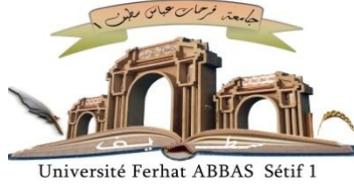


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS - SETIF 1
FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

THESE

Présentée au Département de Génie des Procédés
Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Option: Génie des procédés pharmaceutiques
Par

ZIDANE Salima

THÈME

Encapsulation de substances actives assistée par les
 β -Cyclodextrines

Soutenue le 24/07/2019 devant le Jury:

BAITICHE Milad	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Présidente
MAIZA Amor	M.C.A	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Directeur de thèse
BOUTAHALA Mokhtar	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Examineur
REFFAS Abd Elbaki	M.C.A	Univ. M^{ed} Boudiaf M'sila	Examineur
MAGHCHICHE Abdelhak	M.C.A	Univ. Hadj Lakhder Batna	Examineur
NASRI Ramdan	M.C.A	Univ. Frères Mentouri –Constantine	Examineur
CHEVALIER Yves	Professeur	Université de Claude Bernard Lyon-1	Invité

Note liminaire

Ce travail de thèse couvre deux thématiques différentes et est réparti en deux parties, partie Théorique comporte deux chapitres (I et II) et la Partie Pratique comporte trois chapitres (III, IV et V).

Les références bibliographiques sont mentionnées à la fin de chaque chapitre.

Une partie de ces travaux a fait l'objet de deux publications dans des journaux scientifiques internationaux, ainsi que deux communications internationales.

Publications

1. S. Zidane, A. Maiza, H.Boulegblem, B. Fenet Y. Chevalier, Inclusion complex of Tramadol in β -cyclodextrin enhances fluorescence by preventing self-quenching. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. (2018)

DOI: 10.1007/s10847-018-0874-1.

2. S. Zidane, A. Maiza, H.Boulegblem, W. Herizi and S. Dahmani, Investigation of Cyclodextrin Inclusion Compounds Using FT-IR, SEM and X-Ray Diffraction. *IJCEA* (2016)

DOI: 10.7763/2016V7.568

Communications internationales

1. S. Zidane, A. Maiza, H.Boulegblem,, Spectral characteristics of Hydrochlorothiazide in β -Cyclodextrin 2nd international conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials. The Negresco, Nice, France. October 15-17 (2014)
2. S. Zidane, A. Maiza, H.Boulegblem, Investigation of cyclodextrin inclusion compounds using FT-IR, SEM and X-Ray diffraction. Paris, France. September 15-16. (2014)

Mes travaux de thèse se sont déroulés au laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) à l'université Claude Bernard Lyon 1- France, au sein de l'équipe de Chimie. J'ai donc eu la chance d'utiliser en routine un grand nombre d'équipements d'analyse et de synthèse mais surtout de travailler et d'apprendre auprès de nombreux collègues.

Mes premiers remerciements vont à M. Amor Maiza maître de conférences à l'université de Farhet Abbes-Sétif 1, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche de manière perfectionnée et minutieuse.

Je tiens ensuite à remercier le professeur Yves Chevalier de l'université Claude Bernard Lyon 1, France, de m'avoir encadrée et soutenue le long de mon stage et après le stage et jusqu'à aujourd'hui. Je le remercie de m'avoir tant appris sur les domaines d'expertises et pour toutes ses grandes qualités humaines, en particulier, sa patience, son écoute, sa gentillesse et sa grande disponibilité. Je retiendrai les heures de discussion pour comprendre les mystères du fonctionnement des complexes hôte-invité et je lui suis très reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet complet et varié pour lequel j'ai eu la chance de réaliser toutes les étapes, de la synthèse à l'application des systèmes étudiés.

Merci également à madame Milad Djerboua née Baitiche, professeure à l'université de Sétif de m'avoir honorée d'accepter de présider le jury. Je tiens également à remercier Mr Mokhtar Boutahala, professeur à l'université de Sétif pour l'effort consenti à juger mon travail, Je suis reconnaissante à Messieurs Abd Elbaki Reffas, maître de conférences à l'université de M'sila, Maghchiche Abdelhak, maître de conférences à l'université Hadj Lakhder Batna et Nasri Ramdan, maître de conférences à l'université de Constantine d'avoir bien voulu se déplacer pour participer au jury de soutenance. Je leur exprime ma gratitude pour le temps consacré à lire et à juger mon travail. Je remercie, également, le professeur Yves Chevalier, l'invité d'honneur, d'avoir accepté mon invitation à la soutenance de thèse.

Je voudrais remercier M. Hatem Fassi le directeur du laboratoire LAGEP de m'avoir accueillie dans son laboratoire et M. Bernard Fenet responsable du Centre Commun de RMN, Université Claude Bernard Lyon 1, France, pour toute l'aide qu'il m'a apportée quant à l'interprétation des résultats grâce à son œil expert et avisé et pour sa motivation à toute épreuve, véritable source d'énergie en cas de période creuse. Je voudrais adresser mes remerciements à Madame Géraldine Agusti, responsable des analyses et instrumentation. Je voudrais remercier, également, M. Jean-Pierre Valour, responsable du service ingénierie de projets et M. Olivier Garrigues, responsable informatique, université Lyon 1- LAGEP, France pour la confiance qu'ils m'ont apportée et pour le sourire permanent.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes qui ont eu l'occasion de m'aider au cours de ces années, que ce soit à LAGEP, à l'université de M'sila ou à l'université de Sétif.

Et pour finir je voudrais remercier ma famille et en particulier mon mari Hocine Bouleghlem enseignant à l'université Med Boudiaf M'sila pour m'avoir aidée, soutenue et encouragée, pendant les mois compliqués de la rédaction ; ma mère, mes trois enfants (Maher, Hanine et Racim Montassir) et mes amies et surtout Dr Mouna enseignante à l'université 8 mai 1945 Guelma, pour tout leur soutien pendant cette aventure.

A l'esprit de mon fils Rassime Ziad

Note liminaire	I
Remerciements.....	II
Dedicace.....	III
Résumé.....	VIII
Abstract.....	IX
المخلص	X
Liste des abréviations	XI
Liste des figures.....	XIII
Liste des tableaux.....	XVII
Introduction générale.....	1
Références bibliographique.....	4

Partie Théorique

Chapitre .I. Généralité sur les Cyclodextrines

I.1 Introduction.....	6
I.2. Cyclodextrines.....	7
I.2.1. Découverte, Historique et Production.....	7
I.2.2. Nomenclatures des CDs.....	10
I.2.3. L'intérêt des cyclodextrines.....	11
I.2.4. Structure et caractéristiques physicochimiques.....	11
I.2.5. Caractéristiques physicochimiques.....	14
I.2.6. Caractéristiques des CDs en RMN ¹ H.....	16
I.3. Cyclodextrines Modifiées.....	18
I.3.1. Difficultés des Modifications.....	18
I.3.2. Exemples de CDs modifiées.....	19
I.4. Domaines d'application des cyclodextrines.....	19
I.4.1 Augmentation de la stabilité.....	19
I.4.2. Masquage du goût et de l'odeur.....	20
I.4.3 Augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité.....	20
I.4.4. Diminution des effets indésirables.....	20
I.4.5. Ciblage moléculaire.....	21
I.4.6. Vectorisation de principes actifs par les CD.....	21
I.5. Toxicité des cyclodextrines.....	21
I.6. Conclusion.....	22
Références bibliographique.....	23

Chapitre .II.

Complexes d'inclusion à base des Cyclodextrines

II.1 Introduction.....	29
II.2. Complexes d'inclusion	29
II.2.1 Complexation en solution.....	29
II.2.2 Complexation en phase solide.....	29
II.2.3 Complexation par malaxage.....	30
II.2.4 Complexation par mélange physique	30
II.3. Inclusion- Complexation.....	30
II.3.1. Formation.....	30
II.3.2. Energies mises en cause.....	31
II.3.3. Structure et stœchiométrie du complexe d'inclusion.....	32
II.3.4. Techniques d'analyses des complexes d'inclusion.....	33
II.3.4.1. A l'état liquide	34
II.3.4.1.1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	34
II.3.4.1.1.1. L'expérience COSY.....	35
II.3.4.1.1.2. L'expérience HSQC.....	35
II.3.4.1.1.3. L'expérience HMBC.....	36
II. 3.4.1.2. Mesure de la solubilité (diagramme de solubilité).....	37
II. 3.4.1.3. Spectroscopie UV.....	40
II. 3.4.1.4. Spectrométrie de Masse.....	40
II. 3.4.1.5. Microcalorimétrie.....	41
II. 3.4.1.6. Solubilité différentielle.....	41
II.3.4.2. A l'état solide.....	42
II.3.4.2.1. Diffraction des rayons x.....	42
II.3.4.2.2. Spectroscopies vibrationnelles: FT-IR et Raman.....	42
II.3.4.2.3. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC).....	43
II.3.4.2.4. Microscopie à balayage électronique.....	43
II.4. Conclusion.....	45
Références bibliographique.....	46

Partie Pratique

Chapitre. III

L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

III.1. Introduction.....	50
III.2. Etude structural du Tramadol.....	51
III.3. Propriétés pharmacodynamiques du Tramadol.....	52
III.4. Optimisation théorique et multi-paramètres du Tramadol.....	55
III.4.1. Représentation des calculs drug-like sur la base de Lipinski.....	55
III .5. Produits chimiques et méthodes.....	59
III.5.1.Produits chimiques.....	59
III.5.2. Méthodes.....	59

III.6. Complexes d'inclusion.....	61
III.6.1. Formation des complexes d'inclusion.....	61
III.6.1.1. Mélange physique (M Ph).....	61
III.6.1.2. Méthode de malaxage (Kneading Méthode) (M Kn).....	61
III.6.1.3. Méthode d'évaporation sous vide (M EV).....	62
III.6.1.4. Méthode par l'irradiation micro-ondes (M MO).....	62
III.6.2. Etude des complexes d'inclusion à base des cyclodextrines.....	62
III.6.2.1. Caractérisation de la β -CD et du Tramadol avant la complexation par la spectrométrie IR.....	62
III.6.2.2. Caractérisation des complexes d'inclusion (Tramadol : β -CD) par IR.....	63
III.6.2.3. Caractérisation du complexe d'inclusion (Tramadol : β -CD) par les RX.....	67
III.6.2.4. Caractérisation du complexe d'inclusion (Tramadol : β -CD) par le MEB.....	68
III.6.2.5. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	70
III.6.2.6. Étude des complexes d'inclusion du Tramadol et de β -CD par RMN ¹ H.....	71
III.6.2.6.1. Détermination de la constante de complexation du Tramadol avec la β -CD.....	71
III.6.2.6.2. Propriétés d'absorbance et de fluorescence du Tramadol.....	80
III.6.2.6.3. Schéma de correction pour l'effet de filtre interne.....	83
III.6.2.6.4. Mise en évidence de l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol à des concentrations élevées.....	88
III.6.2.6.5. Influence de la complexation par la β -CD.....	91
III.6.3. Conclusion.....	98
Références bibliographique.....	99

Chapitre. IV

Formation des complexes d'inclusion

IV.1. Introduction.....	106
IV.2. HCTZ.....	107
IV.2.1. Propriétés pharmacodynamiques d'HCTZ.....	107
IV.2.2. Évaluation du profil du HCTZ par les règles de Lipinski.....	108
IV. 3. Etudes des complexes d'inclusion.....	110
IV. 3.1. Matériels et réactifs.....	110
IV.3.2. Formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD).....	110
IV.3.3. Caractérisation de la β -CD et HCTZ avant la complexation par la Spectrométrie IR.....	111
IV.3.4. Caractérisation du mélange physique formé par IR.....	113
IV.3.5. Caractérisation des complexes d'inclusion formés par les trois méthodes par IR.....	114
IV. 3.6. Caractérisation par les RX du complexe d'inclusion préparé par irradiation sous micro-onde.....	119
IV.3.7. Suivi de la formation du complexe (HCTZ : β -CD) de stœchiométrie variante dans le D ₂ O (tampon phosphate pH=7.4) par RMN ¹ H.....	120
IV.3.7.1. Caractérisation par la résonance magnétique nucléaire des protons (RMN ¹ H).....	121
IV. 4. Acétylation totale des groupements hydroxyles de β -CD par Anhydride acétique.....	126
IV.4.1. Méthode d'acétylation par l'irradiation via micro-onde (<i>technique moderne</i>).....	126
IV.4.1.1. Caractérisation de l'Heptakis (2,3,6-tri- <i>O</i> -acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β CD) par IR.....	127
IV.4.2. Méthode d'acétylation par chauffage classique (reflux).....	128
IV.4.2.1. Identification d'Heptakis (2,3,6-tri- <i>O</i> -acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β -CD) obtenus via chauffage classique par IR.....	129
IV.4.2.2. Caractérisation d'Heptakis (2,3,6-tri- <i>O</i> -acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β -CD) par les RX..	130

IV.5. Formation des complexes d'inclusion (HCTZ : Ac- β -CD).....	131
IV.5.1. Formation de complexe d'inclusion avec l'Ac- β -CD par l'irradiation via micro-onde.....	131
IV.5.2. Identification des complexes d'inclusion de (HCTZ : Ac- β -CD) par IR.....	131
IV.5.3. Identification du complexe d'inclusion de (HCTZ : Ac- β CD) par les RX.....	133
IV.6. Conclusion	134
Références bibliographique.....	135

Chapitre. V
Etude de la solubilité de HCTZ

V.I. Introduction.....	137
V. 2. Vérification de la loi de Béer-Lambert.....	137
V. 2.1. Vérification de la loi de Béer-Lambert et calcul de coefficient d'absorption moléculaire (ϵ).	137
V. 2.1.1. Préparation des solutions.....	137
V. 2.1.2. Calcul de coefficient d'absorption moléculaire (ϵ).....	139
V.3. Etude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de différents agents complexant	139
V. 3.1. Préparation des solutions.....	139
V. 3.2. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de β -CD.....	140
V. 3.2.1. Calcul de la constante de stabilité du complexe (HCTZ : β -CD).....	142
V. 3.3. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de HP- β CD.....	144
V.3.3.1. Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : HP- β CD).....	146
V.3.4. Calcul de l'énergie libre de transfert (ΔG°) pour le procédé de solubilisation de HCTZ dans des solutions aqueuses de β -CD et/ou de HP- β CD.....	147
V.3.5. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de PEG1000.....	148
V. 3.5.1. Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : PEG 1000).....	150
V. 3.6. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de PEG 3500.....	151
V.3.6.1. Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : PEG 3500).....	153
V.3.7. Calcul de l'énergie libre de transfert (ΔG°) pour le procédé de solubilisation de HCTZ dans des solutions aqueuses de PEG 1000 et de PEG 3500.....	154
V.4. Comparaison entre les différentes substances de complexation (β -CD, HP- β CD, PEG1000, PEG3500).....	155
V.5. Conclusion.....	156
Références bibliographique.....	157
Conclusion générale.....	158

Les résultats obtenus montrent que les β -CDs sont capables d'encapsuler le Tramadol et la meilleure méthode d'encapsulation est l'irradiation via micro-onde. Les meilleurs ajustements des spectres aux données expérimentales pour toutes les lignes de RMN sur toute la gamme de concentration ont montrés que le complexe avait une stœchiométrie [1:1] avec une constante d'équilibre $K_{11} = 260 \pm 10$ à 20°C. La complexation du Tramadol par la β -CD ne provoque pas de modification de ses spectres d'absorbance et de fluorescence. L'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol au-dessus de $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a été caractérisée par une constante de Stern-Volmer $K = 810 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. L'inhibition de l'auto-extinction par la formation d'un complexe d'inclusion s'est manifestée par de faibles constantes de Stern-Volmer en présence de β -CD

La β -CD et l'Ac- β -CD ont modifié les propriétés cristallographiques d'HCTZ. Ce changement a été attribué à la formation du complexe d'inclusion. La complexation à l'aide de la HP- β CD ($K_s=846,72 \text{ M}^{-1}$) et la dispersion dans le PEG 1000, peut être une alternative dans l'optique de la résolution des lacunes d'HCTZ, à savoir son insolubilité et sa mauvaise biodisponibilité.

Mots clés : Auto-extinction, β -CD, HCTZ, irradiation via micro-onde, PEG, solubilité, Tramadol.

The results obtained show that the β -CDs are capable of encapsulating Tramadol and the best encapsulation methods are irradiation's via microwave. The best spectral fit to experimental data for all NMR lines over the entire concentration range showed that the complex had [1: 1] stoichiometry with an equilibrium constant $K_{11} = 260 \pm 10$ at 20°C. Complexation of Tramadol by β -CD does not cause modification of its absorbance and fluorescence spectra. Fluorescence self-quenching of Tramadol above 1 mmol.L⁻¹ was characterized by a Stern-Volmer constant $K = 810 \text{ L.mol}^{-1}$. Inhibition of self-quenching by formation of an inclusion complex was manifested by lower Stern-Volmer constants in the presence of β -CD.

β -CD and Ac- β CD have modified the crystallographic properties of HCTZ and we can attribute this change to the formation inclusion complex. Complexation using HP- β CD ($K_s = 846.72 \text{ M}^{-1}$) and dispersion in PEG 1000, may be an alternative in terms of resolution shortcomings of HCTZ, namely its insolubility and poor bioavailability.

Keywords : Self-quenching, β -CD, HCTZ, microwave irradiation, PEG, solubility, Tramadol.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن بيتا دكسترين حلقي قادر على تغليف الترامادول ، وأفضل طريقة للتغليف هي الإشعاع عبر الميكروويف. أظهرت أفضل التعديلات الطيفية للبيانات التجريبية لجميع خطوط الرنين المغناطيسي النووي عبر نطاق التركيز أن المعقد كان معاملته ستوكيومتري [1 : 1] مع ثابت التوازن $K_{11} = 260 \pm 10$ عند 20 درجة مئوية .

لا يسبب تعقيد الترامادول بواسطة بيتا سكلوكسترين حلقي أي تغيير في أطراف الامتصاص والإشعاع. الانقراض الذاتي لإشعاع الترامادول فوق 1 ملمول/ل تم تمييزه بواسطة ثابت ستيرن فولمار الذي يساوي 810 ل/مول . وقد تجلى تثبيط الانقراض الذاتي عن طريق تكوين معقد بواسطة ثوابت ستيرن فولمر ذات قيم ضعيفة في وجود بيتا سكلودكسترين حلقي.

البيتا دكسترين حلقي والاستيل بيتا دكسترين حلقي غيروا خصائص البلورات للهيدروكلوروتيازيد. هذا التغيير راجع إلى تشكيل مجمع إدراج. قد يكون التعقيد باستخدام هيدروكسي بروبيل دكسترين حلقي ذو ثابت ذوبانية يساوي 846.72 مول⁻¹ والتشتت في البولي ايثيلان جليكول 1000 بديلاً في ضوء حل عيوب الهيدروكلوروتيازيد ، أي عدم قابليته للذوبان وتوافره البيولوجي الضعيف.

الكلمات المفتاحية: الانقراض الذاتي ، البيتادكسترين حلقي ، الهيدروكلوروتيازيد ، إشعاع الميكروويف ، البولي ايثيلان جليكول ، ذوبانية ، ترامادول.

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
API	Ionisation chimique à Pression Atmosphérique
AT1	Antagonistes des récepteurs de l'Angiotensine II
β-CD	Béta Cyclodextrine
β-CD acétylé	Beta Cyclodextrine acétylé
BCS	Système de Classification Biopharmaceutique
CDs	Cyclodextrines
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (CDB) (Differential Scanning Calorimetry)
EFI	Effet de Filtre Interne
EFIP	Effet de Filtre Interne Primaire
EFIS	Effet de Filtre Interne Secondaire
ESI	Ionisation par Electronébulisation (Electrospray ionisation)
FDA	Agence américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux (Food and Drug Administration)
HCTZ	Hydrochlorothiazide
HMBC	Spectroscopie par Corrélation de Liaisons Multiples Hétéronucléaires
HP- β-CD	Hydroxypropyl béta Cyclodextrine
IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
IR	Infra Rouge
IPAP-HSQC	Spectroscopie de Corrélation Mononumérique Hétéronucléaire
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
<i>J</i>	Constante de Couplage
Log P	Lipophile
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MPO	Optimisation théorique et Multi-Paramètres
N Accep ALH	Nombre d'Accepteurs de Liaisons Hydrogène
N Donn DLH	Nombre de Donneurs de Liaisons Hydrogène
ODT	<i>O</i> -Desméthyltramadol
PA	Principe actif
PEG	Polyéthylène glycol
PSA	Surface Polaire
Rdt	Rendement

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN 2D	Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire en Deux Dimensions
RX	Rayons X
TGI	Tractus Gastro-Intestinal
TOCSY	Spectroscopie de Corrélation Totale
UCD	United States Dollar
UV	Ultra-Violet
VM	Volume Moléculaire
α-CGTase	Alfa Cyclodextrin Glycosyltransferase
β-CGTase	Béta Cyclodextrin Glycosyltransferase
γ-CGTase	Gamma Cyclodextrin Glycosyltransferase
Δ	Déplacement Chimique
3D	Tridimensionnelle

Chapitre. I

Généralités sur les cyclodextrines

Fig.I.1. Structure tridimensionnelle de quelques molécules cages : Clathrates (a), Ethers couronnes (b), Sphérants (c) et Cyclodextrines (d).....	6
Fig.I.2. Schéma général de la dégradation enzymatique de l'amidon (A) et structure chimique des CDs (B).....	8
Fig.I.3. Nombre de publications parues sur les Cyclodextrines en fonction des quatre phases de développement des Cyclodextrine.....	11
Fig.I.4. Représentation schématique des CDs.....	12
Fig.I.5. Structure tridimensionnelle des différentes cyclodextrines naturelles (de bas en haut α -CD, β -CD et γ -CD).....	13
Fig.I.6. Structure simplifiée montrant la forme tronconique (forme spatiale).....	14
Fig.I.7. Numérotation des protons d'une unité glucose.....	14
Fig.I.8. Représentation d'une unité glucosidique (unité glucose en 1→4) en conformation chaise.....	16
Fig.I.9. Spectre RMN 1H de la β -CD dans D ₂ O.....	17
Fig.I.10. Spectre RMN 13C de la β -CD dans D ₂ O.....	17
Fig.I.11. Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs. Les groupes hydroxyle se situent aux positions 2, 3 et 6 de chaque unité glucose.....	18

Chapitre II

Complexes d'inclusion à base des Cyclodextrines

Fig.II.1. Exemple de formation du complexe d'inclusion (a) et Représentation schématique à 3D de la formation d'un complexe d'inclusion (b).....	31
Fig.II.2. Représentation schématique des différents types de complexes d'inclusion de cyclodextrine.....	33
Fig.II.3. COSY de la β -CD native dans D ₂ O.....	35
Fig.II.4. Spectre HSQC de la β -CD native.....	36
Fig.II.5. Spectre HMBC du citronellol dans l'acétone.....	36
Fig.II.6. Types de diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors.....	37
Fig.II.7. Courbe de la solubilité S_t en fonction de la concentration cyclodextrine $[CD]_t$	39
Fig.II.8. Influence de l'addition de la β -cyclodextrine sur le spectre UV d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 95 μ M et à pH = 5.....	40
Fig.II.9. Spectres obtenus par diffraction des rayons X d'un principe actif, l'ibuprofène (sel de trométhamine (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).....	42
Fig.II.10. Spectres FT-IR d'un principe actif, la cladribine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP- β -cyclodextrine.....	43
Fig.II.11. Images MEB d'un principe actif, l'ibuprofène (le sel de trométhamine) (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).....	44

Chapitre. III

L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Fig.III.1. <i>Nauclea latifolia</i> , fruit et fleur.....	52
Fig.III.2. Structure moléculaire du Tramadol, de la codéine et de la morphine de gauche à droite.....	52
Fig.III.3. Structure des énantiomères (1R, 2R)-Tramadol et (1S, 2S)-Tramadol.....	53
Fig.III.4. O-Desméthyltramadol (ODT).....	53
Fig.III.6. Règles de Lipinski appliquées au Tramadol.....	57
Fig.III.7. Variation de la biodisponibilité en fonction de Log P de différents médicaments.....	58
Fig.III.8. Spectre IR de β -CD et du Tramadol avant la complexation.....	63
Fig.III.9. Spectre IR du Tramadol, β -CD et (Tramadol: β -CD M Ph).....	64

Fig.III.10. Spectre IR des complexes: (Tramadol: β -CD M ph), (Tramadol: β -CD VE), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M).....	65
Fig.III.11. Spectres IR des complexes: (Tramadol: β -CD M Ph), (Tramadol: β -CD VE), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M) dans la gamme [2000 - 4000] cm^{-1}	66
Fig.III.12. Spectres IR des complexes: (Tram: β -CD M Ph), (Tram: β -CD VE), (Tram: β -CD MO) et (Tram: β -CD KnM) dans la gamme [2200 - 3000] cm^{-1}	66
Fig.III.13. Spectres IR des complexes: (Tramadol: β -CD M Ph), (Tramadol: β -CD VE), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M) dans la gamme [1550 - 1650] cm^{-1}	67
Fig.III.14. Diffractogramme des RX de β -CD, Tramadol et des complexes (Tramadol: β -CD M Ph), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD KnM).....	68
Fig.III.15. Photographie de microscope électronique à balayage de (a) Tramadol (500 \times), (b) Tramadol (1000 \times), (c) (Tramadol : β -CD MO) (500 \times), (d) (Tramadol : β -CD MO) (3000 \times), (e) β -CD (1000 \times) et (f) β -CD (3000 \times).....	69
Fig.III.16. Spectres RMN ^1H et attribution des raies RMN de β -cyclodextrine (a) et du Tramadol (b).....	72
Fig.III.17. Tracé de contour 2D de l'expérience IPAP-HSQC-TOCSY sur une solution de Chlorhydrate de Tramadol (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dans D_2O	75
Fig.III.18. Variation des spectres RMN ^1H par rapport au rapport molaire β -CD/Tramadol croissant de bas en haut entre [1/10] et [10/1].....	76
Fig.III.19. Variation des déplacements chimiques de l'RMN ^1H par rapport aux concentrations relatives de Tramadol et de β -CD.....	79
Fig.III.20. Spectre d'absorption du Tramadol à plusieurs concentrations.....	81
Fig.III.21. Spectres de fluorescence du Tramadol (0,01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) pour les longueurs d'onde d'excitation de 216 nm et 271 nm.....	82
Fig.III.22. Émission de la fluorescence à 297 nm pour des solutions aqueuses de chlorhydrate de Tramadol à différentes concentrations dans une cuve carrée en quartz de $1 \times 1 \text{ cm}^2$	85
Fig.III.23. Émission de fluorescence de solutions de Tramadol à différentes concentrations et meilleur ajustement des équations 11 et 13 aux données expérimentales en utilisant les paramètres indiqués dans le texte (trait plein). La ligne pointillée montre la prédiction sans auto-extinction ($K = 0$).....	89
Fig.III.24. Émission de fluorescence pour les mesures effectuées dans des ouvertures réduites arrêtant une partie des faisceaux d'excitation ou d'émission.....	91
Fig.III.25. Gauche: Spectres d'absorption de la solutions de Tramadol $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en présence de β -CD à des rapports molaires croissants (β -CD)/[Tramadol]: 0 (noir), 0,25 (rouge), 0,5 (vert), 1,0 (bleu), 1,5 (cyan), 2,5 (magenta), 5,0 (orange). À droite: Spectres d'absorption des solutions de Tramadol $3,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans divers solvants: eau (noir), méthanol (rouge), éthanol (vert) et 2-propanol (bleu).....	92
Fig.III.26. Emission de fluorescence à 297 nm en fonction de la concentration en Tramadol pour une concentration constante de β -CD = 12 mM (points rouges) par rapport au Tramadol pur (points bleus).....	95
Fig.III.27. Emission de la fluorescence de Tramadol à 297 nm en fonction de la concentration en β -CD. Losanges verts: [Tramadol] = 0,1 mM; Carrés bleus: [Tramadol] = 0,01 mM; Cercles rouges: [Tramadol] = 3,0 mM.....	96

Chapitre. IV

Formation des complexes d'inclusion

Fig.IV.1. Structure chimique de la Benzoxazole (a), de l'HCTZ (b), de la Chlorothiazide (c) et de la thiazide (d).....	107
Fig.IV.2. Règles de Lipinski appliquées au HCTZ.....	109
Fig.IV.3. Spectre infrarouge de la β -CD native.....	111
Fig.IV.4. Spectre infrarouge de l'HCTZ dans le KBr.....	112
Fig.IV.5. Spectre IR de HCTZ, β -CD et le mélange physique (HCTZ: β -CD M Ph) [1 : 1].....	113

Fig.IV.6. Spectre IR de β -CD, HCTZ et des complexes formés: (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE).....	114
Fig.IV.7. Spectres IR des complexes: (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE) dans la gamme [500 - 1000] cm^{-1}	117
Fig.IV.8. Spectres IR des complexes: (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE) dans la gamme [1000 - 1500] cm^{-1}	117
Fig.IV.9. Spectres IR des complexes: (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE) dans la gamme [1560 - 1640] cm^{-1}	118
Fig.IV.10. Spectre IR des complexes: (HCTZ: β -CD M Ph), (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE) dans la gamme [1500 - 2000] cm^{-1}	118
Fig.IV.11. Spectres IR des complexes: (HCTZ: β -CD MO), (HCTZ: β -CD KnM) et (HCTZ: β -CD VE) dans la gamme [2800 - 3500] cm^{-1}	119
Fig.IV.12. Diagrammes de diffraction des rayons X du β -CD (a) et du complexe (HCTZ: β -CD MO) (b) et de HCTZ (c).....	120
Fig.IV.13. Les deux protons internes H-3 et H-5 présentés dans une unité glucosidique de β -CD.	121
Fig.IV.14. Schéma représente les différents protons de HCTZ.....	121
Fig.IV.15. Variation du proton H-3 du complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D_2O (pH=7.4, RMN ¹ H, 500 MHz).....	123
Fig.IV.16. Variation du proton H-5 du complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D_2O (pH=7.4, RMN ¹ H, 500 MHz).....	124
Fig.IV.17. Variation des protons H-a et H-b de HCTZ dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D_2O (pH=7.4, RMN ¹ H, 500 MHz).....	125
Fig.IV.18. Variation du proton de l'hétérocycle thiazidique dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D_2O (pH=7.4, RMN ¹ H, 500 MHz).....	125
Fig.IV.19. Acétylation de la β -CD par Anhydride acétique par l'irradiation via micro-onde.	126
Fig.IV.20. Spectre IR du β -CD et Ac- β -CD obtenue par chauffage moderne (MO).....	127
Fig.IV.21. Acétylation de la β -CD par Anhydride acétique via chauffage classique.....	128
Fig.IV.22. Spectre IR de β -CD et Ac- β CD synthétisée par chauffage classique.....	129
Fig.IV.23. Spectre IR d'Ac- β CD par chauffage moderne (a) et Ac- β CD chauffage classique(b)	130
Fig.IV.24. Diagrammes de diffraction des rayons X Ac- β CD (a) et β -CD (b).....	130
Fig.IV.25. Spectre IR du HCTZ(a), complexe (HCTZ : Ac- β CD) (b) et le Ac- β CD (c).....	131
Fig.IV.26. Diagrammes de diffraction des rayons X du complexe (HCTZ : Ac- β -CD) (a), Ac- β -CD (b), et HCTZ (c).....	133

Chapitre. V

Etude de la solubilité de HCTZ

Fig.V.1. Spectre UV du HCTZ à différentes concentrations.....	138
Fig.V.2. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du HCTZ.....	138
Fig.V.3. Courbe de tendance du spectre de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du HCTZ.....	139
Fig.V.4. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à différentes concentrations	140
Fig.V.5. Spectre d'Absorbance en fonction de la concentration de β -CD.....	141
Fig.V.6. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à température ambiante (25°C)	142
Fig.V.7. Courbe de tendance du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à température ambiante.....	143
Fig.V.8. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de HP- β CD à différentes concentrations.....	144
Fig.V.9. Absorbance en fonction de la concentration de HP- β CD.....	145
Fig.V.10. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP- β CD à température ambiante.....	146
Fig.V.11. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP- β CD à température ambiante.....	147

Fig.V.12. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG1000 à différentes concentrations.....	149
Fig.V.13. Absorbance en fonction de la concentration de PEG 1000.....	149
Fig.V.14. Phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG1000 à température ambiante.....	150
Fig.V.15. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 à température ambiante.....	151
Fig.V.16. Absorbance en fonction de la concentration de PEG3500.....	152
Fig.V.17. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG3500 à température ambiante.....	153
Fig.V.18. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 3500 à température ambiante.....	154

Chapitre. I
Généralités sur les cyclodextrines

Tableau.I.1. Résumé de l'historique des cyclodextrines.....	9
Tableau.I.2. Prix par kilogramme de différentes cyclodextrines.....	10
Tableau.I.3. Principales caractéristiques physico-chimiques de l' α -, β - et γ -cyclodextrine.....	15
Tableau.I.4. Attribution de RMN ^1H et de RMN ^{13}C de la β -CD dans D_2O	18

Chapitre. III
L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Tableau.III.1. Inhibition de la liaison des opioïdes et monoamines par le Tramadol (\pm), ses énantiomères (+/-) et M1 à partir de préparations de cerveau de rat.....	55
Tableau. III.2. Valeurs seuils des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle de Lipinski.....	56
Tableau.III.3. Évaluation des paramètres de Tramadol en utilisant le serveur molinspiration.....	56
Tableau.III.4. Analyse DSC du mélange physique (Tramadol: β -CD) et les complexes formés	70
Tableau.III.5. Comparaison entre les méthodes de formation des complexes d'inclusion.....	71
Tableau.III.6. Attribution de lignes RMN ^1H de chlorhydrate du Tramadol et de β -CD.....	73
Tableau.III.7. Constante d'équilibre K_{11} du complexe [1:1] et les valeurs des déplacements chimiques du RMN ^1H du Tramadol et du β -CD sous leurs formes libres et complexées.....	80

Chapitre. IV
Formation des complexes d'inclusion

Tableau.IV.1. Prédiction de la règle de Lipinski d'HCTZ.....	108
Tableau.IV.2. Comparaison entre les méthodes de formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD).....	110
Tableau.IV.3. Nombre d'ondes fondamentales et propositions d'attribution du β -CD.....	112
Tableau.IV.4. Nombre d'ondes fondamentales et propositions d'attribution du HCTZ.....	113
Tableau.IV.5. Comparaison entre le nombre d'onde des principaux groupes de β -CD... libre et dans les complexes d'inclusion (HCTZ: β -CD) [1/1].....	115
Tableau.IV.6. Comparaison entre le nombre d'onde de HCTZ libre et HCTZ dans le complexe d'inclusion (HCTZ: β -CD) [1/1].....	116
Tableau.IV.7. Déplacements chimiques des protons de β -CD et HCTZ dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante pH=7.4 (RMN 500 MHz, D_2O , pH=7.4).....	122
Tableau.IV.8. Comparaison et déplacement des bandes d'absorption IR de l'HCTZ libre ou associé au complexe (HCTZ : Ac- β CD) préparé par l'irradiation via micro-onde.....	132
Tableau.IV.9. Comparaison et déplacement des bandes d'absorption IR de l'Ac- β CD seule ou associée au complexe (HCTZ : Ac- β CD) préparé par l'irradiation via micro-onde.....	132

Chapitre. V
Etude de la solubilité de HCTZ

Tableau.V.1. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de β -CD.....	140
Tableau.V.2. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de HP- β CD.....	144
Tableau.V.3. Energie libre de Gibbs (ΔG°) pour le processus de solubilisation de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD et/ou HP- β CD à 25°C.....	148
Tableau.V.4. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG 1000.....	148
Tableau.V.5. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG3500.....	152
Tableau.V.6. Energie libre de Gibbs (ΔG°) pour le processus de solubilisation de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 et/ou PEG 3500 à 25°C.....	154
Tableau.V.7. Les rapports et les constantes de solubilités de chaque agent complexant.....	155

Introduction Générale

La chimie joue un rôle central tant par sa place au sein des sciences de la nature et de la connaissance que par son importance économique et son omniprésence dans notre vie quotidienne. Elle contribue de façon déterminante aux besoins de l'humanité en nourriture et en médicament, en vêtements et en habitations, en énergie et en matières premières et en transport. La chimie est aussi une industrie, du produit de grand tonnage à la haute technologie la plus innovante, des nanomatériaux aux molécules thérapeutiques finement ciblées [1].

Depuis environ deux siècles, la chimie moléculaire a édifié un vaste ensemble de molécules et de matériaux de plus en plus sophistiqués. De la synthèse de l'urée en 1828 [2] à l'achèvement, dans les années 1970, de la synthèse de la vitamine B12 [3-5], cette discipline n'a cessé d'affirmer son pouvoir sur la structure et la transformation de la matière.

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, appelé chimie supramoléculaire, implique des liaisons dites faibles (forces électrostatiques, liaisons hydrogène, forces de Van der Waals) entre les molécules, contrairement aux atomes qui, eux, font intervenir des liaisons de covalence (liaisons fortes) par mise en commun d'électrons. La majorité de ces interactions sont du type hôte-invité ou complexe d'inclusion, dont les cyclodextrines font parties des hôtes les plus intéressants.

Depuis leur découverte en 1891 par Villiers [6], 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 un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : solubilité dans l'eau, la réactivité, stabilité, amélioration de la fluorescence lorsque le fluorophore est impliqué en complexation, etc. Les cyclodextrines ont été modifiées structurellement et largement étudiées pour la complexation d'une grande variété de molécules organiques [7,8] ; En dehors de l'amélioration de la fluorescence entraînée par la mobilité restreinte, un autre mécanisme est l'inhibition de l'extinction. Ainsi, la complexation de l'espèce fluorescente par β -CD fait une barrière stérique contre la proximité des extincteurs [9-14]. Un phénomène en relation qui n'a pas reçu d'attention jusqu'ici est l'auto-extinction qui a lieu à des concentrations élevées de molécules fluorescentes. Une partie de cette thèse porte sur ce dernier point en utilisant le chlorhydrate de Tramadol comme molécule fluorescente. D'un autre côté, l'amélioration de l'absorption par voie orale des

principes actifs non hydrosolubles est l'un des défis les plus fréquents et les plus importants pour les scientifiques de la formulation dans l'industrie pharmaceutique, en raison de la production à grande échelle de substances actives nouvellement synthétisées souffrant de solubilité limitée dans l'eau. Par conséquent beaucoup d'efforts ont été fait pour augmenter la dissolution des médicaments pour cette classe de composés, comme la classe II et la classe IV [15] de la classification (BCS) où les médicaments ont une faible solubilité et une faible perméabilité après administration orale.

Différents tensioactifs et complexes d'inclusion ont été utilisés pour améliorer la solubilité et la stabilité et, par conséquent augmenter de la biodisponibilité globale de différents principes actifs. La deuxième partie de cette thèse s'intéresse à la formation des complexes d'inclusion entre Hydrochlorothiazide (HCTZ) qui est un antihypertenseur peu soluble dans l'eau et les CDs (β -CD et/ou Ac- β CD). Dans ce contexte, nous avons proposé une nouvelle méthode de formation des complexes d'inclusion qui consiste en l'irradiation aux micro-ondes. Une étude comparative de la solubilité de HCTZ en présence de β -CD, HP- β CD et/ou PEG (PEG 1000, PEG 3500) a été aussi réalisée.

Le contenu de la thèse est divisé en cinq chapitres précédés d'une introduction générale. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique des CDs, il comprend, également, une synthèse bibliographique sur les CDs et leurs propriétés d'inclusion. Dans le deuxième chapitre, nous avons détaillé les méthodes de formation des complexes d'inclusion et l'étude des structures et des stœchiométries. Par ailleurs, et en particulier, les méthodes d'études des complexes d'inclusion sont brièvement développées.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la complexation du Tramadol avec la β -CD, dans ce but, nous avons commencé par une optimisation théorique du Tramadol par l'utilisation des méthodes d'optimisation multiparamétriques (MPO) afin de prédire le meilleur équilibre des propriétés physicochimiques des composés, où nous avons appliqué la règle de base la plus couramment utilisé : la règles de Lipinski. Ensuite, une formation des complexes d'inclusion par différentes méthodes a été étudiée et suivis par IR, RX, MEB et la DSC, ensuite la complexation du Tramadol par la β -CD a été étudiée au moyen d'expériences de RMN¹H en solution aqueuse. L'analyse structurale complète a été réalisée à l'aide d'expériences HSQC-TOCSY, d'absorption UV-visible et les propriétés fluorescentes du Tramadol lui-même ont été étudiées. Enfin, l'influence de la complexation par β -CD a été abordée dans des solutions diluées où aucune extinction significative n'a eu lieu et dans des conditions de concentration plus élevée où l'auto-extinction a réellement eu lieu.

La fluorescence à haute concentration nécessite une correction de l'absorbance connue sous le nom d'effets de filtre interne (EFI), son calcul et une validation expérimentale sont aussi détaillés, dans le troisième chapitre.

Le quatrième chapitre est consacré à l'évaluation théorique du profil du HCTZ suivi par la formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD) par différentes méthodes. La caractérisation des complexes formés par IR, RX et le suivi de la formation du complexe par RMN¹H ont, également, été réalisés. Ensuite, la synthèse de la β -CD Acylé par deux méthodes (chauffage moderne et chauffage classique) et la formation du complexe d'inclusion (HCTZ : Ac- β CD) par irradiation via micro-onde ainsi que la caractérisation des produits obtenus par l'IR et les RX ont été détaillées.

L'étude de la solubilité de HCTZ fait l'objet du cinquième et dernier chapitre. Cette étude permet de conforter les résultats expérimentaux et obtenir des informations sur la variation de la solubilité de HCTZ en présence des complexants proposés et sur les énergies libre de Gibbs et les mécanismes qui régissent le processus d'encapsulation.

Enfin, cette thèse s'achève par une conclusion générale qui présente le bilan global des principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives de recherche projetées.

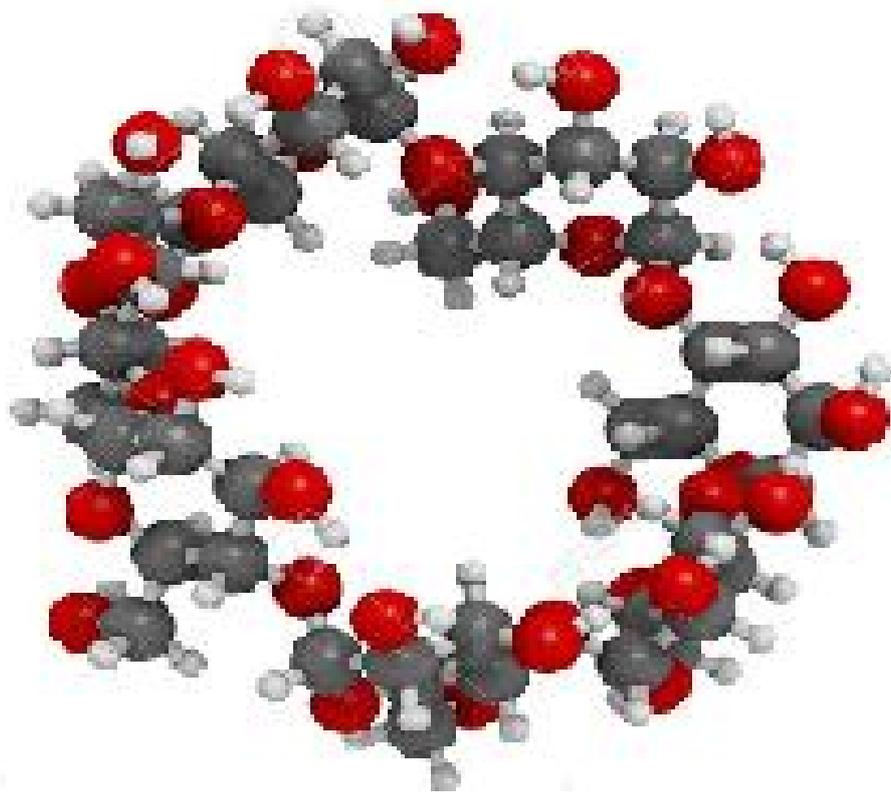
- [1] J.M. Lehn, Perspectives en Chimie : Moléculaire, supramoléculaire, adaptative. *La lettre du Collège de France*. ISSN 1628-2329 (2011) 3-4
- [2] F. Wöhler, Ueber künstliche Bildung des Harnstoffs. *Annalen der Physik und Chemie*. 88 (2) (1828) 253-256.
- [3] R. B. Woodward, The total synthesis of vitamin B12. *Pure Appl. Chem.* 33 (1) (1973) 145-178.
- [4] A. Eschenmoser, Organische Naturstoffsynthese heute: Vitamin B12 als Beispiel. *Naturwissenschaften*. 61 (1974) 513-525.
- [5] A. Eschenmoser, C.E. Wintner, Natural Product Synthesis and Vitamin B12. *Science*. 196 (4297) (1977) 1410-1420.
- [6] 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.
- [7] K. H. Fromming, J. Szejtli. Cyclodextrins in Pharmacy. *The Netherland: Kluwer Academic Dordrecht*. (1994) 13-15.
- [8] H. Hashimoto. Preparation, structure, property and application of branched cyclodextrins. In: Duchene D, editor. *New trends in cyclodextrins and derivatives*. Paris: Editions de Sante; (1991) 97-156.
- [9] M. Sbai, S.A. Lyazidi, D.A. Lerner, B.D. Castillo, M.A. Martin, Modified β -cyclodextrins as enhancers of fluorescence emission of carbazole alkaloid derivatives. *Anal. Chim. Acta* 303(1995) 47-55.
- [10] M. Sbai, S.A. Lyazidi, D.A. Lerner, B.D. Castillo, M.A. Martin, Stoichiometry and association constants of the inclusion complexes of ellipticine with modified β -cyclodextrin. *Analyst*. 121 (1996) 1561-1564.
- [11] S.M. Shuang, S.Y. Guo, L. Li, M.-Y. Cai, J.H. Pan, β -Cyclodextrin derivatives as fluorescence enhancers of the drug, hesperidin. *Anal. Lett.* 31(1998) 1357-1366.
- [12] R.E. Galian, A.V. Veglia, Fluorescence quenching inhibition of substituted indoles by neutral and ionized cyclodextrins nanocavities. *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry* 187 (2007) 356-362.
- [13] F.E. Oddy, S. Brovelli, M.T. Stone, E.J.F. Klotz, F. Cacialli, H.L. Anderson, Influence of cyclodextrin size on fluorescence quenching in conjugated polyrotaxanes by methyl viologen in aqueous solution. *J. Mater. Chem.* 19(2009) 2846-2852.

- [14] A.G. Bracamonte, A.V. Veglia, Cyclodextrinsnanocavities effects on basic and acid fluorescence quenching of hydroxy-indoles. *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry*. 261(2013) 20-25.
- [15] P. Sanphui, V.K. Devi, D. Clara, N. Malviya, S. Ganguly, G.R. Desiraju, Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Mol. Pharm.* 12 (2015) 1615-1622.

Partie

Théorique

Chapitre .I



Généralités sur les Cyclodextrines

I.1. Introduction

La chimie supramoléculaire fit son apparition dans les années soixante-dix. Elle est basée sur l'étude des interactions non-covalentes entre les espèces chimiques [1]. Ces interactions, semblables à celles existant dans les systèmes naturels, ont inspiré les chimistes pour développer de nouveaux concepts. Le plus souvent, l'espèce qui va reconnaître le substrat est un macrocycle fonctionnalisé qui forme, par l'arrangement tridimensionnel de ses atomes et de ses fonctions, une cavité dans laquelle le substrat sera piégé.

Depuis sa naissance, la chimie supramoléculaire a développé des récepteurs moléculaires aptes à complexer les cations, les anions et/ou les molécules neutres [2]. La structure du récepteur détermine la nature du ou des substrats qu'il est capable de se lier. La fixation de ses substrats donne lieu à un complexe d'inclusion et le phénomène ainsi observé, est appelé "Complexation" [3,4].

L'un des premiers chimistes qui s'orienta vers ces interactions intermoléculaires fut Jean-Marie-Lehn, définit la chimie supramoléculaire comme «la chimie des assemblages de molécules et des liaisons intermoléculaires» ou «la chimie au delà de la molécule individuelle» [5].

L'association entre les différentes espèces chimiques donne lieu à des complexes moléculaires. Ces derniers jouent un rôle important dans la multitude de processus chimiques et biologiques. Nombreuses classes de macromolécules peuvent former des complexes d'inclusion, comme par exemple : les clathrates [6], les éthers couronnes [7], les sphérants [8] et les cyclodextrines [9], dont une représentation schématique de leur structure est donnée ci-dessous (Figure I.1).

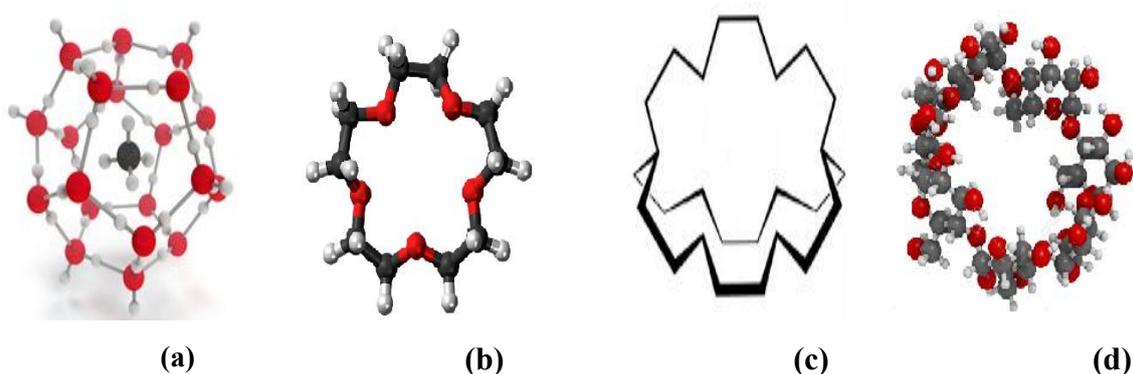


Fig.I.1. Structure tridimensionnelle de quelques molécules cages : Clathrates (a), Ethers couronnes (b), Sphérants (c) et Cyclodextrines (d)

Ces molécules cages qui sont capables d'encapsuler d'autres molécules et qui ont des applications aussi bien en pharmacologie, alimentation, cosmétologie, ainsi que d'autres secteurs industriels. Parmi tous les hôtes potentiels, les CDs font partie de ces molécules creuses qui possèdent l'aptitude à encapsuler à l'intérieur de leurs cavités de nombreuses molécules invitées et à former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : solubilité dans l'eau, réactivité, stabilité,...etc. De par cette propriété de complexation, les CDs sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour améliorer la biodisponibilité des principes actifs, augmenter leurs stabilités et solubilité, diminuer leurs effets secondaires, etc. mais aussi dans les industries cosmétique ou agroalimentaire pour stabiliser des produits volatils ou oxydables, masquer des odeurs indésirables,... etc.

Dans cette partie, nous avons choisi de limiter la présentation des cyclodextrines à leurs propriétés structurales et géométriques qui conditionnent leur réactivité. Les méthodes de caractérisation et de détermination des paramètres réactionnels seront également présentées.

I. 2.Cyclodextrines

Une cyclodextrine (dite parfois cycloamylose) est une molécule-cage ou cage moléculaire d'origine naturelle qui permet d'encapsuler diverses molécules [10]. Les cyclodextrines se rencontrent aujourd'hui dans un grand nombre de produits agroalimentaires et pharmaceutiques et sont donc l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Les plus grandes de ces molécules sont dites «cyclodextrines géantes». [11]

I. 2.1. Découverte, historique et production

Les cyclodextrines furent découvertes il y a un peu plus d'un siècle. A cette époque, Villiers [12] isole pour la première fois un groupe d'oligosaccharides non réducteurs provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par une amylase (cyclodextrineglucosyl transférase) produite par différents bacilles dont *Bacillus macerans*. Villiers a isolé 3g d'une substance cristalline $((C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O)$ à partir de la digestion de 1kg d'amidon par une souche de micro-organismes [12]. Lors de ces travaux, Villiers met en évidence deux produits (probablement l' α - et la β -cyclodextrine) résultant de cette dégradation enzymatique ayant des propriétés physico-chimiques proches de celles de la cellulose, il les baptise donc «cellulosines» [12].

Douze ans plus tard, Ces « celluloses » furent étudiées par Schardinger [13,14] qui découvrit un moyen simple d'en identifier deux types grâce à leurs complexes avec l'iode:

⊕ Le premier type forme un complexe cristallin gris-vert en milieu anhydre, qui est alors nommé l' α -dextrine.

