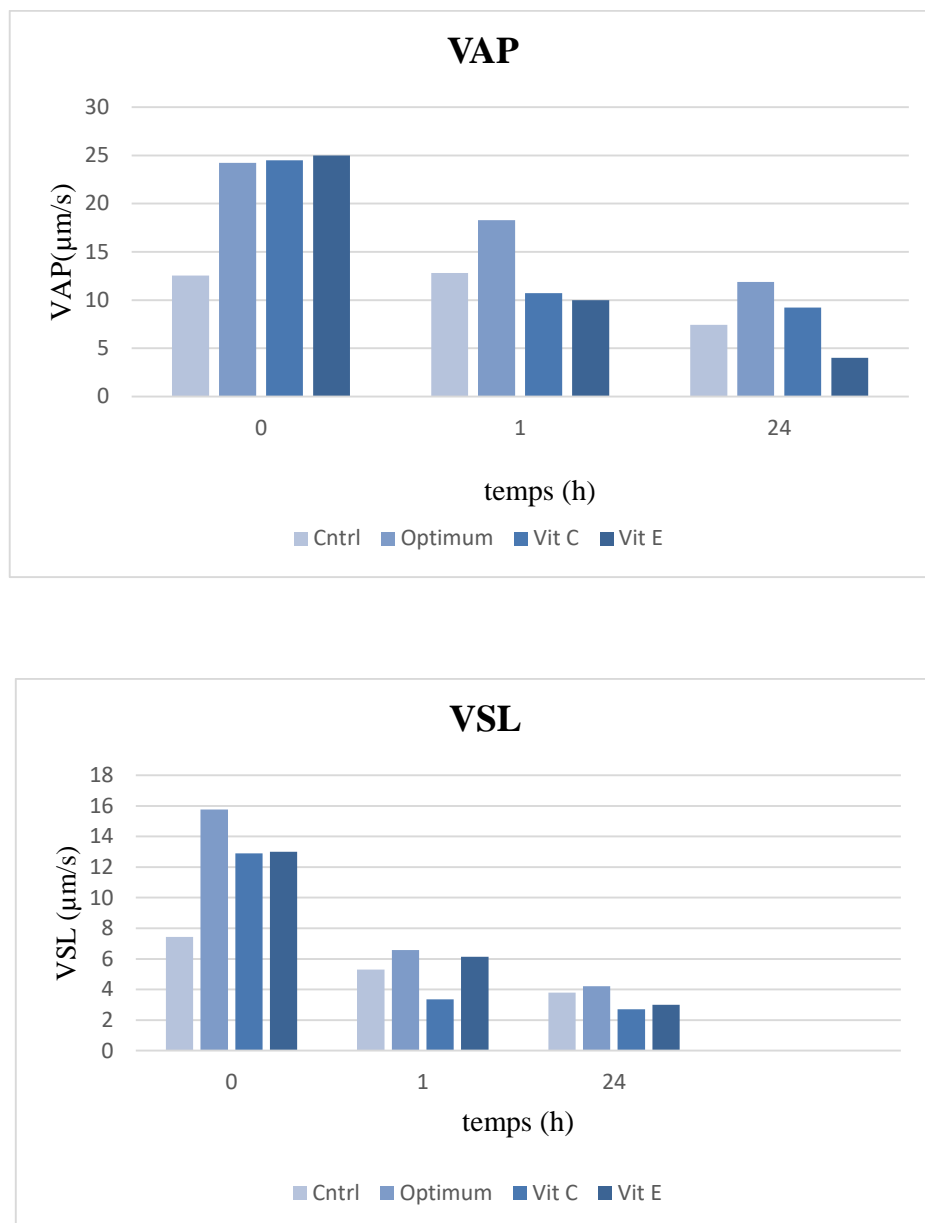


Figure 3. 10: Effets des différents traitements sur les paramètres de motilité spermatisques

5.1 Observation :

On peut observer dans le test de motilité (VCL, VAP, VSL), à l'instant $t = 0$, que l'effet de la vitamine C seule est le plus dominant puis vient juste après l'effet de l'optimum (PM- β -CD/Vit E ratio 2:1) qui est aussi important contrairement au contrôle et à la vitamine E.

Après 1h on constate que l'effet du contrôle s'est amélioré mais l'optimum reste meilleur et contrairement à la vitamine C on peut constater que son effet se dégrade.

Après 24h on peut voir que l'optimum reste toujours meilleur.

5.2 Interprétation :

A l'instant $t = 0$ la vitamine C atteint son maximum cela peut s'expliquer par le fait que la vitamine C est soluble et commence déjà à neutraliser les radicaux libres donc elle a un effet immédiat mais avec le temps elle se retrouve dans un milieu neutre elle commence à se dégrader et devient elle-même pro-oxydante donc son effet diminue.

Par contre l'effet de l'optimum reste toujours meilleur cela est dû à la présence de la vitamine E donc la vitamine C va contribuer à sa régénération et elle n'aura pas vraiment le temps pour la pro-oxydation c'est l'effet de synergie qui rentre en jeu.

Conclusion et perspectives

Diverses propriétés physicochimiques de la vitamine E ont pu être modifiées et améliorées grâce à la complexation par les cyclodextrines en particulier sa solubilité dans le milieu biologique aqueux de conservation spermatique.

En effet, dans le présent travail il a été question d'étudier à l'aide de la méthodologie des plans d'expérience l'impact des complexes 'vitamine E /cyclodextrines' seuls ou en association avec la vitamine C sur la cryoconservation spermatique. L'objectif final étant de rendre l'effet antioxydant de la vitamine E exploitable en :

- Améliorant sa solubilité. Ceci par la préparation des complexes avec deux types de cyclodextrines une native β -CD et une autre modifiée PM- β -CD
- Effectuant des caractérisations pour s'assurer de la formation du complexe PM- β -CD avec deux méthodes à savoir caractérisation par infrarouge(IR) et microscopie électronique à balayage (MEB).
- Procédant à une étude statique notamment méthodologie des plans d'expériences afin de trouver un optimum en complexe et en vitamine C qui donne la meilleure réponse en ce qui concerne le taux de dissolution et aussi la motilité spermatique.
- Enfin en suivant la cinétique de dissolution de cet optimum et en la modélisant afin de trouver le type de diffusion qui en résulte de cet effet de synergie entre les deux vitamines.

La technique de complexation par les cyclodextrines plus précisément la cyclodextrines modifiée s'est avéré très efficace dans l'amélioration de la solubilité de la vitamine E ainsi que la conservation spermatique. Il a été aussi démontré qu'elle est d'autant plus efficace en l'associant à la vitamine C (effet de synergie).

La libération de la vitamine E à partir des complexes d'inclusion fut de type Fickienne, indiquant que le processus régissant cette diffusion est le gradient de concentration.

En guise de perspective, il serait intéressant dans de futurs travaux de mettre plus en avant cet effet de synergie en :

- Utilisant d'autres types de vecteurs pour la vitamine E comme les liposomes et le polyéthylène glycol ...
- Réaliser d'autres tests particulièrement, le test du stress oxydatif (TBRS)

- Exploiter cet effet de synergie dans d'autres domaines pharmaceutique.

Références bibliographiques

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

A Khellouf, K.Benhenia, S.Fatami, M.Iguer-Ouada – The complementary effect of cholesterol and vitamin E reloaded in cyclodextrins on frozen bovine semen : motility parameters, membrane integrity and lipid peroxidation,. CryoLetters 39 (2), 113-120 (2018).

A. Villiers, Sur la fermentation de la fécule en dextrine par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend.Fr.. Acad. Sci.* 112 (1891) 536-538.

AI Glazar, SF Mullen, J Liu, JD Benson, JK Critser Edward L.Squires ,James K.Graham - Cryobiology, 2009 – Elsevier Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol.

Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS. Superoxydismutase dans les suspensions de sperme humain: relation avec la composition cellulaire, le stress oxydatif et la fonction des spermatozoïdes. *Radic libre Biol Med* 1996;21:495–504.

Alvarez JG, Storey BT., 1982 C Labbé, D Labbé - Corpus, 2003 - journals.openedition.org.

Ankit Jain Sanjay K.Jain *In vitro* release kinetics model fitting of liposomes: An insight December 2016, Pages 28-40.

Bergstrom, CA, Charman, WN, Porter, CJ, 2016. Prédiction informatique de stratégies de formulation pour les composés au-delà de la règle de 5. *Adv. Déliv. Tour.*

Burton G., Jauniaux E. (2011). Oxidative stress. *Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology.* 25: 287-299. 9.

Chambia S Vitamin C in disease prevention and cure: an overview S

Dwivedi, KK Shukla, PJ John... - Indian journal of clinical ..., 2013 –Springer

Chan JM , Supplemental vitamin E intake and prostate cancer risk in a large cohort of men in the United States JM Chan, MJ Stampfer, J Ma, EB Rimm- *Biomarkers & Prevention*, 1999 – AACR.

Coan, KE, Shoichet, BK, 2008. Stoechiométrie et chimie physique de la promiscuité inhibitrice à base d'agréats. *Confiture. Chim. Soc.* 130, 9606–9612.

Références bibliographiques

D. Diaz, C.M. Escobar Llanos, M.J.B, Bernad. Study of the binding in an aqueous medium of inclusion complexes of several cyclodextrins involving fenoprofen calcium. *Drug Dev Ind Pharm.*25 (1999) 107-110.

Fatmi, Sofiane; Taouzinet, Lamia; Skiba, Mohamed; Iguer-Ouada, Mokrane The Use of Cyclodextrin or its Complexes as a Potential Treatment Against the 2019 Novel Coronavirus: A Mini-Review Number 4, 2021, pp. 382-386(5).

Florence Guignot Cryoconservation des embryons des espèces domestiques Productions animales, 2005 - hal.inrae.fr.

G, A Sahu, DS Kumar, S Jena, A Harani... - J PharRes, 2012 researchgate.net.

Guilland JC. Les interaction entre les vitamines A, D, E et : synergie et/ou compétition. OCL, Oliseeds and Fats, crops and lipids, (2011).

Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 2010;4(8):142–51.

Head KA, Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer *Altern Med Rev*, 1998 - laleva.org.

I .Yahiaoui. Les plans d'expériences Initiation à la construction et l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré. Université Bejaia ,2014/2015.

J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98(5) (1998) 1743-1753.

Jena A Kumar, Method development and validation for acyclovir in tablet dosage form by RP-HPLC, 2012.