⊕ Le deuxième type forme un complexe cristallin rouge en milieu anhydre et est alors nommé la β -dextrine (Fig.I.2).

Crini [15], dans une de ses récentes revues intitulée « Historique des CDs » a divisé l'histoire des CDs en cinq périodes: la découverte, la période de doute, la période de maturation, l'exploration et l'utilisation. Quelques étapes clés sur l'historique des CDs sont résumées dans le tableau I.1.

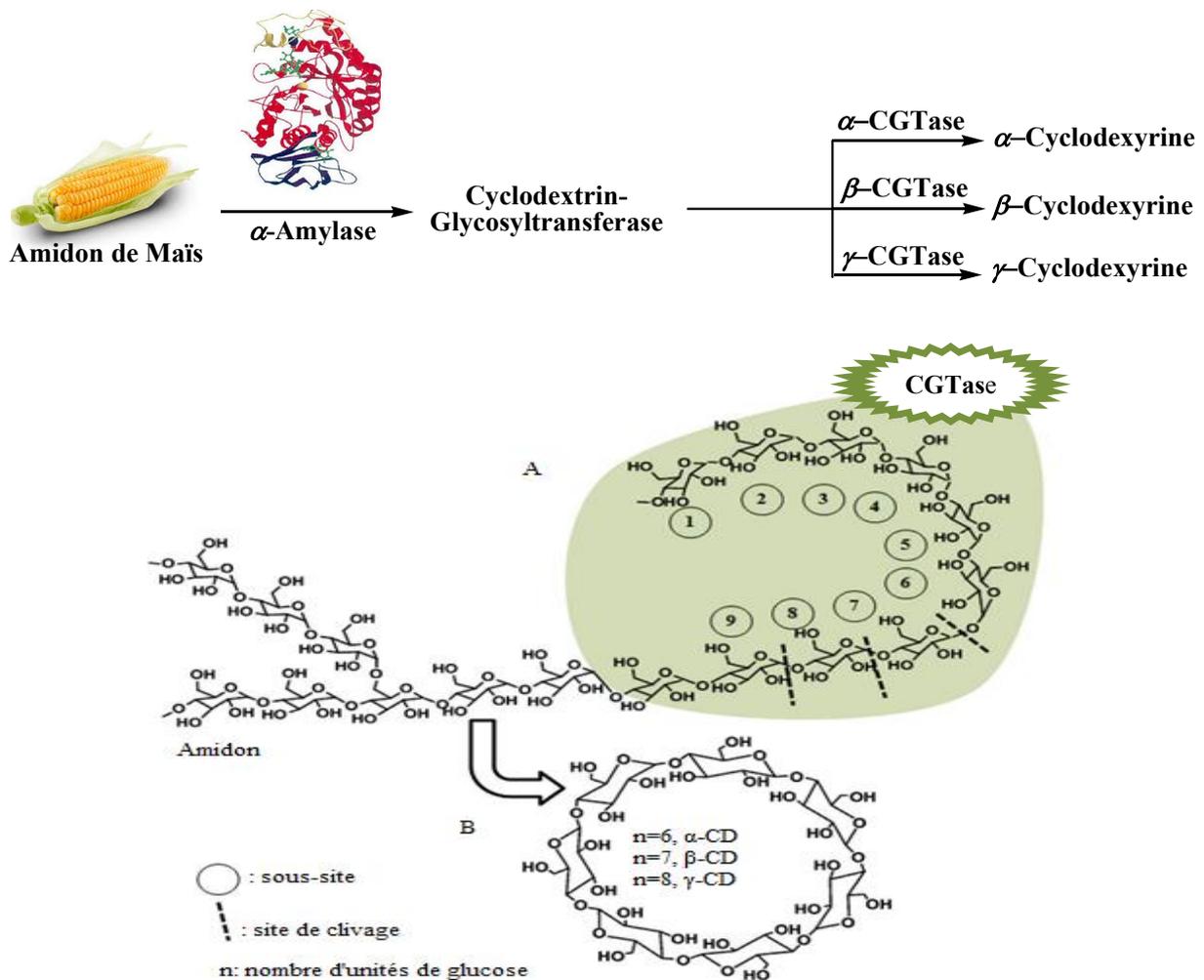


Fig.I.2. Schéma général de la dégradation enzymatique de l'amidon (A) et structure chimique des CDs (B) [15].

Tableau. I.1. Résumé de l'historique des cyclodextrines

Années	Evènements	Références
1891	Découverte des celluloses par Villiers	[12]
1903	Première publication sur les α - et β -dextrines par Sharding	[14]
1911	Publication du dernier article de Sharding sur les dextrines	[13]
1924- 1938	Description et préparation des CDs méthylées	[17]
1938	Découverte de la γ -CD	[18]
1938- 1952	Elucidation de la structure de l' α -, β - et γ -CDs	[19]
1953	Premier brevet sur l'application des CDs pour Freudenberg, Cramer et Plieninger en Allemagne	[20]
1954	Premier livre sur les CDs et leur capacité de complexation	[21]
	Découverte de CDs renfermant jusqu'à 12 unités de glucose	
	Premières études de toxicité des CDs	
1965	Classification des complexes d'inclusion selon leurs profils de diagrammes de solubilité	[22,23]
1965- 1968	Monographies sur les CDs	[24]
1976	α - et β -CDs sont approuvées au Japon comme additifs alimentaires. La prostaglandine E2/ β -cyclodextrine (Prostarmon ETM) est commercialisée au Japon par Ono Pharmaceutical Co.	[25]
1981	Organisation du premier symposium international sur les CDs à Budapest par Szejtli	[26]
1981- 1986	Recrudescence dans la synthèse des dérivés de CDs et des brevets en Europe et aux Etats Unis	[26]
1988	Commercialisation des tablettes de Piroxicam/ β -cyclodextrin (Brexin) en Europe par Chiesi Farmaceutici (Italie)	[26]
1990	Un brevet sur la sulfobutyl-éther- β -cyclodextrine par Stella et Rajewski	[27]
1997	Commercialisation de la solution pharmaceutique à administration orale Itraconazole/HP- β -CD (Sporanox) aux Etats Unis	[28]
2003	26000 publications sur les CDs	[27]
2008	Commercialisation du BRIDION [®] : γ -CD modifiée utilisée comme antidote de certains anesthésiques	[28]
2008- 2017	Applications des CDs dans les domaines : pharmaceutique, cosmétique, catalyse, dépollution, chromatographie, textile,... etc.	[20]

Aujourd'hui, la production de β -CD est supérieure à 1000 T/an et son prix continue de baisser (quelques \$ par kilogramme). D'autres CDs naturelles ou modifiées sont produites industriellement (Tableau I.2).

Tableau.I.2. Prix par kilogramme de différentes cyclodextrines [29]

Prix en masse (USD / kg)	
α -Cyclodextrine	45
β -Cyclodextrine	5
γ -Cyclodextrine	80

I.2.2. Nomenclatures des CDs [30,31]

Les CDs reçurent beaucoup de noms différents durant leur histoire. Leur nomenclature exacte suppose des règles bien définies. Tout d'abord, Villers les baptisa "cellulosines". [12] suite aux travaux de Schardinger, les CDs furent renommées " dextrines cristallisée α " et " dextrines cristallisée β " [13]. Puis Freudenberg découvrit la γ -CD qu'il appela " γ -dextrine" [32]. Pour rendre hommage aux travaux pionniers de Schardinger, les CDs reçurent le nom de "dextrine de Schardinger " dans la littérature ancienne [14].

Finalement, le terme qui s'imposa par la suite, est dextrines avec une lettre grecque en préfixe, par convention la lettre grecque α concerne les cyclodextrines avec six unité glucosidique, β sept et ainsi de suite. Cependant, cette nomenclature n'est pas parfaite.

En effet, le terme cyclodextrine informe sur la nature de sucre, mais ne renseigne pas sur la nature de la liaison glycosidique. Pour répondre à la question, la terminologie officielle dépendant des règles de nomenclature de l'IUPAC, est "cyclomalto"-nombre d'unité glucosidique +"ose". Ainsi le terme "malto" fait référence à une jonction saccharidique α - (1 \rightarrow 4), par exemple pour la β -CD, il faut employer le terme de "cyclomaltoheptaose".

Le terme officiel a encore des imperfections, puisque la terminaison "ose" implique normalement dans la nomenclature des sucres, un centre anomérique (C_1) libre, ce qui n'est pas le cas dans les CDs. De plus, le terme maltose peut faire référence à un disaccharide. Actuellement, le nom trivial "cyclodextrine" avec sa lettre grecque en préfixe, est utilisé par un grand nombre d'auteurs [33] et fait office de terme général.

I.2.3. L'intérêt des cyclodextrines

Le nombre de publications concernant les cyclodextrines n'a cessé de croître depuis la fin des années 1960, période à laquelle les méthodes de production, les structures, les propriétés physiques et chimiques et la formation de complexes d'inclusion ont été découverts. Du fait de leur faible toxicité, la production industrielle de ces molécules est entreprise: la matière première (l'amidon) est peu coûteuse et la technique de production par dégradation enzymatique relativement simple.

Les caractéristiques structurales et physico-chimiques des CDs ont fait que l'intérêt des chercheurs pour les cyclodextrines est toujours grandissant, comme le montre la constante augmentation du nombre de publications sur les CDs (Fig.I.3).

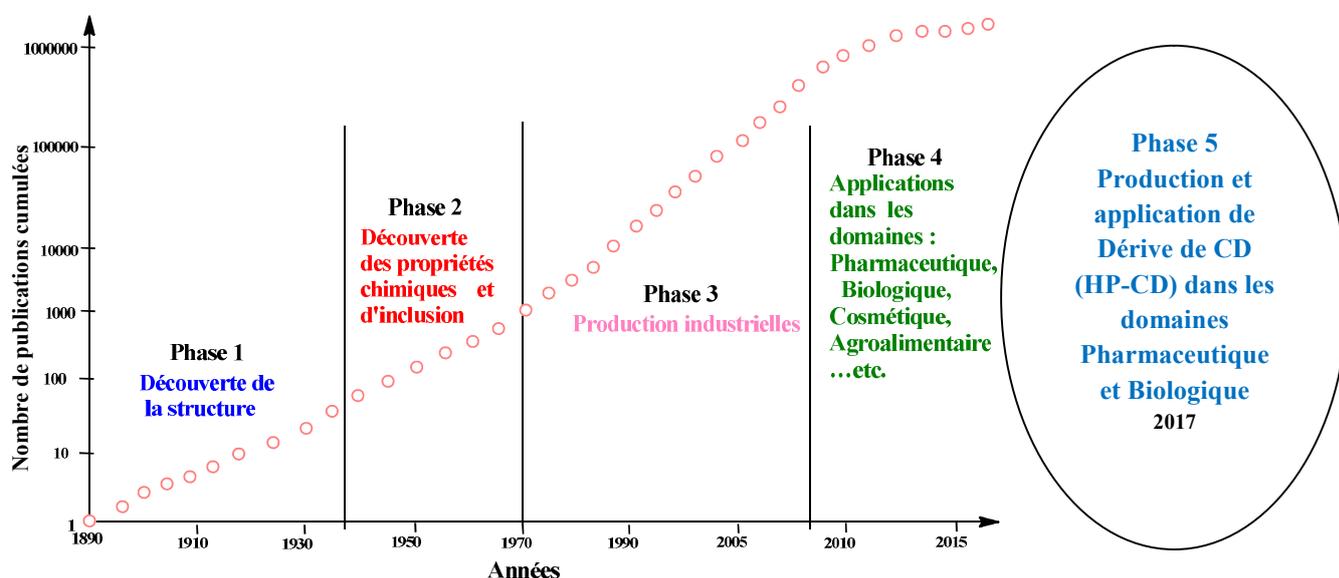


Fig.I.3. Nombre de publications parues sur les Cyclodextrines en fonction des quatre phases de développement des Cyclodextrine [34-36].

I.2.4. Structure et caractéristiques physicochimiques

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs obtenus par dégradation enzymatique (amylase de *Bacillus Macerans*) de l'amidon. Elles font partie de la famille des molécules cages au même titre que les calyxarènes, les éthers-couronnes, le cucurbituril, ...etc [37].

Ce sont des oligomères cycliques du glucose de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$ et comportant de six à douze unités α -D-glucopyranose. Les trois principales cyclodextrines, notées α -, β -, et γ -cyclodextrine contiennent respectivement six, sept et huit unités D-glucopyranosiques (Fig.I.4) liée en α -1,4.

En raison des facteurs stériques et des tensions dans le cycle glucosidique, les CDs comportant moins de six unités glucopyranose ne peuvent pas exister. En revanche, les cyclodextrines avec 9, 10, 11, 12, ou 13 unités glucopyranose (δ -, ϵ -, ζ -, η -, ou θ -CD, respectivement) ont été décrites, tandis que la δ -CD a été bien caractérisée.

Les CDs de plus grande taille, celles qui ont une conformation hélicoïdale, sont rapidement réduites par des enzymes en des produits de taille restreinte [38].

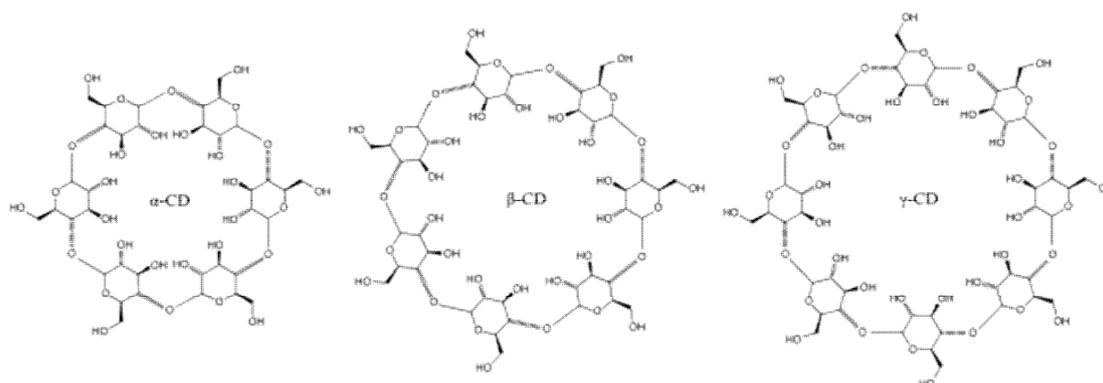


Fig.I.4. Représentation schématique des CDs [9]

Grâce aux structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des Rayons X, la forme tronconique des cyclodextrines a pu être déterminée, ainsi que le réseau de liaisons hydrogènes interglucosidiques des hydroxyles primaires et des hydroxyles secondaires. La structure du cône est formée autour d'un squelette carboné construit par les unités de glucoses reliées entre elles par les atomes d'oxygène glucosidiques. Ce squelette crée une cavité moléculaire possédant des propriétés très originales dues aux positions spatiales des différents groupements constitutifs de la cyclodextrine. Cette cavité d'environ 5 à 8 Å de diamètre qui leur permet d'inclure de nombreux composés organiques pour former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution (Fig.I.5).

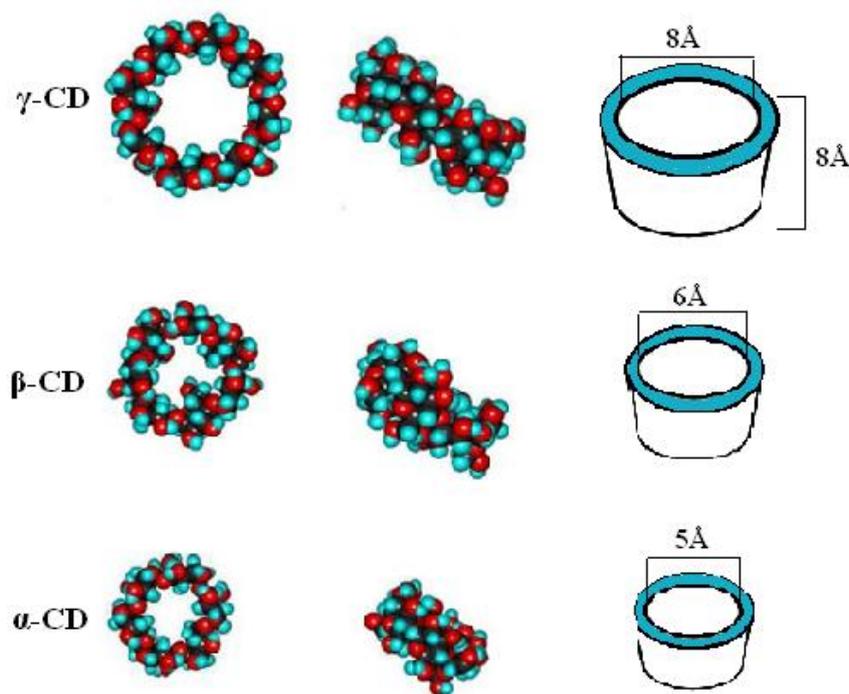


Fig.I.5. Structure tridimensionnelle des différentes cyclodextrines naturelles (de bas en haut α -CD, β -CD et γ -CD) [9].

La structure 3D des CDs est de type tronc-conique, dont la paroi est constituée d'unités glucose en conformation chaise 4C_1 , (Fig.I.6). En conséquence de la conformation 4C_1 des unités glucopyranosides tous les hydroxyles secondaires sont situés sur la partie la plus large du tore (face secondaire) et les hydroxyles primaires sur l'autre face (face primaire). De plus, la formation de deux couronnes de liaisons hydrogène, sur ces deux faces, donne à l' α - et la β -CD, une structure relativement rigide.

Selon la numérotation communément employée dans la chimie des sucres, les protons H-1, H-2, H-4 et les deux protons H-6a,b sont dirigés vers l'extérieur, tandis que les protons H-3 et H-5 sont orientés vers l'intérieur de la cavité. Ces derniers sont les seules pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité [39] (Fig. I. 7).

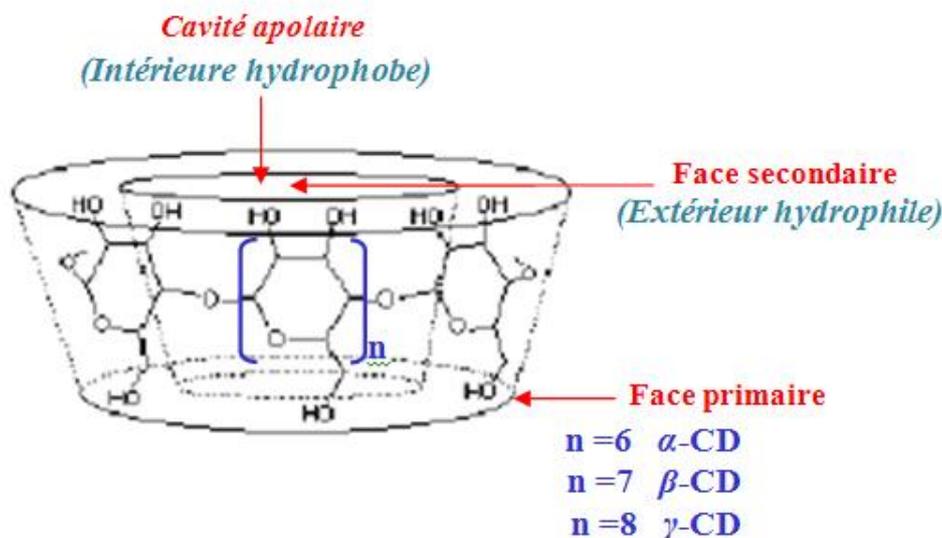


Fig.I.6. Structure simplifiée montrant la forme tronconique (forme spatiale)

Les oxygènes interglucosidiques O-4 forment les ponts entre les différentes unités de glucose et leurs paires d'électrons non liantes sont dirigées vers l'intérieur de la cavité moléculaire. Cette orientation conduit l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine à posséder une forte densité électronique ce qui lui confère les caractéristiques d'une base de Lewis.

Un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaire entre l'hydroxyle OH-2 d'une unité glucopyranoside et l'hydroxyle OH-3 de l'unité suivante tend à rigidifier la structure, particulièrement dans le cas de la β -CD (la moins soluble) alors que l' α et la γ -CD ont des structures plus flexibles (réseau de liaisons hydrogènes incomplet) [40].

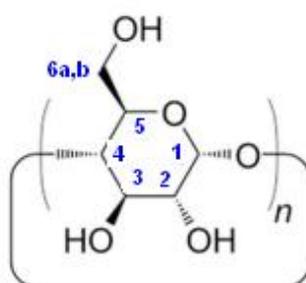


Fig. I.7. Numérotation des protons d'une unité glucose.

I.2.5. Caractéristiques physicochimiques

Les trois principales cyclodextrines [41] natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau.I.3.

Tableau.I.3. Principales caractéristiques physico-chimiques de l' α , β et γ - cyclodextrine
[9], [42-45]

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
Pouvoir rotatoire spécifique [α] _D ²⁵	+150,5	+162,5	+177,4
pKa, 25°C	12,33	12,20	12,08
$\Delta H^\circ_{(\text{ionisation})}$ (kcal.mol ⁻¹)	8,36	9,98	11,22
$\Delta S^\circ_{(\text{ionisation})}$ (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-28,3	-22,4	-17,6
$\Delta H^\circ_{(\text{solution})}$ (kcal.mol ⁻¹)	7,67	8,31	7,73
$\Delta S^\circ_{(\text{solution})}$ (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	13,8*	11,7*	14,7*
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
Température de fusion (°C)	275	280	275
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Molécules dans la maille	4	2	6
Forme des cristaux (obtenus de l'eau)	Plaques hexagonales	Parallélogrammes monocliniques	Prismes quadriques
Constante de diffusion à 40°C	3.443	3.224	3.000

*: *Etat standard de fraction molaire*

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' α -CD à la γ -CD. De par la taille de sa cavité, la β -CD est celle qui complexe le plus grand nombre de composés et elle et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CDs [17]. La solubilité dans l'eau varie de façon plus inattendue. En effet, la β -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' α -CD et la γ -CD, possède la solubilité la plus faible. Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogène intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyle secondaires [15].

Au sein de la β -CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau. Dans l' α -CD, cette ceinture est incomplète car l'une des unités glucopyranose est dans une position distordue. La γ -CD, non plane et plus flexible, possède la plus grande solubilité dans l'eau. La β -CD étant la plus intéressante du point de vue de la complexation, plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité en solution. L'une d'elles consiste en l'addition de solvants organiques. Il a été montré que l'acétonitrile et l'éthanol permettent d'augmenter sa solubilité, contrairement au méthanol [18, 19]. Une autre méthode consiste à substituer les groupes hydroxyle par d'autres groupes fonctionnels, ce qui fera l'objet du paragraphe I.3.

En résumé, les CD ont une structure macrocyclique dont l'extérieur est hydrophile et l'intérieur hydrophobe. Ces caractéristiques structurales sont à l'origine des propriétés très particulières des CD [16]. Notons que les CD font l'objet de plusieurs dénominations qui varient selon les époques et les auteurs. Ainsi, la β -CD est aussi désignée sous les termes de β -dextrine de Schardinger, cyclomaltoheptaose, cycloheptaamylose, β -CD,... etc. Notons enfin que les CD sont biodégradables, ce qui, ajouté au fait qu'elles sont produites à partir d'une ressource renouvelable, constitue une autre caractéristique encourageant leur utilisation.

I.2.6. Caractéristiques des CD en RMN ^1H

La β -cyclodextrine possède 7 unités glucosidiques identiques. Le premier pas dans l'étude structurale d'un composé organique par RMN est d'enregistrer un spectre proton de ce produit.

(Fig. I.8).

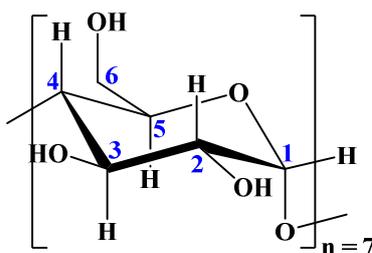


Fig.I.8. Représentation d'une unité glucosidique (unité glucose en 1→4) en conformation chaise.

D'après la littérature le proton anomérique H-1 et le carbone anomérique C₁ sont les plus déblindés, d'après Bakkour, l'attribution des protons et des carbones de la β -cyclodextrine natives sont présentés sur les figures (fig. I.9) (fig. I.10) respectivement [46].

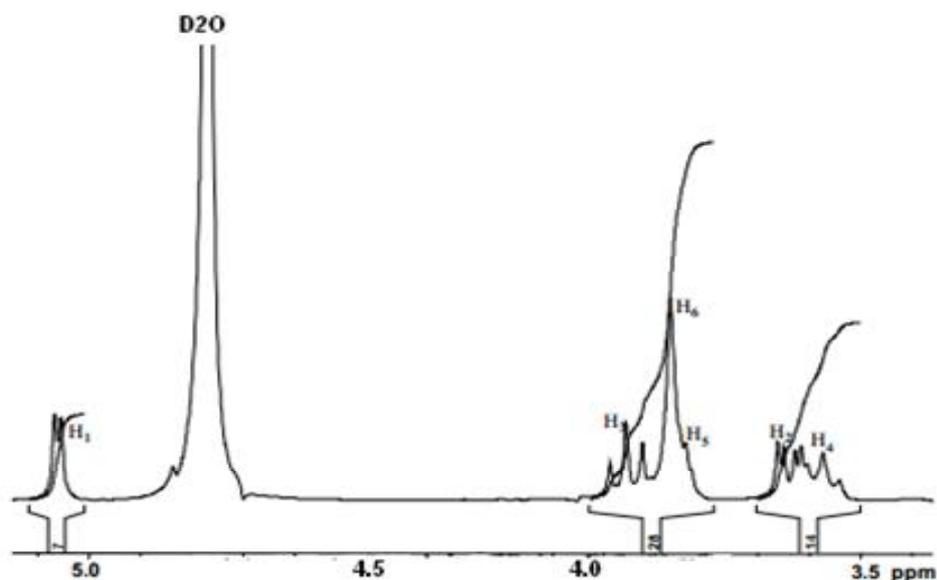


Fig. I.9. Spectre RMN ^1H de la β -CD dans D_2O

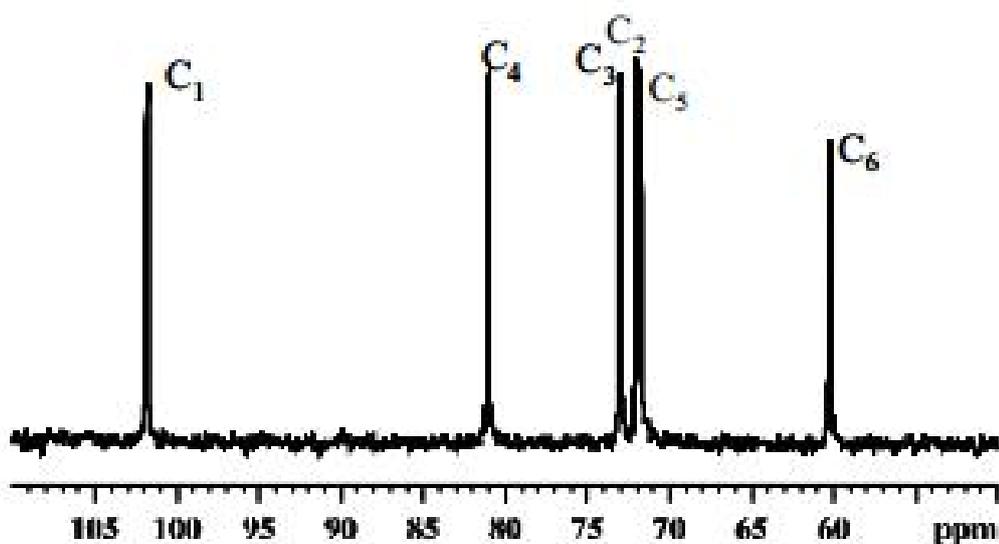


Fig. I.10. Spectre RMN ^{13}C de la β -CD dans D_2O .

Avant toute modification chimique, il est important de connaître les caractéristiques RMN des CDs natives. Dans le cas de CDs natives les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont relativement simple en raison de la symétrie C_n des CDs. Tout se passe comme si une seule unité glucopyranose. L'attribution des protons et des carbones de la β -CD est présentée dans le tableau. I. 4.

Tableau.I.4. Attribution du RMN ^1H et du RMN ^{13}C de la β -CD dans D_2O [46]

^1H	$\delta(\text{ppm})$	J (Hz)	^{13}C	$\delta(\text{ppm})$
H-1	5,06	$J_{1,2} = 3,5$	C ₁	101,8
H-2	3,64	$J_{2,1} = 3,5 ; J_{2,3} = 9,4$	C ₂	72,0
H-3	3,96	$J_{3,2} = 9,4 ; J_{3,4} = 9,4$	C ₃	73,0
H-4	3,57	$J_{4,3} = 9,4$	C ₄	81,1
H-5	3,84	/	C ₅	71,7
H-6a,b	3,86	/	C ₆	60,2

I.3. Cyclodextrines Modifiées

Comme nous l'avons vu, chaque unité glucose constituant le cycle des CDs possède trois fonctions hydroxyle. Les CDs peuvent donc être modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène ou du groupe hydroxyle tout entier par une grande variété de groupes, neutres ou ioniques tels que les groupes alkyles, hydroxyalkyles, sulfobutyles, glucosyles, acetyles,... etc.

Parmi les objectifs visés lors de ces modifications, on peut citer [47]:

- ✦ 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.

I.3.1. Difficultés des modifications

La difficulté des modifications des CDs est liée à la présence de nombreux groupes hydroxyle et à la cavité. En effet, les groupes hydroxyle présents aux positions 2, 3 et 6 de chaque unité glucose (fig. I.11) entrent en compétition vis-à-vis du réactif et rendent les modifications sélectives difficiles [48]. De plus, la cavité peut interférer en complexant le réactif et diriger son activité à une place inattendue.

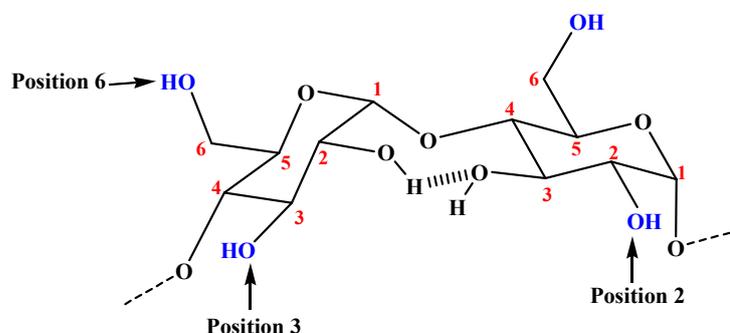


Fig. I.11. Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs. Les groupes hydroxyle se situent aux positions 2, 3 et 6 de chaque unité glucose [49].

La modification sélective étant difficile et coûteuse à réaliser, les CDs commerciales sont généralement des mélanges de dérivés qui diffèrent non seulement par le nombre de substituants mais aussi par leurs positions sur le cycle. Ces dérivés ont donc souvent des propriétés de complexation et de reconnaissance chirale différentes les uns des autres [50-52], ce qui peut rendre leur utilisation plus délicate et moins reproductible.

I.3.2. Exemples de CDs modifiées

Plus de 1500 dérivés de CDs ont été décrits dans la littérature mais la plupart d'entre eux ne connaîtront aucune utilisation à grande échelle à cause des difficultés liées à leur synthèse et du coût élevé qui en résulte [50]. On peut dénombrer une centaine de dérivés commercialement disponibles, principalement utilisés en chimie analytique ou comme intermédiaire de synthèse.

En terme de quantité produite ou d'utilisation, les CDs les plus importantes sont les dérivés ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier [53] :

- ✦ Les β -CDs méthylées,
- ✦ Les β - et γ -CDs hydroxypropylées,
- ✦ Les β -CDs sulfobutylées,
- ✦ Les CDs branchées (glucosylées, maltosylées),
- ✦ Les CDs sulfatées.

I.4. Domaines d'application des cyclodextrines

Étant donné que chaque molécule invitée est entourée individuellement par cyclodextrine (dérivé) la molécule est micro-encapsulée d'un point de vue microscopique. Cela peut conduire à des changements avantageux dans les propriétés chimiques et physiques des molécules invitées. Les propriétés complexantes des cyclodextrines avec un large panel de molécules et leur caractère biodégradable les prédisposent à de nombreuses et diverses applications dans des domaines tels que la cosmétique, l'agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, l'environnement...etc.

Dans cette partie, nous présenterons quelques exemples d'utilisation de la cyclodextrines dans l'industrie pharmaceutique (c'est le domaine qui nous intéresse).

I.4.1. Augmentation de la stabilité

Certaines molécules ont une faible stabilité. Par exemple, la vitamine E est très sensible à la lumière et à l'air. L'inclusion de cette molécule dans une cyclodextrine permet de la protéger des agressions du milieu extérieur [54].

D'autres publications montrent que l'encapsulation d'un composé dans les cyclodextrines permet d'augmenter sa stabilité vis-à-vis de la lumière, la température, l'hydrolyse, l'oxydation, les

réarrangements stériques, l'amélioration de la stabilité de Fénoprofen par la complexation avec β -CD et HP- β CD [55].

I.4.2. Masquage du goût et de l'odeur

Certaines molécules ont un goût ou une odeur désagréable. C'est le cas par exemple de l'eszopiclone. Ce principe actif utilisé pour traiter les insomnies possède un mauvais goût amer qui reste en bouche, l'inclusion de la molécule dans la cavité de la cyclodextrine permet de le masquer aux papilles gustatives et ainsi d'atténuer son amertume [56]. Le même procédé est également utilisé pour masquer les mauvaises odeurs de spiruline et de certaines formulations [57].

I.4.3 Augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité

C'est dans ce domaine que les cyclodextrines sont les plus employées en pharmacie. La biodisponibilité se définit par la quantité de principe actif qui parvient à son site d'action et la vitesse avec laquelle il y accède. La mesure au niveau du site d'action étant difficile à obtenir, on considère plus généralement la biodisponibilité comme la fraction du médicament qui atteint la circulation générale. Elle dépend de plusieurs facteurs comme sa vitesse de dissolution, sa solubilité ou sa vitesse d'absorption intestinale. L'encapsulation d'un principe actif par une cyclodextrine permet d'augmenter sa solubilité aqueuse, sa vitesse de dissolution et par conséquent d'accroître sa biodisponibilité. Les exemples dans la bibliographie de molécules encapsulées dans une cyclodextrine pour améliorer sa solubilité sont très nombreux. Pour n'en citer que quelques-uns, les cyclodextrines sont utilisées pour augmenter la solubilité des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'ibuprofène, le nimésulide [58], le naproxène [45] ...etc des antihistaminiques tels que le terféndine et la cinnarizine [59] ou des antimycosiques tels que le miconazole [60] et le kétoconazole [61]. Celecoxib [40], Lycopene [54], Flurbiprofen [55], Eflucimibe [56], Digitoxin [57].

I.4.4. Diminution des effets indésirables

Le principal effet secondaire des anti-inflammatoires non stéroïdiens est l'irritation des muqueuses gastro-intestinales. L'encapsulation de ces anti-inflammatoires par des cyclodextrines permet de diminuer les effets secondaires pour plusieurs raisons.

L'augmentation de la solubilité et par conséquent de la biodisponibilité de la molécule, permet de réduire les doses et ainsi les effets secondaires. De plus, la dissolution rapide de la molécule évite le contact direct des cristaux de principe actif avec la muqueuse gastrique et donc diminue son irritation [62].

I.4.5. Ciblage moléculaire

Une application très différente est le «ciblage moléculaire ». Cette technique consiste à diriger le principe actif vers le site biologique où il pourra exprimer son activité. Dans cette approche, le transporteur doit permettre d'acheminer le médicament vers un site précis. Des cyclodextrines peuvent ainsi être greffées avec des molécules ayant un récepteur spécifique dans l'organisme et devenir un excellent vecteur moléculaire. La β -CD greffée d'un peptide enképhaline ou endorphine est destinée au ciblage de médicaments neurotropes c'est à dire agissant directement au niveau cérébral. L'enképhaline ou endorphine présentent une très grande affinité pour les récepteurs cérébraux de la morphine [63].

I.4.6. Vectorisation de principes actifs par les CD [64-66]

Les CD sont couramment utilisés comme excipients de formulation dans les médicaments. Les principes actifs étant souvent des molécules hydrophobes, ce qui peut poser des problèmes d'assimilation par voie orale lors de la digestion, leur inclusion dans un complexe permet de mieux contrôler leur passage dans le circuit sanguin ou la progressivité de leur diffusion. Par ailleurs, les CD permettent de transformer des composés liquides en solides (poudres, comprimés) par précipitation des complexes d'inclusion.

I.5. Toxicité des cyclodextrines

Le profil toxicologique des trois cyclodextrines naturelles les plus communes et de certains dérivés chimiquement modifiés a récemment été passé en revue [67,68]. En général, les cyclodextrines naturelles et leurs dérivés plus hydrophiles sont seulement capables de passer à travers les membranes biologiques lipophiles, telles la cornée, les muqueuses ou la peau, avec de grandes difficultés. Même la β -CD méthylée qui est plus ou moins lipophile ne passe pas facilement les membranes biologiques lipophiles, bien qu'elle interagisse de manière plus efficace avec les membranes que les dérivés hydrophiles.

Toutes les études de toxicité ont démontré que l'administration orale de cyclodextrines est non-toxique, ceci étant dû à leur très faible absorption gastro-intestinale (0.1 à 3%).

Le caractère hémolytique des cyclodextrines est bien connu mais n'apparaît en fait qu'à forte concentration. En effet à faible concentration (5mmol pour l' α -CD et 10 mmol pour la β -CD), les cyclodextrines protègent les globules rouges contre l'hémolyse osmotique et l'hémolyse induite par la chaleur alors qu'à forte concentration elles provoquent l'hémolyse en complexant et relarguant le cholestérol des membranes cellulaires [69,70]. Cette action hémolytique est faible

avec la γ -CD mais plus forte avec l' α -CD et la β -CD et cette propriété conditionne les effets des CD par voie intraveineuse ou intramusculaire. Un certain nombre d'études toxicologiques ont montré que la γ -CD, la 2-hydroxypropyl- β -CD, la sulfobutyléther- β -CD et la maltosyl- β -CD sont sans danger même pour l'administration parentérale. Par contre, l' α -CD, la β -CD et les β -CD méthylées ne sont pas acceptables pour l'administration parentérale [71]

Les cyclodextrines ont longtemps été accusées de provoquer des irritations lors de leur application cutanée [72], ceci étant lié directement à leur pouvoir hémolytique et donc à leur capacité à inclure les différents constituants des membranes biologiques. Mais une étude, consistant en l'application de quantités équivalentes à 2mg de CD sur 1 cm² de peau et utilisant un vélocimètre laser Doppler afin de mesurer la vasodilatation éventuelle de la peau, a démontré clairement l'absence d'effet irritant (après 24h d'occlusion) des cyclodextrines naturelles, de la diméthyl- β -cyclodextrine et des dérivés hydroxypropyl de la β -CD et la γ -CD [73]. Il a aussi été montré par cette même technique que l'utilisation du complexe d'inclusion β -CD/acide rétinoïque permettait de réduire significativement l'irritation cutanée produite par le principe actif seul [74].

De plus il faut souligner le fait que cet effet irritant "supposé" est lié aux cyclodextrines vides et que dans leur utilisation habituelle celles-ci sont, pour un temps donné sous forme complexée.

I.6. Conclusion

Les CDs sont utilisés en pharmacie en tant qu'excipient dans la formulation des médicaments. Elles permettent notamment de transformer des composés liquides en solides par précipitation, et/ou changer des molécules hydrophobes en composés hydrophiles.

Les différentes caractéristiques de ces molécules cages offrent un potentiel certain pour la résolution de notre problématique de départ ; à savoir, la faible solubilité de la HCTZ d'une part et l'auto-extinction du Tramadol à forte concentration d'une autre part; c'est pourquoi le long de ce chapitre on s'est intéressé de l'évolution des CDs depuis 1981 jusqu'à présent, on s'est basé spécialement sur leurs synthèse et leurs structure, en faisant une nette comparaison sur les propriétés physico-chimiques des plus abondants CDs qui sont au nombre de trois (α , β et γ), avec un rappel sur leurs toxicologie et leurs domaine d'applications.

- [1] F.Biedermann, H.J. Schneider, Experimental binding energies in supramolecular complexes. *Chem. Rev.* 116 (52) (2016) 5216-5300.
- [2] G.V.Oshovsky, D.N. Reinhoudt, W. Verboom, Supramolecular chemistry in water. *Angewandte Chemie International Edition.* 46(14) (2007) 2366-2393.
- [3] K. D. Daze, T.Pinter, C.S. Beshara, A. Ibraheem, S.A. Minaker, R.J.M. Courtemanche, R.E. Campbell, F. Hof, Supramolecular hosts that recognize methyllysines and disrupt the interaction between a modified histone tail and its epigenetic reader protein. *Chem. Sci.* 3 (2012) 2695-2699.
- [4] J.M. Lehn, Perspectives in Supramolecular Chemistry-From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 29 (11) (1990) 1304-1319.
- [5] B. Hasenknopf, J.M. Lehn, B.O. Kneisel, G. Baum, D. Fenske. *Angew. Chem. Int. Engl.* 35 (1996) 1838-1840.
- [6] J.M. Lehn, Receptors, Catalysts, and Carriers. *Science Supramolecular Chemistry.* 227 (1985) 849-856.
- [7] C.J. Pedersen, The discovery of crown ethers. *Science.* 241 (1988) 536-540.
- [8] D.J.Cram, P. Sho, C.B. Knobler, E. Maverick, K.N. Trueblood. A Transacylase Partial Mimic *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 839-841.
- [9] J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 98(5) (1998) 1743-1753.
- [10]. S. Manuel, J. P. Joly, B. Courcot, J. Élysée, N.E .Ghermani, A .Marsua, Synthesis and inclusion ability of a bis- β -cyclodextrin pseudo-crypt and towards Busulfan anticancer agent. *Tetrahedron.* 67(7) (2006) 1706-1714.
- [11] K Gessler, I. Usón, T. Takaha, N. Krauss, S.M Smith, S. Okada, G.M Sheldrick , W Saenger, V-Amylose at atomic resolution: X-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexaicosaoase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(8) (1999) 4246-4251.
- [12] 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.
- [13] F. Schardinger, Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Mikroben. *Zentr. Bakt. Parasitenk.* 2 (29) (1911) 188-197.
- [14] F. Schardinger, Genußm. Gebrauchsgegenstände. *Z.Z.Unters. Nahr.* 6 (1903) 865-880.

- [15] G. Crini, Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 114 (21) (2014) 10940-10975.
- [16] W.F. Lai, A.L. Rogach, W.T. Wong, Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 46 (20) (2017) 6379-6419.
- [17] K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, Über die Schardinger - Dextrine aus Stärke. *Ber. Chem.* 71 (1938) 1596-1573.
- [18] K. Freudenberg, R. Jacobi, Über Schardingers Dextrine aus Stärke Liebigs. *Ann. Chem.* 518 (1935) 102-108.
- [19] K. Freudenberg, E. Schaaf, G. Dumpert, T. Ploetz, New views on starch. *Naturwissenschaften.* 27 (1939) 850-853.
- [20] K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, Verfahren zur Herstellung von Einsschlussverbindungen physiologisch Wirksamer Organischer verbindungeen, Knoll A.G. *Chemische Fabriken, German patent.* Number 895769. (1953).
- [21] F. Cramer, Einschlussverbindungen Inclusion Compounds. *Springer-Verlag, OHG- Berlin, Gottinger. Heidelberg* (1954) 115-165.
- [22] T. Higuchi, K.A. Connors, Phase-solubility techniques. *ADV. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 117-210.
- [23] D. French, A.O. Pulley, J.A. Effenberger, M.A. Rougvie, M. Abdullah, Studies on the Schardinger dextrins. XII. The molecular size and structure of the delta-, epsilon-, zeta-, and eta-dextrins. *Arch Biochem Biophys.* 111(1) (1965) 153-160.
- [24] V. Caesar. Starch and its Derivatives, Chap. X, J. A. Radley (Ed.). *Chapman and Hall, London.* (1986) 277-290
- [25] M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(7) (2007) 645-666
- [26] J. Szejtli, Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.*, 76 (10) (2004) 1825-1845.
- [27] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329 (2) (2007) 1-11.
- [28] F.Sallas, R. Darcy, Amphiphilic cyclodextrins-Advances in synthesis and supramolecular chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (2008), 957-969.
- [29] D.Duchene, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int.J.Pharm.* 329 (2007) 1-11.

- [30] R. Baiping, J. Binbo, H. Rundong, Z. Mingzhen, C. Hong, M. Jie, S. Yan, J. Lingyun, Z. Jie. HP- β -cyclodextrin as an inhibitor of amyloid- β aggregation and toxicity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 20476-20485.
- [31] K. H. Fromming, J. Szejtli. Cyclodextrins in Pharmacy. *The Netherland: Kluwer Academic Dordrecht.* (1994) 13-15.
- [32] K. Freudenberg, F. Cramer. Die Konstitution der Schardinger Dextrin alpha, beta dextrin, and gamma^[1]. *Zeitschrift Für Naturforschung. Section B Journal of Chemical Sciences.* 3 (1948) 464-466.
- [33] J. Szejtli, Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*, 98(5) (1998) 1743-1753.
- [34] J. Szejtli, Cyclodextrins and their inclusions complexes. *Académiai Kiadó, Budapest.* 34 (1982) 250-296.
- [35] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, J. J. Bradshaw, D. A. Laufer, Acid dissociation of cyclohexaamylose and cycloheptaamylose. *Bioorg. Chem.* 9 (3) (1980) 299 - 304.
- [36] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, D. A. Laufer, Acid dissociation of cyclooctaamylose. *Bioorg. Chem.* 11 (1982) 274-280.
- [37] M. J. Jozwiakowski, K. A. Connors Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydr. Res.* 143 (1985) 51-59.
- [38] M. E. Davis, M. E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery.* 3 (2004). 1023-1035.
- [39] G. R. Balou, Synthèse de glycophanes à partir du D-glucal, thèse de l'université Henri Poincaré, Nancy-1, en Chimie et Physicochimie. (2008).
- [40] M. N. Reddy, T. Rehana, S. Ramakrishna, K. P. R. Chowdary, P. V. Diwan. β -Cyclodextrin complexes of celecoxib: molecular-modeling, characterization, and dissolution studies. *AAPSJ.* 6 (1) (2004) 68-76
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] D. Duchêne, A. Bochot, T. Loftsson, Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. *STP Pharma Pratiques.* 19 (2009) 15-27.

- [44] G. Piel, Study of the Influence of Both Cyclodextrins and L-Lysine on the Aqueous Solubility of Nimesulide; Isolation and Characterization of Nimesulide-L-Lysine-Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 86 (1997) 475-480.
- [45] 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.
- [46] Y.Bakkour, Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des Cyclodextrines natives et polymérisées, Thèse de Doctorat de l'Université de Lille 1, en Sciences et Technologies. (2005).
- [47] S. Tian, P.Forgo, V.T.D'Souza, Selective modification at the 3-position of cyclodextrin. *Tetrahedron Letters*. 37 (46) (1996) 8309-8312.
- [48] A.R. Khan, P. Forgo, K. Stine, V.T. D'Souza, Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 98 (5) (1998) 1977-1996
- [49] V. Zia, R. Rajewski, V. Stella, Thermodynamics of Binding of Neutral Molecules to Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrins (SBE- β -CDs): The Effect of Total Degree of Substitution. *Pharm. Res.* 17 (2000) 936-941.
- [50] E. Francotte, L. Brandel, M. Jung, Influence of the degree of substitution of cyclodextrin sulfobutyl ether derivatives on enantioselective separations by electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 792 (1997) 379-384.
- [51] A. Salvador, E. Varesio, M. Dreux, J.-L. Veuthey, Binding constant dependency of amphetamines with various commercial methylated β -cyclodextrins. *Electrophoresis*. 20 (1999) 2670-2679.
- [52] M. Taghvaei, G. Stewart, beta.-Cyclodextrin solubility in reversed-phase high-performance liquid chromatographic eluents. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1902-1904.
- [53] L. Szente, J. Szejtli, Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36 (1999) 17-28.
- [54] M. Vertzoni, Kartezini T, Reppas C, Archontaki H, and Valsami G. Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems. *Int J Pharm.* 309 (2006) 115-122.
- [55] 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.
- [56] A. Gil, A. Chamayou, E. Leverd, J. Bougaret, M. Baron, G .Couarraze, Evolution of the interaction of a new chemical entity, eflucimibe, with gamma-cyclodextrin during kneading process. *Eur J Pharm Sci.* 23 (2004) 123-129.

- [57] H. Ueda, T. Wakamiya, H. Endo, H. Nagase, K. Tomono, T. Nagai, Interaction of cyclomaltonnaose (Delta-CD) with several drugs. *Drug Dev Ind Pharm.* 25 (1999) 951-954.
- [58] G. Piel, Study of the Influence of Both Cyclodextrins and L-Lysine on the Aqueous Solubility of Nimesulide; Isolation and Characterization of Nimesulide-L-Lysine-Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 86 (1997) 475-480.
- [59] E. Redenti, L. Szente J. Szejtli, Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 89 (2000) 1-8.
- [60] V. Barillaro, Theoretical and experimental investigations on miconazole/cyclodextrin/acid complexes: Molecular modeling studies. *International Journal of Pharmaceutics.* 342 (2007) 152-160.
- [61] A. Selva, Study of β -cyclodextrin-ketoconazole-tartaric acid multicomponent non-covalent association by positive and negative ion-spray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry.* 33 (1998) 729-734.
- [62] S. Warrington. Effects of piroxicam-beta-cyclodextrin on the gastrointestinal tract. *European Journal of Rheumatology & Inflammation.* 12 (1993) 29-37.
- [63] B. Perly, F. Pilard. Cyclodextrins and their applications. *Clefs CEA.* (1997) 35. 32-43.
- [64] R. Bordes, Thèse de Doctorat. Synthèse, physicochimie et polymérisation de tensioactifs paires d'ions dérivés du norbornene, Univ. Toulouse III – Paul Sabatier, France, (2007).
- [65] M. J. Jozwiakowski, K. A. Connors, Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydrate Research.* 143 (1985) 51-59
- [66] T. Loftsson, Cyclodextrins in pharmaceutical formulation, Nordic industrial fund Report, (1998).
- [67] T. Loftsson, Pharmaceutical Applications of β -Cyclodextrin. *Pharmaceutical Technology Europe.* 11 (1999) 20-32
- [68] K. H. Frömring, J. Szejtli. Cyclodextrins in pharmacy. In: Davies JED, Editor. Topics in Inclusion Science. *Dordrecht-Boston-London, Kluwer Academic Publishers.* 5 (1994) 233- 250.
- [69] T. Loftsson, Pharmaceutical application of β -cyclodextrin, *Cyclodextrin News.* 15 (2001)23-24.
- [70] T. Loftsson 1, P. Jarho , M. Másson , T. Järvinen , Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2(2) (2005) 335-351.

- [71] T. L. Yaksh, J. Jang, Y. Nishiuchi, K. P. Braun, S. Ro, M. Goodman, The utility of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a vehicle for the intracerebral and intrathecal administration of drugs. *Life Sci.* 48 (1991) 623-633.
- [72] K. Uekama, T. Irie, M. Sunada, M. Otagiri, Y. Arimatsu, S. Nomura, Alleviation of perchlorperazine-induced primary irritation of skin by cyclodextrin complexation. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 3860-3862.
- [73] P. Montassier, D. Duchêne, M.C. Poelman, Inclusion de la tretinoïne dans les cyclodextrines. *International Journal of Pharmaceutics.* 153 (1997) 199-209.
- [74] D. Amdidouche, P. Montassier, M.C. Poelman, D. Duchêne, Evaluation by laser Doppler velocimetry of the attenuation of tretinoin-induced skin irritation by β -cyclodextrin complexation. *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 111-116.

Chapitre .II

Complexes d'inclusion à base des Cyclodextrines

II.1 Introduction

Un complexe d'inclusion hôte-invité est formé de façon réversible quand une molécule hydrophobe occupe la cavité, l'hôte étant la cyclodextrine et l'invité la molécule incluse, sa formation est réalisée par la création de nouvelles interactions énergétiquement favorable entre la cavité de la CD et la molécule invitée. En effet la molécule hydrophobe en solution aqueuse (interaction apolaire-polaire non favorable) remplace les molécules d'eau à l'intérieur de la cavité à caractère hydrophobe conduisant au complexe d'inclusion (interaction apolaire-apolaire) [1]. Des liaisons de Van Der Waals entre la cyclodextrine et la molécule invitée amènent le complexe à un niveau d'énergie plus favorable, ainsi que des liaisons hydrogènes si l'invité le permet.