Journal of Pharmaceutical sciences, Vol.15, P 55-366, 2002.

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

Levin M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New Engl J Med.* 1986;31:892–902.

Lopez G.V., Batthyany C., Blanco F., Botti H., Trostchansky A., Migliaro E., Radi R., Gonzalez M., Cerecetto H., Rubbo H. (2005). Design, synthesis, and biological characterization

Références bibliographiques

of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 5787-5796.

M. Cirri, C. Rangoni, F. Maestrelli, G. Corti, P Mura, Development of fast dissolving tablets of flurbiprofencyclodextrin complexes. *Drug Dev Ind Pharm.* 31 (2005) 697-707.

M. Hezavehei, M. Sharafi, HM Kouchesfahani, R. Henkel, A. Agarwal, V. Esmaeili, A. Shahverdi, cryoconservation du sperme : une revue de la cryobiologie moléculaire actuelle et des approches avancées, *Reprod. Biomédical. En ligne* 37 (2018) 327–339.

M.Charoenchaitrakool, Dehghani. N.R. Foster, Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics.* 239 (2002) 103-112.

M.M. Al Omari. N.H. Daraghmeh , M.I. El-Barghouthi , M.B. Zughul , B.Z. Chowdhry, S.A. Leharne, A.A. Badwan, Novel inclusion complex of ibuprofen tromethamine with cyclodextrins : Physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 50 (2009) 449-458.

Mariame Akouche, Maguy Jaber, Emilie-Laure Zins, Marie-Christine Maurel, Jean-Francois Lambert, Thomas Georgelin Thermal Behavior of D-Ribose Adsorbed on Silica: Effect of Inorganic Salt Coadsorption and Significance for Prebiotic Chemistry (October 24, 2016) 15834-15846.

Munnich A, Ogier H, Saudubray J-M et Amédée-Manesme O. 1987. Les Vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Masson, Paris, 428 p. p.

N. Faisant, J. Slepman et JP. Benoit, « PLGA based microparticles elucidations of mechanisms and a new simple mathematical model quantifying drug release », European
Nadine B.S La vitamine E: ses effets préventifs vis à vis des cancers et des maladies cardiovasculaires, 1993- B Savard - docplayer.fr.

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

P. Mura, F. Maestrelli, M. Cirri, Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and amino acids. *International Journal of Pharmaceutics.* 260 (2003)

293-302.

P. Théron, J. Auger, A. Legrand, P. Jouannet α -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes 1 October 1996, Pages 739–744.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2000). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233-23

R, Luus HG. Comparison of absorption rates in bioequivalence studies of immediate release drug formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992; 30(5): 153-159.

R.C.Doijad, M. M. Kanakal, F.V. Manvi, Effect of processing variables on dissolution and solubility of piroxicam: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69 (2007) 323-326.

S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath et P. Chowdhury, « kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems », *Acta Poloniae Pharmaceutica*, Vol. 67, P 217-223, 2010.

S. Tian, P. Forgo, V.T.D'Souza, Selective modification at the 3-position of cyclodextrin. *Tetrahedron Letters*. 37 (46) (1996) 8309-8312.

S. Xing. Isothermal Titration Calorimetry and Theoretical Studies on Host-guest Interaction of Ibuprofen with α -, β - and γ -Cyclodextrin. *Journal of solution chemistry*. 38 (2009) 531-543.

S.A. Leharne, A.A. Badwan, Novel inclusion complex of ibuprofen tromethamine with cyclodextrins : Physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 50 (2009) 449-458.

Saokar Telang, Vitamin C in dermatology, PS Telang - Indian dermatology online journal, 2013 - ncbi.nlm.nih.gov.

Taouzinet L, Fatmi S, Khellouf A, Skiba M, & Iguer-ouada M, (2020), *Drug Delivery Letters* 10, 228–236.

Taouzinet, Lamia; Fatmi, Sofiane; Lahiani-Skiba, Malika; Skiba, Mohamed; Iguer-Ouada, Mokrane Encapsulation Nanotechnology in Sperm Cryopreservation: Systems Preparation Methods and Antioxidants Enhanced Delivery *Cryoletters*, Volume 42, Number 1, January 2021, pp. 1-12(12).

Thuwanut P, Axner E, Johansson A, Chatdarong K. Détection de la réaction de peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes de chat épидидymaire congelés/décongelés à l'aide de BODIPY (581/591) C11. *Reprod Dom Anim* 2009;44:373–76.

Références bibliographiques

V. Hanco C. Poilâne Jie Chen Composite lin/époxy : optimisation par plan d'expériences 2
juin 2011.

V. V. Axel-Castelli, G. Trivieri, I. Zucchelli, L. Brambilla, T. Barbuzzi, C. Castiglioni, M. Paci, G. Zerbi, M. Zanol, Characterisation of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97 (2008) 3897-3906.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y & Critser JK (2004) *Cryobiology* 48, 146–156.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.02>.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Propriétés et provenance des produits utilisés

Tableau 1: propriétés des produits utilisés

Produits utilisés	Masse molaire g/mol	Pureté
Vitamine E (C ₂₉ H ₅₀ O ₂)	430.69	96%
Vitamine C (C ₆ H ₈ O ₆)	176.12	99%
Per methyl-beta-cyclodextrines (PM-β-CD)		≥95%
Beta cyclodextrines β-CD	1134.98	≥97%
Ethanol (C ₂ H ₅ OH) [M=46,07, pureté:99%]	46,07	99%
Fructose	180.16	≥99%
<i>Tris</i>	121.14	99.8

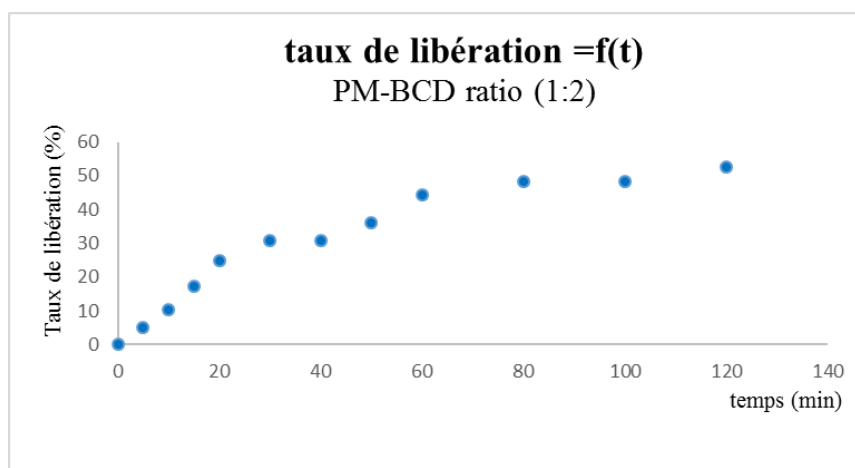
- L'alpha-tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), *le tris*, le fructose, les cyclodextrines, ont été achetés auprès de SIGMA ALDRICH, Allemagne
- L'éthanol et le méthanol de qualité HPLC ont été achetés chez Biochem
- Tous les réactifs sont de qualité analytique

Annexe 2 : Taux de solubilité

Ces tableaux représentent les résultats obtenus et les graphes correspondant, après la quantification du taux de libération à partir des aires de pics obtenus par HPLC pour les différents complexes et avec les différentes concentrations en vitamine C (les ratios en complexe et en vitamine C sont représentés sur chaque graphe).

Tableau 2:taux de libération PM-β-CD ratio(1:2)

PM-B-CD					
	temps(min)	air T1	concentration (mg/ml)	concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	0,7039	0,10186686	0,10186686	5,093342981
	10	0,71	0,102749638	0,204616498	10,23082489
	15	0,99	0,143270622	0,34788712	17,39435601
	20	1,0343	0,149681621	0,497568741	24,87843705
	30	0,7972	0,11536903	0,612937771	30,64688857
	40	0,0051	0,000738061	0,613675832	30,68379161
	50	0,7584	0,10975398	0,723429812	36,17149059
	60	1,1316	0,163762663	0,887192475	44,35962373
	80	0,56	0,081041968	0,968234443	48,41172214
	100	0,601	0,086975398	0,968234443	48,41172214
	120	0,5963	0,086295224	1,054529667	52,72648336

**Figure 1:**courbe du taux de libération PM-β-CD ratio(1:2)**Tableau 3:**taux de libération PM-β-CD ratio(2:1)

PM-B-CD					
	temps(min)	air T2	concentration (mg/ml)	concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	0,9803	0,14186686	0,14186686	7,093342981
	10	1,969	0,284949349	0,426816208	21,34081042
	15	0,8745	0,126555716	0,553371925	27,66859624
	20	1,1922	0,172532562	0,725904486	36,29522431
	40	1,5188	0,219797395	0,945701881	47,28509407
	50	1,0608	0,153516643	1,099218524	54,96092619
	60	1,0328	0,149464544	1,248683068	62,4341534
	80	0,81	0,117221418	1,365904486	68,29522431

	100	0,702	0,101591896	1,467496382	73,3748191
	120	0,7381	0,106816208	1,57431259	78,71562952

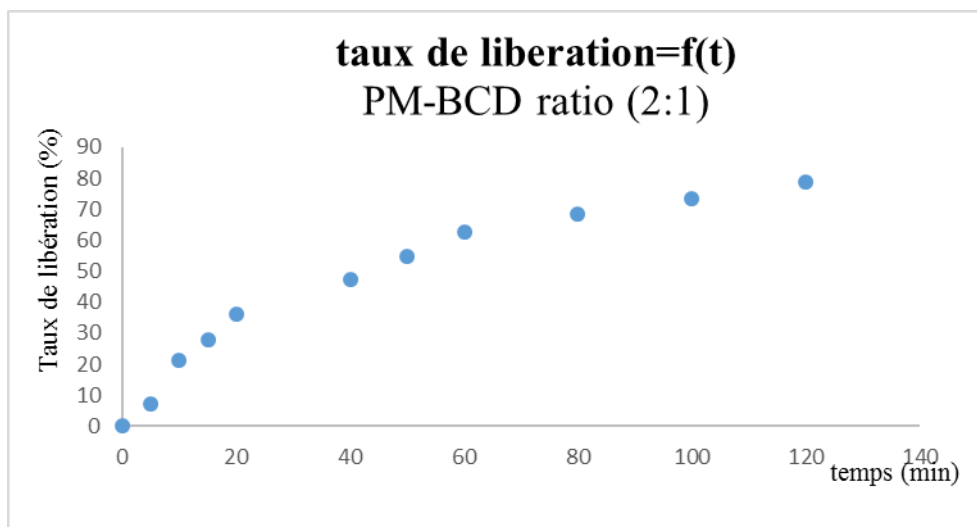


Figure 2 :courbe du taux de libération PM-β-CD ratio(2:1)