Il existe différents procédés pour réaliser des complexes d'inclusion.

II.2. Complexes d'inclusion

II.2.1 Complexation en solution [2-4]

La complexation en solution consiste à dissoudre la cyclodextrine et la molécule à inclure dans un milieu souvent aqueux et à laisser l'équilibre s'établir. Le complexe formé est récupéré sous forme solide après sa précipitation. Cette précipitation peut se faire par diverses façons :

- ⊖ précipitation spontanée,
- ⊖ précipitation par refroidissement,
- ⊖ neutralisation,
- lyophilisation,
- ⊖ évaporation du solvant (évaporation sous vide).

La complexation en suspension est quasi identique sauf que les composés ne sont pas dissous mais maintenus en suspension à l'aide d'une forte agitation. Le principal inconvénient de cette méthode est l'utilisation d'un solvant et donc la nécessité de l'éliminer une fois le complexe est formé.

II.2.2 Complexation en phase solide

La complexation peut être envisagée en phase solide par co-broyage. L'avantage principal de cette technique est l'absence de solvant. Néanmoins des phénomènes non désirés peuvent apparaître comme un changement polymorphique et/ou une diminution de la stabilité du complexe.

II.2.3 Complexation par malaxage

La technique de malaxage consiste à humidifier les composés afin d'obtenir une pâte puis de la malaxer. La présence d'eau favorise la formation d'un complexe d'inclusion [5].

II.2.4 Complexation par mélange physique

Un mélange physique entre des composés et des CDs est préparé simplement par trituration mécanique. Dans l'échelle de laboratoire des CDs et le composé sont mélangés ensemble complètement par trituration dans un mortier et passent au travers un tamis approprié pour obtenir la dimension particulaire désirée dans les produits finis. [6].

II.3. Inclusion – Complexation

II.3.1. Formation

Les CDs sont des molécules cages qui peuvent former des complexes d'inclusion de type hôte-invité avec des molécules peu solubles en solution aqueuse. Le thème "composé d'inclusion" a été présenté en 1950 [7], Ce complexe s'effectue de manière non-covalente à l'intérieur de la cavité grâce, soit à des liaisons hydrogène, soit à des interactions électrostatiques de Van der Waals. En l'absence d'autres molécules, la cavité apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau dont la présence est énergétiquement défavorable, dû à des interactions polaires-apolaires. Lors de l'addition de molécules « invitées » moins polaires, les molécules d'eau peuvent être remplacées facilement, d'autres solvants, comme le DMF, le DMSO ou la pyridine, présentent une très bonne affinité avec la cavité. Ce processus réversible (les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution) peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité [8,9].

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 ;
- ⊕ 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.

Les complexes les plus courants sont de type 1:1 (v/v) (Figure II.1).

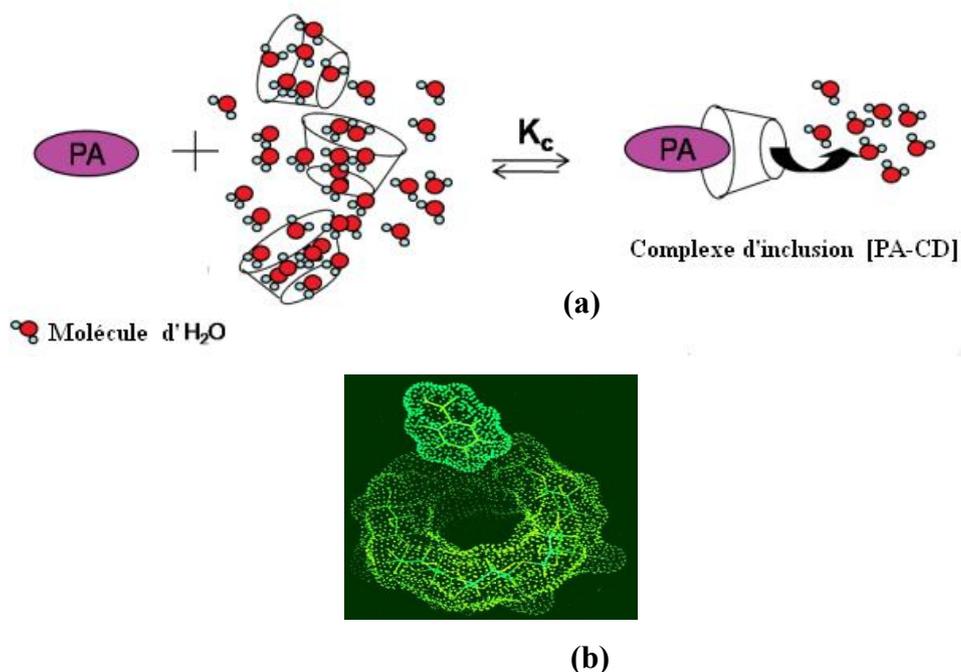


Fig. II.1. Exemple de formation du complexe d'inclusion (a) et Représentation schématique à 3D de la formation d'un complexe d'inclusion (b) [10].

II.3.2. Energies mises en cause.

En solution aqueuse la cavité des CD est occupée par des molécules d'eau énergiquement non-favorables (interaction polaire-apolaire), ce qui permet une substitution aisée par des molécules invitées de moindre polarité que l'eau. Plusieurs contributions énergétiques ont été mises en évidence pour expliquer les interactions en jeu lors de la formation de complexes par des cyclodextrines.

- ⊕ Adaptation stérique : par des changements conformationnels de la molécule invitée et/ou de la cyclodextrine (conformation induite) lors du processus d'inclusion.
- ⊕ Formation de liaisons hydrogène.
- ⊕ Interactions de Van der Waals : forces de dispersion de London et interactions dipôle dipôle induit.
- ⊕ Interactions hydrophobes, dipôle-dipôle, de transfert de charges et électrostatiques.
- ⊕ Relargage de molécules d'eau à «haute-enthalpie» de la cavité de la cyclodextrine.
- ⊕ Relargage de molécules de solvant de la cavité de la cyclodextrine avec un gain d'entropie.
- ⊕ Relâchement des tensions du macrocyle [11].

C'est l'action simultanée de plusieurs de ces interactions qui rend l'inclusion spécifique effective, les phénomènes de reconnaissances moléculaires étant dus à la coopération de multiples interactions faibles.

Ce phénomène d'inclusion ne fait intervenir aucune liaison covalente mais uniquement des forces telles que les liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, ce qui permet ainsi le relargage de la molécule invitée, ouvrant la voie à de multiples applications [11].

II. 3.3. Structure et stœchiométrie du complexe d'inclusion

Les CDs peuvent ainsi inclure partiellement ou en totalité un invité, ce qui donne alors lieu à la formation de complexes comportant éventuellement plusieurs molécules de CDs ou de molécules invitées [12]. Pour chaque molécule invitée, la stœchiométrie, la stabilité, et la structure du complexe peuvent dépendre du type de la CD.

De plus, un facteur important qui régularise la complémentarité est la taille des cavités de la CD. De nombreux exemples de complexes CD-invité, avec divers arrangements structuraux, se trouvent ainsi décrits dans la littérature [13]. Les complexes d'inclusion les plus fréquents sont de type 1:1. C'est-à-dire qu'à une molécule de cyclodextrine correspond une molécule invitée incluse entièrement ou partiellement [14]. Si une molécule est trop volumineuse pour s'infiltrer entièrement au sein de la cavité, son autre extrémité, laissée libre, peut à son tour être encapsulée par une autre molécule de cyclodextrine.

Dans ce cas, on aboutit à la formation d'un complexe de type 2:1 [15]. Il existe aussi des complexes de type 1:1:1, 1:1:2 [16], 2:2 [17], 3:1 [18], et 3:2 [19].

Il est également possible que ce soit une même molécule de cyclodextrine qui interagisse avec plusieurs molécules pour former des complexes 1:2 [20] ou 1:3 [21].

L'effet stérique joue donc un rôle important dans le phénomène de complexation. Aussi, l' α -CD complexe plus facilement des petites molécules comme des chaînes aliphatiques, la β -CD peut complexer les composés aromatiques ou les hétérocycles et la γ -CD s'accommode de grandes molécules comme les macrocycles et les stéroïdes.

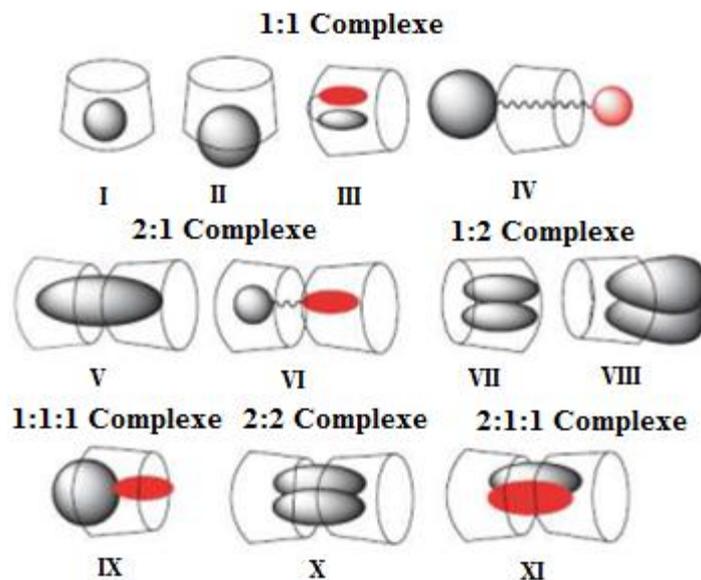


Fig. II.2. Représentation schématique des différents types de complexes d'inclusion de cyclodextrine [13].

II.3.4. Techniques d'analyses des complexes d'inclusion

Les CDs sont capables de former des complexes d'inclusion avec de nombreux composés tels que des sels inorganiques, des gaz, des molécules organiques, des molécules organométalliques, des polypeptides... etc.

Selon la nature de la CD et de l'invité, un complexe d'inclusion possède des propriétés propres comme sa stœchiométrie, sa constante d'association et sa structure spatiale.

L'étude des propriétés physico-chimiques du complexe d'inclusion constitue une large partie de la chimie organique moderne. La première étape consiste à déterminer la stœchiométrie du complexe formé.

Après avoir déterminé la stœchiométrie du complexe, il faut évaluer la constante d'association qui reflète la force d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule cage-molécule invite) et permet de connaître la proportion de la molécule complexée.

Un certain nombre d'études physico-chimiques décrites dans la littérature pour déterminer la constante d'association reposent sur les techniques suivantes :

- ⊕ La méthode de solubilisation [22,23],
- ⊕ La spectroscopie d'absorbance (UV et visible) [24],
- ⊕ La spectroscopie d'émission moléculaire (fluorescence) [25],

- ⊕ La résonance magnétique nucléaire, RMN,
- ⊕ La titration microcalorimétrique [26,27],
- ⊕ L'électrophorèse capillaire,
- ⊕ Le suivi de la tension superficielle et d'autres méthodes électrochimiques.

Les techniques spectroscopiques consistent à suivre l'intensité d'absorbance ou de fluorescence de la molécule complexée. Le passage d'une molécule de la phase aqueuse vers la cavité de la CD modifie la polarité de son micro environnement. Ceci provoque une augmentation ou une atténuation de son intensité d'absorption ou d'émission [28].

Cela peut permettre de suivre l'avancement de la complexation et de déterminer la constante de stabilité du complexe. Ces techniques sont aussi utilisées pour doser la CD dans l'eau.

Une fois la substance incluse dans la cavité de la cyclodextrine, ses propriétés physicochimiques sont modifiées. Toutes les techniques utilisées pour caractériser l'existence d'un complexe d'inclusion mettent en évidence une modification de la molécule invitée.

II.3.4.1. A l'état liquide

II.3.4.1.1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une technique permettant d'étudier les noyaux atomiques possédant des propriétés magnétiques (spin-actifs) dans un champ magnétique extérieur puissant (^1H , ^{13}C ,...etc.). Etant donné que l'environnement électronique des noyaux influence le champ magnétique perçu par ces noyaux, et que cet environnement électronique est influencé par les liaisons chimiques dans lesquelles sont impliqués ces noyaux, il est possible de mettre en évidence "l'environnement chimique" des noyaux étudiés "déplacement chimique". Cette technique est largement utilisée pour la déduction des structures des composés [29].

L'inclusion d'une molécule dans la cavité d'une CD est caractérisée par des variations des déplacements chimiques des protons situés à l'intérieur de cette cavité (H-3 et H-5). Ces déplacements pouvant être observés en RMN ^1H , cette technique est utilisée pour l'étude des interactions de substances avec les CDs [30].

Les techniques RMN à deux dimensions sont également souvent employées pour détecter la formation des complexes.

II.3.4.1.1.1. L'expérience COSY

L'expérience COSY [31] permet d'identifier les protons ^1H couplés scalairement. A l'aide de cette expérience, il est possible de mettre en évidence l'existence de couplage scalaire 2J (entre deux protons portés par le même atome de carbone) 3J (entre deux protons portés par des atomes de carbone en α) et 4J (protons séparés par quatre liaisons).

Jeener et coll. ont attribué les protons de l'unité glucosidique de la β -CD à partir de la carte COSY (figure.II.3),

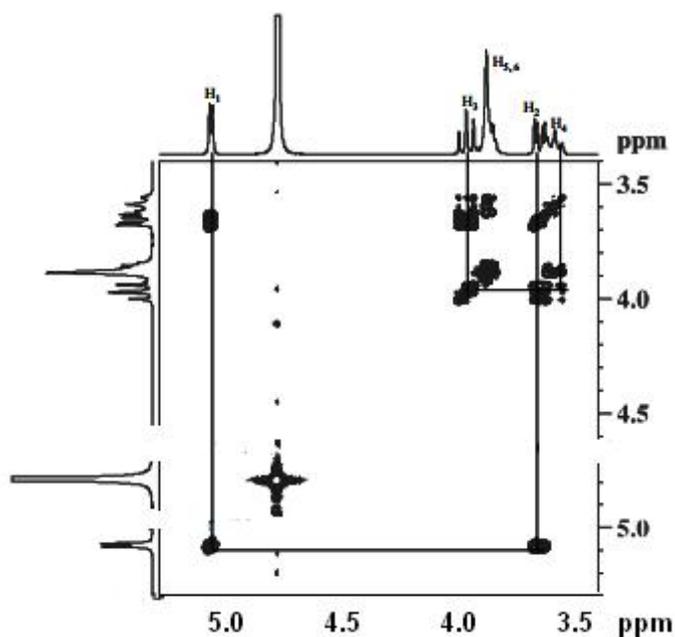


Fig. II.3. COSY de la β -CD native dans D_2O

II.3.4.1.1.2. L'expérience HSQC

Cette expérience RMN [31] en deux dimensions permet de détecter les carbones directement liés à un proton. Sur la carte HSQC 2D, les déplacements chimiques des protons sont obtenus dans la première dimension (axe horizontal) et les déplacements chimiques des carbones dans la deuxième dimension (axe vertical). Chaque tache de corrélation indique une connexion entre un carbone et un proton. L'attribution de Kilpeläinen et Coll. de la β -CD native est présenté sur la figure. II.4.

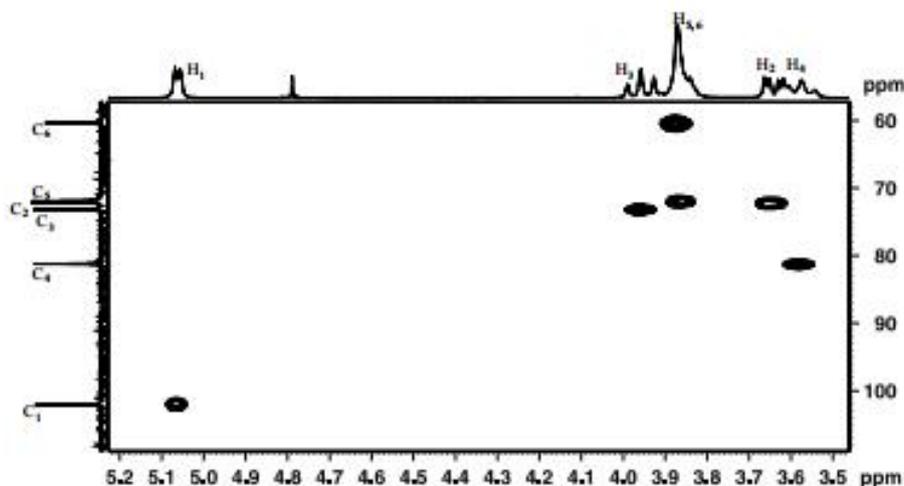


Fig. II.4. Spectre HSQC de la β CD native

II.3.4.1.1.3. L'expérience HMBC

Cette expérience permet d'identifier les couplages à longue distance [32] (c'est-à-dire à travers deux ou trois liaisons 2J ou 3J) entre les protons et les carbones. Comme l'HSQC, la première dimension (axe horizontal) correspond aux déplacements chimiques des protons et la deuxième dimension (axe vertical) à ceux des carbones. Chaque tache de corrélation indique une connexion entre un carbone et un proton à travers 2 ou 3 liaisons chimiques.

Cette expérience est surtout utilisée pour attribuer les carbones quaternaires comme l'illustre l'exemple suivant :

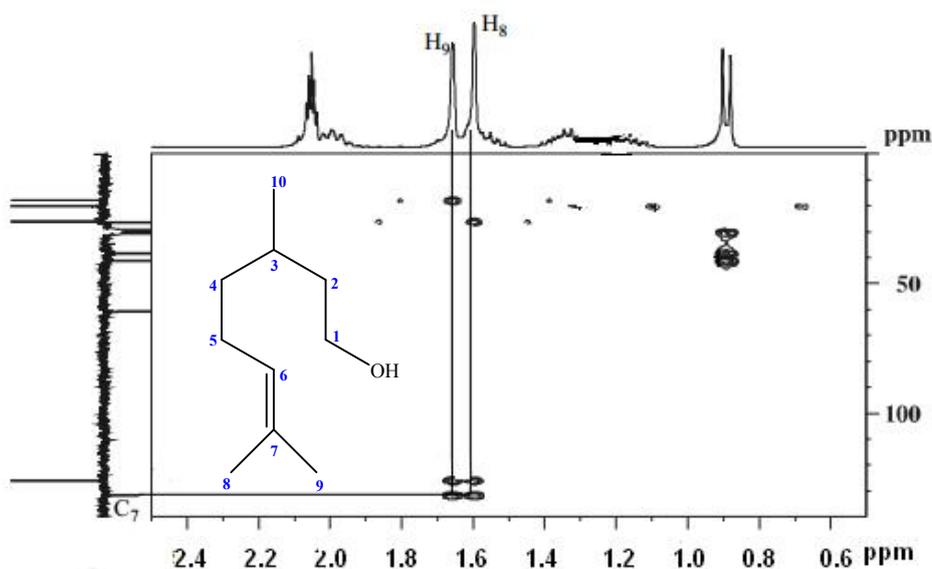


Fig. II.5. Spectre HMBC du citronellol dans l'acétone

D'après les résultats de Bakkour. montré sur la figure.II.5 on observe que le carbone 7 de citronellol possède deux taches de corrélation sur la carte HMBC avec les protons 8 et 9. L'obtention de spectres ayant une résolution proche de celle obtenue en solution, on peut réaliser des expériences 2D classiques (COSY, HSQC) [33].

II.3.4.1.2. Mesure de la solubilité (diagramme de solubilité)

La formation du complexe avec la CD fait augmenter la solubilité de la molécule inclus (invitée). Les diagrammes de solubilité ou isothermes de solubilité sont réalisés en plaçant un excès de substance en présence de solutions aqueuses de CDs de concentrations croissantes, à une température donnée.

Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre de la complexation (de plusieurs heures à plusieurs jours), la quantité de substance solubilisée est déterminée 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 vertical et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe horizontal.

Higuchi et Connors [34] ont classé les différents types de diagrammes (Figure II.6) caractérisant les interactions substrat-principe actif, auxquelles peuvent être assimilées les interactions CD et molécule invitée.

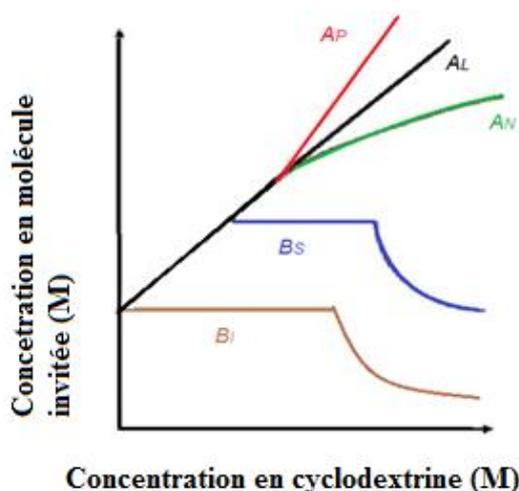


Fig. II.6. Types de diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors [34].

Les diagrammes de solubilités sont classés en types A et B ; les courbes de type A indiquent la formation de complexes d'inclusion solubles, sont obtenu quand la solubilité apparente de la substance augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrine [35]. Les profils A_L (linéaires) sont généralement attribués à la formation de complexes 1:1. Un diagramme de type A_P traduit la formation simultanée de complexes de stœchiométries différentes (1:1 à l'origine, puis 1:2 ou 1:3, ...etc.) [34].

Le profil A_N peut être difficile à interpréter. La chute de solubilité par rapport au profil linéaire peut être liée à des modifications de la solubilité du complexe, de la constante diélectrique du milieu ou à l'association de molécules de cyclodextrines entre elles [36]. Tandis que les courbes de type B suggère la formation des complexes d'inclusion avec une faible solubilité. Si on considère la courbe B_S , la solubilité du substrat est augmentée par l'ajout de cyclodextrine jusqu'au point A. Du point A à B, la solubilité maximale du complexe est atteinte puis l'ajout de cyclodextrine entraîne une précipitation du complexe. Pour la courbe B_i , l'ajout de cyclodextrine n'entraîne pas une augmentation de solubilité du substrat. De plus, au bout d'une certaine concentration, le complexe d'inclusion précipite.

La constante d'association K_a d'un complexe 1:1 peut être déterminée à partir de la portion linéaire des diagrammes B ou A selon l'équation [37]:

On a:



La constante d'association est donnée par l'équation suivante :

$$K_a = \frac{[PA:CD_n]}{[PA][CD]^n} \quad (1)$$

Avec :

K_a = Constante d'association.

$[PA : CD_n]$ = Concentration du complexe à l'équilibre.

$[CD]$ = Concentration de cyclodextrine à l'équilibre.

$[PA]$ = Concentration du principe actif à l'équilibre.

n = Coefficient de stœchiométrie.

Dans le cas où $n = 1$ (complexe type 1:1), la constante d'association est déterminée par la combinaison entre ces équations :

$$S_t = [PA] + [PA: CD] \quad (2)$$

$$[CD]_t = [CD] + [PA: CD] \quad (3)$$

Avec $[PA] = S_0$

Soit :

S_t = la solubilité totale de la molécule invitée PA en présence de cyclodextrine.

$[CD]_t$ = la concentration totale de cyclodextrine.

S_0 = la solubilité initiale de la molécule invitée PA.

$$S_t = S_0 + \frac{K_a S_0 [CD]_t}{1 + K_a S_0} \quad (4)$$

Si on trace S_t en fonction $[CD]_t$, on obtient une droite de pente $\frac{K_a S_0}{1 + K_a S_0}$ et d'ordonnée à l'origine S_0 (figure. II. 7).

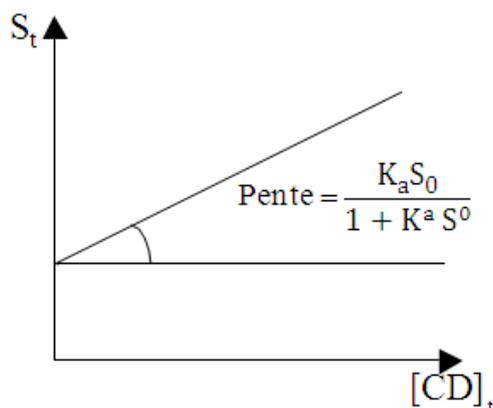


Fig. II.7. Courbe de la solubilité S_t en fonction de la concentration cyclodextrine $[CD]_t$.

D'après la pente, on peut déterminer la constante d'association K_a tels que :

$$K_a = \frac{\text{pente}}{S_0(1-\text{pente})} \quad (5)$$

Piel et coll [30] ont utilisé cette méthode pour étudier la complexation du miconazole et de la betamethazone avec des cyclodextrines, ils ont obtenu des valeurs comparables à celles qui sont obtenues par RMN.

II.3.4.1.3. Spectroscopie UV

La spectroscopie UV-visible étant une technique assez sensible, elle permet de travailler dans des gammes de concentrations faibles, ce qui peut être intéressant pour des produits peu soluble. Beaucoup de molécules invitées présentent une modification de leur spectre d'absorption UV-visible lorsqu'elles sont incluses dans une cyclodextrine.

Généralement, ces modifications spectrales sont similaires à celles observées lors d'un changement de solvant. Un déplacement du maximum d'absorption ou une diminution du coefficient d'extinction molaire peut alors observer [38]. La Figure. II.8 montre l'influence de l'addition de la β -CD dans un rapport molaire variant de 0 à 100 Mm sur le spectre d'une solution de piroxicam. L'ajout de CD entraîne un effet hypsochrome et hypochrome sur le spectre UV du piroxicam.

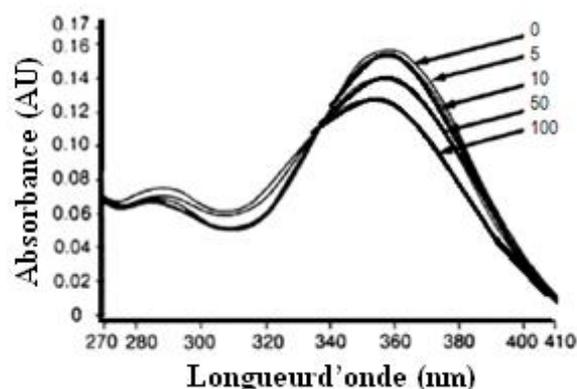


Fig. II.8. Influence de l'addition de la β -cyclodextrine sur le spectre UV d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 95 μ M et à pH = 5 [38].

En mesurant les variations de λ_{\max} ou de l'absorbance en fonction de la concentration en cyclodextrine, la constante d'association d'un complexe 1:1 peut être déterminée selon la méthode de Benesi-Hildebrand [38].

II. 3.4.1.4. Spectrométrie de Masse

D'après la littérature, il n'y a pas de changement entre la phase liquide et la phase gazeuse en terme de complexe ; la dissociation entre la molécule hôte et invitée se fait rarement. Les complexes peuvent donc être analysés par spectrométrie de masse. Différentes techniques ont été utilisées avec différentes sources (ESI ou API) et différents analyseurs que ce soit en mode d'ionisation positive ou négative [39-41]. Les échantillons sont en général

dissous dans une solution aqueuse ou un mélange acétonitrile-eau puis introduits dans le spectromètre.

II. 3.4.1.5. Microcalorimétrie

La mesure de la chaleur libérée lors du mélange de deux solutions, l'une contenant la cyclodextrine et l'autre contenant le principe actif, permet de quantifier l'énergie libérée par la formation du complexe. Par la variation des débits de deux solutions, l'enthalpie et l'entropie de formation du complexe peuvent se calculer, ainsi que la constante d'association de celui-ci [42].

II. 3.4.1.6. Solubilité différentielle

Dans certains solvants organiques, la cyclodextrine n'est pas soluble. Dans ces conditions, le principe actif inclus dans la β -cyclodextrine reste piégé dans la cavité alors que la fraction non incluse est dissoute dans le solvant. Depuis longtemps les solvants organiques sont donc utilisés pour laver les complexes d'inclusion et enlever les molécules non incluses.

Frömming et Szejtli en 1994 ont décrit une technique analytique appelée la solubilité différentielle. Ils ont dissous leur produit dans l'acétone [43].

La β -cyclodextrine n'étant pas soluble dans ce solvant, seul le principe actif libre est analysé. Si 50 % d'eau est ensuite ajouté au mélange, la cyclodextrine et le principe actif encapsulé deviennent solubles. Il est alors possible d'analyser la totalité du principe actif libre et lié.

Van Hees et coll en 2002 ont repris ces analyses avec le complexe piroxicam- β -cyclodextrine mais en remplaçant l'acétone par de l'acétonitrile [44]. La β -cyclodextrine est également insoluble dans l'acétonitrile. De plus ce solvant est moins volatile et la fenêtre spectrale d'analyse UV peut descendre plus bas en longueur d'onde (jusqu'à 200 nm) qu'avec l'acétone [44-46].

II.3.4.2. A l'état solide

II.3.4.2.1. Diffraction des rayons x

La diffraction des rayons X permet d'observer un changement du réseau cristallin lors de la formation d'un complexe. En général, la disparition ou la diminution des raies de diffraction du principe actif synonyme est observé, d'une perte de cristallinité et donc d'une possible complexation. La figure ci-dessous montre le spectre obtenu par Al Omari et coll. [47] pour les diffractions des rayons X d'un principe actif, le sel de trométhamine de l'ibuprofène (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).

Le spectre obtenu pour le mélange physique comporte des raies caractéristiques du principe actif et de la β -cyclodextrine avec une prédominance de cette dernière. Le spectre obtenu pour le complexe est complètement différent dû à la perte de cristallinité qui est généralement associée à la formation d'un complexe d'inclusion [47].

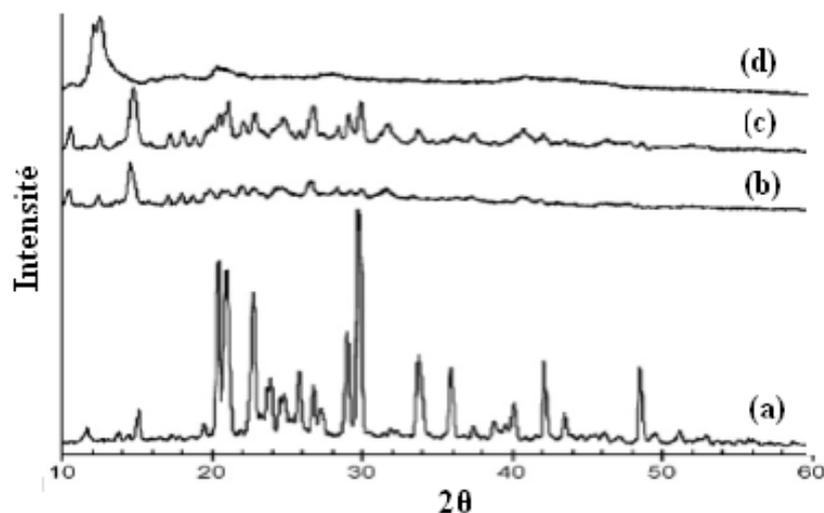


Fig. II.9. Spectres obtenus par diffraction des rayons X d'un principe actif, l'ibuprofène (sel de trométhamine (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d) [47].

II.3.4.2.2. Spectroscopies vibrationnelles: ATR et Raman

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

La figure ci-dessous montre les spectres FT-IR du principe actif, la cladribine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP- β -cyclodextrine (d) obtenus par Axel-Castelli et coll. [48]. Les flèches noires marquent des bandes de vibration caractéristiques du principe actif à l'état non complexé. Ces bandes de vibration deviennent peu visibles dans le mélange physique et disparaissent dans le complexe [48].

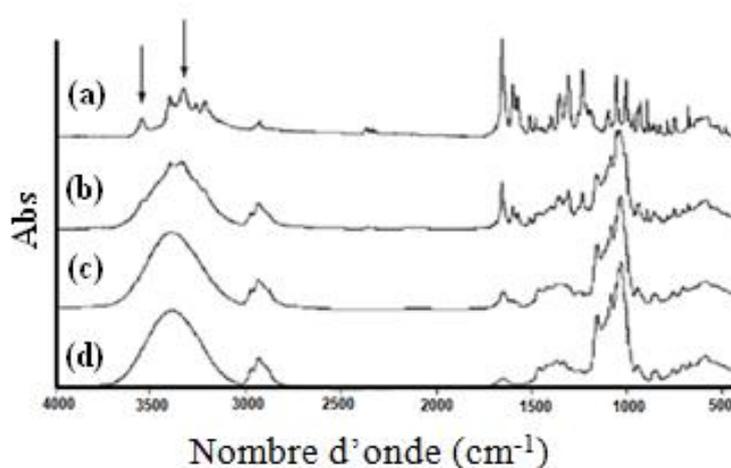


Fig. II.10. Spectres FT-IR d'un principe actif, la cladribine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP- β -cyclodextrine [48].

II.3.4.2.3. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

La DSC permet d'observer les événements thermiques caractéristiques d'un composé tels que la fusion, les transitions de phases, l'oxydation etc. Lors de la formation d'un complexe d'inclusion, les propriétés cristallographiques des composés changent. Des analyses thermiques peuvent être utilisées pour observer ce changement.

La disparition du pic de fusion de la molécule invitée est généralement observée.

La mesure de l'enthalpie absorbée au cours de la fusion est directement proportionnelle à la quantité du composé présent sous forme cristalline [5].

II.3.4.2.4. Microscopie à balayage électronique

La microscopie à balayage électronique est souvent utilisée pour observer le changement de morphologie de la molécule invitée lorsqu'elle est encapsulée dans une cyclodextrine. La figure ci-dessous montre l'analyse MEB d'un principe actif, le sel de trométhamine de l'ibuprofène (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d) obtenus par Al Omari et coll. [47]. Dans le mélange physique, la morphologie obtenue est un mélange de la morphologie du

principe actif et de celle de la β - cyclodextrine avec une prédominance de cette dernière. Par contre il est impossible de reconnaître la morphologie des composés dans l'analyse du complexe ce qui prouve une interaction entre le principe actif et la cyclodextrine [47].

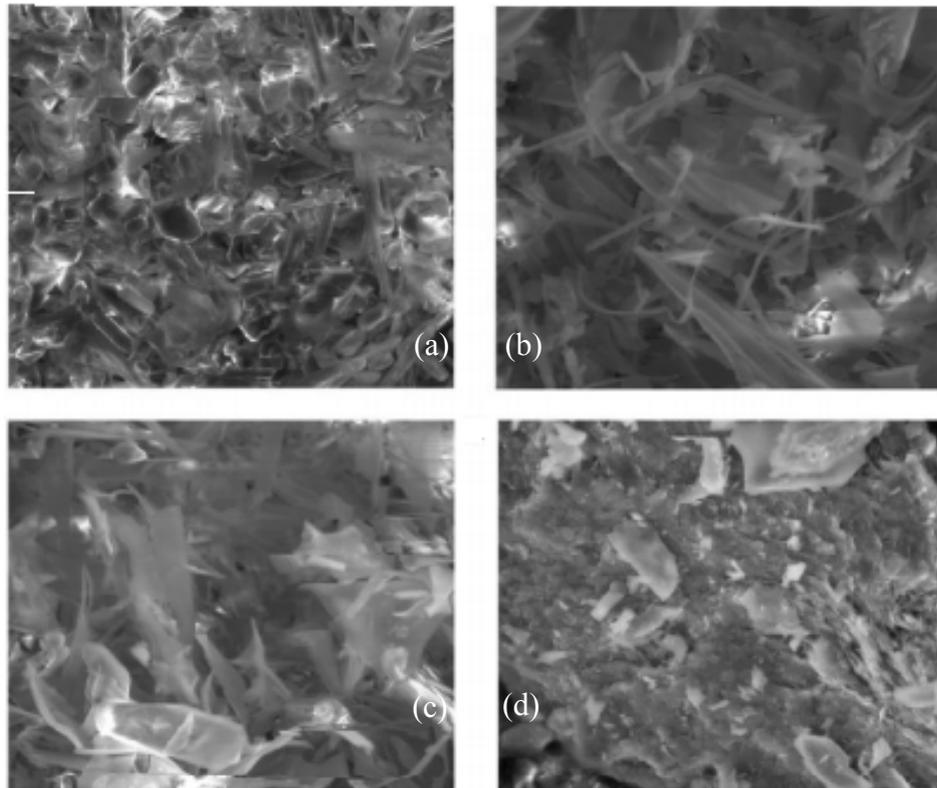


Fig. II.11. Images MEB d'un principe actif, l'ibuprofène (le sel de trométhamine) (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).

II.5. Conclusion

La formation de complexes d'inclusion peut être conditionnée par les caractéristiques physicochimiques de l'invitée ainsi que par l'affinité relative des différentes CDs en question. L'encapsulation peut également avoir différents impacts sur les caractéristiques physicochimiques et les activités biologiques des molécules bioactives. Nous verrons ainsi que l'encapsulation en CDs permet une meilleure solubilisation des molécules bioactives dans l'eau.

- [1] G. Crini, M. Morcellet, N. Morin : Quelques applications des complexes d'inclusion cyclodextrine/substrat. *A review, l'actualité chimique*. 247 (2001) 18-25.
- [2] M.Charoenchaitrakool, Dehghani. N.R. Foster, Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. *International journal of pharmaceuticals*. 239 (2002) 103-112.
- [3] X. Zhang, D. Wu, J. Lai, Y. Lu, Z. Yin, W. Wu, Piroxicam/2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Prepared by a New Fluid-Bed Coating Technique. *Journal of pharmaceutical sciences*. 98 (2009) 665-675.
- [4] 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.
- [5] M.Sauceau, E.Rodier, J.Fages, Preparation of inclusion complex of piroxicam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. 47 (2008) 326-332.
- [6] P.S. Mohanachandran, P.G. Sindhumol, T.S. Kiran, Enhancement of solubility and dissolution rate. *An Overview, Int. J. Comp. Pharm.* 4 (11) (2010) 1-10.
- [7] F. Cramer, *Einschlussverbindungen Inclusion Compounds*. Springer-Verlag, OHG- Berlin. *Gottinger.Heidelberg*. (1954) 115-165.
- [8] T. Loftsson, Duchene, D., Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int.J.Pharm.* 329 (2007) 1-11.
- [9] M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin chemistry*. Springer-Verlag :Berlin Heidelberg, New York. (1978) 260-290.
- [10] E. Bilensoyi, *Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine*. John Wiley & Sons. (2011) 25-42.
- [11] S. Weisse, *Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée*. Thèse de l'Université de Paris XI. (2002).
- [12] W. Sandrine, *Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A, stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée*. Thèse de Doctorat. Université PARIS XI, (2002).
- [13] A. Douhal, Chemical, physical and biological aspects of confined systems, *Cyclodextrin Materials, Photochemistry Photophysics and photobiology*. Elsevier. (2006) 5-18.
- [14] M. Kodaka, Application of a General Rule to Induced Circular Dichroism of Naphthalene Derivatives Complexed with Cyclodextrins. *J.Phys.Chem.A* .102 (42) (1998) 8101-8103.
- [15] M. Kikuchi, Y.Uemura, F.Hirayama, M.Otagiri, K.Uekama, Effect of cyclodextrins on anthracycline stability in acidic aqueous media, *J.Incl.Phenom.* 2 (1984) 623-630.

- [16] G. Pistolis, A.Malliaris, Evidence for Highly Selective Supramolecular Formation between Perylene/ γ -CD and Pyrene/ γ -CD Complexes in Water. *J.Phys.Chem.B.*, 108 (9) (2004) 2846-2850.
- [17] R.L.Schiller, S.F.Lincoln, J. H.Coates, The inclusion of pyronine Y by β - and γ -cyclodextrin. A Kinetic and equilibrium study. *J.Chem.Soc.Faraday Trans-1*. 83 (1987) 3237-3248.
- [18] M.E. Davis, M. E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3 (2004) 1023-1035.
- [19] D. D. Chow, A.H.Karara, Characterzation, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- β -Cyclodextrin complex systeme. *Int.J.Pharm.* 28 (1986) 95-101.
- [20] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology. *Davies, J.E.D (Ed.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.* (1988) 441-450.
- [21] K. Kano, S.Hashimoto, M.Sisido, Y.Imanishi, A chiral pyrene excimer in .gamma.-cyclodextrin cavity. *J. Am. Chem. Soc.* 107 (21) (1985) 6117-6118
- [22] X.J. Wang, M.L. Brusseau, Simultaneous Complexation of Organic Compounds and Heavy Metals by a Modified Cyclodextrin. *Environ Sci Technol* . 29 (9) (1995) 2346-2351.
- [23] X.J. Wang, M.L. Brusseau, Solubilization of some low-polarity organic-compounds by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Environmental Science and Technology*. 27(13) (1993) 2821-2825.
- [24] M. Suzuki, Y. Sasaki, Inclusion compound of cyclodextrin and azodye. I. Methyl orange. *chem. pharm. Bull.* 27 (1979) 609-619.
- [25] Y. Zhou. The Interaction of Piroxicam with Neutral (HP- β -CD) and Anionically Charged (SBE- β - CD) β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 56 (2006) 215-220.
- [26] B.A. Demian, Correlation of the solubility of several aromatics and terpenes in aqueoushydroxypropyl-beta-cyclodextrin with steric and hydrophobicity parameters. *Carbohydr. Res.* 328 (2000) 635-639.
- [27] S . Tanada, T.Nakamura, N. Kawasaki, Y.Torii , S. Kitayama., *J. of Coll. Inter. Sci.*217 (1999) 417-419.
- [28] M. L. E. McBain. E. Hutchinson, Solubilization and related phenomena. *New York : Academic press* .(1955).
- [29] C. Vollhardt, N.E.Schore, La déduction des structures par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. In: *Traité de Chimie Organique*. De Boeck Université, Bruxelles.(1995) 324-371.

- [30] G. Piel, S. Moutard, B.Perly, S.H.Henry de Hassonville, P.Bertholet, V.Barillaro, M.Piette, L.Delattre, B. Evrard, Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 14 (2004) 87-91.
- [31] J.Jeener, G. Alewaeters, Pulse pair technique in high resolution NMR” a reprint of the historical 1971 lecture notes on two-dimensional. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* 95 (2016) 75-80.
- [32] I. Kilpeläinen, S.Kaltia, P.Kuronen, K.Hyvärinen, P.H. Hynninen, Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of 132(R)-methoxychlorophylla using the two-dimensional HMQC and HMBC techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* 32 (1) (1994) 29-35.
- [33] Y.Bakkour, Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des Cyclodextrines natives et polymérisées. Thèse de l'Université de Lille 1, en Sciences et Technologies. (2005).
- [34] T. Higuchi, K.A.Connors, Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation.* 4 (1965) 117-212.
- [35] M.E. Brewster, T.Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 59(2007) 645-666.
- [36] D. Castagne, Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomes ou biologiques, Thèse Doctorat, Université de Liège. (2010).
- [37] D. Acerbi, Biopharmaceutical optimisation of beta-cyclodextrins inclusion compounds. *Drug investment.* 2 (2) (1990) 29-36.
- [38] J. A. Hildebrand, H. A Benesi, A graphical method for the determination of binding constants. *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703-2710.
- [39] A. Selva, Multicomponent non-covalent associations of β -cyclodextrin (β -CD)-drug inclusion complexes with diethanolamine (DEA). Detection and characterization of gaseous protonated 1:1:1 β -CD-Drug-DEA adducts by ionspray ionization and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry.* 31 (1996) 1364-1370.
- [40] D. Asta, Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified β -cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry.* 64. (2009) 331-340.
- [41] B. Kralj, A. Smidovnik, J. Kobe, Mass spectrometric investigations of alpha- and beta-cyclodextrin complexes with ortho-meta- and para-coumaric acids by negative mode electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 23 (2009) 171-180..

- [42] D.Z. Sun, A microcalorimetric study of host-guest complexes of α -cyclodextrin with alkyl trimethyl ammonium bromides in aqueous solutions. *Journal of solution chemistry*. 34. 701-712,2005.
- [43] K. H. Fromming, J. Szejtli. Cyclodextrins in Pharmacy. *The Netherland: Kluwer Academic Dordecht*. (1994) 13-15.
- [44] T. Van Hees, G. Piel, S.H. De-Hassonville, B. Evrard, L. Delattre, Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *European journal of pharmaceutical sciences*. (2002) 15. 347-353.
- [45] M. Valero, L.J. Rodriguez, M.M. Velazquez, Inclusion of non-steroidal anti-inflammatory agents into aqueous cyclodextrins: A UV-absorption spectroscopic study. *Il Farmaco*. 51 (1996) 525-533.
- [46] C. M. Sabliov, C. Fronczek, C. E. Astete, M. Khachatryan, L. Khachatryan, C. Leonard, Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. *J Am OilChem*. (2009).
- [47] M.M. Al Omari, N.H. Daraghme, 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.
- [48] 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.

Partie

Expérimentale

Chapitre. III

L'effet de la
complexation par la β -
CD sur l'auto-
extinction de la
fluorescence du
Tramadol

III.1. Introduction

L'augmentation de l'émission de la fluorescence est souvent observée lorsque les colorants sont solubilisés dans des milieux confinés, soit immobilisés à l'état solide ou liés en tant qu'espèces complexant avec des polymères, des protéines ou des cyclodextrines (CDs). L'origine de l'amélioration de la fluorescence par les CDs par rapport à celle du colorant libre en solution aqueuse peut être liée à plusieurs phénomènes physico-chimiques, à savoir la polarité du site de solubilisation qui modifie le spectre d'absorption, mobilité restreinte qui prévient la désintégration non radiative de la fluorescence, inhibition de l'extinction par accessibilité restreinte des désactivateurs [1-3]

Il est généralement difficile de déterminer quel phénomène est responsable de l'augmentation des émissions. Des questions aussi complexes appellent des enquêtes quantitatives sur chaque phénomène. Le présent travail vise à une étude quantitative de l'auto-extinction et son inhibition par complexation par β -CD. Des améliorations de fluorescence élevées ont été révélées lorsque l'environnement local du colorant limite sa mobilité. L'émission induite par l'agrégation est le mécanisme le plus puissant, en particulier pour les colorants dont la fluorescence se désintègre par des rotations intramoléculaires [4]. Dans certains cas, la cristallisation provoque une forte amélioration de la fluorescence par facteur de centaines. La liaison aux polymères et aux protéines provoque également des effets similaires [5,6].

La formation du complexe d'inclusion avec des CDs donne une amélioration de la fluorescence lorsque le fluorophore est impliqué en complexation. A titre d'exemple, Xu et coll. ont rapporté une augmentation de 30 fois pour un pseudorotaxane d'un tensioactif salicylaldéhyde azine bolaform avec de la β -CD. Dans ce cas le fragment fluorescent salicylaldéhyde azine était impliqué dans la complexation d'inclusion à l'intérieur de la cavité hydrophobe du β -CD [7].

L'amélioration de la fluorescence est moindre lorsque le site de complexation avec β -CD est séparé de la partie fluorescente du colorant. À titre d'exemple, la complexation d'un pentaphénylméthylsilole à quatre branches par β -CD a conduit à une augmentation de la fluorescence de deux fois car la complexation a eu lieu sur les bras poly (oxyde de propylène) au lieu du colorant lui-même [8].

En dehors de l'amélioration de la fluorescence entraînée par la mobilité restreinte, un autre mécanisme est l'inhibition de l'extinction. Ainsi, la complexation de l'espèce fluorescente par β -CD fait une barrière stérique contre la proximité des extincteurs [9-14].

Un phénomène en relation qui n'a pas reçu d'attention jusqu'ici est l'auto-extinction qui a lieu à des concentrations élevées de molécules fluorescentes. Le présent chapitre porte sur ce dernier point en utilisant le chlorhydrate de Tramadol comme molécule fluorescente où nous avons étudié les propriétés fluorescentes du Tramadol subissant une complexation d'inclusion avec la β -CD dans des solutions diluées et/ou de concentrations plus élevées ; Dans ce but, une formation des complexes d'inclusion par différentes méthodes a d'abord été étudiée.

Il convient de noter que la gamme de concentration du présent travail est différente des doses thérapeutiques, de sorte que la pertinence pharmaceutique est faible; le but actuel est d'étudier la photochimie. Pour l'étude des phénomènes de fluorescence à hautes concentrations où une absorbance élevée affaiblit l'émission de fluorescence, une méthodologie a été fournie.

L'étude est construite comme suit:

- Etude structural du Tramadol;
- ⊖ Optimisation théorique et multi-paramètres du Tramadol ;
- ⊖ Formations et caractérisations des complexes d'inclusion [Tramadol : β -CD] ;
- ⊖ Détermination de la constante de complexation de Tramadol avec la β -CD ;
- Mise en évidence de l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol à des concentrations élevées ;
- ⊖ Inhibition de l'auto-extinction par complexation avec la β -CD.

III.2. Etude structural du Tramadol

Le chlorhydrate de Tramadol est un analgésique opioïde synthétisé en 1962 dans les laboratoires de Grünenthal, en Allemagne. Son autorisation de mise sur le marché (AMM) sous le nom Tramal[®] date de 1977 [15], le Tramadol a été approuvé pour la commercialisation aux États-Unis comme un analgésique non contrôlée en 1995 sous le nom commercial d'Ultram[®]. IL a été délivré en France le 11 avril 1997 par l'AMM. Son originalité pharmacologique qui le rattache en partie aux opiacés classiques justifie sa place dans l'arsenal thérapeutique, en particulier dans le domaine de la douleur aiguë [16,17]. Il est classé au niveau deux de la catégorie analgésiques, tels que la codéine et le dextropropoxyphène; il peut être utilisé en cas de douleurs aiguës (par exemple après une intervention chirurgicale) et de douleurs chroniques (comme dans le cas d'une blessure au dos ou d'un cancer). Enfin, les différentes présentations thérapeutiques de la molécule rendent son utilisation clinique aisée tant par voie entérale que parentérale ainsi que par voie locorégionale.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

En 2013, une équipe française a identifié le Tramadol à l'état naturel dans les racines d'un pêcher africain (*Nauclea latifolia*, Fig.III.1), à la concentration de 0,4% [18]. Pour la première fois, un médicament de synthèse est découvert dans une source végétale à des concentrations cliniquement significatives. Les auteurs considèrent que 20 g de plante contiennent l'équivalent d'une pilule de Tramadol, sans en préciser le dosage [19]. En 2014, le Tramadol est commercialisé dans cent pays à travers le monde.



Fig. III.1. *Nauclea latifolia*, fruit et fleur

III.3. Propriétés pharmacodynamiques du Tramadol

Il est nommé selon l'IUPAC de 2-(diméthylamino) méthyl-1-(3-méthoxyphényl) cyclohexanol, de formule brute $C_{16}H_{25}NO_2$. Il a une structure proche de la codéine et de la morphine (Fig .III.2).

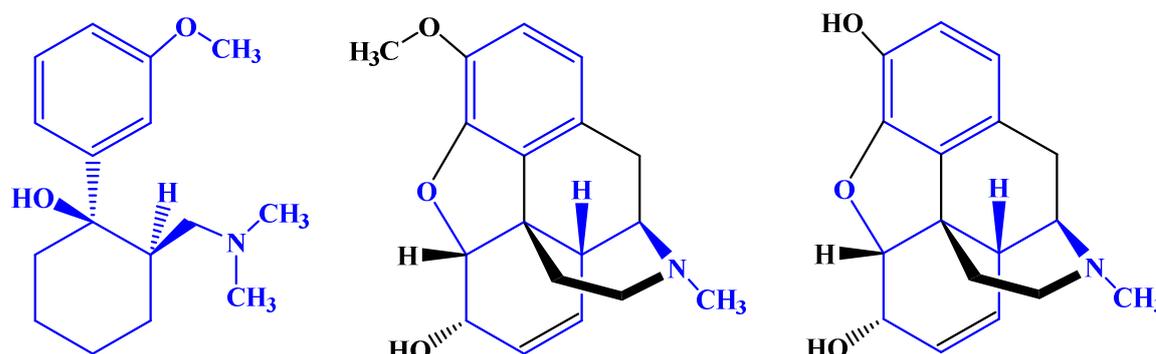


Fig.III.2. Structure moléculaire du Tramadol, de la codéine et de la morphine de gauche à droite

Le tramadol est un mélange racémique de deux énantiomères (Fig.III.3), l'énantiomère (*1R*, *2R*) (+) étant le plus actif [20]. Le Tramadol a une faible affinité pour les récepteurs μ (6000 fois plus faible que la morphine et 10 fois moins importante que la codéine) [21] et presque négligeable pour les autres récepteurs d'opioïdes endogènes (*Kappa*, *Delta*) en raison de la présence d'un radical méthyle sur le noyau phényle [22].