Tableau 4:taux de libération PM-β-CD ratio(1:0.8)

PM-B-CD	temps (min)	air T3	Concentration (mg/ml)	concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	1,4488	0,209667149	0,209667149	10,48335745
	10	1,2392	0,179334298	0,389001447	19,45007236
	15	1,0233	0,148089725	0,537091172	26,85455861
	20	0,9869	0,142821997	0,679913169	33,99565847
	30	0,9113	0,131881331	0,811794501	40,58972504
	40	0,9345	0,135238784	0,947033285	47,35166425
	50	0,9194	0,133053546	1,080086831	54,00434153
	60	0,965	0,139652677	1,219739508	60,9869754
	80	0,7072	0,102344428	1,322083936	66,10419682
	100	0,7072	0,102344428	1,424428365	71,22141823
	120	0,7072	0,102344428	1,526772793	76,33863965

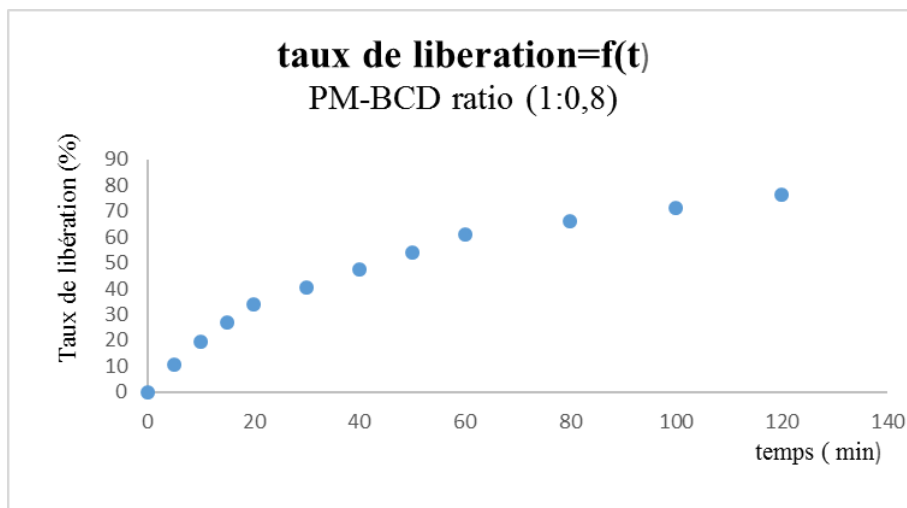


Figure 3: courbe du taux de libération PM-β-CD ratio(1:0.8)

Tableau 5: taux de libération β-CD ratio (1:2)

B-CD	temps (min)	air T4	Concentration (mg/ml)	Concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	0,1637	0,023690304	0,023690304	1,184515195
	10	0,0592	0,008567294	0,032257598	1,612879884
	15	0,072	0,010419682	0,042677279	2,133863965
	20	0,1032	0,014934877	0,057612156	2,880607815
	30	0,0965	0,013965268	0,071577424	3,578871201
	40	0,0877	0,012691751	0,084269175	4,213458755
	60	0,0653	0,009450072	0,093719247	4,685962373
	80	0,07	0,010130246	0,103849493	5,192474674
	100	0,0685	0,009913169	0,113762663	5,68813314
	120	0,046	0,006657019	0,120419682	6,020984081

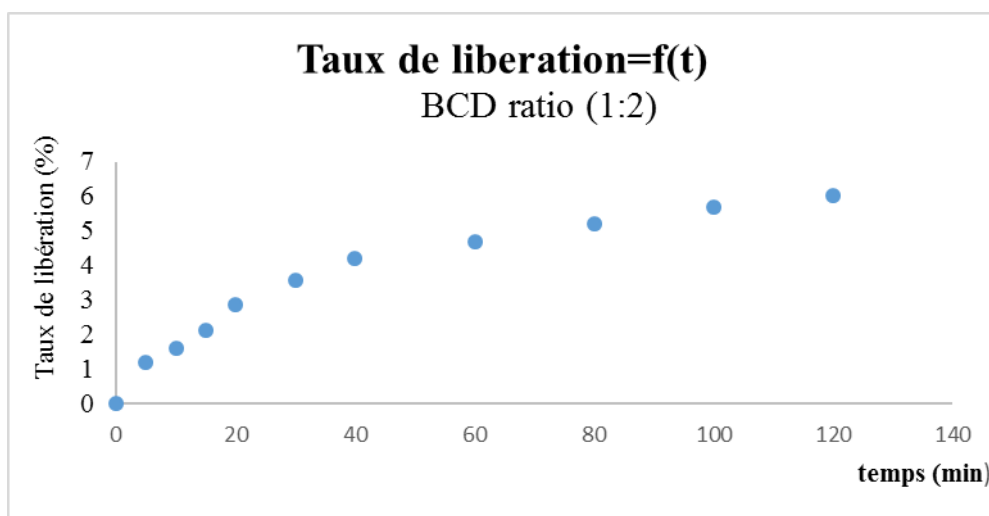


Figure 4: courbe du taux de libération β -CD ratio(1:2)

Tableau 6: taux de libération β -CD ratio(2:1)

B-CD					
	temps (min)	air T5	Concentration (mg/ml)	concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	0,1835	0,026555716	0,026555716	1,327785818
	10	0,1343	0,019435601	0,045991317	2,299565847
	15	0,2254	0,032619392	0,078610709	3,930535456
	20	0,1805	0,026121563	0,104732272	5,236613603
	30	0,1996	0,028885673	0,133617945	6,68089725
	40	0,2816	0,040752533	0,174370478	8,718523878
	50	0,167	0,024167873	0,19853835	9,926917511
	60	0,155	0,022431259	0,220969609	11,04848046
	120	0,2153	0,031157742	0,252127352	12,60636758

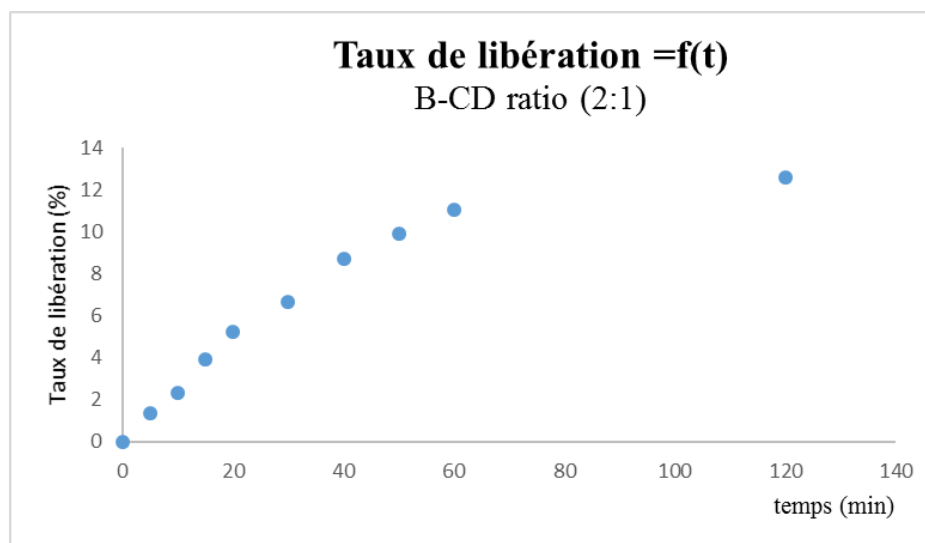


Figure 5: courbe du taux de libération β -CD ratio(2:1)

Tableau 7: taux de libération β -CD ratio(1:0.8)

B-CD					
	temps (min)	air T6	Concentration (mg/ml)	concentration final (mg/ml)	Taux de libération (%)
	0	0	0	0	0
	5	0,2856	0,041331404	0,041331404	2,066570188
	10	0,2473	0,035788712	0,077120116	3,856005789
	15	0,2433	0,035209841	0,112329957	5,616497829
	20	0,3599	0,052083936	0,164413893	8,220694645

	30	0,3447	0,049884226	0,214298119	10,71490593
	40	0,3244	0,046946454	0,261244573	13,06222865
	50	0,2918	0,042228654	0,303473227	15,17366136
	60	0,2944	0,04260492	0,346078148	17,30390738
	120	0,2526	0,036555716	0,382633864	19,1316932

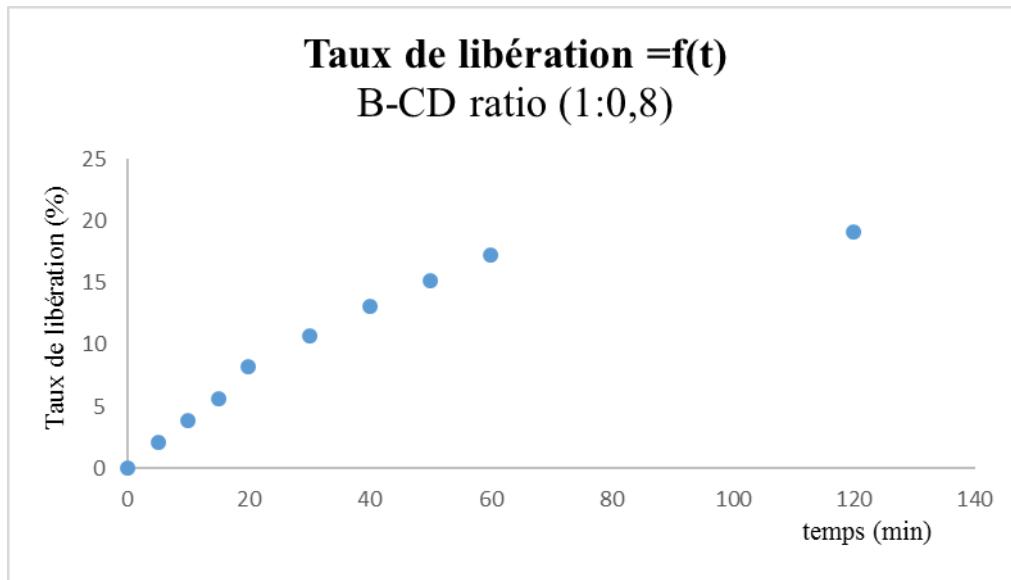


Figure 6: courbe du taux de libération β -CD ratio(1:0.8)