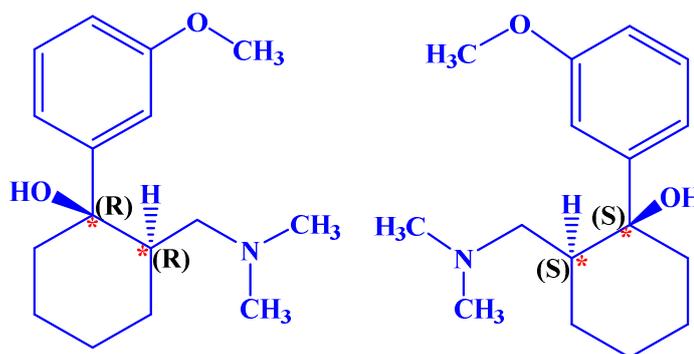


Fig.III.3. Structure des énantiomères (*1R*, *2R*)-Tramadol et (*1S*, *2S*)-Tramadol

Son mécanisme principal d'activité analgésique est l'inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradréline dans le noyau du raphé dorsal [20, 23]. Alors que son métabolite principal de sa biotransformation ; *O*-desméthyltramadol (M1, ODT) (Fig.III.4), dépourvu de groupement méthyle sur le noyau phényle, a une affinité 200 fois plus forte pour les récepteurs opioïdes que le médicament original [24,25].

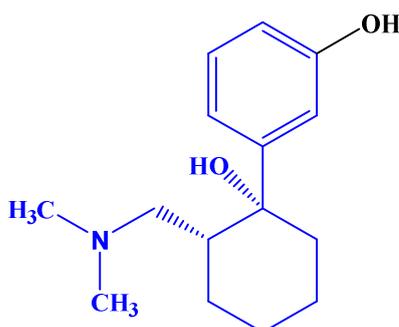


Fig.III.4. *O*-Desméthyltramadol (ODT)

Par ailleurs, des résultats d'études menées sur les hommes et les animaux indiquent que les effets analgésiques du Tramadol ne sont que partiellement neutralisés ($\approx 30\%$) par la naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes [24].

Ces résultats suggèrent l'implication d'un mécanisme d'action non opioïde. En effet, le Tramadol inhibe la recapture neuronale de la noradrénaline et de la sérotonine (5-HT) (5-hydroxytryptamine) (Fig.III.5).

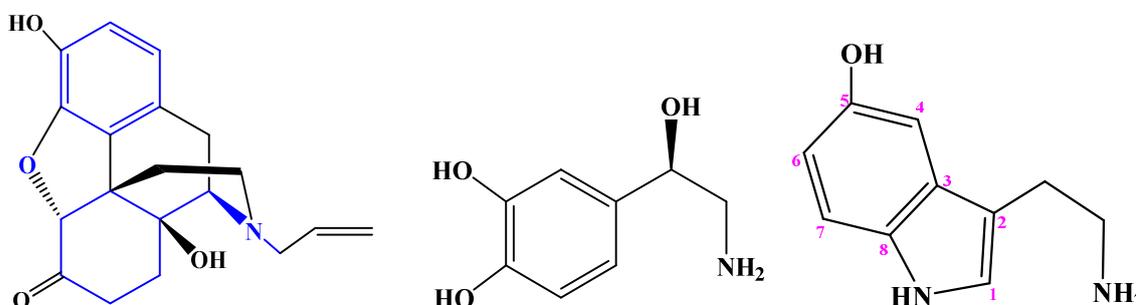


Fig.III.5. Présentation de la structure moléculaire de la naloxone, de la noradrénaline et de la sérotonine (5-HT) de gauche à droite

Ce mode d'action particulier est dû aux propriétés complémentaires des deux énantiomères

- ⊖ L'énantiomère (+) a une plus forte affinité pour le récepteur opioïde (μ). Il s'agit d'un inhibiteur puissant de la recapture synaptique de la 5-HT et il entraîne une libération accrue de 5-HT.
- ⊖ L'énantiomère (-) a une affinité moindre pour le récepteur (μ). Il s'agit d'un inhibiteur puissant de la recapture synaptique de la noradrénaline.

Le mélange racémique des deux énantiomères (\pm) possède une activité antalgique supérieure à l'effet additif des deux composants, en raison de la synergie entre l'effet opioïde et l'effet monoaminergique central. Ce double mécanisme explique l'effet analgésique du Tramadol par action sur les composantes nociceptives et neuropathiques de la douleur, le tableau ci-dessus rassemble les différents effets de Tramadol sur un rat. [25, 26]

Tableau.III.1. Inhibition de la liaison des opioïdes et monoamines par le Tramadol (\pm), ses énantiomères (+/-) et M1 à partir de préparations de cerveau de rat [25, 26]

Composés	Ki (μ M)				
	Mu (μ)	Delta (δ)	Kappa (κ)	Noradrénaline	Sérotonine
(\pm) Tramadol	8.3	100	81	1,8	1,9
(+) Tramadol	4.4	54	83	6,9	0,87
(-) Tramadol	130	490	81	0,59	4,8
M1, ODT	0,017	0,69	1,8	42	7,5
Morphine	0,0021	0,008	0,17	>100	>100

Ki : Constante de dissociation obtenue par inhibition de la fixation d'un ligand

III.4. Optimisation théorique et multi-paramètres du Tramadol

Nous pouvons utiliser les méthodes d'optimisation multiparamétriques (MPO) pour prédire le meilleur équilibre des propriétés physicochimiques des composés, parmi ces méthodes, nous appliquons la règle de base la plus couramment utilisé : la règles de Lipinski [27, 28].

III.4.1. Représentation des calculs « drug-like » sur la base de Lipinski

Les règles de Lipinski de chaque médicament éventuel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels que son faible coût de production, être soluble, être stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME). Ainsi, en 1997, Lipinski et coll [27] ont proposé ce qu'on appelle couramment la « règle de Lipinski » ou la « règle de cinq » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être absorber par voie orale s'il respecte au moins trois des cinq critères représentés dans le Tableau. III.2. La règle de Lipinski est la plus utilisée pour l'identification des composés (Drug-Like) [29,30].

Tableau. III.2. Valeurs seuils des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle de Lipinski [28].

	Propriétés physico-chimiques	Règle de Lipinski
Les cinq règles	Poids moléculaire (PM) en Daltons (g/mol)	≤ 500
	Lipophile (LogP)	$0 < \text{Log P} < 3$
	Nombre de donneurs de liaisons hydrogène (DLH)	≤ 5
	Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (ALH)	≤ 10
	Le nombre de liaisons flexibles	≤ 15

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur Molinspiration (bioactivité de la molinspiration.v2018.10). Les paramètres de Tramadol sont rassemblés dans le Tableau. III.3.

Tableau.III.3. Évaluation des paramètres de Tramadol en utilisant le serveur molinspiration.

Paramètres physico-chimiques de Tramadol	
M (g/mol) ^a	263,38
PSA ^b (Å ²)	32,70
N Accp ALH ^c	3
N Donn DLH ^d	1
(LogP) ^e	2,92
Violations ^f	0
Liaisons rotatives	4
V M ^h	270,01

Notes: Masse moléculaire^a; Surface Polaire^b; Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène^c; Nombre de donneur de liaisons hydrogène^d; Lipophilie calculée (Kow)^e; Nombre de violations^f; liaisons rotatives^g; volume moléculaire^h.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

A travers le tableau.III.3, nous remarquons que le Tramadol a une valeur de PSA inférieure à 140 \AA^2 ce qui montre la bonne prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes. La Règle de Veber [31] stipule qu'une bonne biodisponibilité est favorisée lorsque la PSA (Surface polaire topologique) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (mesure de polarité absolue) [32]. Il est clair que le Tramadol est en accord avec la règle de Veber. Nous remarquons aussi que les valeurs du nombre de liaisons rotatives est inférieure à 10, ce qui nous permet de dire que le nombre de liaisons rotatives dans le Tramadol est très faible.

Nous pouvons, également, voir dans le tableau.III.3 que le Tramadol a le nombre d'accepteurs d'hydrogène inférieurs à 10 [33], les trois sites accepteurs de l'hydrogène sont les (O de alcool et O de l'éther et l'amine tertiaire) et le nombre de donneurs d'hydrogène inférieurs à 5, le site donneur de l'hydrogène est (OH). (Fig.III.6). Le poids moléculaire du Tramadol (263.38 g/mol), une valeur inférieure à 500 g/mol , signifie que la molécule traverse facilement les membranes cellulaires [34].

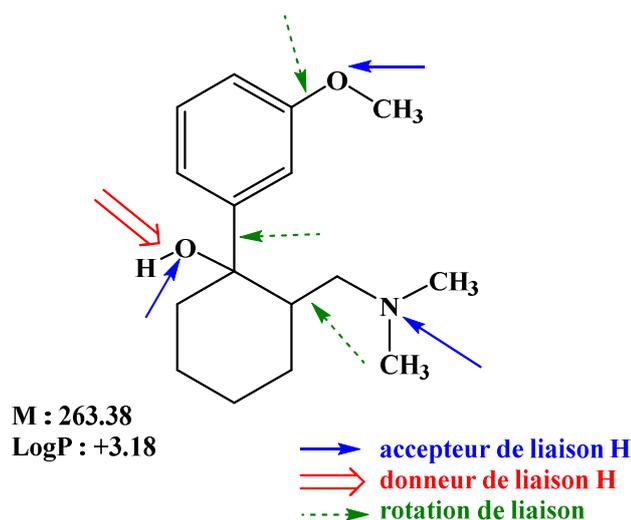


Fig. III.6. Règles de Lipinski appliquées au Tramadol

La lipophilie a été corrélée à divers modèles de propriétés de médicaments affectant ADME / toxicité. Ils incluent la perméabilité, l'absorption, la distribution, la liaison aux protéines plasmatiques, métabolisme, élimination et toxicité. Lombardo et coll. [35,36] ont corrélé le volume de distribution pharmacocinétique (V_d) à lipophilicité.

Le guide général pour une absorption gastro-intestinale optimale après une administration orale, admet que le Log P doit être modéré (entre 0 et 3), comme suggéré dans la figure. III.7. Exprimé à travers la valeur de leur coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}), la méthode de prédiction du log P

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

développée par molinspiration, basé sur les contributions du groupe fonctionnelle des composés. La formule suivante est utilisée pour calculer la valeur de log P :

$$\text{Log Kow} = \text{Log P} = \frac{\text{Concentration du composé en solution dans l'octanol}}{\text{Concentration du composé en solution dans l'eau}} \quad [37] \quad (1)$$

Où Log P= log Kow: coefficient de partage octanol-eau.

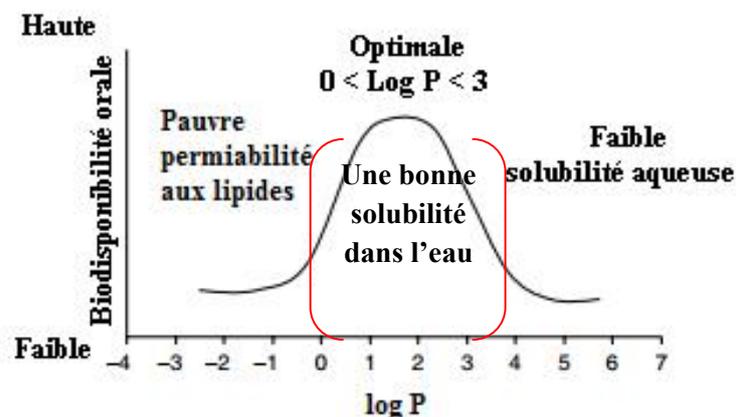


Figure. III.7. Variation de la biodisponibilité en fonction de Log P de différents médicaments [38]

- ⊖ Si $\log P < 0$, les composés avec un log P négatif sont plus polaires et ont une perméabilité pauvres aux lipidiques,
- ⊖ Si $0 < \log P < 3$, les composés ont un bon équilibre de perméabilité et de solubilité,
- ⊖ Si $\log P > 3$, les composés sont plus apolaires et ont une faible solubilité dans l'eau.

Donc d'après le tableau.III.3, nous avons obtenu une valeur positive de log P égale à 2,92, ce qui confirme que le Tramadol a une très forte solubilité dans l'eau (hydrophile).

En ce qui concerne le nombre de violation, nous remarquons que le Tramadol a une violation nulle. Ce qui suggère que le Tramadol théoriquement n'aurait pas de problèmes avec la biodisponibilité orale.

À partir des résultats obtenus ; nous pouvons conclure que le Tramadol respecte les règles de Lipinski, et est utilisable par voie orale, il est présent dans de nombreuses spécialités, et c'est l'un des médicaments les plus utilisés au monde.

Mais le problème de ce médicament est ses effets indésirables majeurs et sa durée de vie très courte. C'est pour cela que nous avons proposé une stratégie d'encapsulation du Tramadol dans une molécule cage, et nous avons choisis la β -cyclodextrine.

Les cyclodextrines forment des complexes d'inclusion avec une grande variété de substances organiques, en solution ou à l'état solide [39,40]. L'amélioration de la solubilité du médicament par la formation d'un complexe d'inclusion de telles molécules rend les CD très utiles en tant qu'agents de solubilisation dans les formes pharmaceutiques [39]. Par ailleurs, la complexation à l'intérieur de la cavité de la CD permet de moduler la biodisponibilité des médicaments [41,42]. Les CDs sont des excipients utiles dans les formulations [43,44]. Le polysaccharide cyclique β -CD est constitué de sept unités α -1,4-D-glucopyranosides. La β -CD forme des complexes d'inclusion avec le Tramadol [45], en raison de pKa du chlorhydrate de Tramadol de 9,488 [46] (C'est une base faible), il est sous sa forme cationique lorsqu'il est en solution aqueuse sans tampon.

III .5. Produits chimiques et méthodes

III.5.1.Produits chimiques

Le chlorhydrate de Tramadol de pureté > 99% a été acheté auprès de Sigma-Aldrich et utilisé tel que reçu. La β -CD a été fourni par Roquette Frères (Lestrem, France) comme Kleptose™ et utilisé tel quel. L'eau désionisée ayant une résistivité de 18 M Ω cm a été utilisée pour la préparation de solutions aqueuses et des complexes d'inclusion.

III.5.2. Méthodes

Toutes les expériences ont été réalisées à 20°C, qui correspond à la température réglée des pièces où les instruments ont été installés.

- ⊕ Les travaux effectués au cours des dernières années ont conduit à plusieurs manières de formation des complexes d'inclusion (invité : β -CD). Parmi celles-ci, nous avons choisi trois méthodes de préparation du complexe d'inclusion (Tramadol: β -CD) avec un rapport molaire [1:1] : la méthode mélange physique, la méthode malaxage et la méthode d'évaporation sous vide. En plus de ces trois méthodes, nous avons suggéré d'utiliser l'irradiation au micro-onde pour la formation du complexe d'inclusion.
- ⊕ Les spectres IR ont été enregistrés par un Nicolet 50 FT- IR thermoscientifique entre les nombres d'onde 400 et 4000 cm^{-1} .
- ⊕ Les analyses Thermogravimétriques ont été réalisées avec Setaram SETSYS 175 sur une plage de température de 20-220°C, avec une vitesse de balayage de 10°C min^{-1} sous flux d'azote de 100 mL min^{-1} .

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

✦ Les mesures d'absorbance UV ont été effectuées dans des cellules de quartz Hellma de trajet optique de 10 mm et de 1 mm avec un spectrophotomètre Varian Cary[®]50 dans la gamme de longueurs d'onde de 200-400 nm. Le spectre de l'eau pure a été soustrait comme (background).

⊕ La diffraction des rayons X des poudres est réalisée avec l'appareillage et les conditions suivantes : Diffractomètre Philips Xpert MPD, générateur Philips tension 40kV intensité 20 mA, anticathode de cuivre ($K_{\alpha} = 1.5418367 \text{ \AA}$), filtre Ni, $V = 40 \text{ kV}$, $I = 20 \text{ mA}$, fente entrée 1/8, détecteur Xcelerator, mode scan continu, échantillon broyé en poudre sur plaquette, domaine angulaire ($2\theta^{\circ}$) 4° à 100° et la durée du scan : 80 secondes.

✦ Microscopie Electronique à Balayage (MEB), MEB en émission de champ S4700 (SEM Field émission S4700). Elle est utilisée pour étudier les aspects microscopiques de la β -CD et du Tamadol d'une part et du complexe d'inclusion (Tram : β -CD) obtenu par complexation, d'autre part.

⊕ Les mesures de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent Cary Eclipse. La longueur d'onde d'excitation était à l'absorbance maximale $\lambda = 271 \text{ nm}$ de Tramadol. L'émission de fluorescence a été enregistrée dans la gamme 280-500 nm.

Les largeurs de fente d'excitation et d'émission donnant une résolution de 2,5 nm permettaient des mesures sur toute la gamme de concentration. Des cuves carrées à quartz de $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ont été utilisées pour toutes les mesures de fluorescence.

Comme nous avons déjà mentionné et en raison de la forte absorbance des solutions concentrées, l'EFI doit être pris en compte et comme les largeurs des fentes d'excitation et d'émission sont entrées dans le calcul de l'EFI, ces largeurs ont été estimées à partir de mesures de fluorescence effectuées dans des ouvertures de largeur réduite en collant un couvercle opaque à la face d'entrée ou de sortie des cuves carrées.

Une ouverture plus large que les largeurs de fente ne change pas le faisceau lumineux, alors qu'une partie de la lumière est coupée et une atténuation est observée lorsque les ouvertures sont plus étroites.

Le facteur de normalisation pour différentes conditions d'enregistrement a été mesuré à partir du pic de diffusion de Rayleigh provenant du mode d'étirement Raman (O-H) de l'eau pure apparaissant à 301 nm pour une excitation à 271 nm. Il est à noter que la ligne d'eau de diffusion Raman était petite par rapport à la fluorescence du Tramadol, même pour les échantillons les plus dilués.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

L'intensité de fluorescence a néanmoins été corrigée pour cette bande Raman (O-H); et il a été normalisé de sorte que les intensités de fluorescence sont données en unités de la ligne de diffusion Raman d'un échantillon d'eau pure de 1cm d'épaisseur, appelée "unités H₂O".

$$I_{\text{(normalisé)}} = \frac{I_{\text{(échantillon)}} - I_{\text{H}_2\text{O}}}{I_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (2)$$

⊖ Les spectres RMN ¹H des solutions dans D₂O ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker DRX500 fonctionnant à la fréquence de Larmor à 500 MHz. La référence de déplacement chimique était la ligne RMN de HDO à 4,70 ppm. Les constantes de couplage, notées (*J*), sont exprimées en Hz. Les abréviations utilisées signifient:

s : singulet, *d* : doublet, *dd* : doublet de doublet, *ddd* : doublet de doublet de doublet, *t* : triplet, *tt*: triplet de triplet et *td* : triplet de doublet.

L'attribution des lignes RMN ¹H de Tramadol a été réalisée en utilisant une méthode RMN-2D spéciale combinant des expériences RMN hétéronucléaires 2D ¹H-¹³C en utilisant IPAP-HSQC-TOCSY et HMBC. Les spectres ont été enregistrés au niveau du laboratoire LAGEP, à l'université Claude Bernard Lyon 1- France.

III.6. Complexes d'inclusion

III.6.1. Formation des complexes d'inclusion

III.6.1.1. Mélange physique (M Ph)

Nous avons mélangé à sec une quantité de β -CD (1,135 g, 10⁻³ mol) et une quantité de Tramadol (0,263g, 10⁻³ mol) pendant 10 -15 minutes, et nous avons obtenu le complexe (Tramadol : β -CD M Ph) de stœchiométrie [1:1] [47].

III.6.1.2. Méthode de malaxage (Kneading Méthode) (M Kn)

Nous avons mis dans un mortier (0,131 g, 5,10⁻⁴mol) de Tramadol et (0,567g, 5,10⁻⁴ mol) de β -CD, 2 mL d'eau distillée a été ajouté, puis nous avons malaxé 30 à 45 minutes, après nous avons mis le complexe dans un four à vide sans chauffer jusqu'à ce qu'il soit complètement sec (24h), et nous avons obtenu le complexe (Tramadol : β -CD Kn) [48].

III.6.1.3. Méthode d'évaporation sous vide (M EV)

Deux solutions ont été préparées à partir de la β -CD et le Tramadol en dissolvant une quantité (0,567g, $5,10^{-4}$ mole) et (0,131g, $5,10^{-4}$ mole), dans 150 mL d'eau distillée, respectivement. Puis nous avons agité les deux solutions séparément 30 min, puis les deux solutions ont été mélangées ensemble pendant 45 minutes jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

Enfin, nous avons mis le mélange à l'évaporateur rotatif et le produit obtenu est séché à 50°C pendant 24 heures. Nous avons obtenu le complexe (Tramadol : β -CD EV) [49-51].

III.6.1.4. Méthode par l'irradiation micro-ondes (M MO)

Nous avons mis dans un mortier (0,263 g, 10^{-3} mole) de Tramadol et (1,135 g, 10^{-3} mole) de β -CD, 2 mL d'eau distillée a été ajouté, après un léger malaxage, le mélange a été mis au micro-onde à 350 watts pendant 2 à 3 min, et nous avons obtenu le complexe (Tramadol : β -CD MO) [52].

III.6.2. Etude des complexes d'inclusion à base des cyclodextrines

Une fois la substance incluse dans la cavité de la cyclodextrine, ses propriétés physicochimiques sont modifiées. Toutes les techniques utilisées pour caractériser l'existence d'un complexe d'inclusion mettent en évidence une modification de la molécule invitée.

III.6.2.1. Caractérisation de la β -CD et du Tramadol avant la complexation par la spectrométrie IR

Les bandes observées sont présentées sur la figure. III.8.

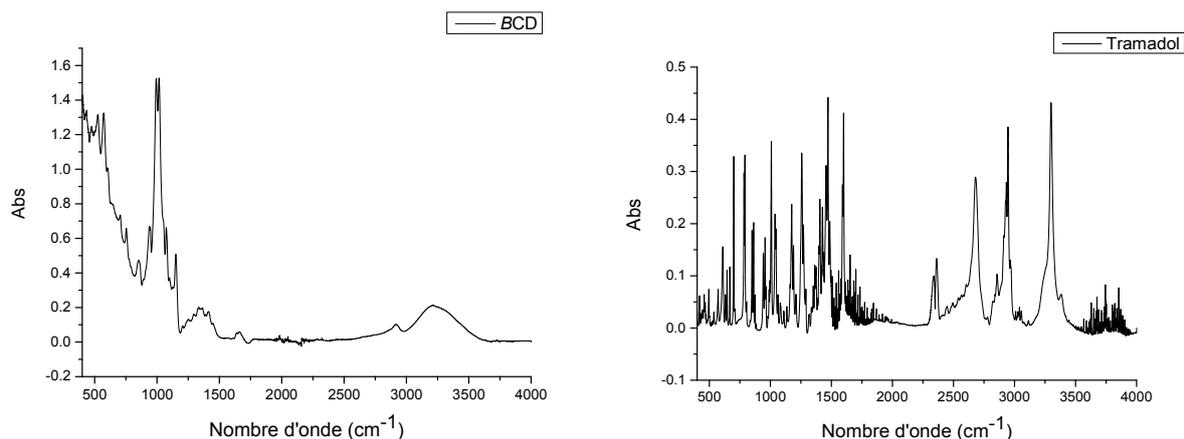


Figure III.8. Spectre IR de β -CD et du Tramadol avant la complexation

III.6.2.2. Caractérisation des complexes d'inclusion (Tramadol : β -CD) par IR

Les interactions entre la cavité et les molécules invitées dans le composé d'inclusion sont caractérisés par des forces faibles entre les molécules telles que des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes [53,54]. La figure. III.9, représente les spectres d'absorption IR pour β -CD, Tramadol et leur mélange physique (Tramadol: β -CD M Ph). Le spectre IR du mélange physique rassemble les pics caractéristiques de β -CD et Tramadol. Ce dernier peut être considéré comme une simple imposition du spectre de β -CD et le spectre du Tramadol.

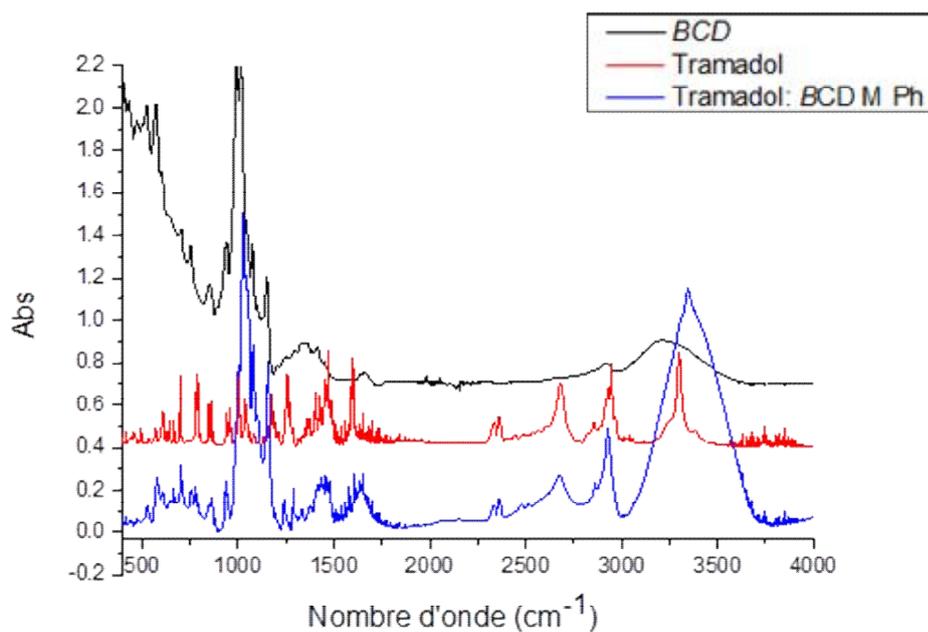


Fig.III.9. Spectre IR du Tramadol, β -CD et (Tramadol: β -CD M Ph)

Les spectres IR des complexes d'inclusion préparés par les méthodes citées plus haut, (Tramadol : β -CD Mph), (Tramadol : β -CD VE), (Tramadol : β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M) ont été examinés dans la Figure.III.10.

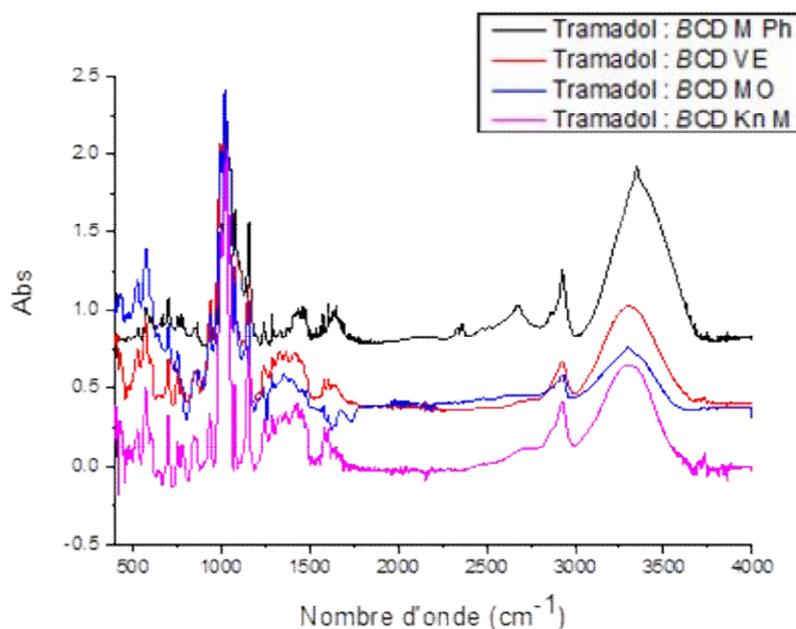


Fig. III.10. Spectre IR des complexes: (Tramadol: β -CD M ph), (Tramadol: β -CD VE), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M)

La première remarque qui peut être faite concerne l'absence de certaines bandes et le décalage d'autres bandes. Ceci nous permettra de dire qu'il y'a une formation des liaisons de complexation. Le Tramadol a une bande d'absorption vers $3305,8 \text{ cm}^{-1}$ (dans le mélange physique apparaît vers 3300 cm^{-1}). Cette bande représente la bande hydrogène intermoléculaire, dans les complexes d'inclusion cette bande est décalé vers $3260,2 \text{ cm}^{-1}$. En plus la forme de la bande a changé (Fig.III.11). Le (C-H) aromatique du Tramadol pur apparaît vers 2927 cm^{-1} et $2815,9 \text{ cm}^{-1}$ une des deux bandes est perdue dans les complexes, l'autre est moins intense (Fig. III.12) et la bande du cycle aromatique apparaît vers $1604,7$; $1577,7$; $1418,2$ et $1434,9 \text{ cm}^{-1}$. Cependant ces bandes sont très faibles $1608,5$; $1581,5$; $1647,1 \text{ cm}^{-1}$ dans les complexe d'inclusion (Fig. III.13). L'amine tertiaire du Tramadol pure apparaît vers (1570 cm^{-1}), cette bande est décalée vers (1590 cm^{-1}) dans les complexes d'inclusion (Fig.III.13).

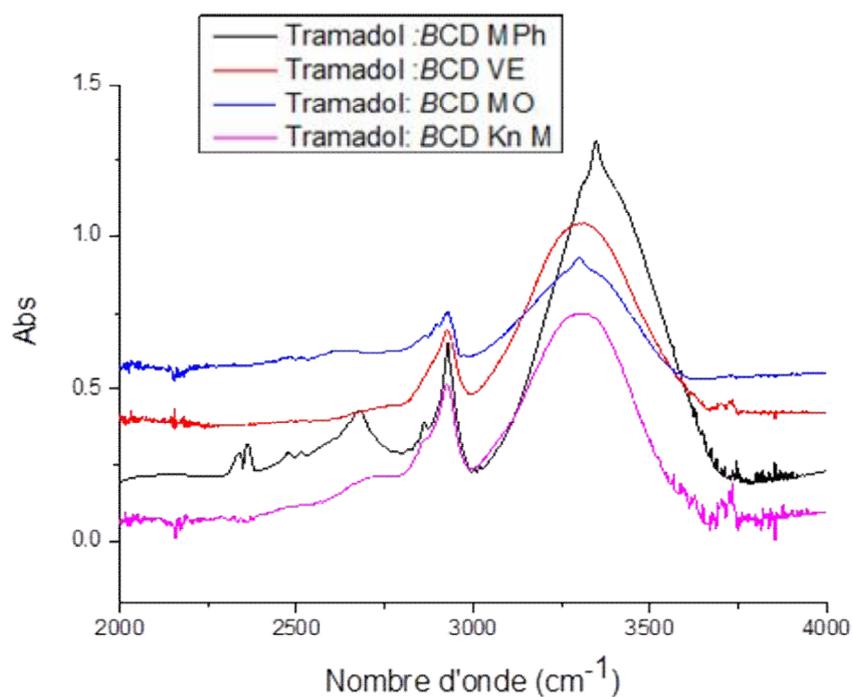


Fig. III.11. Spectres IR des complexes: (Tramadol:β-CD M Ph), (Tramadol:β-CD VE), (Tramadol:β-CD MO) et (Tramadol:β-CD Kn M) dans la gamme [2000 - 4000] cm⁻¹

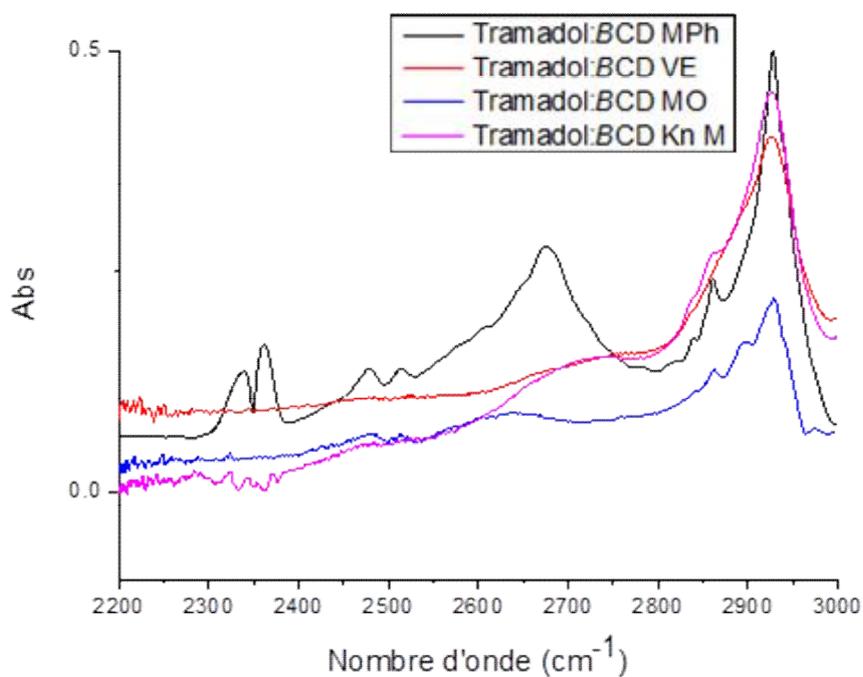


Fig. III.12. Spectres IR des complexes: (Tram:β-CD M Ph), (Tram:β-CD VE), (Tram:β-CD MO) et (Tram:β-CD KnM) dans la gamme [2200 - 3000] cm⁻¹

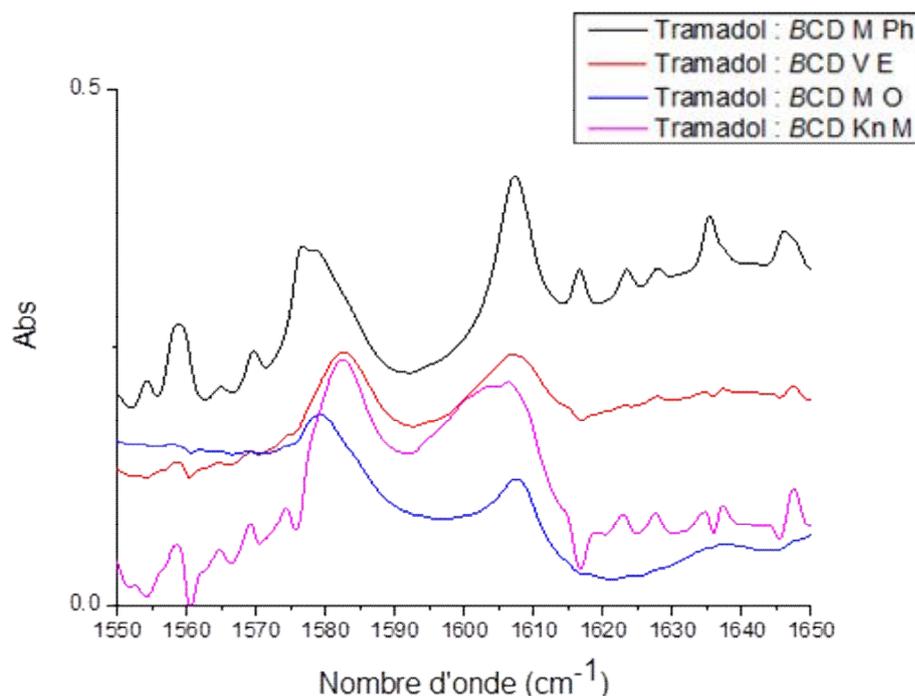


Fig. III.13. Spectres IR des complexes: (Tramadol: β -CD M Ph), (Tramadol: β -CD VE), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD Kn M) dans la gamme [1550 - 1650] cm^{-1}

Ces résultats indiquent que le Tramadol est encapsulé dans la cavité de β -CD selon les trois méthodes à savoir la méthode de malaxage, la méthode d'évaporation sous vide et la méthode d'irradiation via micro-onde.

III.6.2.3. Caractérisation du complexe d'inclusion (Tramadol : β -CD) par les RX

Il a été rapporté dans la littérature que la différence entre les phases solides est responsable des différences de solubilité des médicaments, par exemple une substance amorphe est plus hygroscopique et plus réactive qu'une substance cristalline en raison de son activité thermodynamique plus élevée [55]. La cristallinité et l'amorphie sont des facteurs importants qui doivent être liés à la solubilité des composés [56]. Cette technique permet cependant de comparer des structures obtenues en solution et à l'état solide et apporte de nombreuses informations sur l'influence de la maille cristalline et du solvant sur la structure 3D du complexe d'inclusion, cette technique est utile pour surveiller les changements de cristallinité des composés lors de l'interaction (hôte-invité).

Les diagrammes de diffraction des rayons X de la β -CD, de Tramadol, de (Tramadol : β -CD MPh), de (Tramadol : β -CD Kn) et de (Tramadol : β -CD MO) sont illustrés dans la figure.III.14, les résultats obtenus montrent un profil semi-cristallin pour les complexes d'inclusion obtenus par les trois méthodes contrairement au Tramadol et au β -CD qui présentant un profil cristallin.

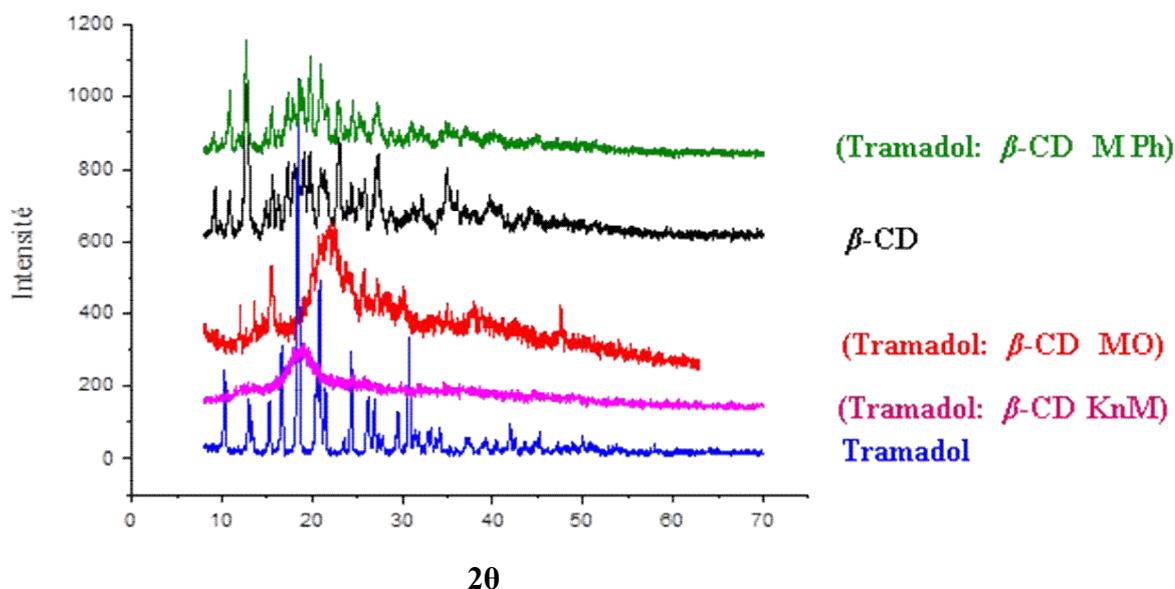


Fig.III.14. Diffractogramme des RX de β -CD, Tramadol et des complexes (Tramadol: β -CD M Ph), (Tramadol: β -CD MO) et (Tramadol: β -CD KnM)

III.6.2.4. Caractérisation du complexe d'inclusion (Tramadol : β -CD) par le MEB

Une microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée pour les matières premières et le complexe obtenu impliquant l'irradiation par micro-ondes afin d'étudier la modification de la morphologie. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure. III.15. Les images ont clairement élucidé la différence dans chaque cas. La structure du complexe d'inclusion est différente de celle du β -CD et du Tramadol pur. La modification des cristaux et de la poudre peut être considérée comme une preuve de la formation d'un nouveau composé (complexe d'inclusion).

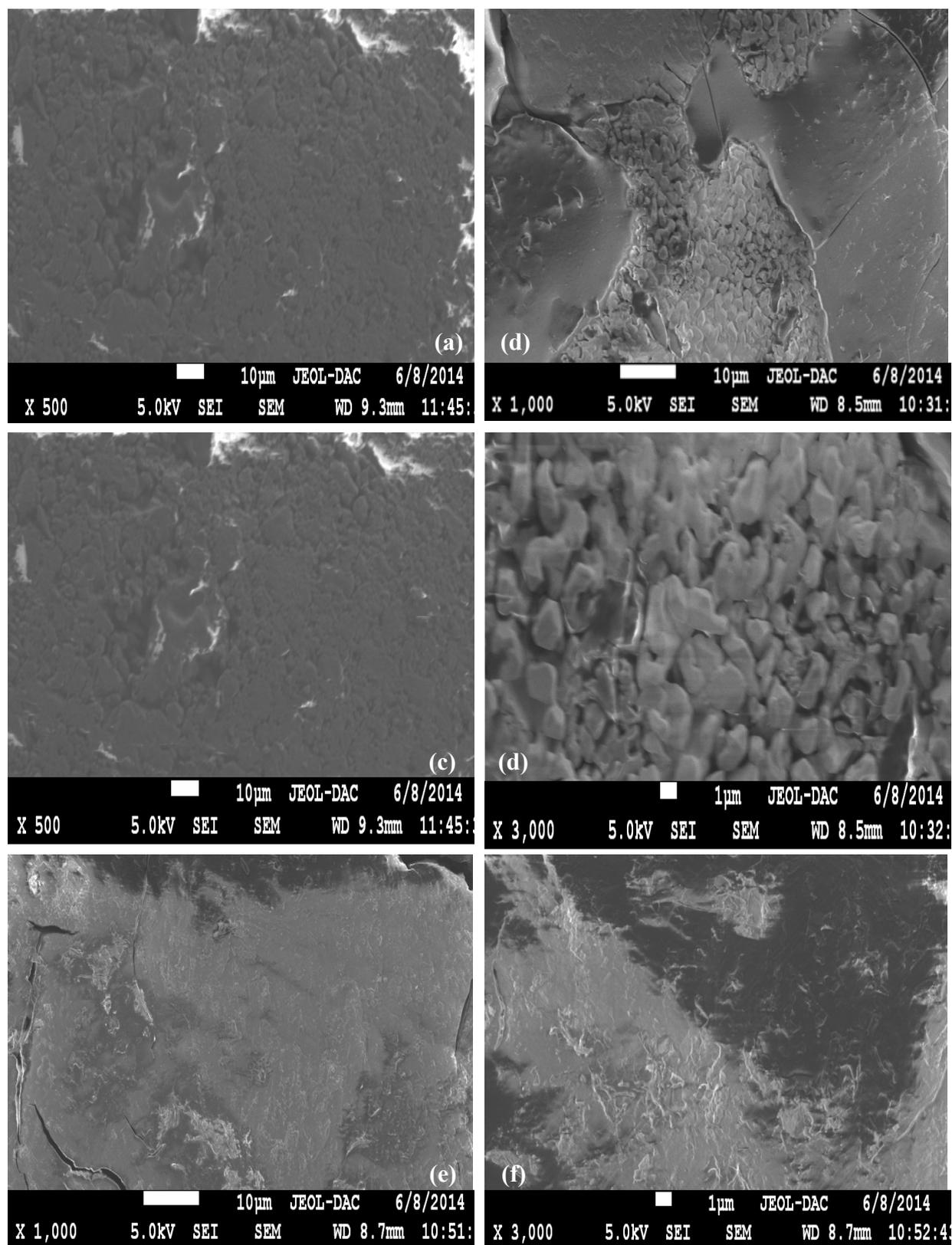


Fig.III.15. Photographie de microscope électronique à balayage de (a) Tramadol (500 \times), (b) Tramadol (1000 \times), (c) (Tramadol : β -CD MO) (500 \times), (d) (Tramadol : β -CD MO) (3000 \times), (e) β -CD (1000 \times) et (f) β -CD (3000 \times) [52].

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les méthodes proposées dans ce travail sont efficaces pour obtenir un complexe (Tramadol: β -CD), l'IR confirmant la formation d'un complexe d'inclusion. Le Tramadol libre a modifié la taille et la morphologie cristalline par l'introduction du β -CD. Ce résultat permet de considérer les CD comme un important excipient pharmaceutique.

III.6.2.5. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est une autre technique utile pour évaluer la pureté des complexes. Avec cette technique, l'inclusion est mise en évidence par la perte du pic de fusion endothermique du Tramadol cristallin. L'analyse thermique a été utilisée avec succès par Redenti et coll [57].

Les résultats relatifs à l'analyse DSC des complexes d'inclusion (Tramadol: β -CD) préparés par les différentes méthodes proposées sont présentés dans le Tableau.III.4. Il s'avère que le complexe obtenu par la méthode d'irradiation sous micro-onde est bien mieux formé que ceux obtenus par les autres techniques.

Tableau. III.4. Analyse DSC du mélange physique (Tramadol: β -CD) et les complexes formés

Complexes d'inclusion	Rapport molaire	Méthode de préparation	Cristallisé %	non cristallisé %
(Tramadol: β -CD)	[1 : 0]	-----	1,000E+02	0,0000E+00
(Tramadol: β -CD)	[1 : 1]	M Ph	9,940E+00	9,0060E+01
(Tramadol: β -CD)	[1 : 1]	M MO	4,513E+00	9,5487E+01
(Tramadol: β -CD)	[1 : 1]	Kn M	2,241E+01	7,7592E+01
(Tramadol: β -CD)	[1 : 1]	M VE	1,532E+01	8,4682E+01

Le tableau.III.5, résume les différentes méthodes utilisées pour préparer les complexes d'inclusion à partir de la β -CD et le Tramadol. La comparaison entre ces méthodes montre un rendement très élevé pour la méthode d'irradiation via micro-onde par rapport aux autres méthodes ce qui confirme les résultats trouvés par la DSC.

Tableau .III.5. Comparaison entre les méthodes de formation des complexes d'inclusion

Méthode de formation des complexes d'inclusion	Temps de reaction	Quantité de solvant utilisé	Rdt (%)
Méthode de malaxage-Kneading Méthode (M Kn)	45 min	MeOH/H ₂ O (v/v)	81
Méthode d'irradiation via micro-onde (M MO)	2 à 3 min	EtOH	92
Méthode d'évaporation sous vide (M VE)	24h et 25min	-----	55

III.6.2.6. Étude des complexes d'inclusion du Tramadol et de β -CD par RMN¹H

Les complexes d'inclusion étudiée au moyen d'expériences de RMN ¹H, ont été préparés par simple mélange de solutions aqueuses de Tramadol et de β -CD; ils ont été utilisés pour des expériences après équilibrage pendant une nuit.

III.6.2.6.1. Détermination de la constante de complexation du Tramadol avec la β -CD

Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés pour plusieurs solutions mélangées de Tramadol et de β -CD dans D₂O en faisant varier la concentration de β -CD à concentration constante de Tramadol. Les variations des déplacements chimiques des lignes de Tramadol et de β -CD par rapport à la concentration de β -CD ont été analysées pour déterminer la stœchiométrie du complexe et la constante d'affinité. L'attribution des lignes RMN ¹H de β -CD est bien connue [58]. Les lignes de Tramadol ont été partiellement assignées par Smyj et coll [59]. Les assignations spectrales données à la figure.III.16 et au Tableau III.6 sont en accord avec celles rapportées par Smyj et coll [59]

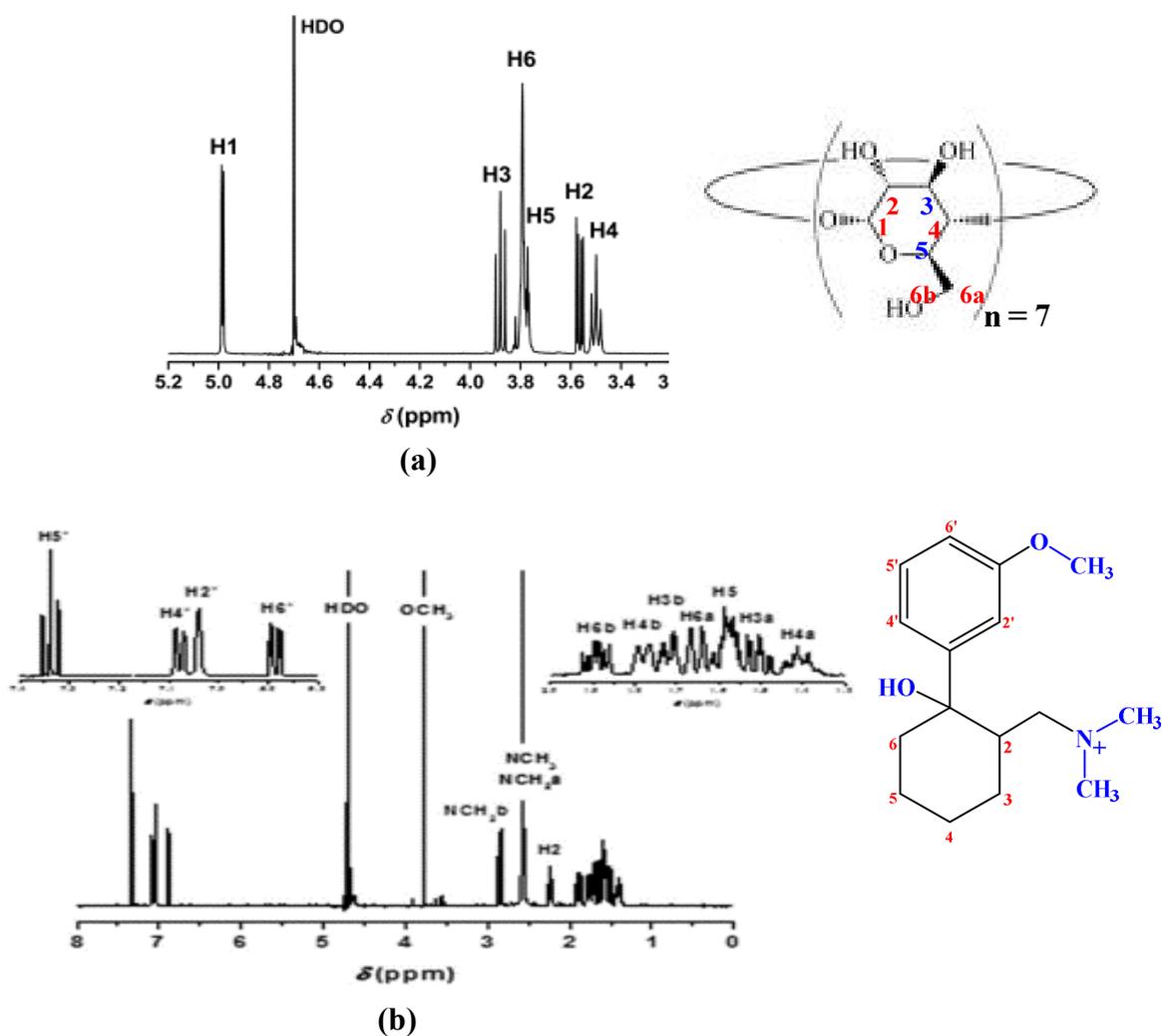


Fig. III.16. Spectres RMN ^1H et attribution des raies RMN de β -cyclodextrine (a) et du Tramadol (b)

Tableau. III.6. Attribution de lignes RMN¹H de chlorhydrate du Tramadol et de β -CD.

	Déplacement chimique δ (ppm)	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)
H-4a	1,415	<i>Tt</i>	
H-3a	1,516	<i>dt</i>	
H-5 a et b	1,58	-	
H-6a	1,653	<i>d</i>	
H-3b	1,719	<i>dd</i>	
H-4b	1,780	<i>dt</i>	
H-6b	1,892	<i>ddd</i>	
H-2	2,232	<i>tt</i>	³ J = 3,3 Hz; ³ J = 10,8 Hz
NCH ₂ a	2,558	<i>dd</i>	³ J _{Ha-H2} = 2,5 Hz; ³ J _{Ha-Hb} = 13,1 Hz
NCH ₃	2,573	<i>s</i>	
NCH ₂ b	2,843	<i>dd</i>	³ J _{Hb-H2} = 10,2 Hz; ³ J _{Ha-Hb} = 13,2 Hz
OCH ₃	3,773	<i>s</i>	
H-6'	6,886	<i>dd</i>	³ J _{H5'-H6'} = 8,2 Hz; ⁴ J _{H2'-H6'} = 2,6 Hz
H-2'	7,040	<i>t</i>	⁴ J _{H2'-H4'} \approx ⁴ J _{H2'-H6'} = 2,2 Hz
H-4'	7,078	<i>d (dd)</i>	³ J _{H4'-H5'} = 7,9 Hz
H-5'	7,339	<i>t</i>	³ J _{H4'-H5'} \approx ³ J _{H5'-H6'} = 8,0 Hz
H-1	4,985	<i>d</i>	³ J _{H1-H2} = 3,7 Hz
H-2	3,564	<i>dd</i>	³ J _{H1-H2} = 3,7 Hz; ³ J _{H2-H3} = 9,9 Hz
H-3	3,880	<i>t</i>	³ J _{H2-H3} \approx ³ J _{H3-H4} = 9,5 Hz
H-4	3,499	<i>t</i>	³ J _{H3-H4} \approx ³ J _{H4-H5} = 9,2 Hz
H-5a	3,772	<i>t</i>	
H-6a et H-5b	3,792		

Compte tenu du manque d'informations complètes sur les assignations des spectres RMN ¹H et ¹³C du Tramadol (protons du cycle cyclohexyle) [59], l'analyse structurale complète a été réalisée à l'aide d'expériences HSQC-TOCSY. Les méthodes classiques utilisant COSY et HSQC échouent dans la région spectrale très encombrée des méthylènes à cycle cyclohexyle.