Annexe 3 : résultats obtenus pour le modèle Korsmeyer-Peppas

Tableau 8: calcule des paramètres du modèle Korsmeyer-Peppas

temps(min)	data	FIT	SD			
0	0	0	0			
5	7,093342981	15,92712672	78,03573523	K	6,92110185	
10	21,34081042	22,8047895	2,143234761	n	0,51785083	
15	27,66859624	28,1329369	0,215612252	SSD	142,646373	
20	36,29522431	32,65236934	13,27039235		Colonne 1	Colonne 2
40	47,28509407	46,75233785	0,283829187	Colonne 1	1	
50	54,96092619	52,47932774	6,158330902	Colonne 2	0,99047097	1
60	62,4341534	57,67562864	22,64355789			
80	68,29522431	66,94096443	1,834019841			
100	73,3748191	75,14098701	3,119349083			
120	78,71562952	82,58115813	14,94231145			

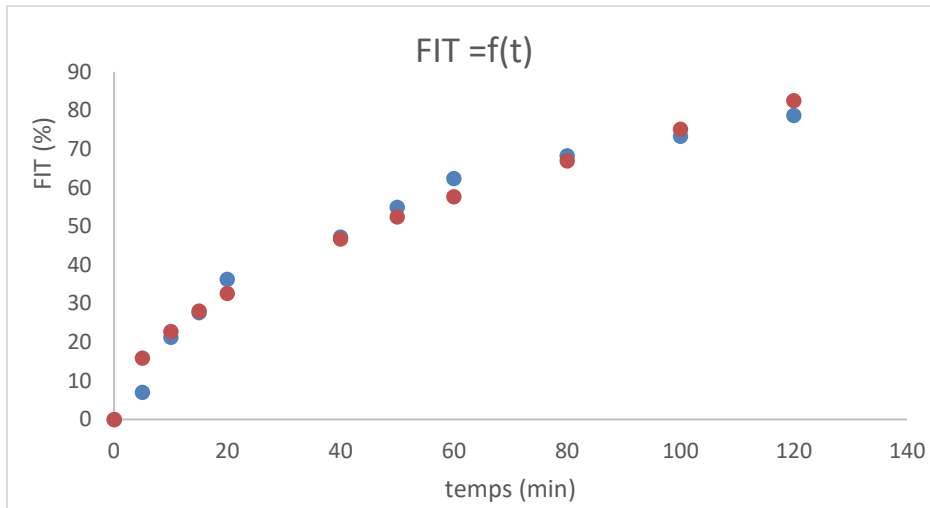


Figure 7: courbe obtenu pour le modèle Korsmeyer-Peppas

Annexe 4 : résultats obtenus pour le modèle d'ordre zéro

Tableau 9: calcul des paramètres du modèle d'ordre 0

temps(min)	data	fit	SD				
0	0	0	0			F=K ₀ *t	
5	7,09334298	4,0792717	9,08462567				
10	21,3408104	8,15854341	173,772164				
15	27,6685962	12,2378151	238,109006		K ₀	0,81585434	
20	36,2952243	16,3170868	399,125978		ssd	1861,98078	
40	47,2850941	32,6341736	214,64947			Colonne 1	Colonne 2
50	54,9609262	40,792717	200,738151		Colonne 1	1	
60	62,4341534	48,9512604	181,788403		Colonne 2	0,94202146	1
80	68,2952243	65,2683472	9,16198477				
100	73,3748191	81,5854341	67,414198				
120	78,7156295	97,9025209	368,1368				

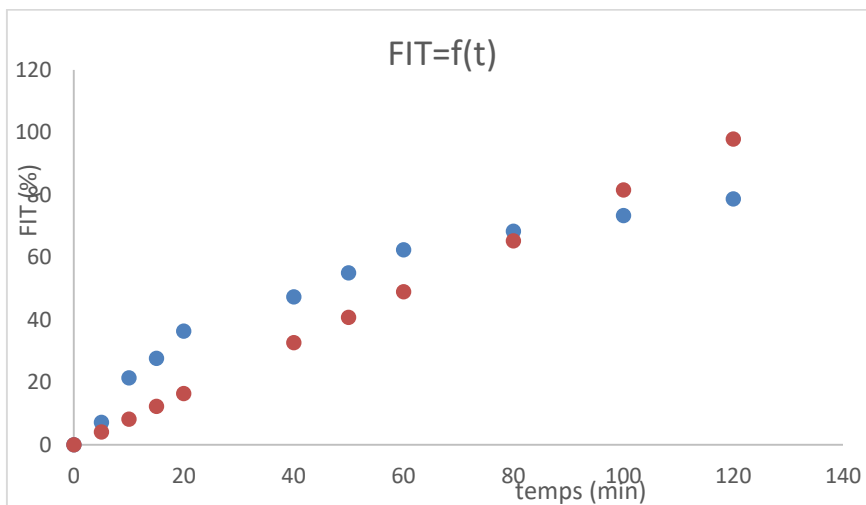


Figure 8: courbe obtenu pour le modèle d'ordre 0

Annexe 5 : résultats obtenus pour le modèle du premier ordre

Tableau 10: calcul des paramètres du modèle d'ordre 1

temps(min)	data=F/100	ln(1-F)
0	0	0
5	0,07093343	-0,07357488
10	0,2134081	-0,24004572
15	0,27668596	-0,3239118
20	0,36295224	-0,45091065
40	0,47285094	-0,64027193
50	0,54960926	-0,79763977
60	0,62434153	-0,97907488
80	0,68295224	-1,14870286
100	0,73374819	-1,32331277
120	0,7871563	-1,54719716