Une série d'expériences de RMN hétéro-nucléaire 2D ^1H - ^{13}C utilisant IPAP-HSQC-TOCSY et HMBC a été réalisée à l'aide d'un procédé spécial de RMN 2D combinant des expériences de RMN hétéro-nucléaire 2D ^1H - ^{13}C utilisant IPAP-HSQC-TOCSY et HMBC. IPAP-HSQC-TOCSY [60] basée sur la séquence de Bruker *hsqcdiedetgpsisp* : (*Ge-2D HSQC-TOCSY ge-2D sensible à la phase utilisant PEP avec édition de multiplicité*). Il est dérivé de méthodes anciennes conçues pour augmenter la sensibilité de la RMN ^{15}N [61,62].

La séquence HSQC-TOCSY utilisant le schéma DIPSI pour la période de mélange permet d'éditer les pics TOCSY de manière assez satisfaisante [63]. Mais il échoue lorsque les pics directs et relais d'un changement chimique du carbone sont très proches et se chevauchent. Un moyen d'atténuer ce problème consiste à combiner deux expériences, l'une avec des relais édités réglés négativement, l'autre avec des relais non édités posant des valeurs positives. La somme et la différence des spectres 2D donnent deux nouvelles données 2D montrant uniquement et respectivement une corrélation directe entre (C-H), et les pics de (CH-H) TOCSY relayés.

La séquence non modifiée est simplement dérivée de la première par suppression de l'impulsion ^{13}C pendant la période d'édition [64]. Le temps de mélange a été réglé à 20 ms, afin de générer un seul relais et de sélectionner uniquement les corrélations (CH-H).

Une amélioration supplémentaire a été l'ajout d'un filtre Z [65] à la fin de la séquence pour éliminer les pics TOCSY des artefacts antiphases. Cette technique permet de récupérer efficacement les signaux d'absorption complète des expériences TOCSY.

Aux fins de l'affectation de ligne, un tracé de sortie approprié est la superposition de la matrice HSQC classique et de celle des relais HSQC-TOCSY. Dans une solution de D_2O , le temps d'acquisition ne peut être trop long car un découplage ^{13}C pendant l'acquisition chaufferait trop l'échantillon. Il est possible de récupérer la résolution par prédiction linéaire directe dans la dimension F2.

Les séquences de Bruker ont été modifiées selon les indications précédentes et utilisées pour la présente attribution du spectre RMN ^1H du Tramadol.

Dans la représentation 2D de la région spectrale des 6 atomes de carbone saturés du cycle cyclohexyle représenté sur la figure III.17, les pics HSQC sont colorés en orange pour (CH_2), en bleu pour (CH), et en vert pour les pics HSQC-TOCSY.

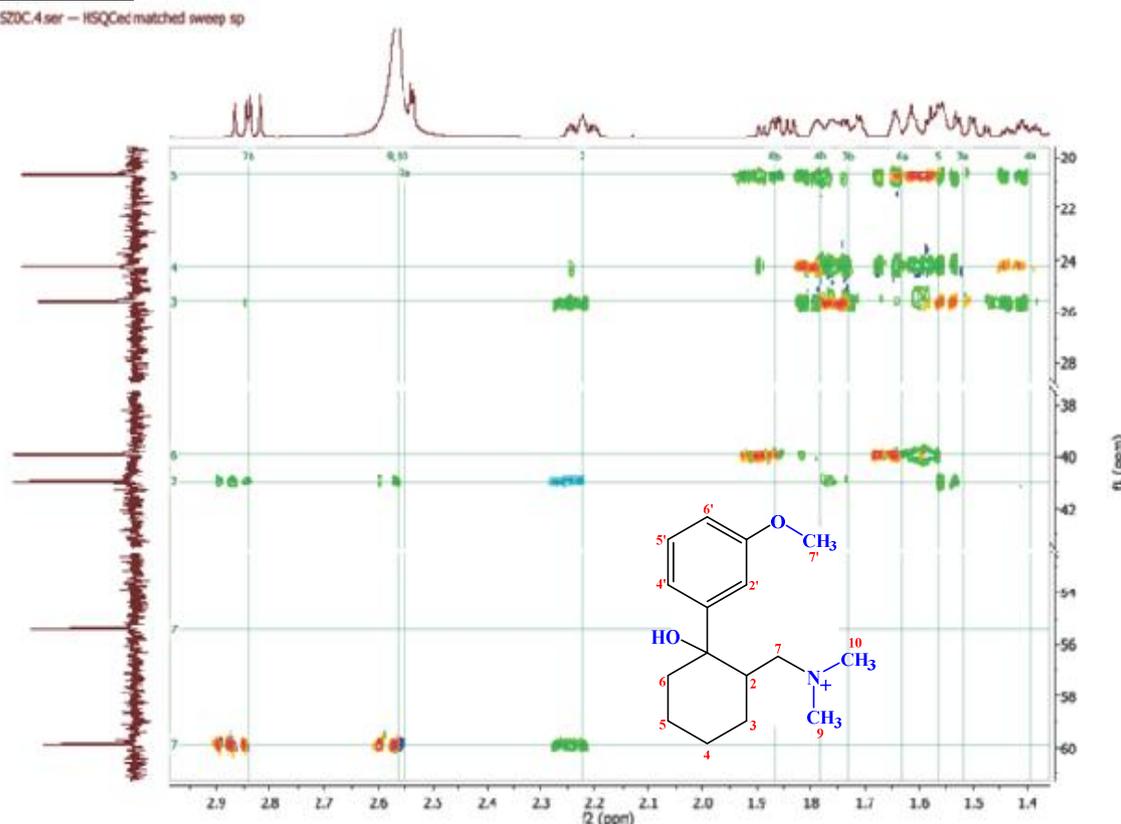


Fig. III.17. Tracé de contour 2D de l'expérience IPAP-HSQC-TOCSY sur une solution de Chlorhydrate de Tramadol (50 mg.L^{-1}) dans D_2O

Une série de spectres RMN ^1H de mélanges (Tramadol/ β -CD) a été enregistrée dans une solution de D_2O à une concentration constante de chlorhydrate de Tramadol (1 mmol.L^{-1}).

Les concentrations de β -CD variaient entre les rapports molaires [1/10] et [10/1] (β -CD/Tramadol).

Toutes les lignes RMN se sont déplacées en fonction de la concentration de β -CD. Le Tramadol est un mélange racémique de deux isomères optiques qui pourraient se lier différemment à la β -CD. Il n'y avait aucune indication pour séparation énantiomère de l'isomère optique de Tramadol par β -CD dans les spectres de RMN.

Les lignes de RMN du Tramadol et des β -CD qui présentant les changements les plus importants ont été sélectionnés pour l'analyse de l'équilibre de complexation

Les raies des protons H-3 et H-5 de la β -CD sont les plus déplacées, car ces protons sont situés à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine ; où pénètrent les molécules invitées.

Un décalage plus important des protons H-3 et H-5 est considéré comme une forte indication de la formation d'un complexe d'inclusion [66,67].

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Les lignes bien résolues du Tramadol montrant que les plus grands changements étaient dans l'ordre décroissant, (NCH₃) et (NCH₂b) au voisinage du groupe ammonio tertiaire, protons H-3a du cycle cyclohexyle, (OCH₃) attaché au cycle aromatique, protons H-6' et H-5' du cycle aromatique, protons H-2 et H-4a du cycle cyclohexyle, et protons (H-2' et H-4') du cycle aromatique. Les spectres typiques représentés sur la figure. III.18 illustrent les décalages spectraux.

Un modèle classique simple de complexation avec une stœchiométrie [1:1] pourrait expliquer les données de RMN ¹H. Il n'était donc pas logique d'envisager des modèles d'équilibre de complexation plus élaborés comprenant la formation d'un complexe (Tramadol: β -CD) d'une autre stœchiométrie.

Les mesures de RMN que nous avons obtenue ne confirment pas les propositions de A. Anton Smith et coll. [45] selon lesquelles un complexe de stœchiométrie [2:1] a été formé. Les confirmations de ces derniers ont été déduites sur la base d'expériences de fluorescence.

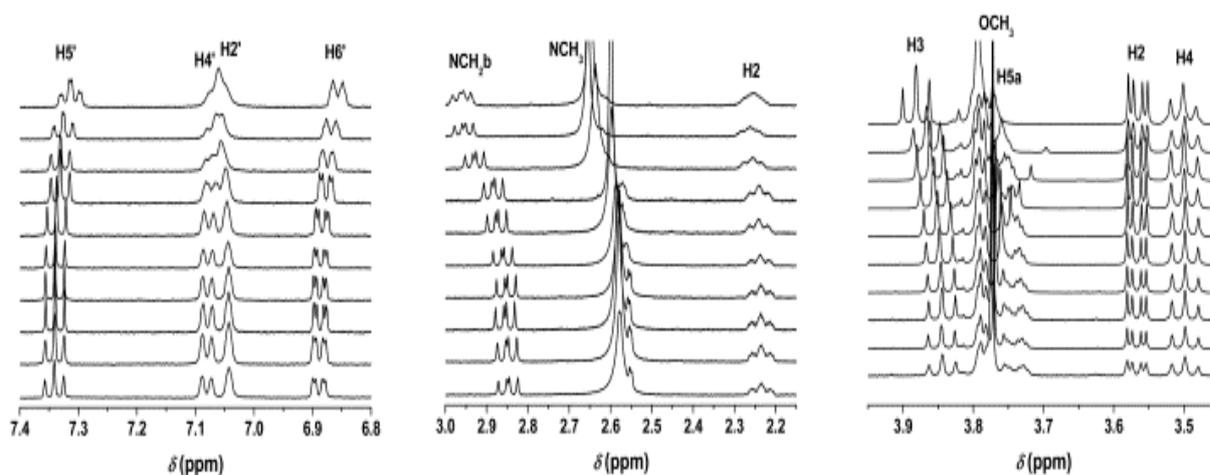


Fig.III.18. Variation des spectres RMN ¹H par rapport au rapport molaire β -CD/Tramadol croissant de bas en haut entre [1/10] et [10/1]

Dans la figure III.18, le spectre en bas est celui du Tramadol pur sur les séries gauche et centrale des spectres empilés; le spectre en haut est celui de β -CD pur sur la série droite de spectres empilés.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

L'équilibre chimique et la loi d'action de masse correspondante du modèle sont donnés par l'équation (3). Dans cette équation, l'activité est remplacée par la concentration en supposant un comportement idéal:



$$K_{11} = \frac{[A-CD]}{[A][CD]} \quad (3)$$

Où;

K_{11} est la constante d'équilibre

A est relatif au Tramadol.

CD est relatif à la β -CD

Les concentrations totales de Tramadol et de β -CD sont:

$$[A]_0 = [A] + [A-CD] \quad (4)$$

$$[CD]_0 = [CD] + [A-CD] \quad (5)$$

Les concentrations de Tramadol libre, de β -CD libre et du complexe (Tramadol: β -CD) ont été calculées à partir des valeurs de K_{11} , $[A]_0$ et $[CD]_0$ en résolvant les équations 3-5 pour $[A]$, $[CD]$ et $[A-CD]$, ce qui donne:

$$[A-CD] = \frac{([A]_0 + [CD]_0 + \frac{1}{K_{11}}) - \sqrt{([A]_0 + [CD]_0 + \frac{1}{K_{11}})^2 - 4[A]_0[CD]_0}}{2} \quad (6)$$

Les déplacements chimiques du RMN¹H des lignes de Tramadol et de β -CD ont été calculés dans la limite d'échange rapide à partir des concentrations et des déplacements chimiques de chaque espèce comme suit:

Pour les lignes de Tramadol:

$$\delta = \delta(\text{Tramadol libre}) \frac{[A]}{[A]_0} + \delta(A-CD) \frac{[A-CD]}{[A]_0} \quad (7)$$

Pour les lignes de β -CD:

$$\delta = \delta(\beta\text{-CD libre}) \frac{[CD]}{[CD]_0} + \delta(A-CD) \frac{[A-CD]}{[CD]_0} \quad (8)$$

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Les déplacements chimiques du Tramadol libre et du β -CD ont été mesurés avec les composés purs. Les prévisions des déplacements chimiques ont été comparées aux données expérimentales pour les mélanges (Tramadol/ β -CD).

Le meilleur ajustement du modèle pour les données expérimentales a été recherché en ajustant les valeurs des paramètres inconnus K_{11} et δ (A-CD) pour chaque ligne d'RMN (figure .III.19) en minimisant la somme des écarts quadratiques moyens de toutes les lignes RMN de Tramadol et de la β -CD.

La fonction de minimisation prenant en compte simultanément toutes les lignes RMN ($i = 1$ à N_i) et les concentrations d'échantillon ($j = 1$ à N_j) est la suivante :

$$\sqrt{\frac{1}{N_i N_j} \sum_{i=1}^{N_i} \sum_{j=1}^{N_j} (\delta_{\text{exp},ij} - \delta_{\text{calc},ij})^2} \quad (9)$$

Les meilleurs ajustements des spectres aux données expérimentales pour toutes les lignes de RMN sur toute la gamme de concentration ont montrés que le complexe avait une stœchiométrie [1:1] sans contribution significative des autres espèces complexes.

La constante d'équilibre est $K_{11} = 260 \pm 10$ à 20°C ($\text{Log}K_{11} = 2,42$). Où les concentrations sont exprimées en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Tous les paramètres sont donnés dans le Tableau III.7.

En raison de la valeur de K_{11} et de la solubilité modérée de β -CD dans l'eau ($18,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), la complexation du Tramadol ne peut être achevée, même en présence d'une concentration maximale de β -CD (solution saturée).

En effet, le rapport de concentration des formes complexées aux formes libres du Tramadol tend à être $\frac{[\text{A-CD}]}{[\text{A}]} = K_{11} [\text{CD}]_0$ lorsque la concentration totale en β -CD est en grand excès par rapport à celle du Tramadol. Par conséquent l'équation (3) est réduite à :

$$\frac{[\text{A-CD}]}{[\text{A}]+[\text{A-CD}]} = \frac{K_{11} [\text{CD}]_0}{1+K_{11} [\text{CD}]_0} \quad (10)$$

En conséquence, la fraction maximale du Tramadol complexé est de 0,78 (78%).

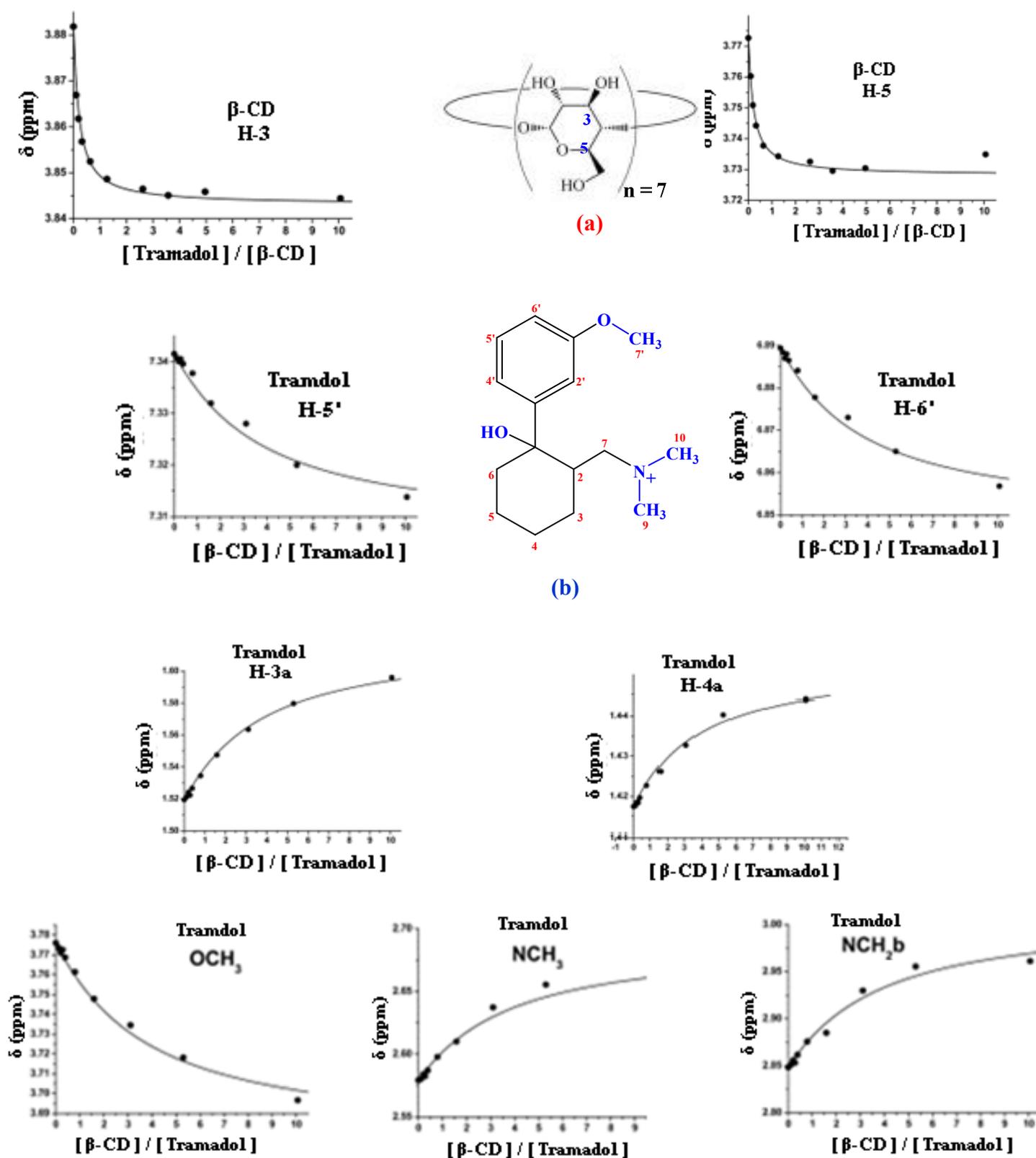


Fig. III.19. Variation des déplacements chimiques de l'RMN ^1H par rapport aux concentrations relatives de Tramadol et de β -CD.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Les lignes pleines sont les meilleurs ajustements de la théorie aux données expérimentales pour la formation de complexes de stœchiométrie [1:1] avec les paramètres donnés dans le Tableau. III.7.

Tableau. III.7. Constante d'équilibre K_{11} du complexe [1:1] et les valeurs des déplacements chimiques du RMN ^1H du Tramadol et du β -CD sous leurs formes libres et complexées.

	Stœchiométrie 1:1 Constante d'équilibre $K_{11} = 260$ $\text{Log}(K_{11}) = 2.42$											
	protons aromatique de Tramadol					Autre protons de Tramadol				β -CD		
Protons	H-2'	H-4'	H-5'	H-6'	OCH ₃	NCH _{2b}	NCH ₃	H-2	H-4a	H-5a	H-3	H-5
$\delta_{\text{(libre)}} \text{ (ppm)}$	7,043	7,081	7,342	6,889	3,776	2,848	2,579	2,235	1,417	1,519	3,882	3,773
$\delta_{\text{(complexe)}} \text{ (ppm)}$	7,068	7,064	7,307	6,848	3,676	3,010	2,690	2,276	1,453	1,619	3,721	3,588

III.6.2.6.2. Propriétés d'absorbance et de fluorescence du Tramadol

Le spectre d'absorption du chlorhydrate de Tramadol en solution aqueuse montre deux bandes bien définies avec des maximum à 216 nm et à 271 nm correspondant aux transitions électroniques (π - π^*) (figure III.20).

Les maximums d'absorbances augmentent linéairement par rapport à la concentration de Tramadol selon la loi de Beer-Lambert et il n'y a pas de décalage des spectres lors du changement de la concentration. Les coefficients d'absorption molaire (extinction) sont $\varepsilon = 7130 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 216 nm et $\varepsilon = 1790 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 271 nm, en accord avec les rapports précédents [45,59].

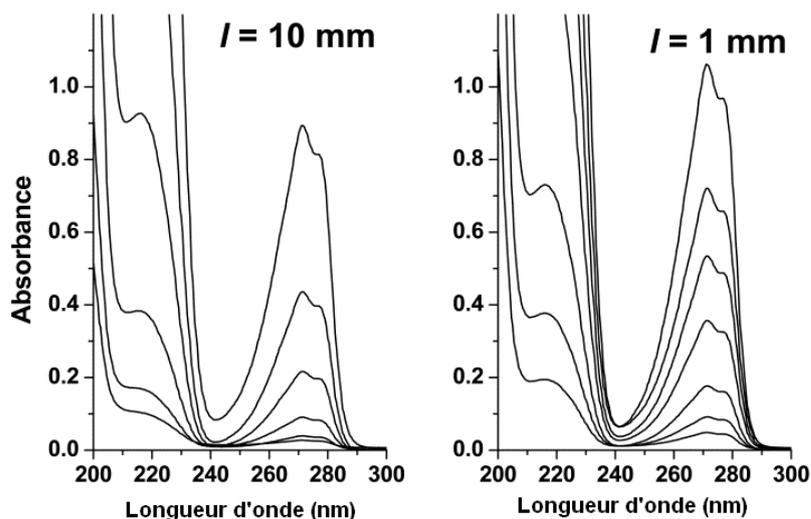


Fig. III.20. Spectre d'absorption UV du Tramadol à plusieurs concentrations.

- **Gauche:** Faibles concentrations dans des cuves de chemin optique ($l=10$ mm); les concentrations sont dans l'ordre de l'absorbance croissante 0,01 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 et 0,5 mmol.L⁻¹.
- **Droite:** Hautes concentrations dans les cuves de chemin optique ($l=1$ mm); les concentrations sont dans l'ordre de l'absorbance croissante (0,25 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 et 6,0) mmol.L⁻¹.

Les spectres de fluorescence du Tramadol ont montré un pic d'émission maximal à 297 nm quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Toutes les expériences ont été réalisées pour une excitation à 271 nm.

Une excitation à 216 nm a donné le même spectre de fluorescence; son intensité était plus élevée simplement parce que l'absorbance à 216 nm était plus élevée qu'à 271 nm (figure III.21).

La forme des spectres de fluorescence n'a pas changé lorsque la concentration de Tramadol a été modifiée. Les spectres de fluorescence dans l'eau et dans l'eau désaérée étaient identiques, ce qui montre que la fluorescence du Tramadol n'était pas significativement atténuée par l'oxygène.

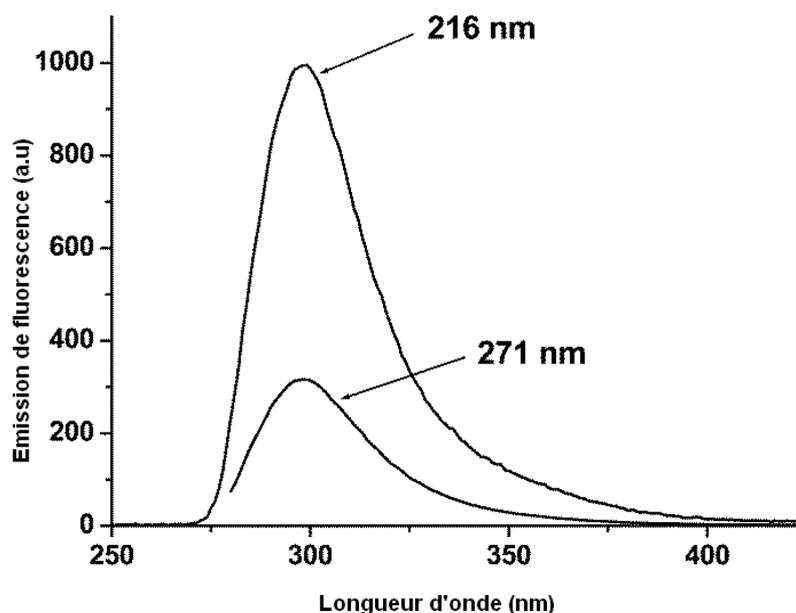


Fig. III.21. Spectres de fluorescence du Tramadol ($0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$) pour les longueurs d'onde d'excitation de 216 nm et 271 nm.

L'intensité de fluorescence ne varie pas linéairement par rapport à la concentration de Tramadol (Fig. III.22). L'intensité de la fluorescence a augmenté linéairement par rapport à la concentration de Tramadol jusqu'à $0,02 \text{ mM}$. Un écart de linéarité vers une émission plus faible a été observé au-delà de cette concentration et l'intensité de la fluorescence a diminué par rapport à la concentration supérieure à $0,5 \text{ mM}$.

En effet, on ne s'attend pas à ce que la fluorescence varie de manière linéaire en fonction de la concentration. Si le rendement quantique de fluorescence ne dépend pas de la concentration, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à l'intensité absorbée de la lumière d'excitation. En tant qu'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, $Abs(\lambda_{ex})$, est proportionnelle à la concentration par la relation de Beer-Lambert, la lumière absorbée le long du chemin optique l et l'intensité de fluorescence totale à la longueur d'onde, $Fluo(\lambda_{em})$, sont des fonctions exponentielles de la concentration C ; équation (11) [68].

$$Fluo(\lambda_{em}) \propto (1 - 10^{-Abs(\lambda_{ex})}) = (1 - 10^{-\epsilon_{ex}lC}) \quad (11)$$

Où le préfacteur (a) est lié au rendement quantique de fluorescence et aux facteurs géométriques provenant de la conception optique du spectrophotomètre. L'équation 11 se réduit à un comportement linéaire dans la limite de faible concentration.

Une autre cause de déviation de la relation simple entre l'émission de fluorescence et l'absorption est l'atténuation de la lumière d'excitation par absorption (EFI). Cet effet est puissant pour les solutions concentrées d'absorbance élevée. Comme l'auto-extinction a lieu pour des solutions assez concentrées, l'émission de fluorescence doit être corrigée pour l'EFI [69].

Le faisceau d'émission est atténué par l'absorption le long de son chemin optique de la face optique d'entrée au fluorescent émetteur de colorant. Cela conduit à une correction appelée «EFI primaire» (EFIP). La lumière émise est également atténuée par l'absorbance à la longueur d'onde d'émission le long du chemin optique, du colorant émetteur à la face optique de sortie. Cette dernière correction appelée «EFI secondaire» (EFIS) est faible car l'absorbance à la longueur d'onde d'émission est faible. L'émission de fluorescence corrigée pour EFI est donnée par une équation approximative de MacDonald et coll. [70] (Équation 12).

$$Fluo(\lambda_{em}) = aC \times EFIP \times EFIS = aC \times \frac{10^{-\varepsilon_{ex}C \frac{l}{2}} \left(10^{\varepsilon_{ex}C \frac{\Delta x}{2}} - 10^{-\varepsilon_{ex}C \frac{\Delta x}{2}} \right)}{\ln(10) \varepsilon_{ex}C \Delta x} \times \frac{10^{-\varepsilon_{em}C \frac{l}{2}} \left(10^{\varepsilon_{em}C \frac{\Delta y}{2}} - 10^{-\varepsilon_{em}C \frac{\Delta y}{2}} \right)}{\ln(10) \varepsilon_{em}C \Delta y} \quad (12)$$

Où ε_{ex} et ε_{em} sont les valeurs expérimentales des coefficients d'extinction aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($\varepsilon_{ex} = 1790 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{em} = 14 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $l = 1 \text{ cm}$ est le chemin optique complet de la cuve carrée, et les paramètres Δx et Δy sont les largeurs de fente du monochromateur et du détecteur d'excitation, respectivement. Le préfacteur a dépend du rendement quantique de fluorescence et des paramètres géométriques du montage expérimental. Ci-dessous une présentation détaillée du modèle de correction EFI ainsi que son domaine de validité et une validation expérimentale.

III.6.2.6.3. Schéma de correction pour l'effet de filtre interne

Comme l'auto-extinction a lieu pour des solutions relativement concentrées, il faut corriger l'EFI. Dans la configuration classique avec une détection perpendiculaire et des cuves de forme carrée ou rectangulaire contenant des échantillons, une telle correction peut facilement être effectuée lorsque le faisceau d'excitation est parallèle et que la lumière d'émission pénètre dans le détecteur sous forme de faisceau parallèle.

Malheureusement, les spectrophotomètres commerciaux utilisent des optiques focalisées. Si le faisceau d'émission est parfaitement focalisé au centre de la cuve carrée contenant la solution, le faisceau d'émission est atténué par l'absorption le long de son chemin optique ($l/2$) pour l'entrée de la face optique vers le centre. Cela conduit à une correction appelée (EFIP).

La lumière d'émission est également atténuée par l'absorbance à la longueur d'onde d'émission le long du chemin optique ($l/2$) du centre à la sortie de la face optique. Cette correction appelée (EFIS) est faible car l'absorbance à la longueur d'onde d'émission est très faible. La dépendance à la concentration de la lumière d'émission est donnée comme suit : [71].

$$\mathbf{Fluo}(\lambda_{em}) = \mathbf{aC} \times \mathbf{EFIP} \times \mathbf{EFIS} = \mathbf{aC} \times \mathbf{10}^{-\epsilon_{ex}C \frac{l}{2}} \times \mathbf{10}^{-\epsilon_{em}C \frac{l}{2}} \quad (13)$$

La correction pour EFI est simple. Cette correction simple valable pour une configuration optique idéale représente les lignes principales de la dépendance à la concentration. En effet, Fluo (λ_{em}) a été calculé à partir de l'Équation.12 en utilisant les valeurs expérimentales des coefficients d'extinction aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($\epsilon_{ex} = 1790 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{em} = 14 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et l (1 cm), et en prenant la constante $a = 4.10^6$ unités $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$, de sorte qu'elle s'adapte à un comportement linéaire inférieur à 0,02 mM.

Le calcul de Fluo (λ_{em}) indique un maximum pour 0,5 mM mais ne correspond pas à l'expérience à des concentrations élevées (figure. III.22). L'émission de la fluorescence était supérieure à l'expérimentale entre 0,2 mM et 2 mM; et elle était inférieure à l'expérimental au-dessus de la concentration de 2 mM de Tramadol. De tels écarts des deux côtés par rapport aux valeurs expérimentales ne peuvent pas être expliqués par l'introduction d'un effet d'auto-extinction qui réduirait systématiquement la fluorescence calculée.

Il apparaît clairement que la simple correction pour un EFI donnée par l'équation.12 n'est pas totalement correcte. Une correction plus précise de l'EFI est indispensable pour travailler sur l'extinction à haute concentration. La section détaillée qui suit vise à sélectionner un schéma de correction satisfaisant.

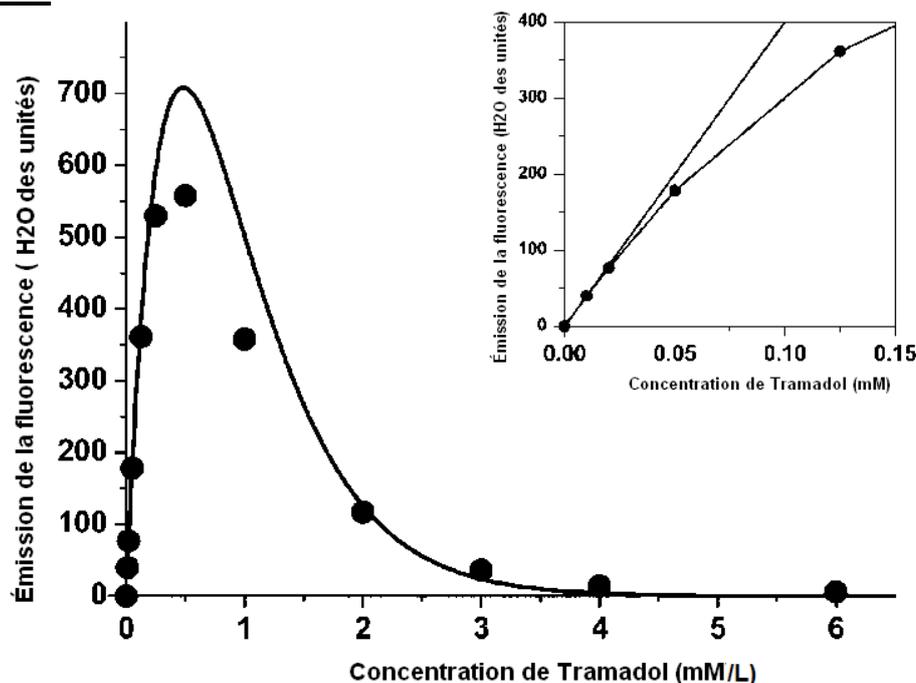


Fig. III.22. Émission de la fluorescence à 297 nm pour des solutions aqueuses de chlorhydrate de Tramadol à différentes concentrations dans une cuve carrée en quartz de $1 \times 1 \text{ cm}^2$.

La longueur d'onde d'excitation était de 271 nm. La ligne en trait plein représente la prévision théorique de l'équation.13 en utilisant les valeurs suivantes : $a = 4.10^6 \text{ H}_2\text{O unités}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\epsilon_{\text{ex}} = 1790 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{em}} = 14 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (pris de l'absorbance mesurée à 297 nm) et $l = 1 \text{ cm}$. L'encart montre une expansion du régime de faible concentration où la variation est linéaire par rapport à une concentration inférieure à 0,02 mM.

Les corrections simples ne sont pas correctes pour les analyses quantitatives en raison de la complexité de la conception optique du spectrophotomètre optimisée pour permettre une détection précise de la fluorescence faible.

Le faisceau primaire est focalisé de telle sorte que l'image optique du monochromateur (la source) se trouve au centre de la cellule de mesure. Cependant, la lumière d'excitation ne converge pas vers un point et le détecteur reçoit la lumière de fluorescence émise par toutes les parties des solutions éclairées par la lumière d'excitation. Un moyen d'éliminer l'EFI pour éviter des corrections compliquées consisterait à raccourcir le chemin optique dans l'échantillon.

La méthode reposant sur le déplacement de la cuve carré par rapport au centre optique proposé par Chen et Hayes [72] nécessite une géométrie spectro-fluorométrique dans laquelle le faisceau lumineux est bien collimaté sous la forme d'un faisceau parallèle étroit [73].

Avec les spectro-fluoromètres commerciaux utilisant une optique focalisée, le faisceau de lumière est largement étalé sur plusieurs millimètres, de sorte que le fait de fixer le point focal près du coin carré de la cuve à échantillons entraîne des réflexions optiques au niveau des dioptries interne et externe quartz-air et quartz-échantillon qui rendent très difficile le contrôle précis du chemin optique.

L'utilisation de géométries de cuve qui réduisent le chemin optique dans l'échantillon (par exemple, une cuve de section triangulaire) est également une cause de problèmes dus aux réflexions optiques car le faisceau lumineux n'est pas bien défini. Utiliser une longueur d'onde d'excitation telle que l'absorbance soit faible (par rapport au maximum d'absorption) minimise en effet le facteur de correction pour l'IFE [74,75]; mais cela diminue aussi l'intensité de la fluorescence. Comme l'intensité de la fluorescence et le facteur de correction augmentent de la même manière par rapport à la lumière absorbée, il n'y a aucun avantage évident à décaler la longueur d'onde d'excitation du maximum d'absorbance.

Comme l'EFI ne peut pas être éliminé par des astuces expérimentales avec un spectrophotomètre commercial et que les schémas de correction simples (Équation.12) ne sont pas assez précis, nous concluons qu'une correction pour l'IFE prenant en compte la conception optique du spectrophotomètre est obligatoire.

Plusieurs schémas de correction pour l'EFI ont été proposés. Ils dépendent de paramètres géométriques de la configuration du spectrophotomètre qui sont difficiles à évaluer et qui ne sont pas clairement décrits dans les fiches techniques des fournisseurs.

Ce sujet a été rendu assez déroutant par l'introduction de corrections visant à rendre l'intensité de fluorescence linéaire par rapport à la concentration. En conséquence, des facteurs de correction ont été calculés pour permettre le calcul d'une intensité de fluorescence «idéale» à partir de celle expérimentale observée. L'intensité de fluorescence «idéale» est définie comme étant proportionnelle à la concentration mais elle ne correspond à aucune intensité de fluorescence pouvant être mesurée, car les lois fondamentales de la fluorescence sont exponentielles par rapport à la concentration.

Les corrections pour l'EFI tenant compte de la géométrie de la configuration optique considèrent que la lumière est répartie de manière homogène dans la section des faisceaux d'excitation et d'émission, de sorte que la partie de la lumière d'excitation qui provoque l'émission de fluorescence jusqu'au détecteur soit entièrement décrite en tant que paramètres uniques.

Lorsque la fente d'émission s'étend sur toute l'épaisseur de l'échantillon, de $(x = 0)$ à $(x = l)$, toutes les molécules excitées envoient une lumière de fluorescence à 90° au détecteur.

Définissant la géométrie optique avec une fente d'émission s'étendant dans la direction x du faisceau d'émission entre x_1 et x_2 ($\Delta x = x_2 - x_1$ et $(x_1 + x_2)/2 = l/2$), le facteur de correction EFIP est la fraction de lumière absorbée le long du chemin optique de x_1 à x_2 donnés par Parker et Barnes [74], ainsi que par d'autres auteurs qui ont donné différentes formes de la même correction [76,77].

La lumière absorbée de $x = 0$ à x_1 est perdue car l'émission de fluorescence correspondante n'atteint pas le détecteur; cette absorption atténue l'intensité de l'excitation.

Le même phénomène est valable en ce qui concerne le rôle de la fente d'excitation couvrant le faisceau d'excitation dans la direction y entre y_1 et y_2 ($\Delta y = y_2 - y_1$ et $(y_1 + y_2)/2 = l/2$), ce qui donne la correction supplémentaire EFIS donnée par MacDonald et coll. (Équation 12). [70]

Dans ce modèle, les paramètres Δx et Δy sont les largeurs de fente du monochromateur et du détecteur d'excitation, respectivement. Un tel modèle ne décrit pas correctement les spectrophotomètres commerciaux utilisant une optique focalisée.

La procédure de la correction de l'EFIS, plus détaillée et probablement plus précise, proposée par Christmann et coll. [78] requiert une optique bien définie avec des faisceaux parallèles, de sorte qu'elle ne puisse pas être appliquée au cas actuel à l'aide d'une optique focalisée.

Le léger manque de précision des corrections EFIS n'est pas vraiment un problème, car la faible absorbance à la longueur d'onde de l'émission rend ces corrections faibles.

Dans le cas présent, ils étaient tous inférieurs à 6%. Les faisceaux lumineux actuels ne sont pas parallèles (optiques focalisées) et l'intensité de la lumière n'est pas répartie de manière uniforme dans les sections de faisceaux, comme l'indiquent des mesures soigneuses effectuées selon la méthode du décalage cellulaire [79]. Les images de fentes du spectrophotomètre Cary Eclipse utilisé actuellement sont horizontales afin d'éclairer une plus grande partie de l'échantillon et d'augmenter la sensibilité [80].

Les premières tentatives signalées de corrections EFI utilisant des valeurs mesurées de largeur de fente ont abouti à la conclusion que les valeurs Δx et Δy permettant des corrections précises différaient des largeurs de fente réelles et qu'une correction EFI spécifique était requise pour chaque configuration géométrique de l'optique [79,81]

En conséquence, des corrections pour EFI ont été effectuées en utilisant l'équation. 12 comme une équation phénoménologique où les paramètres Δx et Δy ont été ajustés de manière à ce que la dépendance de la fluorescence mesurée en fonction de la concentration soit correctement prise en compte.

Holland et coll. Ont déjà fait un ajustement similaire des largeurs de fente pour corriger les données de fluorescence de telle sorte qu'il s'adapte au comportement linéaire [76]. Des contrôles de validité de l'équation.12 pour la correction de l'IEF ont été effectués par plusieurs auteurs. Gu et Kenny ont conclu que c'était précis pour les spectrophotomètres optiques focalisés jusqu'à des valeurs d'absorbance supérieures à 5 (pour un chemin optique de 1 cm) [79]. Dans le cas présent, une absorbance de 5 correspond à une concentration de Tramadol de 3 mM.

III.6.2.6.4. Mise en évidence de l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol à des concentrations élevées

De tels effets ne peuvent pas expliquer la dépendance totale de la fluorescence vis-à-vis de la concentration, de sorte qu'un phénomène d'atténuation supplémentaire a nécessairement eu lieu, à savoir l'auto-extinction. Une auto-extinction a été mise en avant car un écart plus important de la fluorescence calculée par rapport aux données expérimentales s'est produit à des concentrations élevées de Tramadol.

Une auto-extinction possible par des contre-ions de chlorure a été écartée car l'addition de chlorure de sodium jusqu'à 100 mM ne diminuait pas l'émission de fluorescence. L'auto-extinction peut se produire par une extinction statique et/ou dynamique [82]. La désactivation statique implique la formation d'espèces complexes entre un émetteur fluorescent et un extincteur qui auraient dû être révélées par des changements spectraux en fonction de la concentration. La désactivation statique a été écartée car les spectres d'absorbance et de fluorescence n'ont pas changé de forme sur toute la gamme de concentration de Tramadol.

L'auto-extinction dynamique se produit par des collisions entre les molécules de Tramadol. Cela a été expliqué par un seul terme de Stern-Volmer caractérisé par une constante d'auto-extinction K. Une telle modification de l'équation 12 a donné l'équation 14.

$$\text{Fluo}(\lambda_{em}) = aC \times \text{PIFE} \times \text{SIFE} \frac{1}{1+Kc} \quad (14)$$

Le meilleur ajustement aux données de fluorescence a été obtenu avec les valeurs expérimentales $\varepsilon_{ex} = 1790 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{em} = 14 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (prises à partir de l'absorbance mesurée à 297 nm), $l = 1 \text{ cm}$, et pris de la pente de la région linéaire à forte dilution (figure. III.23). Les paramètres a , Δx , Δy et k ont été ajustés de manière à mieux correspondre mieux aux données expérimentales, ce qui donne $a = 4,17 \cdot 10^6 \text{ H}_2\text{O unités}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta x = 5,8 \text{ mm}$, $\Delta y = 5,8 \text{ mm}$, et $K = 812 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. Comme prévu, la valeur de a correspond à la pente pour les faibles concentrations. La valeur précise de Δy n'avait pas d'importance, car ce paramètre avait une faible influence sur la correction EFIS; alors, il était égal à Δx . Dans l'ensemble, seuls Δx et K étaient des paramètres ajustables.

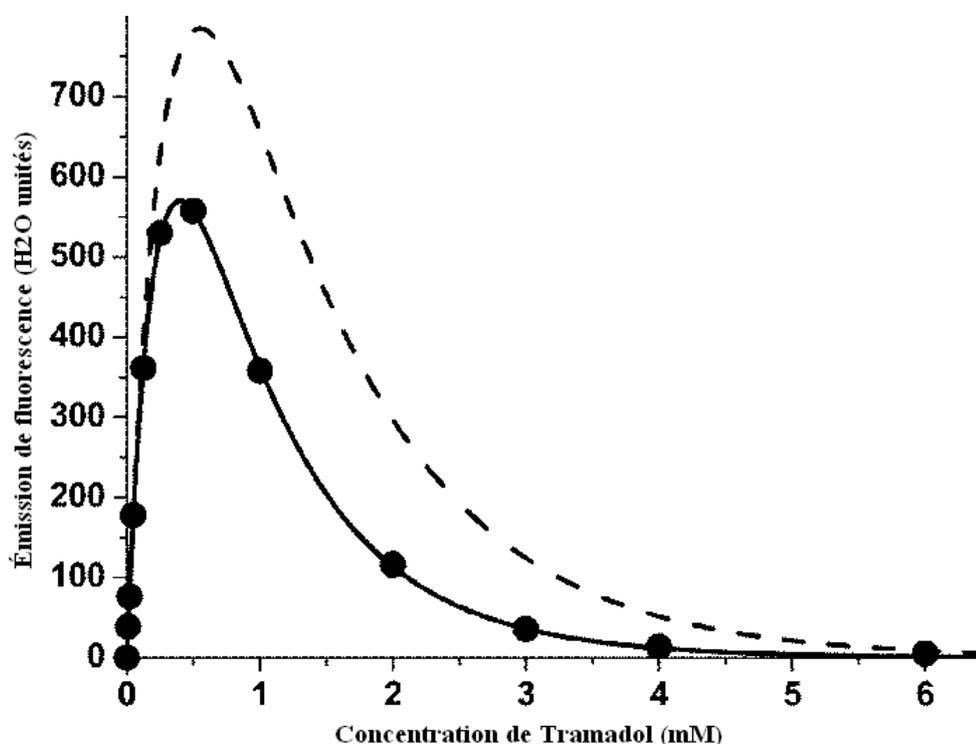


Fig. III.23. Émission de fluorescence de solutions de Tramadol à différentes concentrations et meilleur ajustement des équations 12 et 14 aux données expérimentales en utilisant les paramètres indiqués dans le texte (trait plein). La ligne pointillée montre la prédiction sans auto-extinction ($K = 0$).

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

Une validation du processus de correction a été réalisée au moyen de mesures expérimentales des largeurs des fentes d'émission et d'excitation Δx et Δy . Les largeurs de fente d'excitation et d'émission entrées dans le calcul de l'EFI ont été estimées à partir de mesures de fluorescence effectuées avec des ouvertures de largeur réduite. Ainsi, des masques opaques collés à la face d'entrée ou de sortie des cuves carrées de quartz ont été utilisés comme pare-lumière avec des ouvertures verticales de différentes largeurs pour couper une partie du faisceau d'excitation ou d'émission.

La fluorescence était réduite lorsque les obturateurs étaient plus étroits que le faisceau. Comme prévu, plus la largeur d'ouverture est grande pour l'excitation et l'émission, plus l'intensité de la fluorescence est élevée. Une ouverture plus large que la largeur du faisceau définie par les fentes de l'instrument ne modifie pas le faisceau lumineux, de sorte que les dispositifs d'arrêt de la lumière ne coupent pas la lumière et que l'intensité de la fluorescence totale de la cellule carrée non masquée de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ est récupérée. Une partie de la lumière est coupée et une atténuation est observée lorsque les ouvertures sont plus étroites (figure. III.24).

Le début de la découpe du faisceau correspondait aux largeurs des fentes Δx et Δy dans le plan horizontal. Les valeurs expérimentales étaient $\Delta x = 5,2 \text{ mm}$ et $\Delta y = 5,2 \text{ mm}$.

Les valeurs proches des largeurs d'ouverture ajustée et expérimentale Δx et Δy ont été considérées comme une validation du schéma de correction de l'EFI actuel. La faible différence entre les valeurs expérimentales et ajustées des ouvertures est probablement due à l'inhomogénéité radiale des faisceaux lumineux issus de l'optique focalisée.

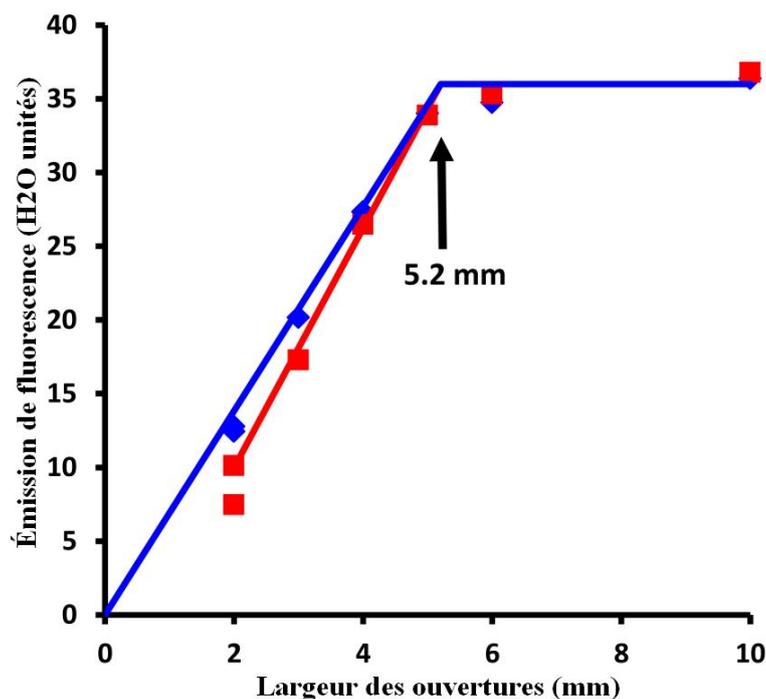


Fig.III.24. Émission de fluorescence pour les mesures effectuées dans des ouvertures réduites arrêtant une partie des faisceaux d'excitation ou d'émission.

Les losanges bleus et les carrés rouges correspondent aux ouvertures coupant le faisceau d'excitation et le faisceau d'émission, respectivement. Les lignes ne sont que des guides pour les yeux.

III.6.2.6.5. Influence de la complexation par la β -CD

L'addition de la β -CD a provoqué la formation de complexes d'inclusion comme montré par les expériences de RMN ¹H et IR. Quelle que soit la concentration de Tramadol, son spectre d'absorption UV n'a pas changé de manière significative lors de la formation de leur complexe d'inclusion (figure .III.25). Des variations de l'absorbance UV ont souvent été observées lors de la complexation par les cyclodextrines; ils ont été attribués aux différences de polarité entre la cavité de la β -CD et l'eau. Dans le cas présent, les spectres du Tramadol libre et du Tramadol complexé étaient identiques car aucun effet global de la présence de β -CD n'a été observé.

En effet, les spectres UV pour une même concentration du Tramadol dans l'eau et dans les solvants organiques de diverses polarités étaient assez similaires en forme et en absorbance (figure. III.25). De légères différences spectrales étaient visibles: Les spectres dans le méthanol, l'éthanol et le 2-propanol étaient tous identiques et ne différaient de ceux dans l'eau que par un léger décalage vers le rouge de 1,5 nm.

Par conséquent, les spectres d'absorbance UV ne peuvent pas être utilisés pour étudier la complexation du Tramadol par β -CD.

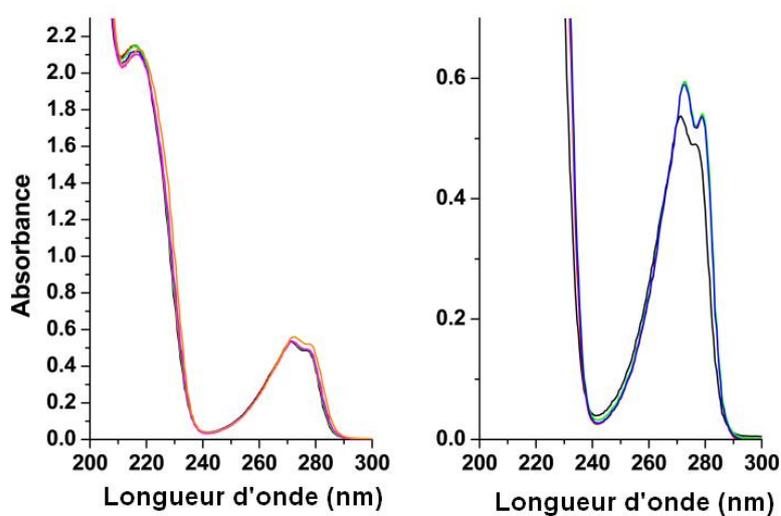


Fig. III.25. Gauche: Spectres d'absorption de la solutions de Tramadol $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en présence de β -CD à des rapports molaires croissants (β -CD)/[Tramadol]: 0 (noir), 0,25 (rouge), 0,5 (vert), 1,0 (bleu), 1,5 (cyan), 2,5 (magenta), 5,0 (orange). À droite: Spectres d'absorption des solutions de Tramadol $3,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans divers solvants: eau (noir), méthanol (rouge), éthanol (vert) et 2-propanol (bleu).

Les spectres d'émission de la fluorescence du Tramadol ont montré des variations bien définies en présence de la β -CD. Cette augmentation de la fluorescence n'a pas été causée par une absorbance plus élevée du complexe à la longueur d'onde d'excitation car l'absorbance mesurée ne variait pas lors de la complexation.

Chapitre. III L'effet de la complexation par la β -CD sur l'auto-extinction de la fluorescence du Tramadol

La forme des spectres de fluorescence n'a pas changé, mais l'intensité d'émission a augmenté ; une telle amélioration de la fluorescence dépend de la concentration du Tramadol. Dans la solution diluée où l'auto-extinction était négligeable, la formation d'un complexe d'inclusion nécessitait l'utilisation d'un très grand excès de β -CD (une solution proche de sa limite de saturation). A titre d'exemple, pour une concentration de Tramadol de 0,01 mM et un excès de 10 fois de β -CD, seulement 3% du Tramadol était impliqué dans un complexe d'inclusion avec la β -CD. Comme indiqué précédemment, une concentration plus élevée de β -CD proche de sa solubilité conduit à la formation maximale de complexes d'inclusion jusqu'à 78%.

La figure.III.26 montre l'émission de fluorescence de Tramadol en présence d'une concentration importante de β -CD (12 mM) comparée à celle du Tramadol pur. La fraction du Tramadol complexé était la même pour toute la série puisque la concentration de β -CD était constante et en excès par rapport au Tramadol. Pour $[\beta\text{-CD}] = 12 \text{ mM}$, il était de 76% (Équation 10). L'inclusion du Tramadol dans la cavité de β -CD a augmenté l'intensité de ses émissions dans la solution concentrée uniquement.

Etant donné qu'une fluorescence améliorée a été observée pour des concentrations de Tramadol suffisamment élevées pour permettre une auto-extinction de la fluorescence de manière significative, il a été conclu que l'inclusion dans la cavité de β -CD ne provoquait pas de changement significatif du rendement quantique de fluorescence, mais empêchait l'auto-extinction en prenant les molécules de Tramadol excitées à l'écart les uns des autres.

La même analyse des données de fluorescence pour le Tramadol pur a été faite pour la solution de Tramadol en présence de β -CD qui contient deux espèces émettant la fluorescence: le Tramadol libre (A) et le Tramadol complexé (A-CD). Un modèle global a été conçu dans lequel le Tramadol libre et complexé sont désactivés par le Tramadol libre et complexé. Les concentrations de Tramadol libre [A] et complexé [A-CD], ont été calculées à partir de l'équation 6 en utilisant la constante d'équilibre $K_{11} = 260$ déterminée par les expériences de RMN.

La variation de l'émission de la fluorescence peut être calculée à partir des concentrations, le paramètre a et la constante de Stern-Volmer des deux formes A et A-CD désactivé par A et A-CD comme suit:

$$Fluo(\lambda_{em}) = \left\{ \frac{\epsilon_A[A]}{1+K_{A/A}[A]+K_{A/A-CD}[A-CD]} + \frac{\epsilon_{A-CD}[A-CD]}{1+K_{A-CD/A}[A]+K_{A-CD/A-CD}[A-CD]} \right\} \times EFIP \times EFIS \quad (15)$$

Où le symbole $K_{A/B}$ représente la constante de Stern-Volmer de l'émetteur A par le l'extincteur B. Les paramètres a_A et $K_{A/A}$ ont déjà été déterminés à partir des expériences sur le Tramadol pur. Les corrections de l'EFI étaient également les mêmes en présence et en absence de β -CD puisque le Tramadol complexé avait la même absorbance que le Tramadol libre. Le préfacteur a_{A-CD} est égal à a_A car l'intensité de fluorescence à faible concentration de Tramadol n'était pas modifiée par la présence d'une forte concentration de β -CD.

Cela signifiait que les rendements quantiques de fluorescence du Tramadol libre et complexé étaient les mêmes. La complexation n'a pas entraîné de variation (amélioration) du rendement quantique, contrairement à de nombreux rapports de la littérature sur différents colorants fluorescents [7,8].

Seules les trois constantes de Stern-Volmer $K_{A/A-CD}$, $K_{A-CD/A}$ et $K_{A-CD/A-CD}$ restaient des paramètres ajustables, ce qui donnait un ajustement satisfaisant de l'équation.15 par rapport aux données expérimentales (Fig. III.26).

Si a_{A-CD} est inclus dans l'ensemble des paramètres ajustables, le meilleur ajustement est obtenu avec $a_{A-CD} = a_A$ dans les limites de la signification expérimentale.

La sensibilité de l'ajustement aux valeurs relatives des constantes de Stern-Volmer $K_{A/A-CD}$, $K_{A-CD/A}$ et $K_{A-CD/A-CD}$ était cependant médiocre. Il était absolument nécessaire que tous soient inférieurs à $K_{A/A}$.

La ligne continue sur la figure.III.26 est un bon exemple d'ajustement pour $K_{A/A} = 812 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ (auto-extinction du Tramadol pur) et $K_{A/A-CD} = K_{A-CD/A} = K_{A-CD/A-CD} = 400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

L'augmentation de l'un de ces paramètres tout en diminuant un autre leur permet de se compenser, de sorte qu'un bon ajustement aux données expérimentales a été conservé. Les valeurs exactes des constantes de Stern-Volmer ne peuvent pas être déterminées à partir des expériences actuelles; mais elles sont absolument plus petites que $K_{A/A}$.

En conclusion, les phénomènes d'extinction étaient plus faibles lorsque le Tramadol était protégé à l'intérieur d'un complexe d'inclusion avec la β -CD.

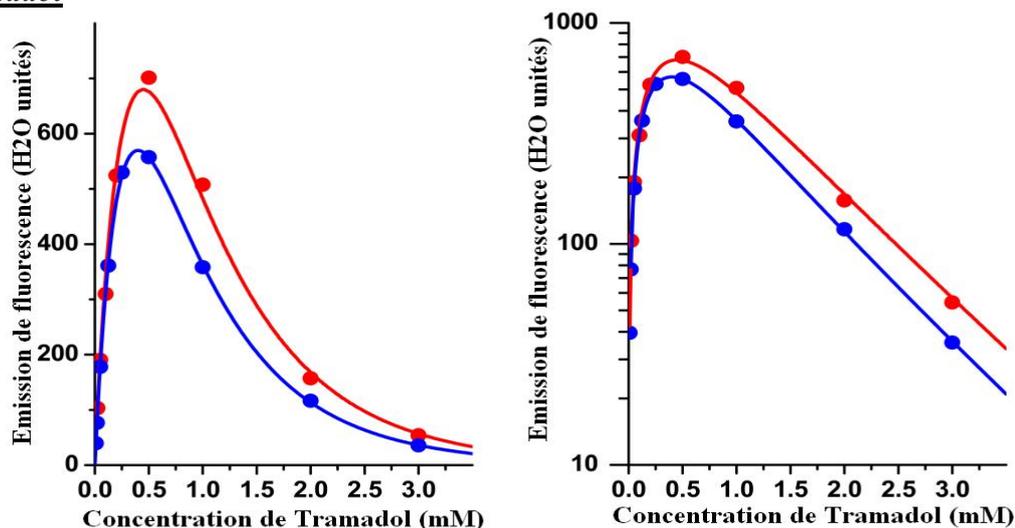


Fig. III.26. Emission de fluorescence à 297 nm en fonction de la concentration en Tramadol pour une concentration constante de β -CD = 12 mM (points rouges) par rapport au Tramadol pur (points bleus).

La ligne continue rouge est la prédiction de l'équation 15 en utilisant les paramètres donnés dans le texte. Les mêmes données sont montrées avec l'échelle linéaire (côté gauche) et l'échelle logarithmique (côté droit) comme moyen d'élargir les faibles intensités de fluorescence.

Dans une autre série d'expériences, la concentration de β -CD a été modifiée à une concentration constante de Tramadol. La fraction de Tramadol complexé variait de 0% ($[\beta\text{-CD}] = 0$) à 78% ($[\beta\text{-CD}] = 15$ mM). Comme le montre la figure.III.27, la fluorescence de 0,01 mM de Tramadol n'a pas varié lors de l'addition de β -CD jusqu'à un excès de 1000 fois par rapport à la stœchiométrie.

La complexation par la β -CD a amélioré l'émission de la fluorescence à la concentration 0,1 mM et 3 mM de Tramadol. La prédiction réussie de l'équation 15 en utilisant les mêmes paramètres que pour les expériences précédentes (Fig. III.26) est donnée en trait plein sur la figure.III.27. La conclusion est la même que pour l'expérience précédente; cette expérience supplémentaire fournit simplement une confirmation en utilisant un protocole expérimental différent.

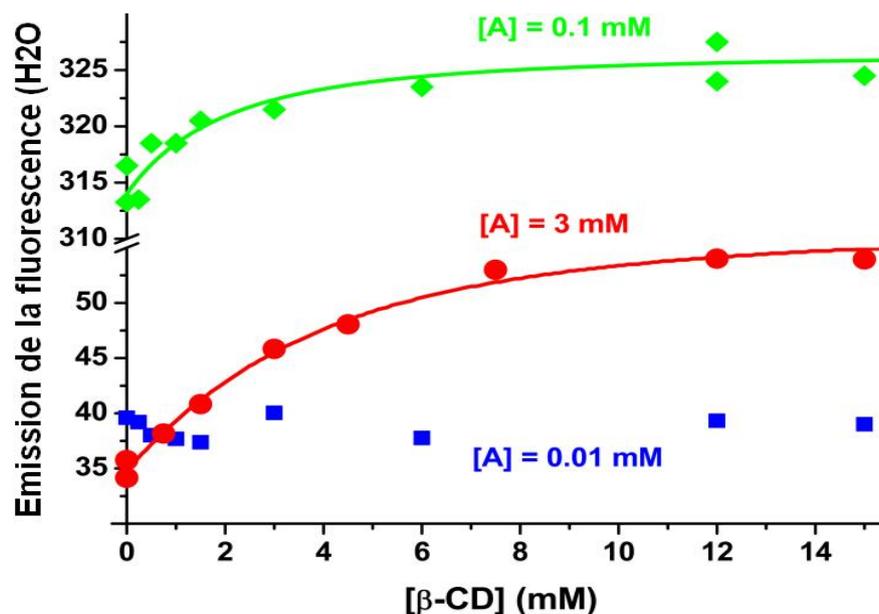


Fig.III.27. Emission de la fluorescence de Tramadol à 297 nm en fonction de la concentration en β -CD. Losanges verts: [Tramadol] = 0,1 mM; Carrés bleus: [Tramadol] = 0,01 mM; Cercles rouges: [Tramadol] = 3,0 mM.

La ligne continue représente la prédiction de l'équation 15 en utilisant des paramètres obtenus en ajustant l'ensemble des données en fonction de la concentration en Tramadol.

L'effet actuel de la complexation par les cyclodextrines sur l'auto-extinction est différent de tous ceux rapportés jusqu'à présent [2]. Des effets plutôt similaires conduisant à l'inhibition de l'extinction de la fluorescence ont été rapportés [2,3].

L'amélioration de la fluorescence par la formation d'un complexe d'inclusion empêchant l'extinction du fluorophore complexé par un extincteur externe a été rapportée dans plusieurs cas [9-14]. La désactivation de la fluorescence par la formation d'excimères intramoléculaire pourrait également être empêchée par la complexation du chromophore à l'intérieur de la cavité de CD [83].

Dans le cas présent, l'auto-extinction n'a pas été complètement éliminée, de sorte que l'amélioration de la fluorescence est restée d'amplitude modérée. La diminution de la constante de Stern-Volmer lors de la complexation par la β -CD est d'un facteur de deux seulement. L'origine est probablement la faible sensibilité à la distance intermoléculaire de la désactivation de la fluorescence par un mécanisme de transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) de type Förster.

Ainsi, plusieurs mécanismes d'extinction pourraient être considérés comme opérationnels. [84,85] Seuls les mécanismes non radiatifs sont pertinents car la forme du spectre de fluorescence n'a pas été affectée par la modification de la concentration de Tramadol. L'extinction par croisement intersystème et par le transfert d'électrons photo-induits ne peut pas s'auto-éteindre. En fait, le transfert radiatif de la molécule excitée à une autre à l'état fondamental est possible puisque les spectres d'absorbance et de fluorescence du Tramadol se chevauchent un peu; mais l'équilibre du transfert est nul car il maintient une molécule de Tramadol dans son état excité. Enfin, le transfert d'énergie non radiatif de Förster et Dexter peut être responsable de l'extinction actuelle [85].

Le transfert d'énergie de Förster est dû aux interactions dipôle-dipôle à longue distance entre une molécule excitée et une autre dans son état fondamental. Ce transfert d'énergie opère sur de longues distances grâce aux caractéristiques à long terme de ces interactions. Le transfert d'énergie de Dexter implique des orbitales moléculaires chevauchantes de l'émetteur et de l'extincteur; c'est un mécanisme à très courte gamme. Comme la protection contre l'auto-extinction par la β -CD était faible, on suppose que le transfert d'énergie de Förster était le mécanisme d'auto-extinction prédominant.

III.6.3. Conclusion

La complexation du chlorhydrate de Tramadol par la β -CD a augmenté l'intensité de l'émission de fluorescence. L'origine de cet effet était l'inclusion de molécules de Tramadol à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine qui empêchait l'auto-extinction. Bien que les propriétés d'absorbance et de fluorescence du Tramadol dans les gammes de concentrations classiques ne varient pas lors de la complexation par la β -cyclodextrine, des expériences menées à des concentrations élevées de Tramadol ont révélé une variation de l'émission de fluorescence.

Une étude détaillée des propriétés de fluorescence associée à une évaluation thermodynamique de l'équilibre de complexation permet de rendre compte quantitativement de l'auto-extinction et de l'influence de la complexation par la cyclodextrine à travers les constantes de désactivation de Stern-Volmer. Ceci complète les principes fondamentaux de l'utilisation de la fluorescence comme outil d'investigation pour étudier la complexation d'inclusion.

La méthodologie nécessite une mise en œuvre correcte de l'effet d'absorbance à haute concentration connu sous le nom d'effet de filtre interne. La même méthodologie peut être utilisée dans d'autres études physico-chimiques utilisant la fluorescence à haute concentration comme les études d'équilibre d'association. Il est en effet intéressant de noter que le travail à haute dilution pour éviter les effets de filtre interne échoue car la dilution provoque la dissociation des structures associées.

- [1] R.P.Frankewich, K.N. Thimmaiah, W.L. Hinze, Evaluation of the relative effectiveness of different water-soluble β -cyclodextrin media to function as fluorescence enhancement agents. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2924–2933.
- [2] P.Bortolus, S.Monti, Photochemistry in cyclodextrin cavities. *Adv. Photochem.* 21 (1996) 1-133.
- [3] V.Ramamurthy, D.F Eaton, Photochemistry and photophysics within cyclodextrin cavities. *Acc. Chem. Res.* 21 (1988) 300-306.
- [4] J.Chen, B.Z. Tang, Restricted intramolecular rotations: a mechanism for aggregation-induced emission. In, Qin,A., Tang,B.Z. *Aggregation-Induced Emission, Wiley, Chichester, UK(2014)* 307-322.
- [5] H.Hwang, H.Kim, S. Myong, Protein induced fluorescence enhancement as a single molecule assay with short distance sensitivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 108 (2011) 7414-7418.
- [6] F.Peccati, J.Hernando, L.Blancafort, X. Solans-Monfort, M.Sodupe, Disaggregation-induced fluorescence enhancement of NIAD-4 for the optical imaging of amyloid- β fibrils. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(2015) 19718-19725.
- [7] J.L Xu, Y. Quan, Q.Y. Li, H.Lu, H.Wu, J.Yin, X.J Wang, Q.Zhang, Significant emission enhancement of a bolaamphiphile with salicylaldehyde azine moiety induced by the formation of (2)-pseudorotaxane with γ -cyclodextrin. *RSC Adv.* 5 (2015) 88176-88180.
- [8] S. L.Deng, P.C.Huang, L.Y. Lin, D.J.Yang, J.L Hong, Complex from ionic β -cyclodextrin polyrotaxane and sodium tetraphenylthiophenesulfonate: restricted molecular rotation and aggregationenhanced emission. *RSC Adv.* 5(2015) 19512-19519.
- [9] M.Sbai, S.A.Lyazidi, D.A.Lerner, B.D. Castillo, M.A. Martin, Modified β -cyclodextrins as enhancers of fluorescence emission of carbazole alkaloid derivatives. *Anal. Chim. Acta* 303(1995) 47-55.
- [10] M. Sbai, S.A. Lyazidi, D.A. Lerner, B.D. Castillo, M.A. Martin, Stoichiometry and association constants of the inclusion complexes of ellipticine with modified β -cyclodextrin. *Analyst.* 121(1996), 1561-1564.
- [11] S.M. Shuang, S.Y.Guo, L. Li, M.-Y. Cai, J.H. Pan, β -Cyclodextrin derivatives as fluorescence enhancers of the drug, hesperidin. *Anal. Lett.* 31(1998), 1357-1366.
- [12] R.E.Galian, A.V. Veglia, Fluorescence quenching inhibition of substituted indoles by neutral and ionized cyclodextrins nanocavities. *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry* 187 (2007) 356-362.

- [13] F.E.Oddy, S. Brovelli, M.T. Stone, E.J.F. Klotz, F. Cacialli, H.L. Anderson, Influence of cyclodextrin size on fluorescence quenching in conjugated polyrotaxanes by methyl viologen in aqueous solution. *J. Mater. Chem.* 19(2009) 2846-2852.
- [14] A.G. Bracamonte, A.V. Veglia, Cyclodextrins nanocavities effects on basic and acid fluorescence quenching of hydroxy-indoles. *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry.* 261(2013) 20–25.
- [15] G. Osterloh, E. Friderichs, F. Felgenhauer, W.A. Günzler, Z. Henmi, T. Kitano, General pharmacological studies on tramadol, a potent analgetic agent (author's transl), *Arzneimittelforschung.* 28 (1978) 135–151.
- [16] M.Vazzana, T.Andreani, J.Fangueiro, C.Faggio, C.Silva, A.Santini, M.L.Garcia, A.M. Silva, E.B. Souto, Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, coadministration of drugs and new drug delivery systems. *Biomed. Pharmacother* 70 (2015) 234–238.
- [17] S.Grond, A.Sablotzki, Clinical pharmacology of tramadol. *Clin. Pharmacokinet.* 43 (2005) 879-923.
- [18] A. Boumendjel, G. T. Sotoing, B.E. Ngo, T. Chabrol, C. Beney, V. Sinniger, Occurrence of the Synthetic Analgesic Tramadol in an African Medicinal Plant. *Angew Chem Int Ed.* 52(45) (2013) 11780- 11784.
- [19] C. Vincent, thèse de doctorat en pharmacie université de bordeaux, étude rétrospective des intoxications aiguës au tramadol à partir des données du centre antipoison et de toxicovigilance de bordeaux ; impact du retrait du dextropropoxyphène. (2014).
- [20] T.A. Bamigbade, C.Davidson, R.M.Langford, J.A Stamford, Actions of tramadol, its enantiomers and principal metabolite, O-desmethyltramadol, on serotonin (5-HT) efflux and uptake in the rat dorsal raphe nucleus. *Brit. J. Anaesth.* 79(1997) 352-356.
- [21] M.C Frink, H.H Hennies, W. Englberger, M. Haurand, B. Wilffert, Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittel-forschung.* 46(11) (1996) 1029–1036.
- [22] H.H Hennies, E.Friderichs, J.Schneider, Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneim.-Forsch.* 38(1988) 877-880.
- [23] W.Reimann, H.H Hennies, Inhibition of spinal noradrenaline uptake in rats by the centrally acting analgesic tramadol. *Biochem. Pharmacol.* 47(1994) 2289-2293.

- [24] C.R Lee, D. McTavish, E.M Sorkin, Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs*.46(2) (1993) 313-340.
- [25] M.Frank, M. Burkhard, S.Frank, and M. S.Ulrike, Enantiomeric Determination of Tramadol and O-Desmethyltramadol by Liquid ChromatographyMass Spectrometry and Application to Postoperative Patients Receiving Tramadol. *Journal of Analytical Toxicology*, 30 (2006) 463- 467.
- [26] P. Oliva, C. Aurilio, F. Massimo, A. Grella, S. Maione, E. Grella, The antinociceptive effect of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. *Eur J Pharmacol*. 445(3) (2002) 179-185.
- [27] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W.Domini, P.J. Feney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23 (1997) 3-25.
- [28] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 44 (2000) 235-249.
- [29] L.Di, E.H.Kerns, Profiling drug-like properties in discovery research. *Current Opinion in Chemical Biology*. 7 (2003) 402- 408.
- [30] G. Vistoli, A. Pedretti, B. Testa. Assessing drug-likeness – what are we missing, *Drug Discov. Today*. 13 (2008)285-294.
- [31] D.F. Veber , S.R. Johnson , H.Y. Cheng , B.R. Smith , K.W. Ward , K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45(12) (2002) 2615-2623.
- [32] L. Rathi, S.K. Kashaw, A. Dixit, G. Pandey, A.K. Saxena, Pharmacophore identification and 3D-QSAR studies in N-(2- benzoyl phenyl)-l-tyrosines as PPAR gamma agonists. *Bioorg. Med. Chem*. 12 (2004) 63-69.
- [33] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B. Dominy, P. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 46 (2001) 3-26.
- [34] P.Ertl, B. Rohde, P.Selzer, Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem*. 43 (2000) 3714-3717.
- [35] C.Hansch, A.Leo, S.B.Mekapati, A. Kurup, QSAR and ADME. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12, (2004) 3391-3400.

- [36] F. Lombardo, R.S. Obach, M.Y Shalaeva, F. Gao, Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding data. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45, (2002) 2867- 2876.
- [37] H.Cumming, C. Rücker, Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method, *American Chemical Society*. 2 (2017) 6244- 6249.
- [38] J.D. Adams, K. Flora, B. Goldspiel, J. Wilson, S. Arbuck, R. Finley, Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns, *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (15) (1993) 141-147.
- [39] D. Duchêne, A.Bochot, S.C.Yu, C.Pépin, M.Seiller, Cyclodextrins and emulsions. *Int. J. Pharm.* 266(2003) 85- 90.
- [40] S.C Yu, A.Bochot, G. Le Bas, M.Chéron, J.Mahuteau, J.L.Grossiord, M. Seiller, D.Duchêne, Effect of camphor/cyclodextrin complexation on the stability of O/W/O multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 261(2003)1- 8.
- [41] V.J.Stella, V.M.Rao, E.A.Zannou, V. Zia,; Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 3-16.
- [42] E.M.Martin Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*. 39(9) (2004) 1033-1046.
- [43] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329(2007)1-11.
- [44] E. Bilensoy, Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine, Current and Future Industrial Applications. *Wiley, Hoboken, New Jersey, USA* (2011).
- [45] A. Anton Smith, R.Manavalan, K.Kannan, N.Rajendiran, Spectral characteristics of tramadol in different solvents and β -cyclodextrin. *Spectrochim. Acta Part A*. 74(2009) 469-477.
- [46] K.J.Box, J.E.A. Comer, Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. *Curr. Drug Metabolism* 9 (2008) 869 – 878.
- [47] J.S Patil, D.V Kadam, S.C Marapur, M.V Kamalapur, Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2 (2010) 29-34.
- [48] P.S Mohanachandran, P.G Sindhumol, T.S Kiran, Enhancement of solubility and dissolution rate, *An overview Muvattupuzha, Kerala, India*. ISSN 0976-8157,(2010).

- [49] M.A. Silva Pires, R.A. Souza Dos Santos, and R. D.Sinisterra, Pharmaceutical composition of hydrochlorothiazide: β -CD: preparation by three different methods, physico-chemical characterization and in vivo diuretic activity evaluation. *Molecules*. 16 (2011) 4482-4499.
- [50] G. Yurtdas, M. Demirel, L. Genc, Inclusion complexes of fluconazole with β -cyclodextrin: Physicochemical characterization and in vitro evaluation. *J. Incl. Phenom. Macro*, 70 (2011) 429-435.
- [51] L. Ribeiro, R.A. Carvalho, D.C. Ferreira, J.B. Veiga-Francisco, Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *Eur. J. Pharm. Sic*. 24 (2005) 1-13.
- [52] S.Zidane, A Maiza, H. Bouleghlem, W. Herizi, S. Dahmani, Investigation of Cyclodextrin Inclusion Compounds Using FT-IR, SEM and X-Ray Diffraction. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 7(3) (2016) 182-185.
- [53] M.T.Fauci, F.Melani, P.Mura, ^1H NMR and molecular modelling techniques for the investigation of the inclusion complex of econazole with β -cyclodextrin in the presence of malic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 25-31.
- [54] E.Fenyvesi, M. Vikmon, J.Szeman, E.Redenti, M.Delcanale, P.Ventura, J.Szejtli, Interaction of hydroxy-acids with β - cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 33 (1999) 339-344.
- [55] S. Qi. , W.J.McAuley, Z.Yang, P. Tipduangta , Physical stabilization of low-molecular-weight amorphous drugs in the solid state: A material science approach. *Therapeutic Delivery*. 5(7) (2014) 817-841.
- [56] X. Zang, D. Wu, J. Lai, Y. Lu, Z. Yin, et W. Wu, Piroxicam/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating techning *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 665-675.
- [57] E. Redenti, T. Peveri, M. Zanol , P. Ventura , G. Gnappi, A. Montenero, A study on the differentiation between amorphous piroxicam: β -Cyclodextrin complex and a mixture of the two amorphous components. *Int.J. Pharm.* 129 (1-2) (1996) 289-294.
- [58] H.J. Schneider, F. Hacket, V.Rüdiger, NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem. Rev.* 98 (1998) 1755-1785.
- [59] R.Smyj, X.P.Wang, F.Han, Tramadol hydrochloride. Profiles Drug Subst. *Excip. Relat. Methodol.* 38 (2013) 463- 494.

- [60] P.Chen, B.Fenet, S. Michaud, N. Tomczyk, E. Véricel, M. Lagarde, M.Guichardant, Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett.* 583 (2009) 3478-3484.
- [61] G.Bodenhausen, D.J.Ruben, Natural abundance nitrogen-¹⁵ NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 69 (1980)185-189.
- [62] A.Gronenborn, A.Bax, P.Wingfield, G.Clore, A powerful method of sequential proton resonance assignment in proteins using relayed ¹⁵N-¹H multiple quantum coherence spectroscopy. *FEBS Lett.* 243 (1989) 93-98.
- [63] T. Domke, A new method to distinguish between direct and remote signals in proton-relayed X, H correlations. *J. Magn. Reson.* 95 (1991) 174-177.
- [64] C.Ronald, C.Crouch, T.D.Spitzer, G.E.Martin, Strategies of the phase editing of relayed responses in 2D HMQC-TOCSY spectra. *Magn. Reson. Chem.* 30(1992) 71-73.
- [65] M.J.Thrippleton, J.Keeler, Elimination of zero-quantum interference in two-dimensional NMR spectra. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 3938 -3941.
- [66] D.J.Wood, F.E.Hruska, W.Saenger, ¹H NMR study of the inclusion of aromatic molecules in α -cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 1735-1740.
- [67] D. Salvatierra, C. Jaime, A.Virgili, F.Sánchez-Ferrando, Determination of the inclusion geometry for the β -cyclodextrin/benzoic acid complex by NMR and molecular modeling. *J. Org. Chem.* 61 (1996) 9578 – 9581.
- [68] B.Valeur, M.N.Berberan-Santos, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2nd ed.(2012) 69-70.
- [69] J.R.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, New York, USA. 3rd ed (2006) 55–56,
- [70] B.C.MacDonald, S.J.Lvin, H.Patterson, Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon. *Anal. Chim. Acta.* 338 (1997) 155-162.
- [71] J.R.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York, USA (2006).
- [72] R.F Chen, J.E. Hayes Jr, Fluorescence assay of high concentrations of DPNH and TPNH in a spectrophotofluorometer. *Anal. Biochem.* 13 (1965) 523-529.
- [73] D.R.Christmann, S.R.Crouch, A.Timmick, Automated instrument for absorption-corrected molecular fluorescence measurements by the cell shift method. *Anal. Chem.* 53 (1981) 276 - 280.

- [74] C.A.Parker, W.J.Barnes, Some experiments with spectrofluorimeters and filter fluorimeters. *Analyst*. **82** (1957) 606 – 618.
- [75] B.Birsdall, R.W.King, M.R.Wheeler, C.A.Lewis Jr, S.R.Goode, R.B.Dunlap, G.C.K. Roberts, Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions. *Anal. Biochem.* 132 (1983) 353-361.
- [76] J.F.Holland, R.E.Teets, P.M.Kelly, A.Timnick, Correction of right-angle fluorescence measurements for the absorption of excitation radiation. *Anal. Chem.* 49 (1977) 706 – 710.
- [77] M. Kubista, R. Slöback, S.Eriksson, B.Albinsson, Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst*. 119 (1994) 417- 419.
- [78] D.R.Christmann, S.R Crouch, J.F.Holland, A.Timnick, Correction of right-angle molecular fluorescence measurements for absorption of fluorescence radiation. *Anal. Chem.* **52** (1980) 291 – 295.
- [79] Q.Gu, J.E.Kenny, Improvement of inner filter effect correction based on determination of effective geometric parameters using a conventional fluorimeter. *Anal. Chem.* 81 (2009) 420-426.
- [80] A.V.Fonin, A.I.Sulatskaya, I.M.Kuznetsova, K.K.Turoverov, Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PLOS One*. 9, (2014) 103878
- [81] N.K.Subbarao, R.C.MacDonald, Experimental method to correct fluorescence intensities for the inner filter effect. *Analyst*. 118 (1993) 913 – 916.
- [82] J.R.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer New York, USA*, 3rd ed (2006) 277- 284.
- [83] R. Arad-Yellin, D.F Eaton, Excited-state reactivity changes induced by complexation with cyclodextrins: Inclusion of 2,2-bis(α -naphthylmethyl)-1,3-dithiane into β - and γ -cyclodextrins. *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 5051 – 5055.
- [84] B.Valeur, , M.N. Berberan-Santos, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2nd Wiley-VCH, Weinheim, Germany ed. (2012) 213–261.
- [85] Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*,. *New York USA*, 3rd ed (2006) 331 –351.

Chapitre. IV

Formation des complexes d'inclusion

IV.1. Introduction

La sélection de molécules actives permettant une formulation nécessitant un minimum d'excipients couramment utilisés et un procédé de fabrication simplifié pour présenter une bonne biodisponibilité, ce qui rend le processus de développement d'un médicament plus rapide, moins complexe et surtout moins coûteux. C'est pourquoi certaines propriétés physico-chimiques sont évaluées très tôt lors de la recherche des molécules actives avant même le choix de la molécule, comme par exemple la solubilité.

Bien que, plusieurs principes actifs présentant une structure chimique potentiellement idéale pour interagir avec la cible, elles échouent dans l'efficacité *in vivo* : après administration, elles ne peuvent se dissoudre dans les milieux aqueux biologiques et par conséquent ne peuvent être transportés sur leurs sites d'action pour atteindre la concentration efficace, amenant à un échec thérapeutique.

L'amélioration de l'absorption par voie orale des principes actifs non hydrosolubles est l'un des défis les plus fréquents et les plus importants pour les scientifiques de la formulation dans l'industrie pharmaceutique, car l'absorption du médicament à partir de cette voie dépend de la libération de la substance médicamenteuse du produit médicamenteux, de la dissolution du médicament dans des conditions physiologiques et de la perméabilité à travers le TGI.

Les connaissances actuelles sur la solubilité, la perméabilité, la dissolution et la pharmacocinétique d'un produit médicamenteux devraient être prises en compte dans la définition des spécifications du test de dissolution pour le processus d'approbation des médicaments.

Par conséquent beaucoup d'efforts ont été fait pour augmenter la dissolution des drogues pour cette classe des composés, comme la classe II et la classe IV (y compris l'HCTZ) [1] de la classification BCS où les médicaments ont une faible solubilité et une faible perméabilité après administration orale [2].

En raison de la production à grande échelle de substances actives nouvellement synthétisées souffrant de solubilité limitée dans l'eau, de nombreuses stratégies très intéressantes ont été proposées pour surmonter ce sérieux obstacle et différents agents complexant pour former de complexes d'inclusion ont été utilisés pour améliorer la solubilité et la stabilité et, par conséquent augmenter la biodisponibilité globale de différents PA [3-5]:

- ⊖ L'emploi de cyclodextrines [6,7];
- ⊖ Les dispersions solides dans des matrices hydrophiles [8-11] (type PEG);
- ⊖ La micronisation;

- ⊖ Les émulsions, micro-émulsions et systèmes auto-émulsifiants;
- ⊖ L'emploi de nanoparticules ;
- ⊖ La réalisation de prodrogues hydrosolubles ;
- ⊖ La formation de sels ou de complexes solubles.

Dans la suite de ce chapitre, nous s'intéresserons à la formation de complexes d'inclusion à partir d'HCTZ et β -CD et/ou β -CD acétylée par différentes méthodes, et le dernier chapitre sera consacré à l'étude de la solubilité d'HCTZ en présence de β -CD, HP- β -CD et/ou PEG.

IV.2. HCTZ

Le traitement pharmacologique de l'hypertension consiste à administrer des médicaments, y compris des bêtabloquants, des inhibiteurs calciques, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (AT1) [12-14] et des diurétiques, en particulier l'HCTZ [15,16], un diurétique approuvé par FDA en tant que traitement d'appoint pour le traitement de l'œdème associé à diverses affections, notamment l'hormonothérapie, cirrhose du foie et insuffisance cardiaque congestive [1,17]. Sa faible solubilité dans l'eau incite les chercheurs à trouver une formulation plus appropriée pour l'administration orale de doses thérapeutiques.

IV.2.1. Propriétés pharmacodynamiques d'HCTZ

L'HCTZ appartenant à la classe chimique du dérivé benzoxazole. Il est un peu soluble dans l'eau dont la biodisponibilité est inférieure à 65%, selon le BCS. Son nom chimique selon l'IUPAC est 6-chloro-1,1-dioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide, de formule brute $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, a une structure proche de la chlorothiazide (Fig. IV.1.).

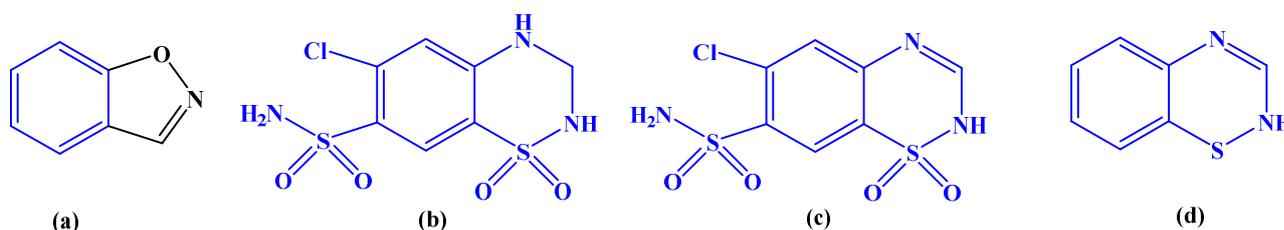


Fig. IV.1. Structure chimique de la Benzoxazole (a), de l'HCTZ (b), de la Chlorothiazide (c) et de la thiazide (d)

Il est pratiquement insoluble dans l'eau, le chloroforme et l'éther, et est peu soluble dans l'alcool. Il est cependant soluble dans l'éthanol, l'acétone, le diméthylformamide, le méthanol, le n-butylamine, ou encore la soude [18].

Les thiazides (benzothiadiazines) (Fig .IV.1) affectent les mécanismes tubulaires rénaux de la réabsorption des électrolytes, augmentant directement l'excrétion du sodium et du chlorure en quantités approximativement équivalentes. Indirectement, l'action diurétique de l'HCTZ réduit le volume plasmatique, avec pour conséquence une augmentation de la perte de potassium urinaire, de l'activité rénine plasmatique, de la sécrétion d'aldostérone et une diminution de la kaliémie [19-21].

IV.2.2. Évaluation du profil du HCTZ par les règles de Lipinski

Nous avons utilisé les règles de Lipinski pour identifier l'HCTZ qui a des problèmes de solubilité, d'absorption et de perméabilité. La règle de Lipinski est la plus utilisée pour caractériser ce type de problèmes. Les prévisions des propriétés ADME pour l' HCTZ sont présentées dans le tableau.IV.1

Tableau.IV.1. Prédiction de la règle de Lipinski d'HCTZ

Propriétés	HCTZ
M (g/mol)	297,75
PSA	118,36
N Accp ALH	7
N Donn DLH	4
(logP)	- 0,06
Violations	0
Liaisons rotatives	1
VM	202,50

Les propriétés ADME ont été calculées à l'aide de serveurs en ligne tels que Molinspiration (v2018.10). D'après le tableau.IV.1, Log P de HCTZ égale à -0,06 (Log P < 0). Donc d'après la (Fig. III.7.) Variation de biodisponibilité en fonction de Log P de différents médicaments, page 58), nous pouvons dire que l'HCTZ est moins soluble dans des solutions aqueuses, ce qui indique que l'HCTZ est hydrophobe. Nous pouvons également voir dans le tableau.IV.1 que l'HCTZ a le nombre accepteurs d'hydrogène inférieurs à 10, les quatre sites accepteurs de l'hydrogène sont les oxygènes de sulfamide et le nombre donneurs d'hydrogène inférieurs à 5, les trois sites donneurs de l'hydrogène sont les amines : NH_{secondaire} et NH_{primaire}. (Fig. IV.2)

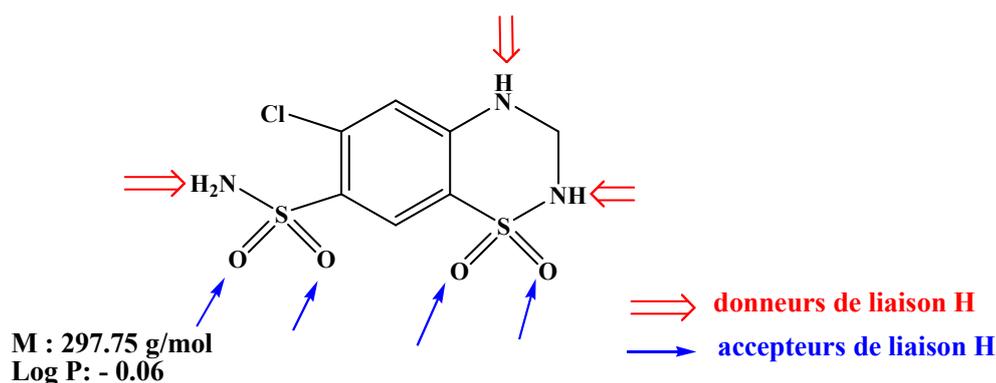


Fig. IV.2. Règles de Lipinski appliquées au HCTZ

Aussi, la masse moléculaire d'HCTZ est 297,75 g/mol, donc il traverse facilement les membranes cellulaires. Pour le nombre de violation, nous remarquons que l'HCTZ a une violation nulle. Le faible nombre de liaisons rotatives dans l'HCTZ indique que ce PA lors de la liaison avec une protéine ne change sa conformation que légèrement. Pour les résultats de PSA, nous remarquons que l'HCTZ possède une valeur égale à 118.36 Å² ce qui montre la mauvaise prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes.

À partir de ces résultats, nous pouvons conclure que l'HCTZ répond à la règle de Lipinski (règles des cinq), mais le problème de ce médicament est l'insolubilité dans l'eau et donc la mauvaise biodisponibilité orale, c'est pourquoi nous avons étudié la possibilité de son encapsulation dans la cavité de β -CD et/ou β -CD acétylé (β -CD acétylé pour étudier l'effet stérique sur l'encapsulation et le rendement).

IV. 3. Etudes des complexes d'inclusion

IV. 3.1. Matériels et réactifs

β -CD, furent fournies généreusement par le laboratoire LAGEP, UMR 5007 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1 (France).

HCTZ, furent fournies généreusement par les laboratoires SALEM, Sarl El-Eulma, Sétif-Algérie.

IV.3.2. Formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD)

Pour préparer les complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD), avec un rapport molaire [1:1], nous avons choisis les mêmes procédures utilisés pour la formation des complexes (Tram : β -CD) dans le troisième chapitre: mélange physique (HCTZ: β -CD Mph), par malaxage (HCTZ: β -CD Kn M) , par irradiation micro-ondes (HCTZ: β -CD MO) et par évaporation sous vide (HCTZ: β -CD VE).

Les complexes formés sont caractérisés par l'IR tandis que les complexes formés via micro-onde et qui ont donné un bon rendement sont caractérisés par les RX en plus de l'IR et nous avons suivis la formation du complexe (HCTZ : β -CD) de stœchiométrie variée dans le tampon phosphate (pH=7.4) par RMN ^1H . Le tableau ci-dessous présente une comparaison de différentes techniques utilisées.

Tableau. IV.2. Comparaison entre les méthodes de formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD)

Mode d'accès	Temps de réaction	Quantité de solvant utilisé	Rdt%
Malaxage (KnM)	45min	MeOH/H ₂ O (2mL) (v/v)	86,03
Irradiation via micro-onde (MO)	2 à 3min	/	93,85
Evaporation sous vide (VE)	24 heures et 25min	Eau distillée (150mL)	58,87

D'après le Tableau. IV.2, nous avons conclu que la méthode de préparation du complexe par irradiation sous micro-onde est très efficace par rapport aux autres méthodes, d'un côté le temps est très court et d'un autre côté le rendement est très élevé, c'est pour cela nous avons choisis cette méthode pour la préparation des complexes avec β -CD acétylée dans la suite du travail.

IV.3.3. Caractérisation de la β -CD et HCTZ avant la complexation par la Spectrométrie IR

Nous avons fait un séchage du KBr et des produits quand veut analyser β -CD et HCTZ, ensuite nous avons préparé des pastilles par le mélange de 3 mg d'échantillon et 97mg de KBr. Le spectre infrarouge de la β -CD native est représenté sur la figure. IV.3 et le spectre de HCTZ est représenté sur la figure. IV.4.

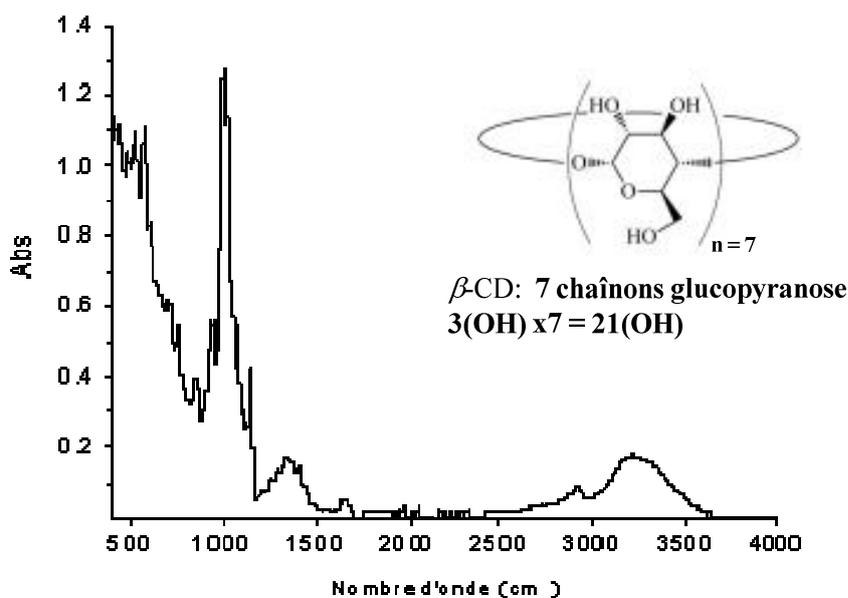


Fig .IV.3. Spectre infrarouge de la β -CD native

Les principales bandes caractéristiques de la β -CD sont rassemblés dans le Tableau. IV.3.

Tableau. IV.3. Nombre d'ondes fondamentales et propositions d'attribution du β -CD

β -CD (KBr, $\bar{\nu}$ cm ⁻¹)	Attribution
3450	Vibration d'élongation des OH liés
2927	CH ₂ d'un alcool primaire
1654	Dans le plan d'O-H de l'eau de cristallisation de la CD
1150	Liaison C-O (dans C-O-C)
1000	Liaison C-O (dans C-O-H)
854-939	Déformation de C-H secondaire du cycle
530-762	C-C du squelette du cycle glucoside

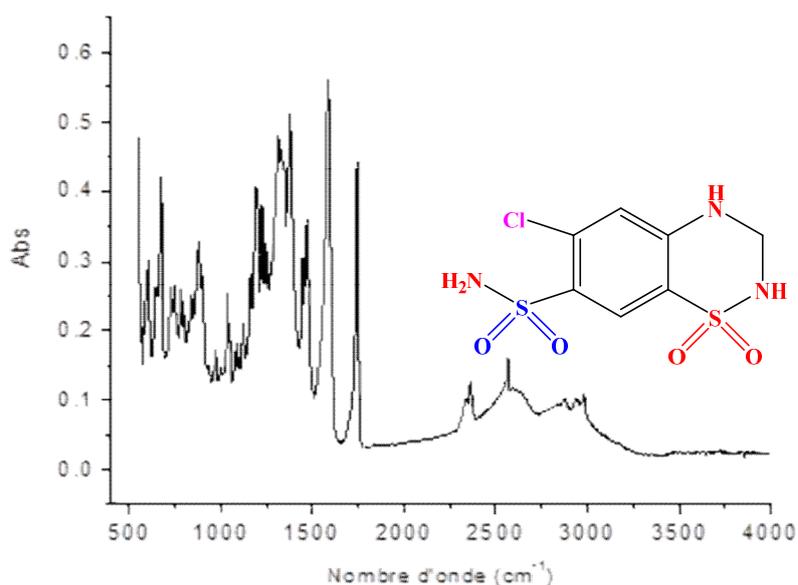


Fig. IV.4. Spectre infrarouge de l'HCTZ dans le KBr

Les principales bandes d'absorption caractéristiques de l'HCTZ sont données dans le tableau.IV.4.

Tableau .IV.4. Nombre d'ondes fondamentales et propositions d'attribution du HCTZ

HCTZ (KBr, $\bar{\nu}$ cm ⁻¹)	Attribution
3420	NH ₂ d'amine primaire.
1480	Déformation dans le plan des groupements NH d'amine secondaire cyclique
1616	CN
1335-1155	Cycle hexane liée au groupement Sulfonamide : (SO ₂ -NH)
1250	C-S
750	Substruction du chlore au benzène
1092	Elongation symétrique du groupement sulfonyl
3100-3000	Élongation du cycle aromatique de la liaison (C-H)
1600-1450	Élongation du cycle aromatique de la liaison (C=C)

VI.3.4. Caractérisation du mélange physique formé par IR

La figure. IV.5 représente le spectre IR de mélange physique (HCTZ : β -CD Mph).

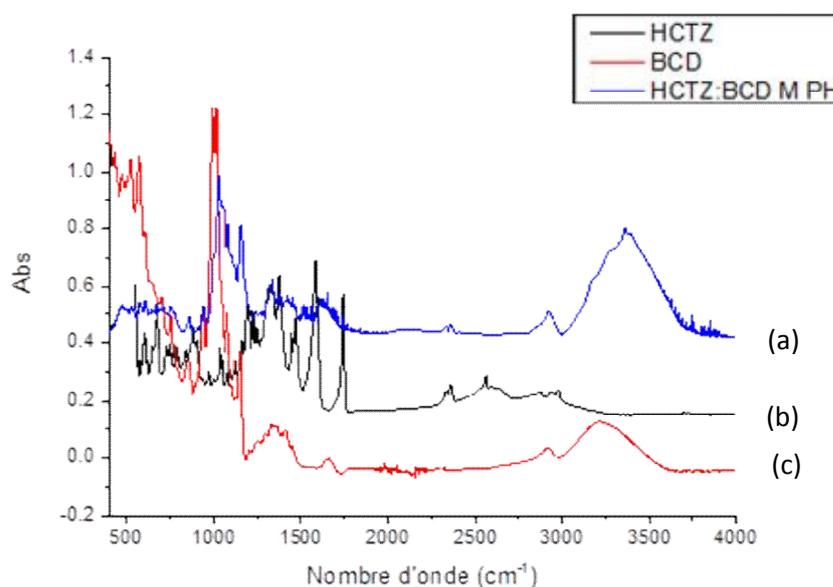


Fig.IV.5. Spectre IR de HCTZ, β -CD et le mélange physique (HCTZ: β -CD M Ph) [1 :1]

D'après le spectre du mélange physique, on retrouve les bandes caractéristiques : $\bar{\nu}_1=3400\text{ cm}^{-1}$ (O-H) , $\bar{\nu}_2=1654\text{ cm}^{-1}$ (eau de la cavité), $\bar{\nu}_3=1000\text{ cm}^{-1}$ (C-O-H), $\bar{\nu}_4=2900\text{ cm}^{-1}$ (C-H de HCTZ) , $\bar{\nu}_5=1495\text{ cm}^{-1}$ (Amine) , $\bar{\nu}_6=1100\text{ cm}^{-1}$ (SO₂NH de cycle). Le spectre IR du mélange physique rassemble les bandes d'absorption caractéristiques de β -CD et HCTZ, qui peut être considéré comme une simple imposition du spectre de β -CD et le spectre du HCTZ. Donc on peut dire d'après les spectres (a, b et c), qu'il n'y a pas eu une inclusion proprement dite dans le mélange physique ; car la présence de toutes les bandes caractéristiques sans changement notable indique fortement la présence de deux composés sans changement (HCTZ et β -CD).

IV.3.5. Caractérisation des complexes d'inclusion formés par les trois méthodes par IR

Pour confirmer la formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD) par les trois méthodes de préparation proposés, nous avons regroupés les spectres d'IR de différents complexes formés pour faire la comparaison entre eux dans la figure. IV.6.

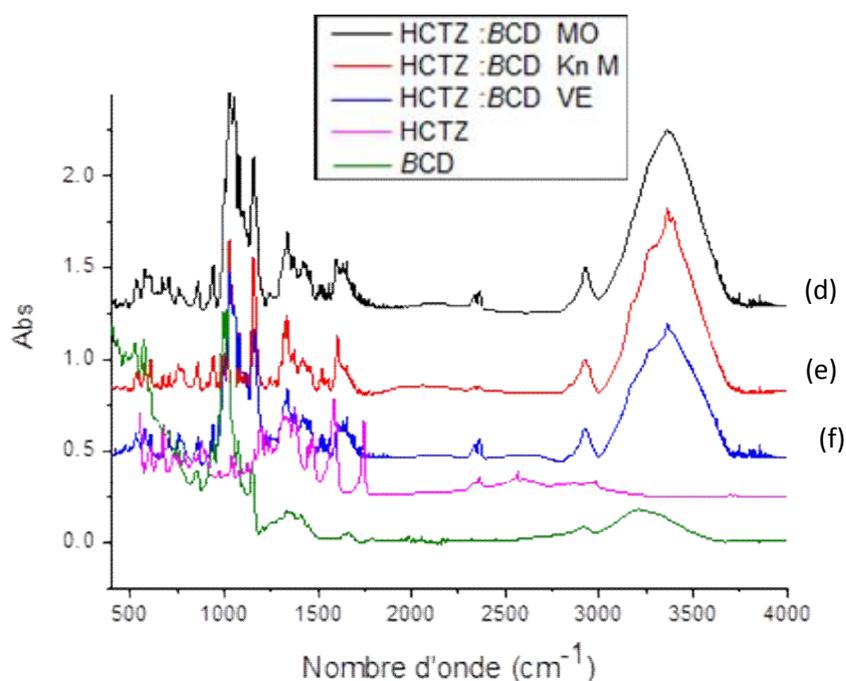


Fig. IV.6. Spectre IR de β -CD, HCTZ et des complexes formés: (HCTZ: β -CD MO) (d), (HCTZ: β -CD KnM) (e) et (HCTZ: β -CD VE) (f)

Nous remarquons que certaines bandes de l'HCTZ sont décalées dans les spectre de complexes (d, e et f), par rapport aux bandes de l'HCTZ native, certaines d'autres, sont disparues ce qui confirme la formation du complexe d'inclusion avec la β -CD. La majorité des bandes de l'HCTZ interfèrent avec celles de la β -CD. Le nombre d'onde des principaux groupes de β -CD et de β -CD dans le complexe observé est représenté dans le tableau.IV.5.

Tableau. IV.5. Comparaison entre le nombre d'onde des principaux groupes de β -CD libre et dans les complexes d'inclusion (HCTZ: β -CD) [1/1].

Groupes fonctionnels	Nombre d'onde (cm ⁻¹)		Décalage ($\Delta\bar{\nu}$)
	β -CD Libre	(HCTZ: β -CD) (1/1)	
(O-H)	3450	3456	+ 6
(CH ₂) de l'alcool primaire	2927	2930	+ 3
(C-O)	1150	1155	+ 5
(O-H) (Vibration de flexion)	1643	Disparition	/
(C-H) secondaire du cycle	854-939	Disparition	/
(C-C) cycle glucopyranose	530-762	Disparition	/

En outre, des vibrations pour l'HCTZ libre et l'HCTZ dans le complexe ont été enregistrées et représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau. IV.6. Comparaison entre le nombre d'onde de HCTZ libre et HCTZ dans le complexe d'inclusion (HCTZ: β -CD) [1/1].