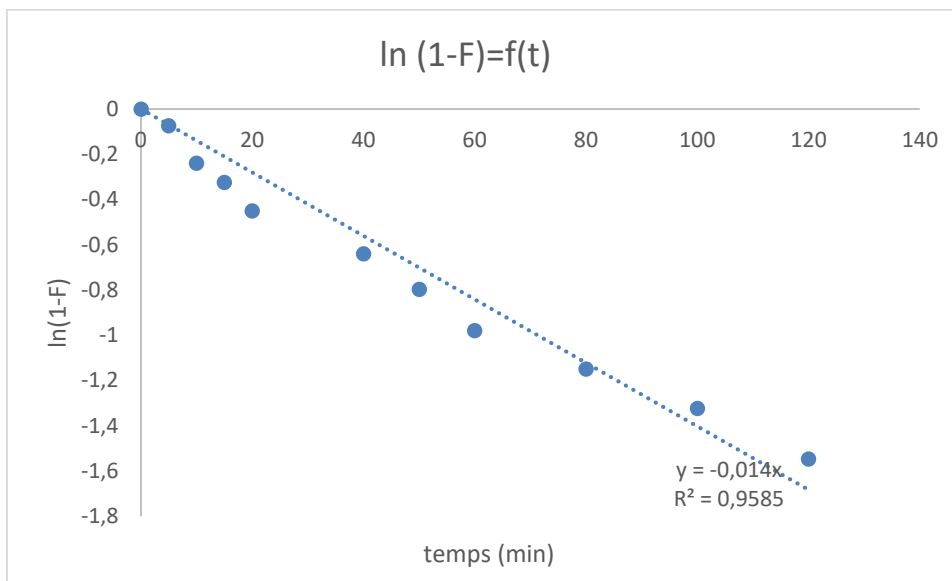


Figure 9: courbe obtenu pour le modèle d'ordre 1

Annexe 6 : résultats obtenus pour le modèle d'Higuchi

Tableau 11: calcul des paramètres du modèle d'higuchi

temps(min)	data	fit	SD				F=Kh*t^0,5	
0	0	0	0					
5	7,09334298	16,6855939	92,0112778					
10	21,3408104	23,5969932	5,09036073					
15	27,6685962	28,9002964	1,51708529			Kh	7,46202444	

20	36,2952243	33,3711878	8,54998946			Ssd	146,594925	
40	47,2850941	47,1939864	0,00830061				Colonne 1	Colonne 2
50	54,9609262	52,7644809	4,82437212			Colonne 1	1	
60	62,4341534	57,8005928	21,4698838			Colonne 2	0,99080208	1
80	68,2952243	66,7423756	2,41133905					
100	73,3748191	74,6202444	1,55108427					
120	78,7156295	81,7423823	9,16123208					

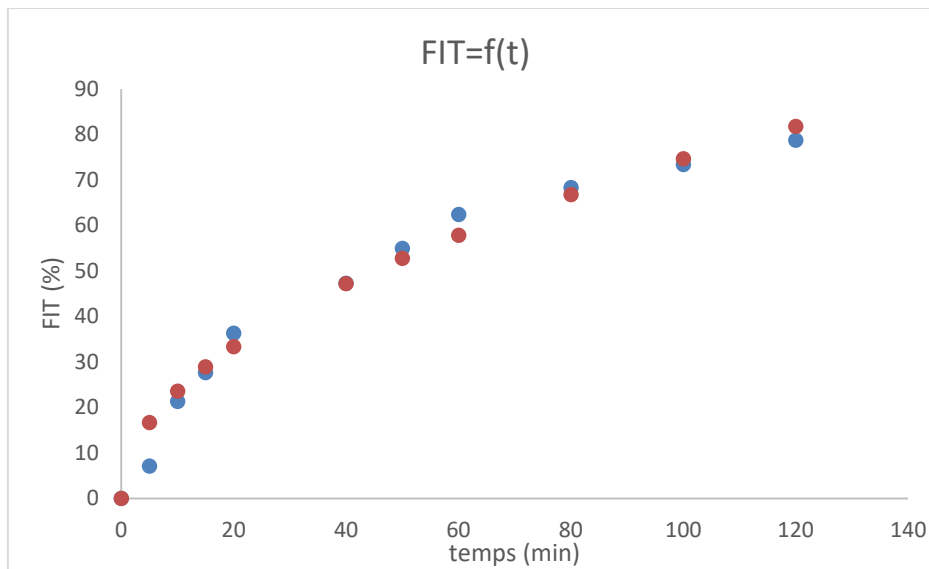


Figure 10: courbe obtenu pour le modèle d'higuchi