Groupes fonctionnels	Nombre d'onde (cm ⁻¹)		Décalage ($\Delta \bar{\nu}$)
	HCTZ libre	(HCTZ : β -CD) [1 :1]	
(N-H) amine primaire	3420	-----	/
(N-H) amine de cycle hexane	1480	1470	- 10
(SO ₂ -NH ₂)	1250	1242	-8
(C-Cl) substitution du chlore	750	Disparition	/
(C-H) Aromatique	3000	2999	-1
(C=C) Aromatique	1600	Disparition	/

○ $\Delta \bar{\nu} = \bar{\nu} (\text{complexe}) - \bar{\nu} (\text{libre})$

Les deux tableaux (IV.5 et IV.6) montrent des augmentations et des diminutions de $\Delta \bar{\nu}$. L'augmentation est due à l'insertion de la partie anneau et de la chaîne de la partie du groupement sulfamide dans la cavité riche en électrons de β -CD par conséquent l'augmentation de la densité du nuage électronique, ce qui entraînera une augmentation du nombre d'ondes ($\Delta \bar{\nu} > 0$).

La diminution du nombre d'onde ($\Delta \bar{\nu} < 0$) entre le complexe d'inclusion et HCTZ est due aux modifications du microenvironnement (microphénomène) qui entraînent la formation de liaisons hydrogène et la présence de forces de Van Der Waals lors de leur interaction pour former le complexe d'inclusion.

Nous remarquons à partir de la figure. IV.7 jusqu'à la figure. IV.11 (les figures représentent les différentes gammes de spectres infrarouges), que les déplacements sont presque les mêmes pour les complexes (HCTZ : β -CD) [1/1] formés par les trois méthodes, on remarque aussi que la résolution des bandes d'absorption observées à 750 cm⁻¹, 1700 cm⁻¹ qui correspond à (C-Cl) et (C=C_{aromatique}) respectivement est disparue dans les trois complexes. Ce résultat peut être attribué à l'interaction entre l'aromatique du HCTZ et la cavité du β -CD. La disparition du bande de déformation du OH (1643 cm⁻¹) de l'eau dans la cavité de β -CD peut aussi observer par la comparaison du spectre IR des complexes (HCTZ : β -CD) et le spectre IR du β -CD.

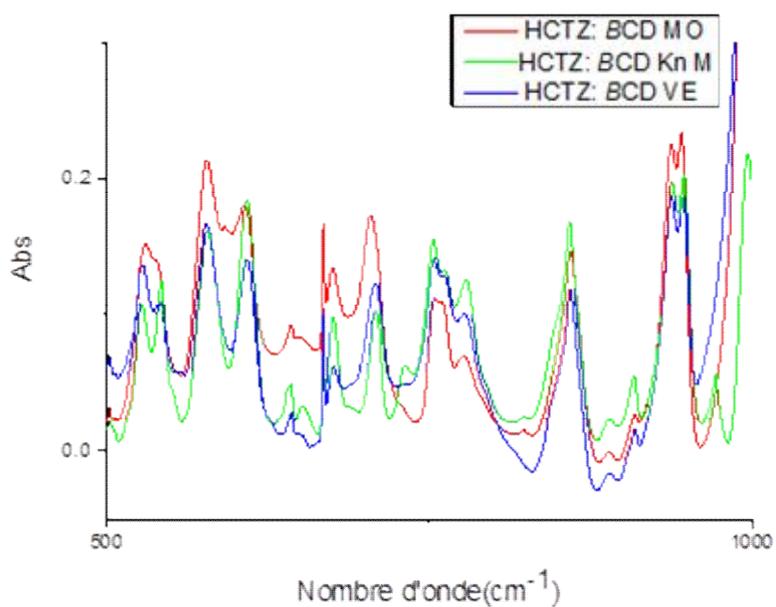


Fig.IV.7. Spectres IR des complexes: (HCTZ:β-CD MO), (HCTZ:β-CD KnM) et (HCTZ:β-CD VE) dans la gamme [500 - 1000] cm⁻¹

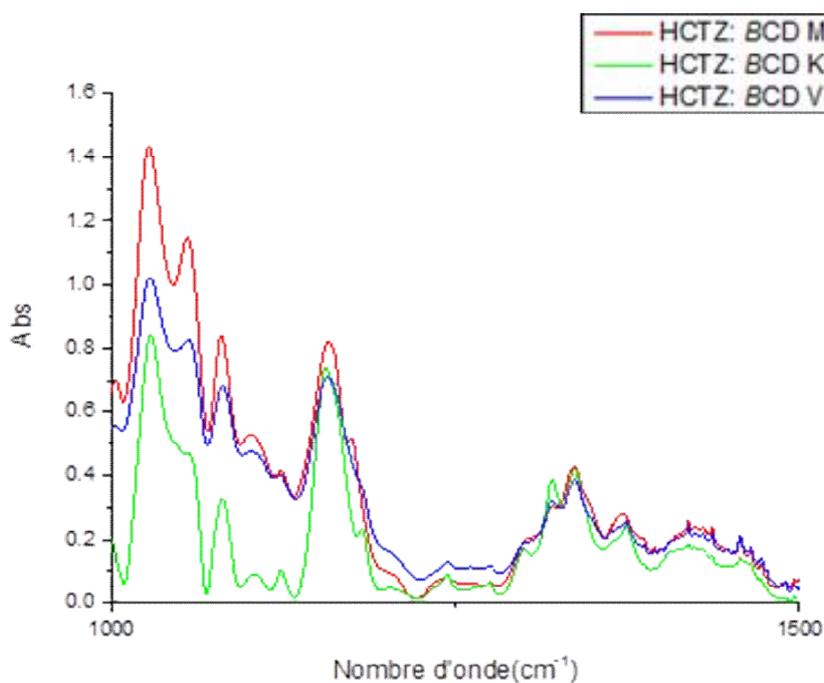


Fig.IV.8. Spectres IR des complexes: (HCTZ:β-CD MO), (HCTZ:β-CD KnM) et (HCTZ:β-CD VE) dans la gamme [1000 - 1500] cm⁻¹

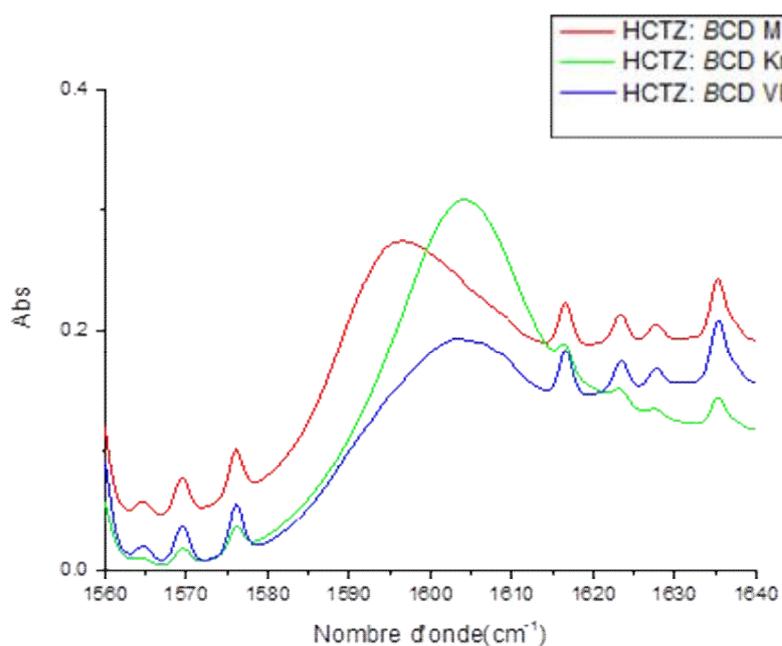


Fig.IV.9. Spectres IR des complexes: (HCTZ:β-CD MO), (HCTZ:β-CD KnM) et (HCTZ:β-CD VE) dans la gamme [1560 - 1640] cm^{-1}

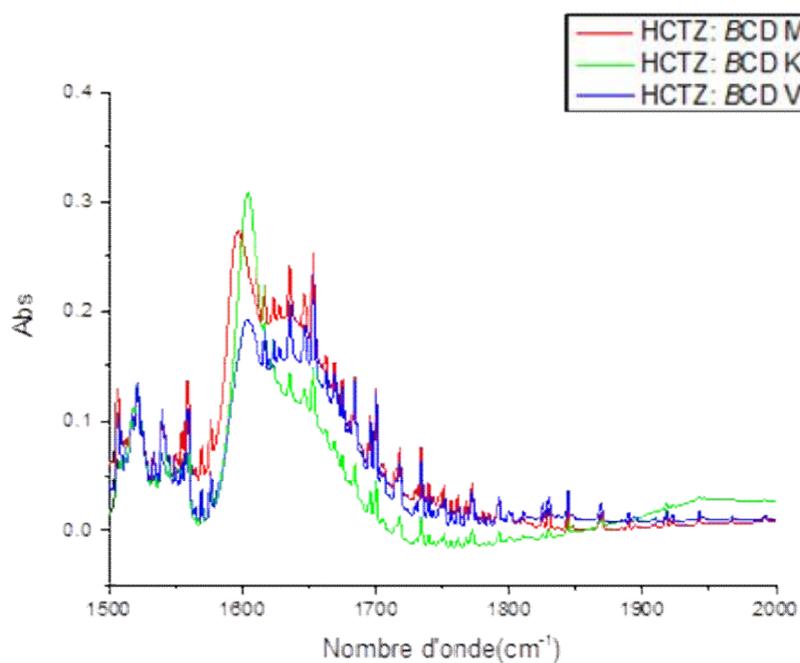


Fig. IV.10. Spectre IR des complexes: (HCTZ:β-CD M Ph), (HCTZ:β-CD MO), (HCTZ:β-CD KnM) et (HCTZ:β-CD VE) dans la gamme [1500 - 2000] cm^{-1} .

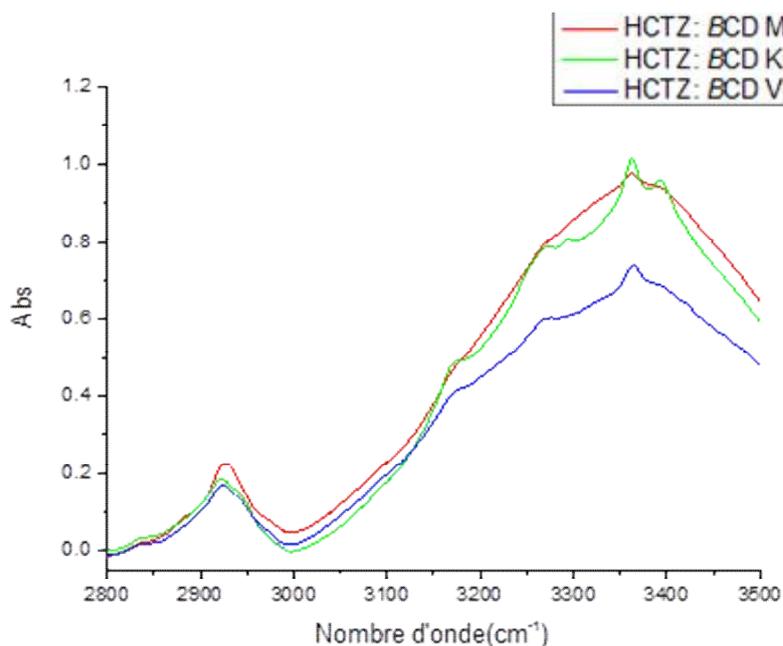


Fig.IV.11. Spectres IR des complexes: (HCTZ:β-CD MO), (HCTZ:β-CD KnM) et (HCTZ:β-CD VE) dans la gamme [2800 - 3500] cm^{-1} .

IV. 3.6. Caractérisation par les RX du complexe d'inclusion préparé par irradiation sous micro-onde

Les Diagrammes de diffraction des RX de β -CD (a), du complexe (HCTZ : β -CD MO) (b) et du HCTZ (c) sont montrés dans la Figure. IV.12.

Les résultats des analyses obtenus par les RX montre un profil amorphe pour le HCTZ en présence de β -CD (HCTZ : β -CD) spectre (b) et un profil semi cristallin pour β -CD spectre (a) contrairement au HTZ spectre (c) qui présente un profil cristallin avec deux pics intense à 19° et 29° . Nous concluons que la β -CD a modifié les propriétés cristallographiques d'HCTZ et nous pouvons attribuer ce changement à la formation du complexe d'inclusion. Donc nous pouvons dire que la solubilité de HCTZ peut s'améliorée et nous pouvons attribuer ça à la complexation avec la β -CD.

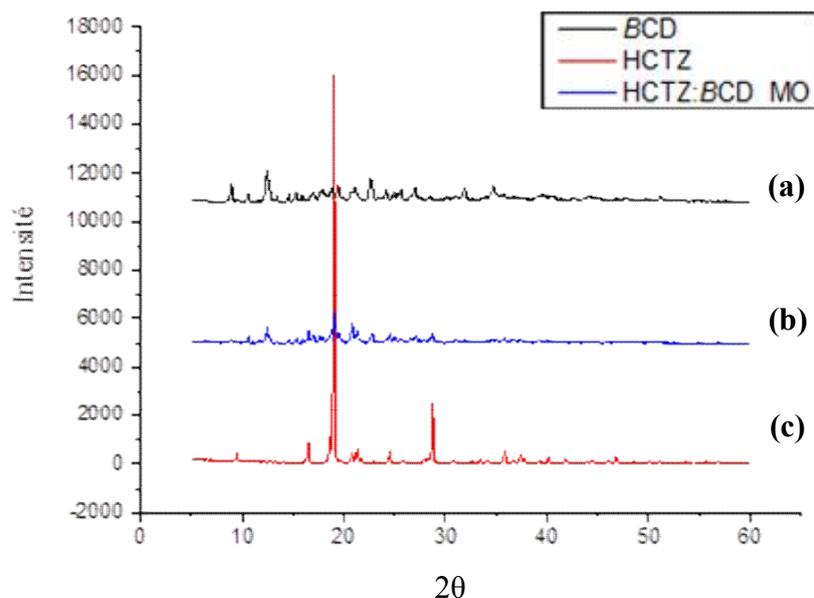


Fig.IV.12. Diagrammes de diffraction des rayons X du β -CD (a) et du complexe (HCTZ: β -CD MO) (b) et de HCTZ (c).

IV.3.7. Suivi de la formation du complexe (HCTZ : β -CD) de stœchiométrie variante dans le D_2O (tampon phosphate, pH=7.4) par RMN 1H

Les spectres de RMN sont indispensables pour affirmer l'inclusion du HCTZ dans la cavité de β -CD. Pour cela, il est possible de réaliser le spectre du proton (RMN 1H) qui renseigne sur la direction de l'inclusion de HCTZ dans la cavité de la β -CD par identification de la position de ses protons. Cette méthode permet de visualiser les déplacements des bandes de résonance des protons internes de la β -CD (H-3, H-5) (Fig. IV.13) en cas d'inclusion d'une molécule, alors que les protons externes restent peu affectés (H-1, H-2, H-4, H-6).

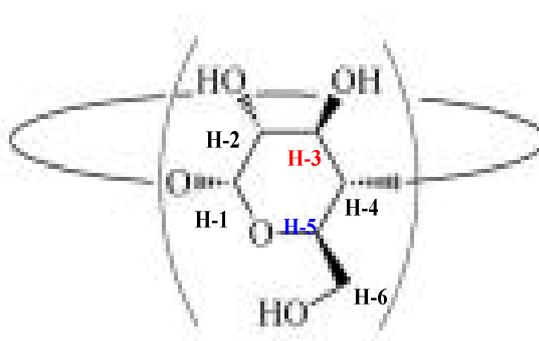


Fig.IV.13. Les deux protons internes H-3 et H-5 présentés dans une unité glucosidique de β -CD

On étudie de même, toutes modifications des bandes de résonance des protons de l'HCTZ afin de déterminer les atomes interagissant avec la β -CD. Lorsqu'un complexe est formé, les variations de la densité électronique autour de certains noyaux causent leur blindage ou déblindage par rapport au champ magnétique externe. Le déplacement chimique de certains pics change: Ainsi, les hydrogènes H-3 et H-5, situés à l'intérieur de la cavité, seront déblindés lors de l'interaction avec l'HCTZ, uniquement lorsqu'il y a formation d'un complexe où l'HCTZ est totalement inclus à l'intérieur de β -CD.

IV.3.7.1. Caractérisation par la résonance magnétique nucléaire des protons (RMN ^1H)

Le tableau ci-dessous rassemble tous les protons de β -CD et HCTZ dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante au tampon phosphate pH=7.4 (RMN 500 MHz, D_2O). On s'intéresse beaucoup plus dans notre étude sur la caractérisation et le suivi de déplacement chimique du H-3 et H-5 du β -CD et le déplacement chimique du H-a, H-b de l'aromatique et les deux protons jumeaux de l'hétérocycle de l'HCTZ (Fig. IV.14)

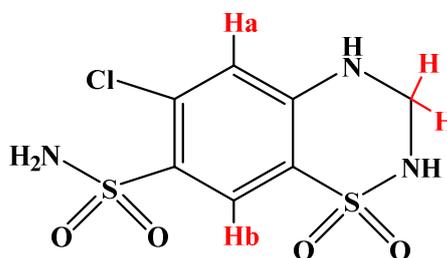


Fig.IV.14. Schéma représente les différents protons de HCTZ

Tableau. IV.7. Déplacements chimiques des protons de β -CD et HCTZ dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante pH=7.4 (RMN 500 MHz, D₂O, pH=7.4).

(D ₂ O, δ ppm)	Complexe d'inclusion (HCTZ: β -CD) avec la stœchiométrie variante								
	[1: 0]	[1:1]	[1: 2]	[1:3]	[1:10]	[0:1]	[2:1]	[3:1]	[10:1]
HCTZ									
(C-H) Hétérocycle	4.761	4.786	4.787	4.787	4.786	/	4.780	4.767	4.774
(C-H _a) Ar	7.070	7.060	7.060	7.055	7.050	/	7.001	6.991	7.007
(C-H _b) Ar	8.165	8.135	8.138	8.136	8.134	/	8.156	8.147	8.169
β-CD									
H-1	/	4.986	4.987	4.987	4.986	4.990	4.985	4.974	4.985
H-2	/	3.578	3.578	3.578	3.578	3.580	3.576	3.565	3.576
H-3	/	3.973	3.974	3.975	3.978	3.981	3.971	3.961	3.970
H-4	/	3.498	3.499	3.499	3.490	3.501	3.498	3.487	3.498
H-5	/	3.859	3.860	3.862	3.867	3.872	3.853	3.844	3.853
H-6	/	3.791	3.792	3.792	3.792	3.793	3.790	3.779	3.790

Après inclusion, l'environnement électronique des protons (H-3, H-5) de β -CD est modifié du fait de la présence de HCTZ dans la cavité, tandis que les protons localisés à l'extérieur (H-2, H-4 et H-6) de la cavité restent pratiquement inchangés.

L'analyse du spectre RMN¹H du complexe (HCTZ: β -CD) avec la stœchiométrie variante dans le tampon phosphate (pH=7.4) montre que tous les protons ont subi un blindage plus ou moins important vers les valeurs inférieures des déplacements chimiques par rapport à ceux de la β -CD pure [0:1]. On constate l'apparition d'une bande large à $\delta = 3,872$ - $3,981$ ppm attribuée au chevauchement des multiplets correspondant aux protons H-3 et H-5 dans les cas [1:1], [1: 2], [1:3] et [1:10] et aux interactions entre les protons H-3 et H-5 dirigés vers l'intérieur de la cavité de la β -CD (partie hydrophobe) avec l'HCTZ.

Donc on peut dire que le complexe d'inclusion (HCTZ: β -CD) à différents coefficients stœchiométriques ([0 :1], [1 :1], [1 :2], [1 :3], [1 :10] et [1 :0]), est confirmé par les déplacements chimiques des protons H-3 et H-5.

Le blindage des protons H-2, H-4 et H-6 peut être dû à la formation de liaisons hydrogène, les figures (de la Fig. IV.15 à Fig. IV.18) rassemblent tous les déplacements chimiques du H-3, H-5 du β -CD et H-a, H-b et les deux protons jumeaux de l'hétérocycle de l'HCTZ.

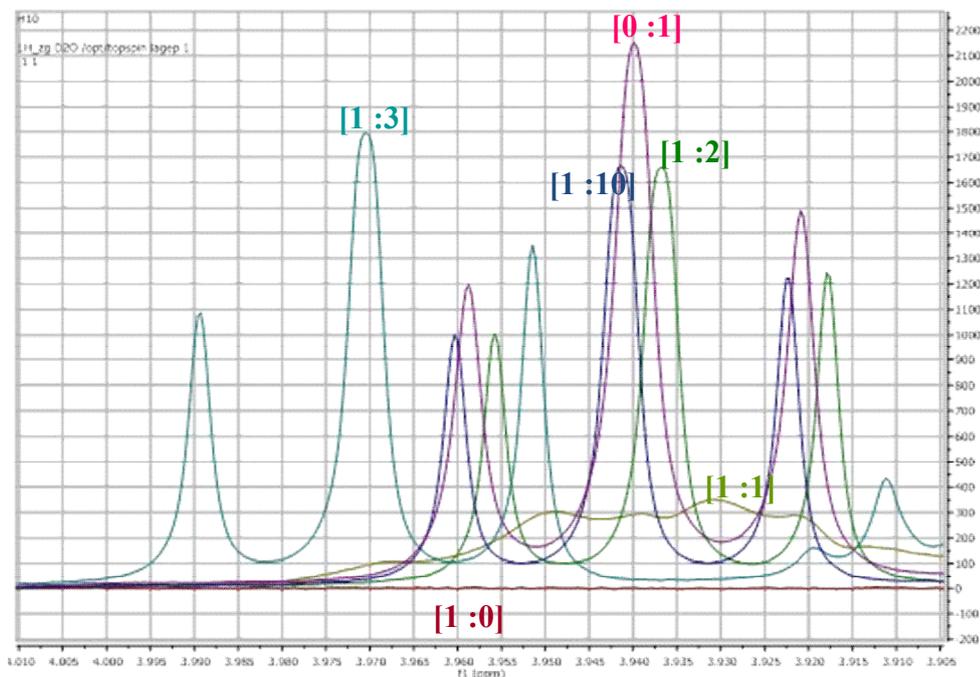


Fig. IV.15. Variation du proton H-3 du complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variée dans le D₂O (pH=7.4, RMN¹H, 500 MHz)

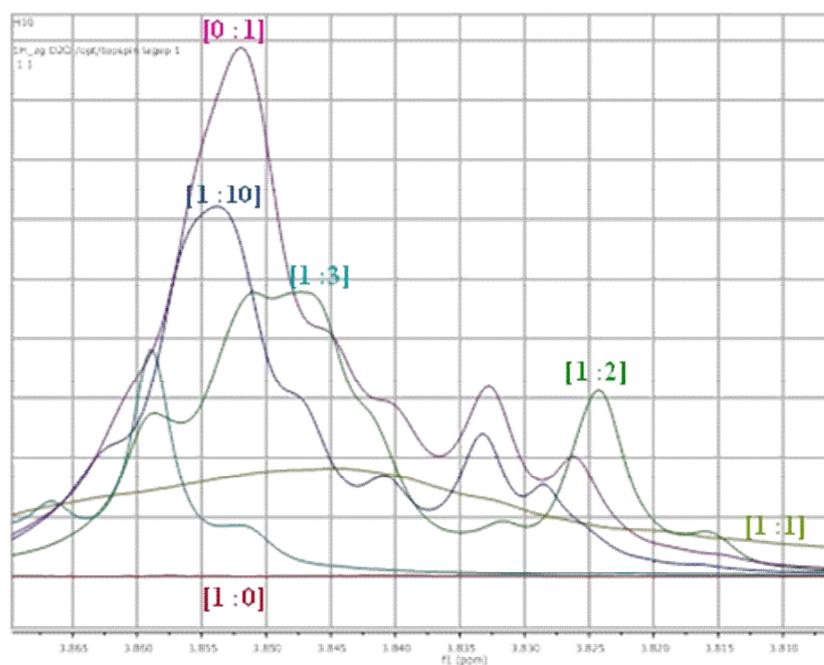


Fig. IV.16. Variation du proton H-5 du complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variée dans le D₂O (pH=7.4, RMN¹H, 500 MHz)

On voit également sur la figure.IV.17 et figure.IV.18 que le proton H-a et H-b du cycle aromatique de HCTZ et les protons du hétérocycle thiazidique sont déplacés, cela prouve que le HCTZ peut pénétrer la cavité via son groupement sulfamide. Ce qui indique que la complexation est un processus dynamique [22] dans lequel il existe un échange rapide entre l'HCTZ libre et complexé

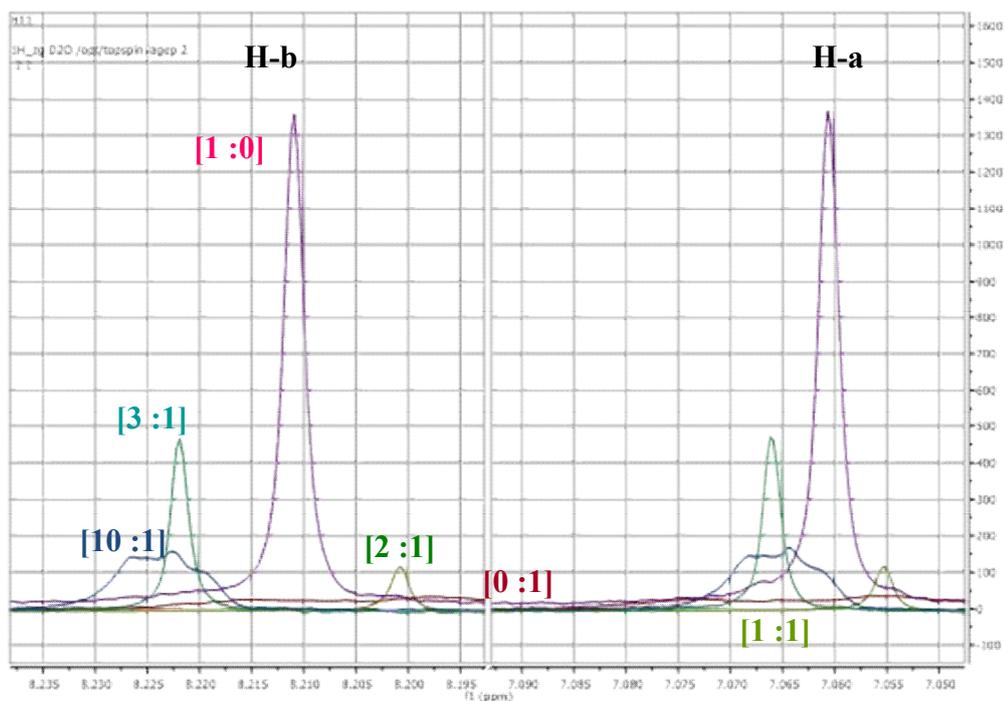


Fig. IV.17. Variation des protons H-a et H-b de HCTZ dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D₂O (pH=7.4, RMN¹H, 500 MHz)

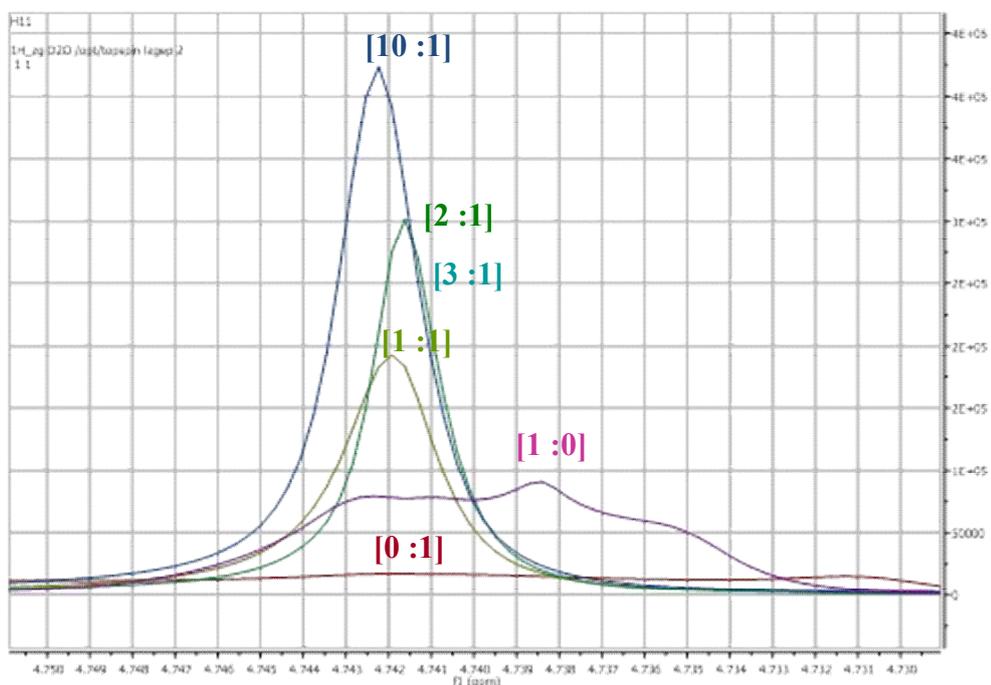


Fig. IV.18. Variation du proton de l'hétérocycle thiazidique dans le complexe (HCTZ: β -CD) de stœchiométrie variante dans le D₂O (pH=7.4, RMN¹H, 500 MHz)

IV. 4.Acétylation totale des groupements hydroxyles de β -CD par Anhydride acétique

IV.4.1. Méthode d'acétylation par l'irradiation via micro-onde (*technique moderne*)

Une quantité de 10g de β -CD (8,81 mmol) est dissoute dans 4,16 mL d'anhydride acétique (4,50 g ; 44,41 mmol, 5 $\acute{e}q.$) puis une quantité de 1,44 g d'acétate de sodium anhydre (17,62 mmol, 2 $\acute{e}q.$) est ajoutée à la solution. La réaction est soumise aux irradiations de micro-ondes à une puissance de 350 watts pendant 3 minutes. Un volume de 50 mL d'acétate d'éthyle est ajouté à la réaction et cette solution est lavée trois fois avec une solution de HCl 10% puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl.

La phase organique est séchée avec du $MgSO_4$ anhydre, filtrée puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit recueilli est recristallisé dans l'éther pour conduire à un solide blanc avec un bon rendement de 98,5%. (Fig. IV.19.).

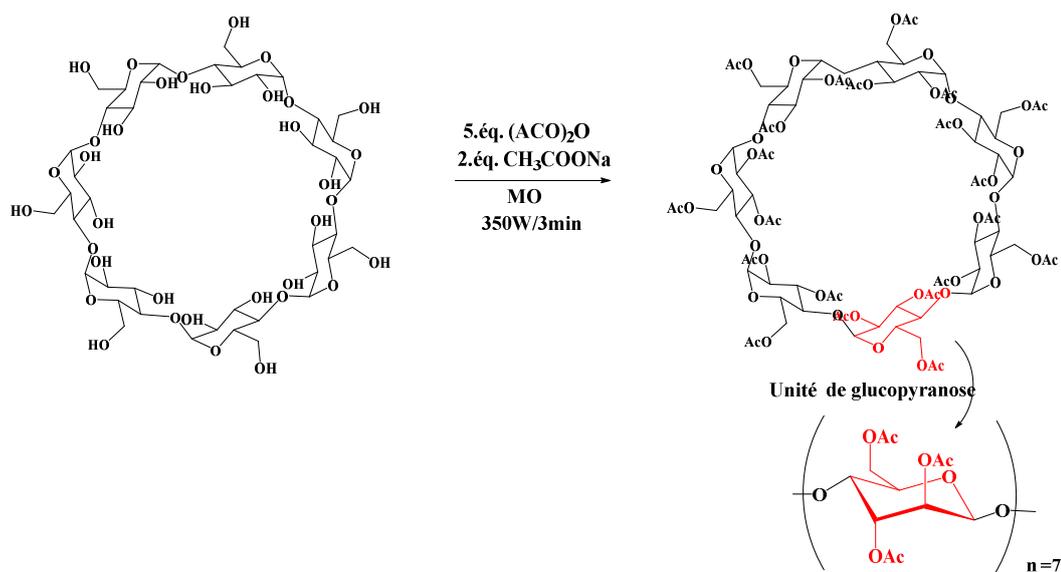


Fig. IV.19. Acétylation de la β -CD par Anhydride acétique par l'irradiation via micro-onde

IV.4.1.1. Caractérisation de l'Heptakis (2,3,6-tri-O-acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β CD) par IR

Pour confirmer l'acétylation totale du β -CD, Nous avons caractérisé notre produit par l'IR les résultats obtenus sont présentés sur la Figure. IV.20.

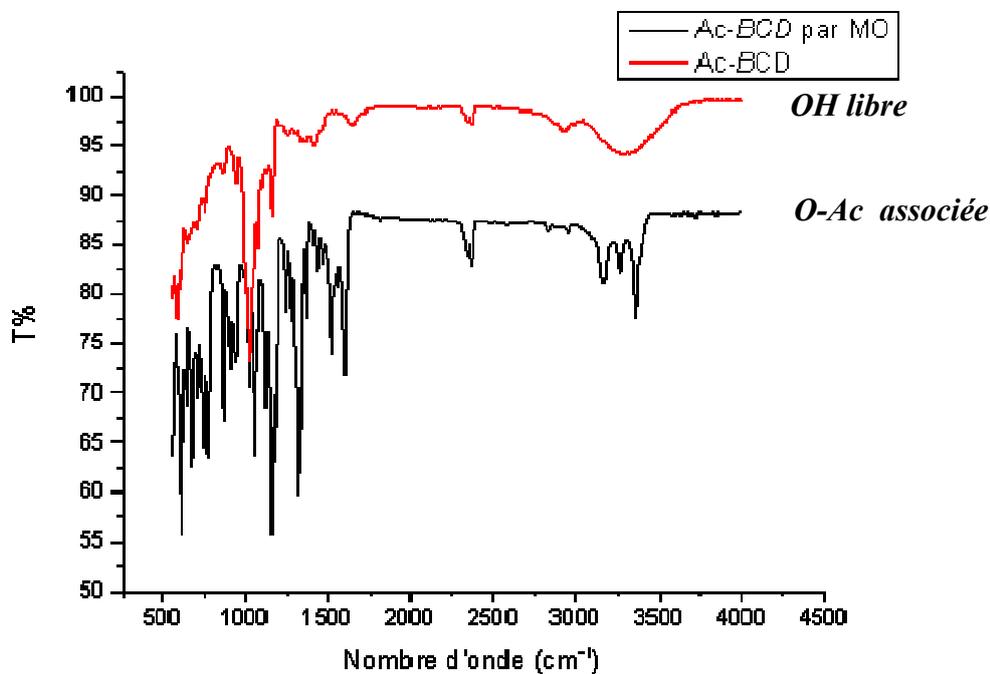


Fig. IV.20. Spectre IR du β -CD et Ac- β -CD obtenue par chauffage moderne (MO)

IR [Ac- β -CD (KBr, $\bar{\nu}$ cm^{-1})]: la zone des bandes larges qui varie entre 3300-3600 cm^{-1} et qui caractérise les trois groupements hydroxyle de chaque unité de glucopyranose est masquée ce qui prouve l'acétylation des O-H, la bande d'absorption qui caractérise le -C-OH et qui précise l'existence des types d'alcool primaire et secondaire de β -CD apparaitre entre (1000-1350 cm^{-1}) et (1500 - 1800 cm^{-1}) respectivement dans le spectre de β -CD est disparu dans le spectre de Ac- β CD.

Nous observons l'apparition d'une nouvelle bande étroite et intense vers 1050 et 1170 cm^{-1} qui caractérise le groupement éther d'Ac. Donc nous pouvons dire que l'acétylation par MO a été réalisée.

IV.4.2. Méthode d'acétylation par chauffage classique (reflux)

Dans un ballon sec de 250mL et sous agitation magnétique, nous avons placé 10g de β -CD (8,81 mmol) solubilisé dans 4,16 mL d'anhydride acétique (4,50 g, 44,41 mmol, 5 $\acute{e}q.$) d'Anhydride acétique anhydre et 1,44g d'acétate de sodium anhydre (17,62mmol, 2 $\acute{e}q.$) à 0C°.

Le mélange réactionnel est chauffé à reflux (100°C) pendant cinq heures puis refroidit à température ambiante. Le traitement consiste à ajouter un volume de l'eau distillée à la réaction jusqu'à ce que le mélange devient clair. Après 15 minutes d'agitation, la phase organique est extraite plusieurs fois par CH₂Cl₂, séchée sur Na₂SO₄ et concentrée sous vide. Le produit recueilli est recristallisé dans l'éther pour conduire à un solide blanc avec un rendement de 70% (Figure IV.21).

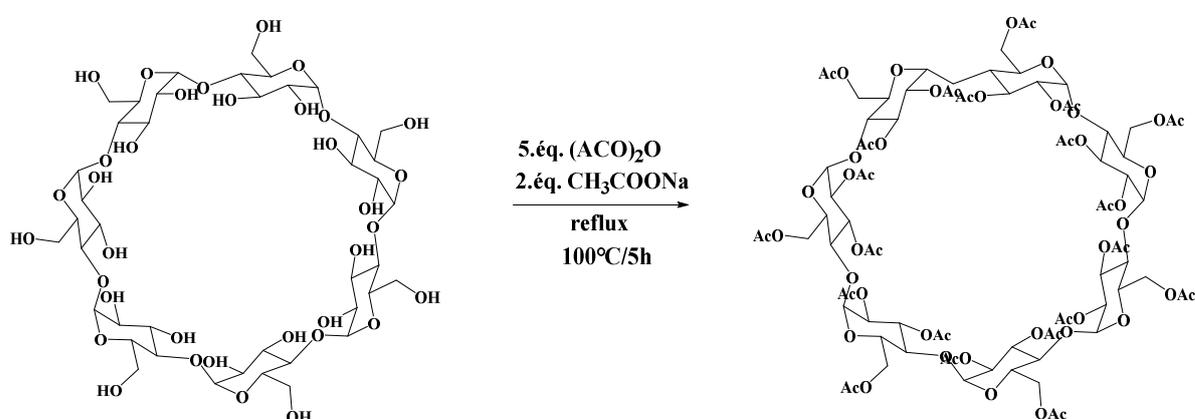


Fig. IV.21. Acétylation de la β -CD par Anhydride acétique via chauffage classique

IV.4.2.1. Identification d'Heptakis (2,3,6-tri-O-acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β -CD) obtenus via chauffage classique par IR

Les résultats obtenus sont montrés sur la figure (Fig. IV.22)

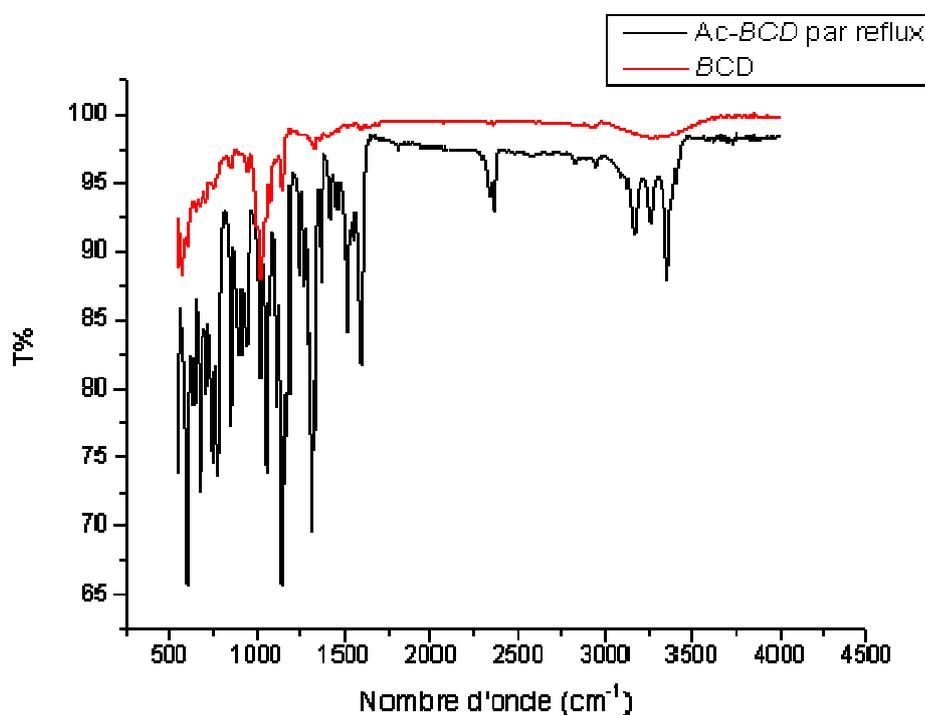


Fig. IV.22. Spectre IR de β -CD et Ac- β CD synthétisée par chauffage classique

IR [Ac- β -CD (KBr, $\bar{\nu}$ cm⁻¹): Nous observons presque les mêmes changements montrés sur la Figure. IV.20.

La figure. IV.23, rassemble les deux spectres de Ac- β -CD préparée par chauffage classique et/ou chauffage moderne, nous remarquons ici que les deux spectres sont presque identiques ce qui confirme l'acétylation de la β -CD par les deux méthodes.

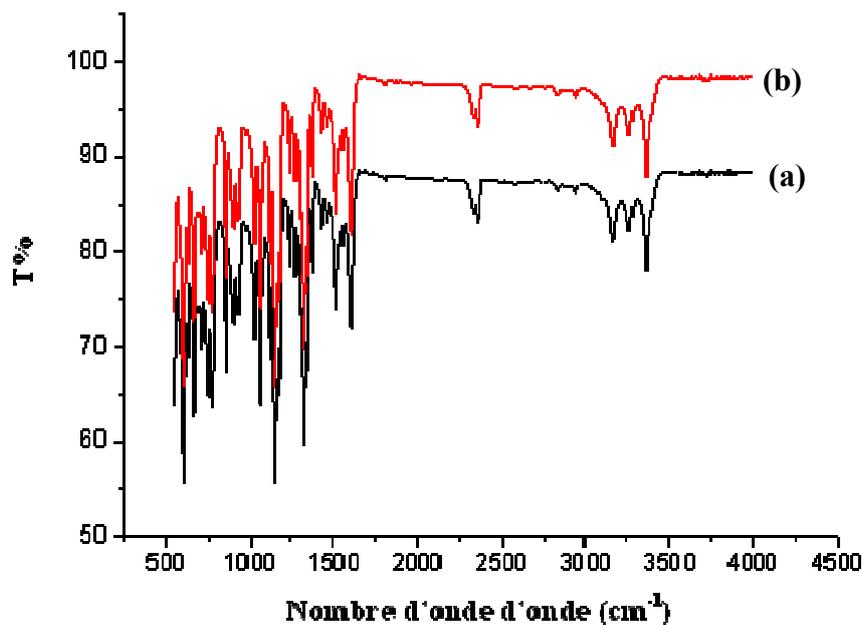


Fig. IV.23. Spectre IR d'Ac- β CD par chauffage moderne (a) et Ac- β CD chauffage classique (b)

IV.4.2.2. Caractérisation d'Heptakis (2,3,6-tri-O-acétyl)- β -Cyclodextrine (Ac- β -CD) par les RX

Une autre méthode pour la caractérisation de la Ac- β -CD a été réalisé c'est les RX

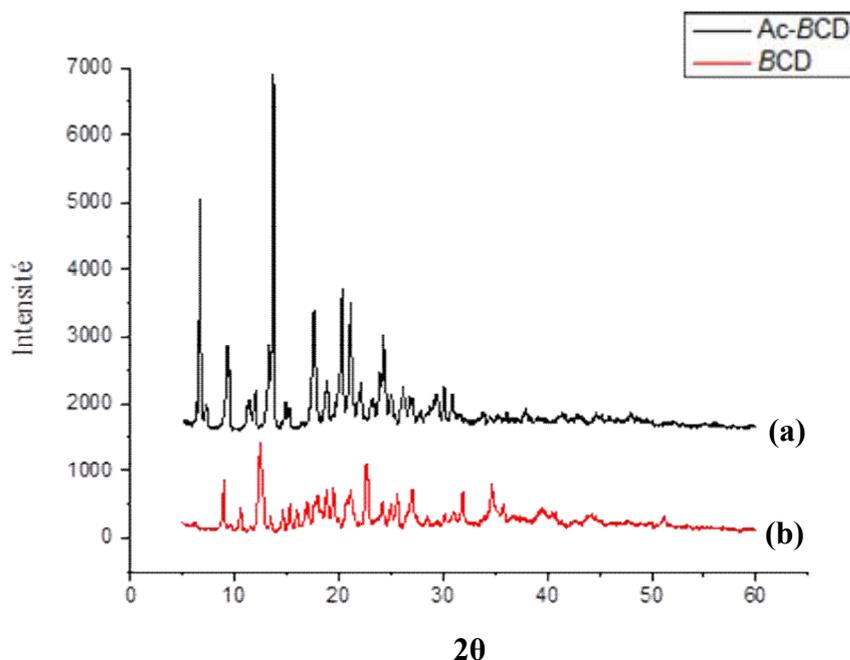


Fig IV.24. Diagrammes de diffraction des rayons X Ac- β CD (a) et β -CD (b)

Les résultats des analyses obtenus par les rayons X montre un profil semi cristallin pour la β -CD (b) et un profil cristalin pour Ac- β -CD (a) avec deux pic intense à de 5° et 15° . Le changement du réseau cristallin implique l'acétylation de la β -CD.

IV.5. Formation des complexes d'inclusion (HCTZ : Ac- β CD)

IV.5.1. Formation de complexe d'inclusion avec l'Ac- β CD par l'irradiation via micro-onde

Nous avons placé dans un creuset une quantité (0,2g) de substance actif (HCTZ) et (0,52g) d'Ac- β CD, nous avons ajouté une petite quantité d'eau et on a bien mélangé durant 2 minutes. Ensuite on a procédé à l'irradiation au four à microonde domestique de type LG à 350 Watt. Après 3 minutes d'irradiation, le contenu est devenu sèche, le produit brut est purifié par cristallisation dans le mélange de AcOEt : Ether de pétrole (v/v), puis analysé par l'IR et les RX. Le rendement atteint 95 %. Le complexe préparé est un complexe équimolaire de type [1 :1].

IV.5.2. Identification des complexes d'inclusion de (HCTZ : Ac- β CD) par IR

Pour confirmer la formation du complexe (HCTZ : Ac- β CD), nous avons caractérisé le produit obtenus par l'IR, les résultats obtenus sont montré sur la figure. IV.25

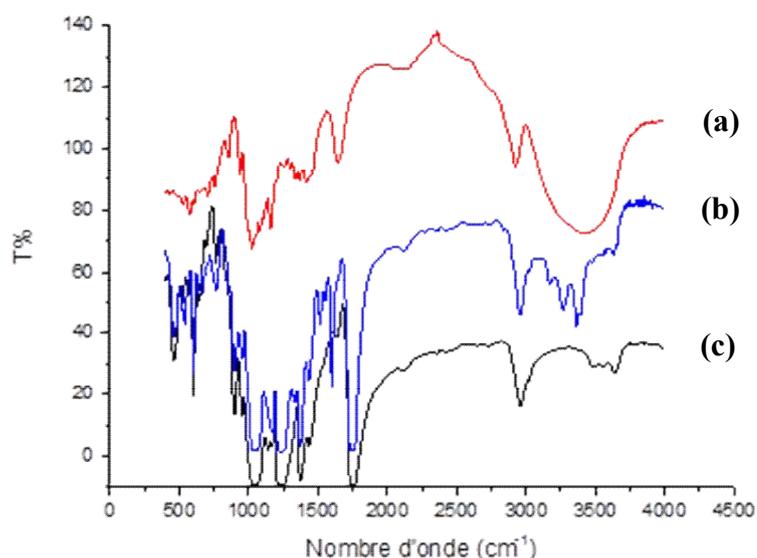


Fig. IV.25. Spectre IR du HCTZ (a), complexe (HCTZ : Ac- β CD) (b) et le Ac- β CD (c).

Le tableau. IV.8 résume les déplacements des bandes d'absorption de l'HCTZ (a) seule ou associé au complexe (HCTZ: Ac- β CD) (b) préparé par l'irradiation via micro-onde.

Tableau. IV.8. Comparaison et déplacement des bandes d'absorption IR de l'HCTZ libre ou associé au complexe (HCTZ : Ac- β CD) préparé par l'irradiation via micro-onde.

Groupes fonctionnels	Nombre d'onde (cm ⁻¹)		Décalage $\Delta \bar{\nu}$
	HCTZ libre	(HCTZ : Ac- β CD) [1 :1]	
(N-H)	3420	3395	-25
(N-H) amine 2 ^{ème} cyclique	1480	Disparition	/
(SO ₂ -NH ₂) (cycle hexane)	1200	1202	+2
(C-Cl) substruction du chlore	750	750	0
(C-H) Aromatique	2900	2990	+90
(C=C) Aromatique	1600	Disparition	0

D'après les spectres présentés dans la figure. IV. 25 et le décalage $\Delta \bar{\nu}$ présenté dans le tableau IV.8, nous constatons que la certaines bandes d'absorptions de l'HCTZ sont décalés dans le spectre du complexe et certaines d'entre elles sont disparus par rapport aux bandes de l'HCTZ libre, ce qui confirme la formation du complexe d'inclusion (HCTZ : Ac- β CD).

Le tableau. IV.9 rassemble les déplacements des bandes d'absorption de l'Ac- β CD (c) seule ou associée au complexe (HCTZ: Ac- β -CD) (b) préparé par l'irradiation via micro-onde.

Tableau. IV.9. Comparaison et déplacement des bandes d'absorption IR de l'Ac- β CD seule ou associée au complexe (HCTZ : Ac- β CD) préparé par l'irradiation via micro-onde.

Groupes fonctionnels	Nombre d'onde (cm ⁻¹)		Décalage $\Delta \bar{\nu}$
	Ac- β -CD libre	HCTZ : Ac- β -CD [1 :1]	
(C-H)	2900	2910	+10
(C=O) Gps (Ac)	1750	1730	-20
(C-O) Gps Ac	1010	1030	+20

D'après le tableau la bande relative à la vibration d'élongation symétrique de (C-O) du groupement Ac de la β -CD modifiée présente un déplacement d'environ $+20 \text{ cm}^{-1}$ vers les fréquences supérieures. Nous pouvons conclure qu'il y'avait une forte interaction intermoléculaire entre ce groupement et l'HCTZ. Donc les décalages enregistrés pour certaines bandes confirment les interactions entre l'HCTZ et l'Ac- β -CD.

L'analyse des spectres de l'IR de complexe d'inclusion (HCTZ : Ac- β CD) préparé par l'irradiation via micro-onde indique une encapsulation totale de l'HCTZ dans la cage de l'Ac- β CD. Les bandes relatives aux groupements fonctionnels de HCTZ sont quasi masquées par celles de l'Ac- β CD. Les décalages enregistrés pour certaines bandes confirment les interactions entre la molécule Ac- β CD et l'HCTZ. Des analyses supplémentaires par les RX sont nécessaires pour les confirmer.

IV.5.3. Identification du complexe d'inclusion de (HCTZ : Ac- β CD) par les RX

Les Diagrammes des RX de HCTZ, d'Ac- β CD et du complexe (HCTZ : Ac- β CD) sont montrés sur la figure. IV.26

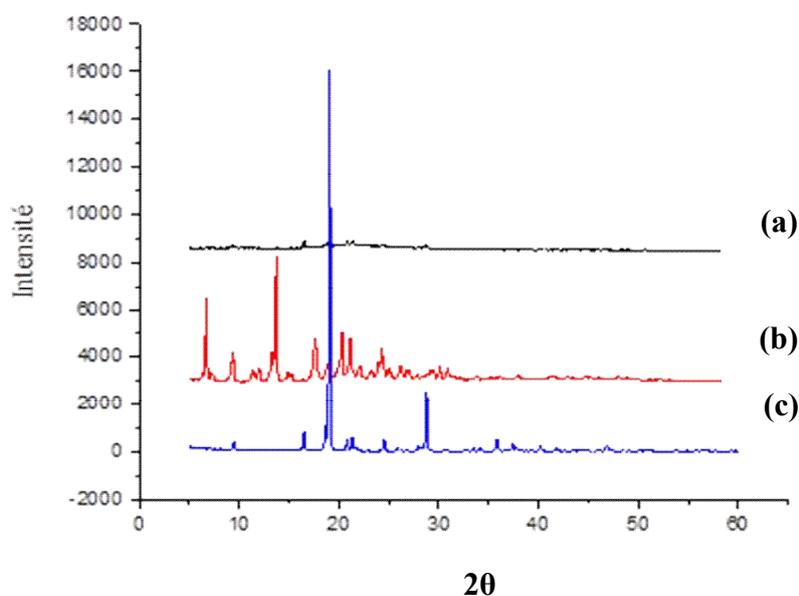


Fig.IV.26. Diagrammes de diffraction des rayons X du complexe (HCTZ : Ac- β -CD) (a), Ac- β -CD (b), et HCTZ (c)

Les résultats des analyses obtenus par les RX montre un profil amorphe pour le complexe d'inclusion (HCTZ : Ac- β CD) contrairement aux Ac- β CD et HCTZ qui ont montré un profil cristallin.

IV.6. Conclusion

Les RX et les analyses IR confirment l'acétylation de la β -CD par les deux méthodes. La disparition des bandes d'absorption caractéristiques de HCTZ et le décalage d'autres ont confirmé la formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD) par les trois méthodes proposées avec un bon rendement pour la méthode d'irradiation via micro-onde. Le suivi de la formation du complexe (HCTZ : β -CD) de stœchiométrie variée dans le tampon phosphate (pH=7.4) par RMN ^1H a montré que les protons H-3 et H-5 de la β -CD sont les plus déplacés comme dans le cas de Tramadol. Les résultats des analyses obtenus par les RX montrent que la β -CD et l'Ac- β CD ont changé la cristallographie de HCTZ d'un profil cristallin à un profil amorphe, nous pouvons attribuer ce changement à la formation des complexes d'inclusion (HCTZ : β -CD) et (HCTZ : Ac- β CD).

- [1] P. Sanphui, V.K. Devi, D. Clara, N. Malviya, S. Ganguly, G.R. Desiraju, Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Mol. Pharm.* 12 (2015) 1615 -1622.
- [2] T. Loftsson, Cyclodextrins and the biopharmaceutics classification system of Drugs. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 44 (2002) 63-67
- [3] M. Veiga, F. Ahsan, Solubility study of tolbutamide in monocomponent and dicomponent solutions of water, *Int. J. Pharm.* 160 (1998) 43-49.
- [4] F. Alvarez-Núñez, S. Yalkowsky, Relationship between Polysorbate 80 solubilization descriptors and octanol –water partition coefficients of drugs, *Int. J. Pharm.* 200 (2000) 217-222.
- [5] N. Ni, T. Sanghvi, S.H. Yalkowsky, Solubilization and preformulation of carbendazim, *Int. J. Pharm.* 244 (2002) 99 -104.
- [6] A. Mohammad, E. Altamimi, M. A.Elzayat, A. Alhowyan, S. Alshehri, F.Shakeel, Effect of β -cyclodextrin and different surfactants on solubility, stability, and permeability of hydrochlorothiazide. *Journal of Molecular Liquids.* 250 (2018) 323-328.
- [7] M.A. Silva Pires, R.Santos et R. Sinisterra, Pharmaceutical Composition of Hydrochlorothiazide: β -Cyclo-dextrin: Preparation by Three Different Methods, Physico-Chemical Characterization and In Vivo Diuretic Activity Evaluation. *Molecules.* 16 (2011) 4482-4499.
- [8] W. L. Chiou, et S. Riegelman, Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J.Pharm. Sci.* 60 (9) (1971) 1281-1302.
- [9] C. Leuninger, et J. Dressman, Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (1) (2000) 47-60.
- [10] S. Sethia, Solid dispersions-revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 20 (2) (2003) 215-247.
- [11] T. Vasconcelos, B. Sarmento, P. Costa, Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today.* 12 (24) (2007) 1068-1075.
- [12] D.Zappe, C.C.Papst, P. Ferber, Randomized study to compare valsartan \pm HCTZ versus amlodipine \pm HCTZ strategies to maximize blood pressure control. *Vas. Health Risk Manag.* 5 (2009) 883-892.
- [13] N. Ladak, J. Thompson, Drugs acting on the heart: Antihypertensive drugs. *Anaesth. Intensive Care Med.* 10 (2009) 392-395.

- [14] C.E. Jensen, R.A.S. Santos, A.M.L. Denadai, C.F.F. Santos, A.N.G.Braga, D.S. Sinisterra, Pharmaceutical composition of valsartan:β-cyclodextrin: Physico-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. *Molecules*. 15 (2010) 4067-4084.
- [15] A.Mahmud, J. Feely, Low-dose quadruple antihypertensive combination more efficacious than individual agents - a preliminary report. *Hypertension*. 49 (2007) 272-275.
- [16] Hydrochlorothiazide, The American Society of Health-System Pharmacists. The American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved (2016).
- [17] B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, A. Rosén, Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin Pharmacol Ther*. 19(5) (1976) 531-537.
- [18] A.C. Moffatt, M.D. Osselton, B. Widdop, J. Watts, Clarke's Analysis of drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, third edition. *Journal of Analytical Toxicology*. 36 (2012) 357- 358.
- [19] V.M. Musini, M. Nazer, K. Bassett, J.M. Wright, Blood pressure-lowering efficacy of monotherapy with thiazide diuretics for primary hypertension, *Cochrane Database Syst. Rev*. 29 (2014). DOI: 10.1002/14651858. CD003824.
- [20] L.H Opie, B.J Gersh. Diuretics. In: L.H Opie, B.J Gersh, eds. *Drugs for the heart*. 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders, (2001) 84-106.
- [21] B. Perly, F. Djedaïni-Pilard,.. Nuclear magnetic resonance of cyclodextrins, derivatives and inclusion complexes. In New trends in cyclodextrins (Duchêne, D., ed.). *Edition de santé, Paris* (1991) 215-246.
- [22] Y.Bakkour. Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées, Thèse de Doctorat en Chimie, Université des Sciences et Technologies de Lille 1 (2005).

Chapitre. V

Etude de la solubilité de HCTZ

V.I. Introduction

Les propriétés de complexation des cyclomalto-oligosaccharides possédant des structures cage biocompatibles issues des biotechnologies, ont été mises à profit dans les trente dernières années pour solubiliser, stabiliser et augmenter la biodisponibilité d'actifs thérapeutiques [1].

Le pouvoir complexant des cyclodextrines et leur capacité à solubiliser les composés inclus rendent l'utilisation de ces substances très intéressante dans de nombreux domaines. L'analyse de la phase de solubilité est parmi les exigences préliminaires pour l'optimisation du développement des complexes d'inclusion des médicaments qui peut être utilisés pour l'évaluation de l'affinité entre la CD et le médicament dans l'eau. Quoique les CDs sont connus pour générer des agrégats (auto-associés) dans des solvants aqueux; la méthode est largement utilisée pour la détermination des rapports molaires de la complexation des médicaments avec les CDs (médicament-CD) [2,3].

Malgré leur structure chimique semblable, le degré de solubilisation varie d'une cyclodextrine à l'autre. La β -CD plus rigide comporte la solubilité la plus faible (1.85 g/100 mL). Ce phénomène s'explique par la formation de liaisons hydrogène intramoléculaire entre les groupes hydroxyles secondaires qui diminue la capacité des β -CD à former des liaisons hydrogènes avec le milieu qui les entoure.

Donc l'hydrosolubilité plus ou moins importante des β -CDs pose problèmes lorsqu'elles doivent être utilisées en milieu aqueux, il serait intéressant de comparer leurs effets avec les cyclodextrines modifiées et en particulier (HP- β CD) et avec un polymère proposé (PEG) en utilisant le HCTZ qui est un antihypertenseur possédant une solubilité limitée dans l'eau, comme invité. Les études de phase de la solubilité ont été effectuées selon la Méthode décrite par Higuchi et Connors [4].

V. 2.Vérification de la loi de Béer-Lambert

V. 2.1.Vérification de la loi de Béer-Lambert et calcul de coefficient d'absorption moléculaire (ϵ)

V. 2.1.1. Préparation des solutions

Nous avons préparé trois solutions de HCTZ (0.0005 mol/L, 0.001 mol/L et 0.002 mol/L), les solutions préparées ont été filtrées et balayées sur un spectrophotomètre UV-visible dans la gamme entre 250-400 nm avec un système de traitement des données.

Les spectres obtenus sont regroupés dans la figure.V.1.

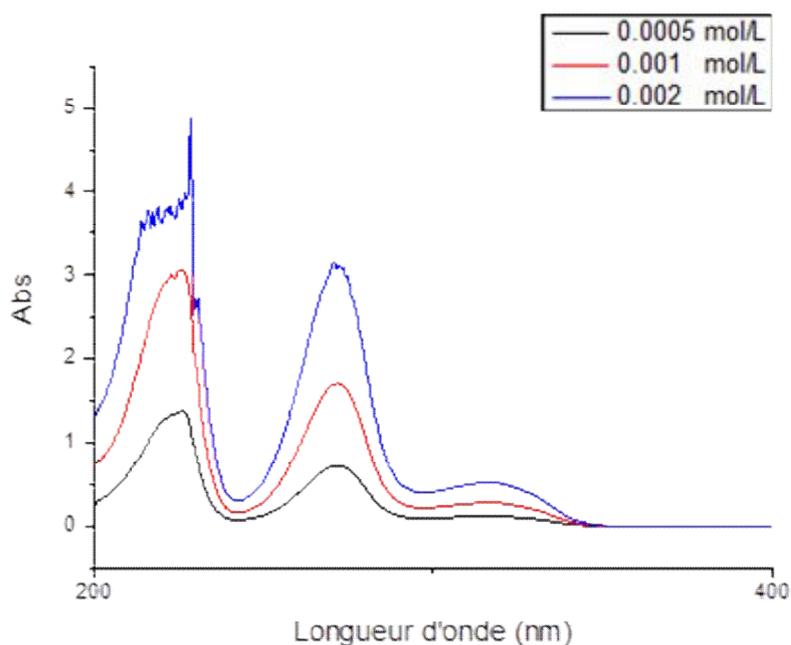


Fig. V.1. Spectre UV du HCTZ à différentes concentrations

Nous remarquons que l'absorption augmente en fonction de la concentration de HCTZ. Pour calculer le coefficient d'absorption moléculaire (ϵ) et vérifier la loi de Beer Lambert nous avons tracé l'absorbance en fonction de la concentration de HCTZ, ensuite nous avons tracé la courbe de tendance, voir (Fig. V.2 et Fig.V.3).

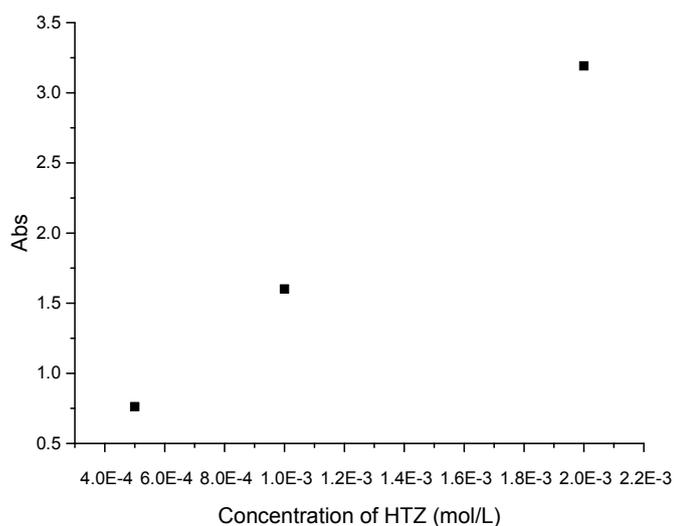


Fig. V.2. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration du HCTZ

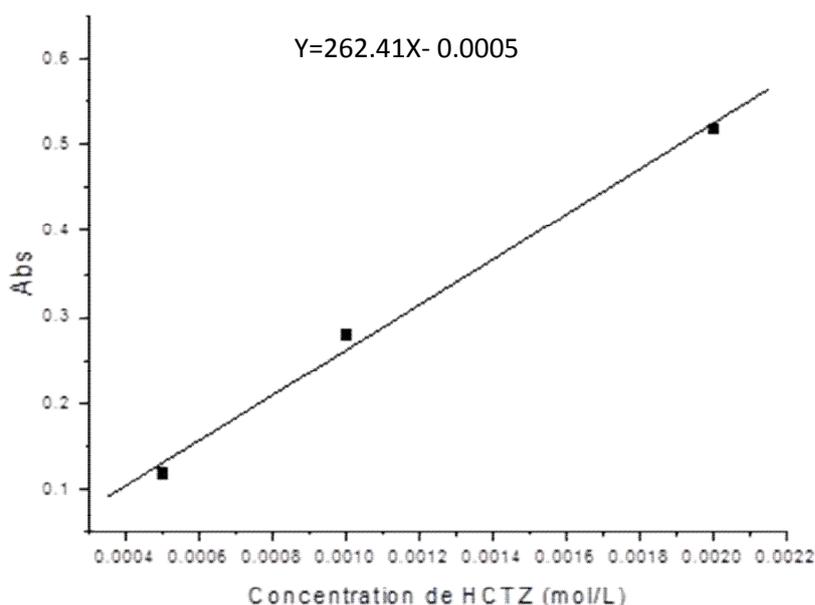


Fig.V.3. Courbe de tendance du spectre de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du HCTZ

V. 2.1.2. Calcul de coefficient d'absorption moléculaire (ϵ)

D'après la figure V.3, la valeur de $\epsilon \cdot l = 262.41 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (on va l'utiliser dans les calculs des concentrations du HCTZ solubilisé dans les complexes).

V.3. Etude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de différents agents complexant

La mise en évidence de l'association des différents agents complexant tel que β -CD et HP- β CD et PEG (1000 et 3500) avec l'HCTZ se fait essentiellement par l'observation de la dissolution progressive du HCTZ en solution aqueuse de ces agents.

V. 3.1. Préparation des solutions

Une quantité de HCTZ est dissoute dans des flacons fermés, contenant une solution aqueuse de β -CD, HP- β -CD, PEG1000 et/ou PEG3500 afin d'obtenir les solutions [HCTZ : β -CD], [HCTZ : HP- β CD], [HCTZ : PEG1000] et/ou [HCTZ : PEG3500] à différentes rapports molaires (1,0), (1 :1), (1 :2), (1 :3) et (1 :4). Les mélanges ont été bien agités pendant 48 heures à température ambiante, jusqu'à l'équilibrage des mélanges.

Après la filtration des échantillons, nous avons préparé des solutions diluées, afin de les analysées par le spectrophotomètre UV.

V. 3.2 Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de β -CD

Le tableau. V.1 résume (λ_{\max}), l'absorbance et la concentration de HCTZ solubilisé en présence de β -CD. La figure. V.4 montre la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde dans une solution aqueuse de β -CD à différentes concentrations.

Tableau. V.1. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de β -CD

(HCTZ: β -CD)	[Complexe] (mol/L)	Abs	λ_{\max}	[HCTZ solubilisé] (mol/L)
[1 : 0]	(0.01/0.00)	0.088	270	0.00033
[1 : 1]	(0.01/0.01)	0.12	270.30	0.00045
[1 : 2]	(0.01/0.02)	0.31	270.49	0.0012
[1 : 3]	(0.01/0.03)	0.53	270.86	0.0020
[1 : 4]	(0.01/0.04)	0.91	271.25	0.0035

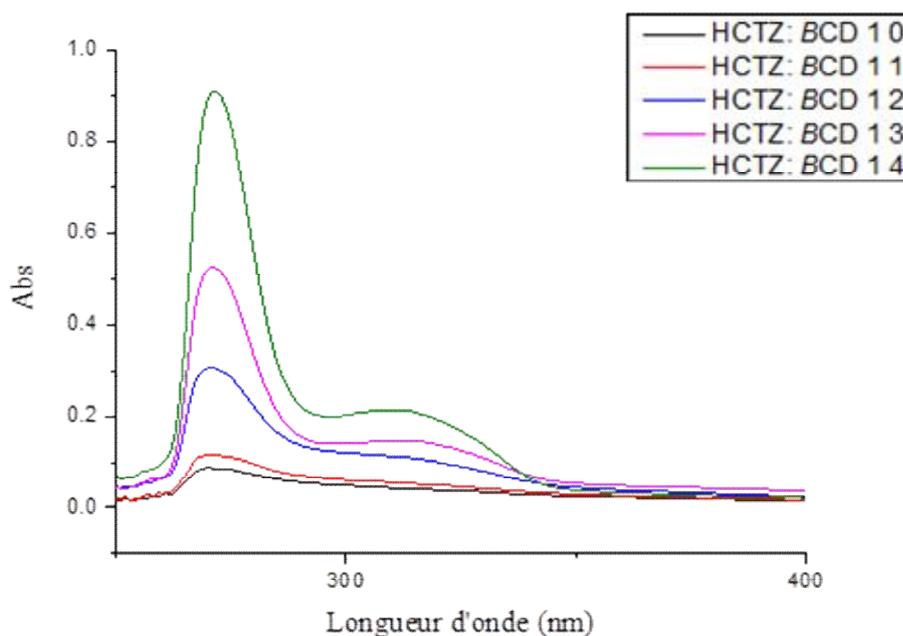


Fig. V.4. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à différentes concentration

De l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration de β -CD, à pH= 6.8 (pH de l'eau pure) représentée sur la figure. V.4, pour des mélanges aqueux ayant une concentration maintenue constante de HCTZ, nous observons que l'intensité de la bande positionnée à 275 nm dépend de la concentration de β -CD. Ce comportement révèle que la formation du complexe (HCTZ: β -CD) a bien eu lieu, vu que la concentration de l'HCTZ est maintenue constante et que la β -CD n'absorbe pas dans ce domaine spectral.

Ces observations permettent également de déduire que l'intensité spectrale reflète indirectement la proportion de HCTZ qui est concerné par l'inclusion. Pour vérifier la variation de l'absorbance, nous avons tracé cette dernière en fonction de la concentration de β -CD.

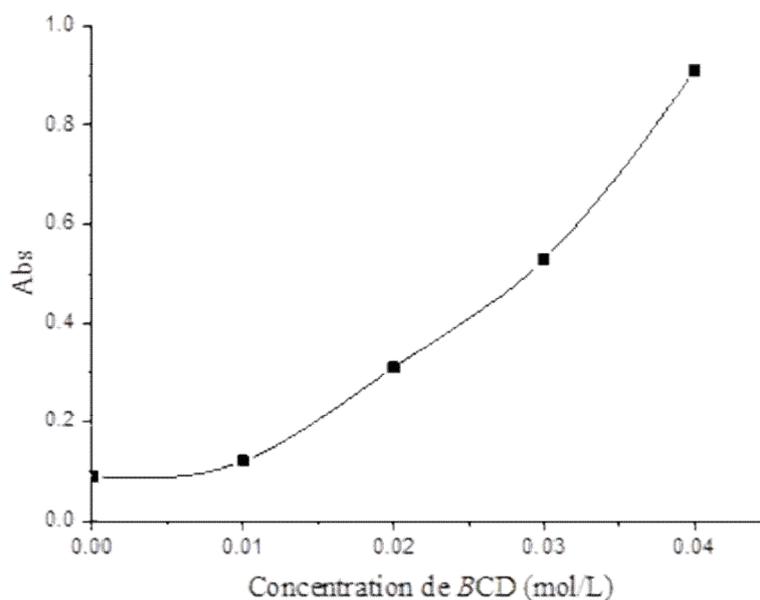


Fig.V.5. Spectre d'Absorbance en fonction de la concentration de β -CD

Nous avons remarqué une augmentation de l'absorbance en fonction de l'augmentation de la concentration de la β -CD (Fig. V.5). Basant sur ces résultats on a tracé la courbe de solubilité de HCTZ en fonction de la concentration de β -CD (Fig. V.6).

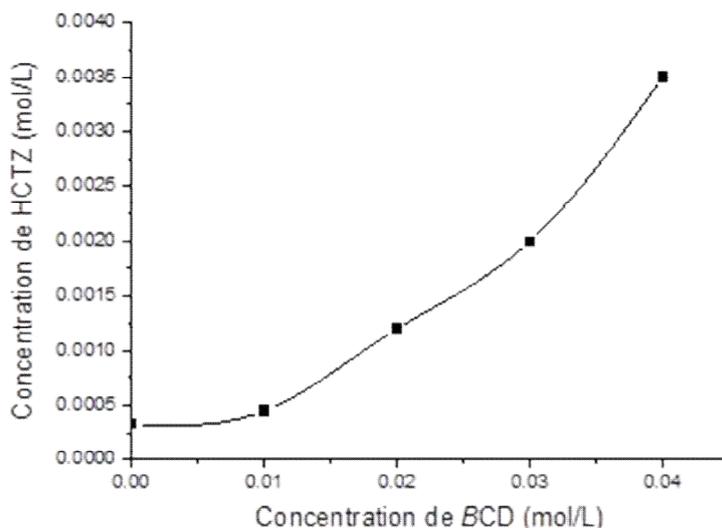


Fig. V.6. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à température ambiante (25°C)

⊖ **Rapport de solubilité:** $R = C_{\text{Max}}/C_{\text{Min}}$, $R_{\beta\text{-CD}} = 10,60$

La courbe de la phase de solubilité de HCTZ a montré une augmentation de la solubilité de HCTZ en présence de β -CD dans l'eau par un rapport de 10.60.

V. 3.2.1. Calcul de la constante de stabilité du complexe (HCTZ : β -CD)

A partir de la pente la courbe de tendance du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à température ambiante (Fig. V.7), nous avons pu calculer la constante de stabilité K.

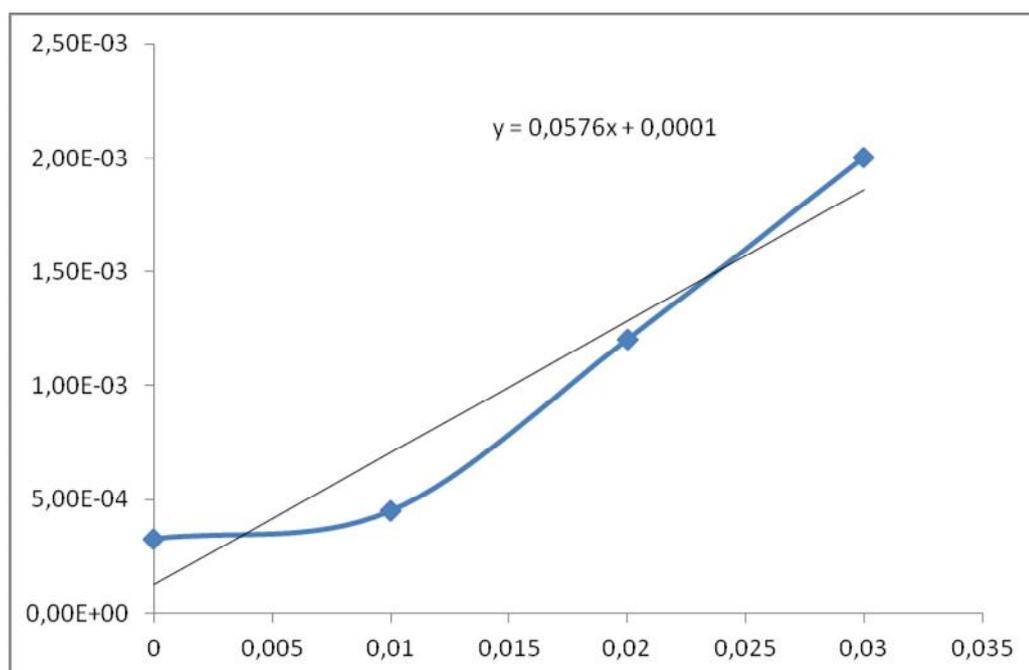


Fig. V.7. Courbe de tendance du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD à température ambiante.

$$K_s = \frac{\text{Pente}}{S_0(1-\text{pente})} \quad [5] \quad (1)$$

$S_0 = 0.0001 \text{ mol/L}$, Pente = 0.0576.

$$K_s = 611.205 \text{ M}^{-1}$$

La courbe de la phase de solubilité (Fig. V.6) a montré une courbe de solubilité de type A_P pour les β -CD, indiquant une déviation positive de la linéarité de l'isotherme ; c'est-à-dire que la β -CD est proportionnellement plus effective à haute concentration. Ce qui indique la formation de complexe d'inclusion de HCTZ en rapport de stœchiométrie [1:1] avec β -CD [5]. La constante de stabilité (K_s) pour le complexe (HCTZ: β -CD) à température ambiante, en supposant une stœchiométrie [1:1], calculée à partir de la courbe de tendance de la courbe de solubilité est 611.20 M^{-1} , ce qui indique la formation du complexe stable, puisque K_s dans la gamme de $200\text{-}5000 \text{ M}^{-1}$ indique une bonne capacité de complexation. Cela suggère aussi qu'il y'a une augmentation dans le profil de dissolution qui serait certainement augmenter la biodisponibilité du HCTZ.

V. 3.3. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de HP- β CD

Le tableau.V.2 résume (λ_{\max}), l'absorbance et la concentration de HCTZ solubilisé en présence de HP- β CD, la figure V.8, montre la variation de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans une solution aqueuse de HP- β CD à différentes concentration.

Tableau. V.2. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de HP- β CD

(HCTZ:HP- β CD)	[complexe](mol/L)	Abs	λ_{\max}	[HCTZ solubilisé](mol/L)
[1 :0]	(0.01/0.00)	0.088	270	0.00033
[1 :1]	(0.01/0.01)	1.804	281	0.0068
[1 :2]	(0.01/0.02)	2.515	276	0.0095
[1 :3]	(0.01/0.03)	2.566	276	0.0097
[1 :4]	(0.01/0.04)	3.020	273	0.0110

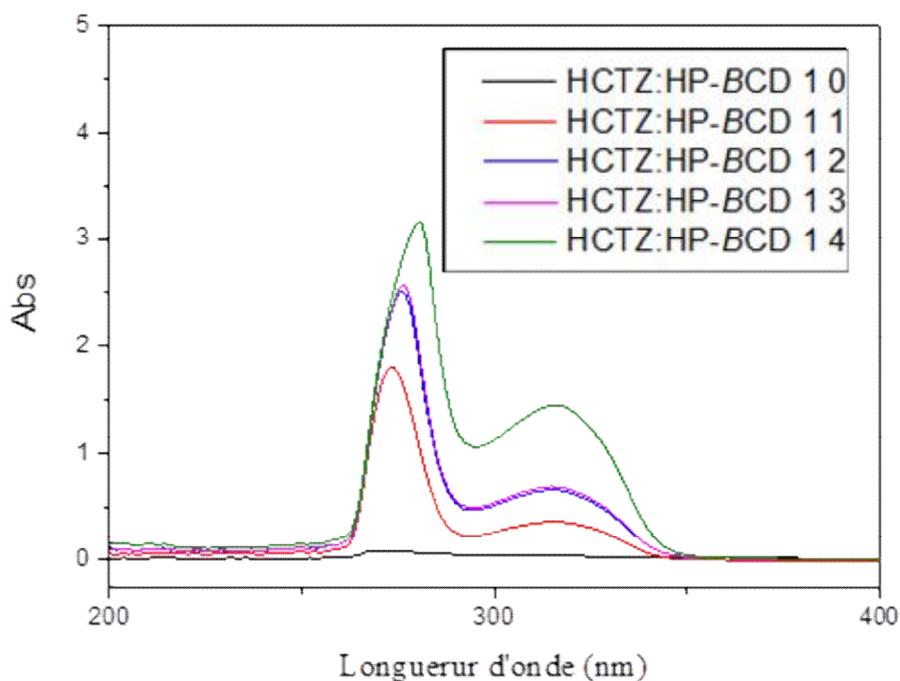


Fig.V.8. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de HP- β CD à différentes concentrations.

Nous avons remarqué l'augmentation de l'absorbance de HCTZ avec l'augmentation de la concentration de HP- β CD dans l'eau. Pour vérifier la variation de l'absorbance nous avons tracé cette dernière en fonction de la concentration de HP- β CD

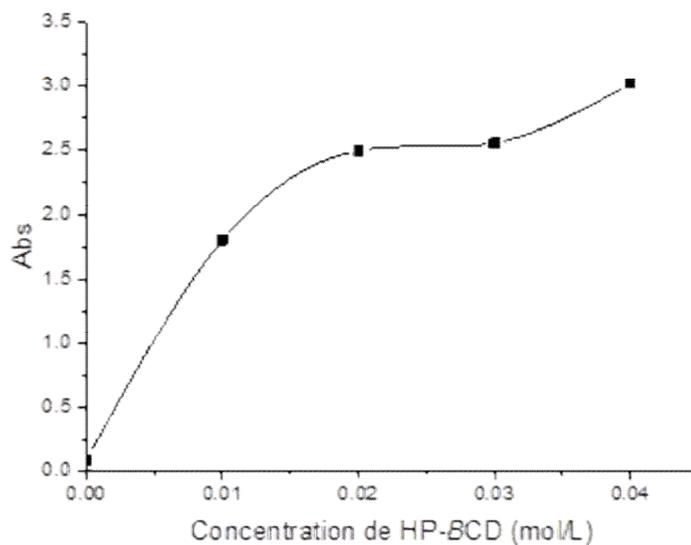


Fig.V.9. Absorbance en fonction de la concentration de HP- β CD

D'après la figure V.9, nous avons remarqué une augmentation de l'absorbance en fonction de l'augmentation de la concentration de la HP- β CD. Basant sur ces résultats nous avons tracé la courbe de solubilité de HCTZ en fonction de la concentration de HP- β CD

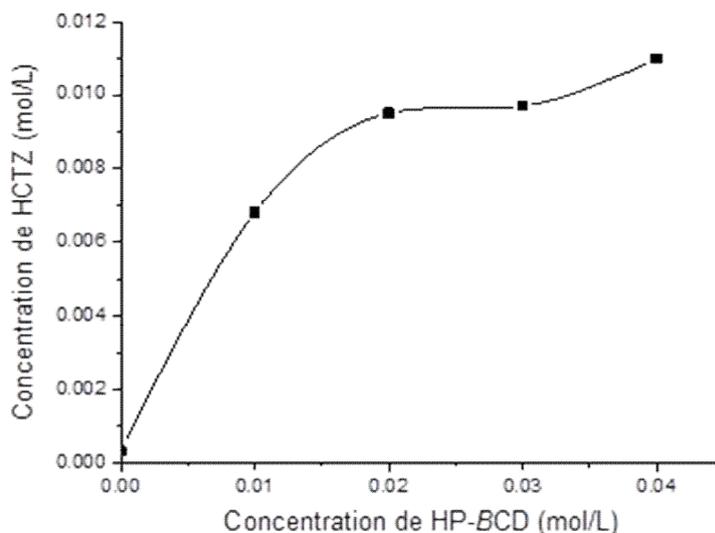


Fig.V.10. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP-βCD à température ambiante.

La courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP-βCD est de type A_N , indique une déviation négative par rapport à la linéarité, en d'autres termes, la HP-βCD est proportionnellement moins effective à haute concentration. Cependant, ce profil 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 HP-βCD entre elles à des hautes concentrations [5].

Le rapport de solubilité est $R_{HP-βCD} = 37$ donc la HP-βCD a augmenté la solubilité de HCTZ trente-sept fois.

V.3.3.1. Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : HP-βCD)

A partir de la courbe de tendance du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP-βCD à température ambiante (Fig. V.11), nous avons pu calculer la constante de stabilité K_s .

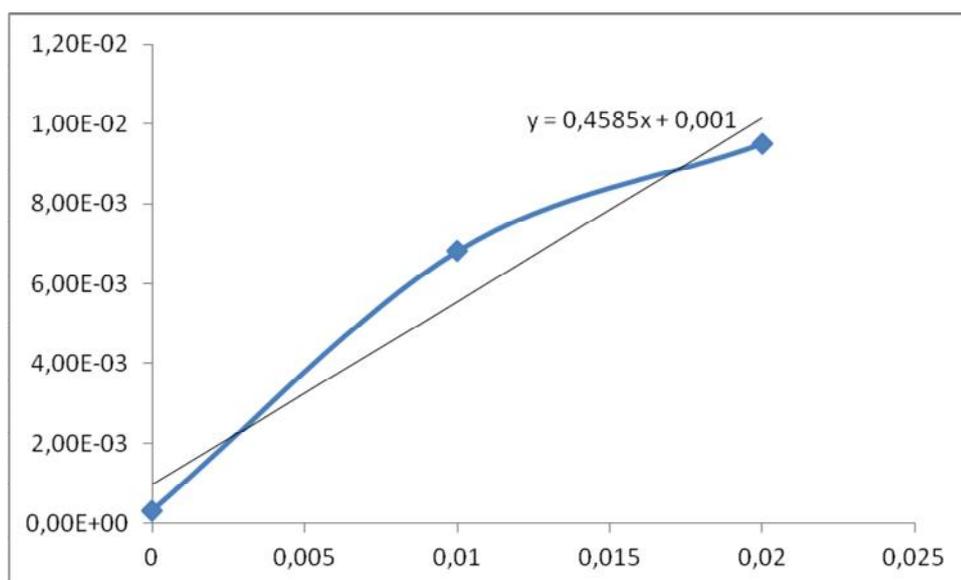


Fig. V.11. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de HP- β CD à température ambiante.

La constante de stabilité (K_s) pour les complexes à température ambiante, en supposant une stœchiométrie [1:1], calculée à partir de la pente de la partie préliminaire de la courbe de solubilité est $846,72 \text{ M}^{-1}$ pour HCTZ: HP- β CD ce qui indique la formation d'un complexe stable. Cela suggère aussi comme le cas de β -CD, qu'il y'a une augmentation dans le profil de dissolution qui serait certainement augmenter la biodisponibilité du HCTZ.

V.3.4 Calcul de l'énergie libre de transfert (ΔG°) pour le procédé de solubilisation de HCTZ dans des solutions aqueuses de β -CD et/ou de HP- β CD

L'énergie libre de transfert (ΔG°) de HCTZ dans l'eau pure à des solutions aqueuses de β -CD et de HP- β CD a été calculée en utilisant les valeurs de la courbe de solubilité (Fig. V.6 et Fig. V.10) respectivement et l'application de l'équation ci-dessous, où, S_s / S_0 = le rapport de solubilité molaire de HTZ dans une solution aqueuse de β -CD et/ou HP- β CD à celle de l'eau pure. [6] Les valeurs obtenues de ΔG° sont présentés dans le tableau. V.3

$$\Delta G^\circ = -2.303RT \log \left(\frac{S_s}{S_0} \right) [6] \quad (2)$$

Tableau. V.3. Energie libre de Gibbs (ΔG°) pour le processus de solubilisation de HCTZ dans une solution aqueuse de β -CD et/ou HP- β CD à 25°C.

Concentration de β -CD et/ou HP- β CD (mol/L)	(ΔG°) (kJ/mol) à 25°C	
	HP- β CD	β -CD
0.01	-4.753	-3.729
0.02	-5.582	-6.162
0.03	-5.634	-7.428
0.04	-5.946	-8.816

Dans cette étude, les valeurs de ΔG° sont tous négatifs pour β -CD et HP- β CD à diverses concentrations, ce qui suggère la nature spontanée de la solubilisation de HCTZ.

V.3.5. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de PEG1000

Le tableau V.4 résume (λ_{\max}), l'absorbance et la concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG1000, la figure V.12 montre la variation de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans une solution aqueuse de PEG1000 à différentes concentrations.

Tableau. V.4. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG 1000

[HCTZ:PEG 1000] [complexe] (mol/L)	Abs	λ_{\max}	[HCTZ solubilisé](mol/L)
[1 :0]	0.088	270.00	0.0003
[1 :1]	0.810	319.32	0.0031
[1 :2]	0.910	318.80	0.0035
[1 :3]	1.104	318.50	0.0042
[1 :4]	1.380	318.50	0.0052

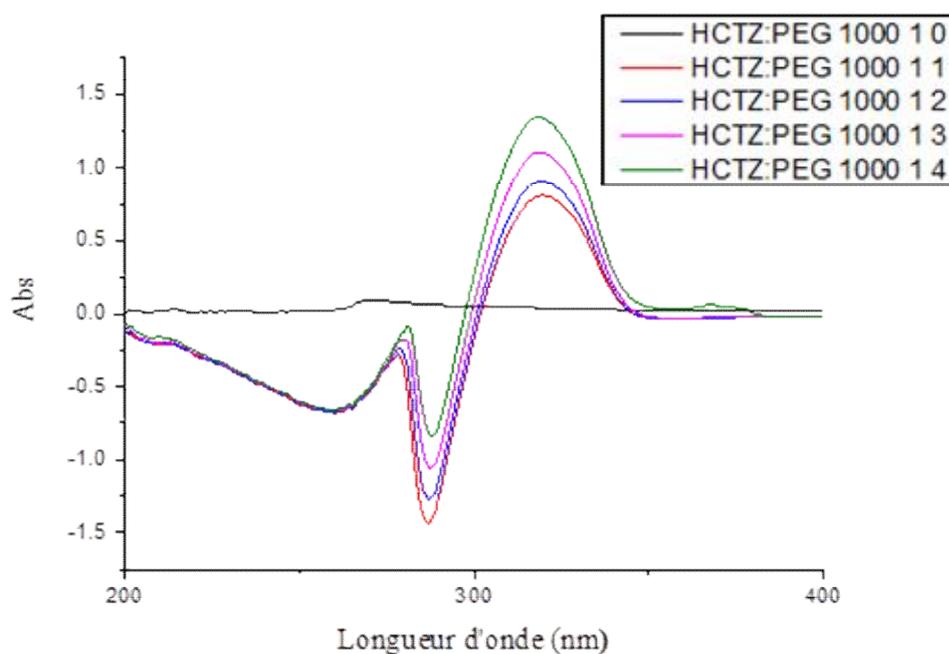


Fig. V.12. Spectre UV de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG1000 à différentes concentration

Nous avons remarqué l'augmentation de l'absorbance de HCTZ avec l'augmentation de la concentration de PEG1000 dans l'eau. Pour vérifier la variation de l'absorbance nous avons tracé cette dernière en fonction de la concentration de PEG1000.

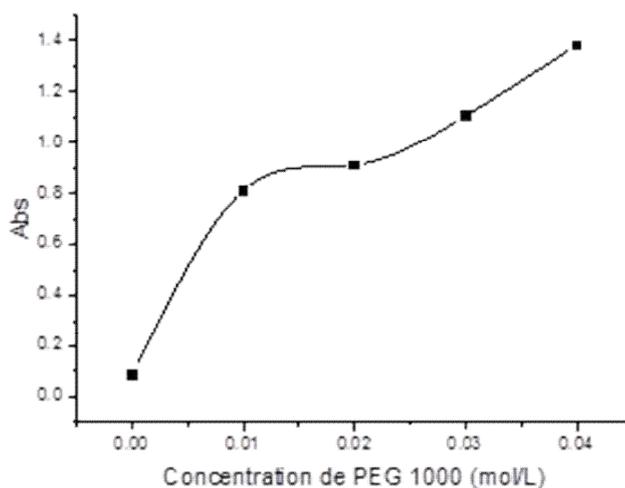


Fig. V.13. Absorbance en fonction de la concentration de PEG 1000

Nous avons remarqué une augmentation de l'absorbance en fonction de l'augmentation de la concentration de PEG 1000. Basant sur ces résultats nous avons tracé la courbe de solubilité de HCTZ en fonction de la concentration de PEG 1000.

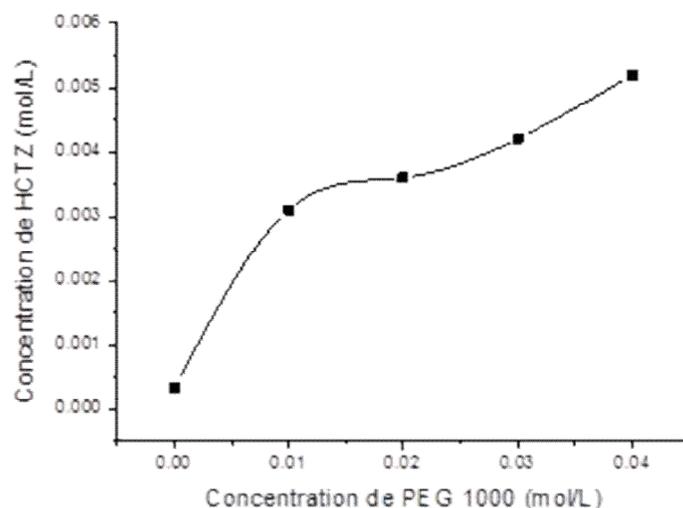


Fig. V.14. Phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG1000 à température ambiante.

La courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 est de type A_N indiquant une déviation négative par rapport à la linéarité comme dans le cas de HP-BCD.

$R_{PEG1000} = 15,75$; donc le PEG 1000 a augmenté la solubilité de HCTZ 16 fois.

V. 3.5.1. Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : PEG 1000)

A partir de la pente de la courbe de tendance de la partie préliminaire du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 à température ambiante (Fig. V.15), nous avons pu calculer la constante de stabilité K_s .

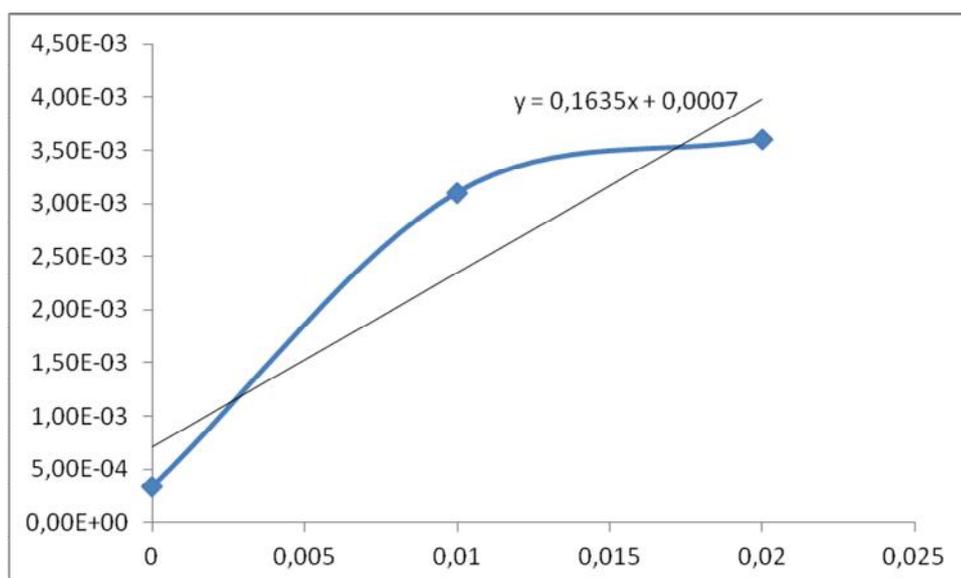


Fig. V.15. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 à température ambiante.

La constante de stabilité (K_s) pour le complexe à température ambiante, en supposant une stœchiométrie 1:1, calculée à partir de la pente de la partie préliminaire de la courbe de solubilité est 279.22 M^{-1} pour (HCTZ: PEG 1000) ce qui indique la formation d'un complexe stable, cela suggère aussi comme le cas de β -CD et HP- β CD, qu'il y'a une augmentation dans le profil de dissolution qui serait certainement augmenter la biodisponibilité du HCTZ.

V. 3.6. Étude la phase de la solubilité de HCTZ en présence de PEG 3500

Le tableau.V.5, résume (λ_{\max}), l'absorbance et la concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG3500, la figure V.16 montre la variation de l'absorbance en fonction de la concentration de PEG 3500 à différentes concentration.

Tableau. V.5. Concentration de HCTZ solubilisé en présence de PEG3500

[HCTZ : PEG3500]	[complexe] (mol/L)	Abs	λ_{\max}	[HCTZ solubilisé] (mol/L)
[1 :0]	[0.01/0.00]	0.088	270.00	0.00033
[1 :1]	[0.01/0.01]	0.58	315.38	0.00221
[1 :2]	[0.01/0.02]	0.78	315.62	0.00297
[1 :3]	[0.01/0.03]	0.87	315.62	0.00331
[1 :4]	[0.01/0.04]	0.96	315.62	0.00365

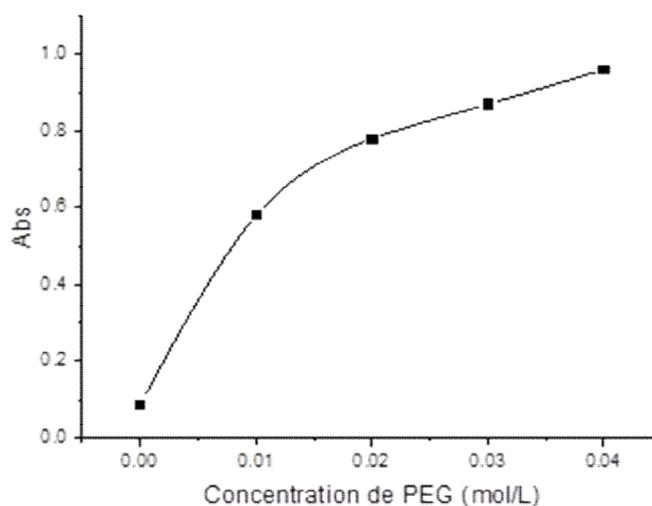


Fig. V.16. Absorbance en fonction de la concentration de PEG3500

Nous remarquons l'augmentation de l'absorbance de HCTZ avec l'augmentation de la concentration de PEG3500 dans l'eau.

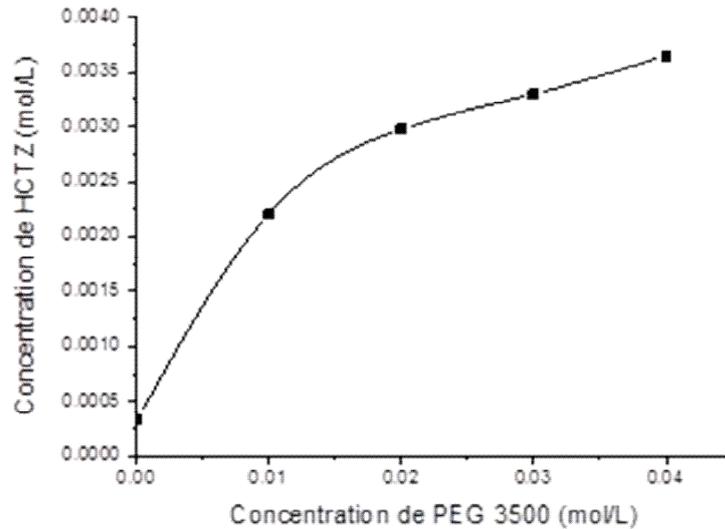


Fig.V.17. Spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG3500 à température ambiante.

La courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 3500 est de type A_N indique une déviation négative par rapport à la linéarité comme HP-BCD et PEG 1000.

$R_{PEG3500}=11.06$ donc le PEG 3500 a augmenté la solubilité de HCTZ 16 fois.

V.3.6.1.Calcul de la constante de stabilité de (HCTZ : PEG 3500)

A partir de la courbe de tendance de la partie droite du spectre de la phase de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 3500 à température ambiante (Fig. V.18), nous avons pu calculer la constante de stabilité K_s .

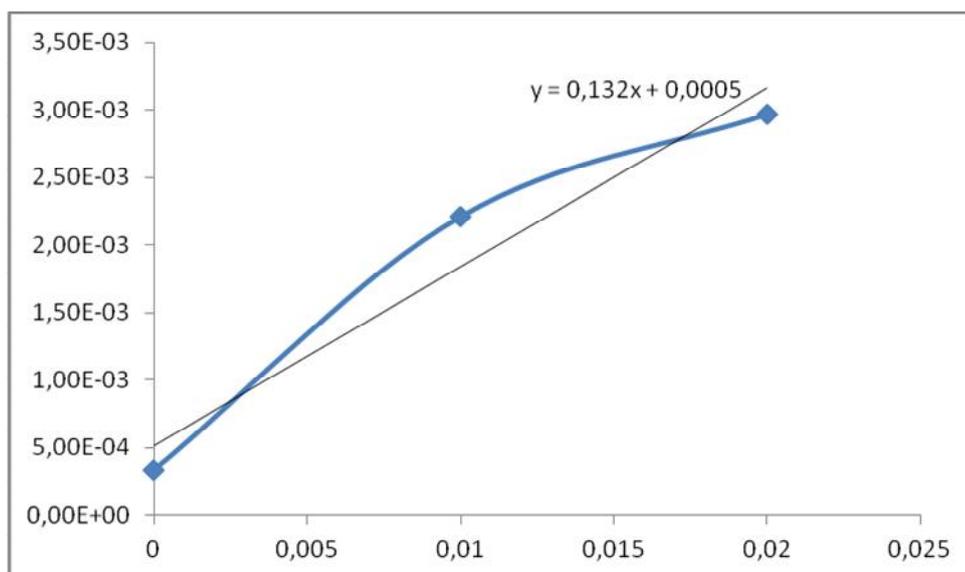


Fig. V.18. Courbe de tendance de la partie préliminaire de la courbe de solubilité de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 3500 à température ambiante.

La constante de stabilité (K_s) pour le complexe à température ambiante, en supposant une stœchiométrie 1:1, calculée à partir de la pente de la partie préliminaire de la courbe de solubilité est 304.14 M^{-1} pour HCTZ: PEG 3500 ce qui indique la formation d'un complexe stable, Cela suggère aussi comme le cas de β -CD, HP- β CD et PEG 1000, qu'il y'a une augmentation dans le profil de dissolution qui serait certainement augmenter la biodisponibilité du HCTZ.

V.3.7. Calcul de l'énergie libre de transfert (ΔG°) pour le procédé de solubilisation de HCTZ dans des solutions aqueuses de PEG 1000 et de PEG 3500

Tableau. V.6. Energie libre de Gibbs (ΔG°) pour le processus de solubilisation de HCTZ dans une solution aqueuse de PEG 1000 et/ou PEG 3500 à 25°C.

Concentration de PEG 1000 et/ou PEG 3500 (mol/L)	(ΔG°) (kJ/mol) à 25°C	
	PEG 1000	PEG 3500
0.01	-3.690	-3.685
0.02	-3.991	-4.418
0.03	-4.443	-4.687
0.04	-4.972	-4.929

Comme dans le cas de β -CD et HP- β CD, toutes les valeurs de ΔG° sont négatives pour diverses concentrations, ce qui suggère la nature spontanée de la solubilisation de HCTZ.

V.4.Comparaison entre les différentes substances de complexation (β -CD, HP- β CD, PEG1000, PEG3500)

Les résultats de l'étude comparative sont montrés dans le tableau V.7.

Tablea.V.7. Les rapports et les constantes de solubilités de chaque agent complexant

Agents complexant	Rapport de solubilité (R)	Constante de stabilité (M^{-1})
β -CD	10	611.20
HP- β CD	37	846.72
PEG 1000	16	279.22
PEG 3500	11	304.14

D'après le tableau. V.7, le rapport de solubilité montre que le HP- β CD a augmenté la solubilité de HCTZ environ de 37 fois, ensuite le PEG 1000 par 16 fois, tandis que le complexe le plus stable est à base de HP- β CD car il possède la plus grande constante de stabilité ($K_s=846.72 M^{-1}$) par rapport au complexe à base de β -CD et aux dispersions solides formés.

V.5.Conclusion

D'après les résultats obtenus, nous avons observé que, $K_S (\text{HCTZ} : \text{HP-}\beta\text{CD}) > K_S (\text{HCTZ} : \beta\text{CD}) > K_S (\text{HCTZ} : \text{PEG 3500}) > K_S (\text{HCTZ} : \text{PEG 1000})$, en principe cela voudrait dire qu'il y a une meilleure ou une plus favorable interaction d'ordre décroissant entre la HP- β CD, β CD, PEG 3500 et/ou PEG 1000 et le HCTZ, cela peut être expliqué par le fait que dans le cas du HP- β CD, et β -CD le HCTZ est attiré vers la cavité des CDs ce qui a donné un complexe plus stable.

Et pour le rapport de solubilité $R_s (\text{HCTZ} : \text{HP-}\beta\text{CD}) > R_s (\text{HCTZ} : \text{PEG 1000}) > R_s (\text{HCTZ} : \beta\text{-CD}) > R_s (\text{HCTZ} : \text{PEG 3500})$, donc il est important de noter que la complexation à l'aide de β -CD (en particulier la HP- β CD) et de la dispersion dans les PEGs (en particulier le PEG 1000) peut être une alternative dans l'optique de la résolution des lacunes de l'HCTZ, à savoir son insolubilité et sa mauvaise biodisponibilité.

- [1] J.Defaye, J.M.G.Fernández, C.O.Mellet, Les cyclodextrines en pharmacie : perspectives pour le ciblage d'actifs thérapeutiques et le contrôle d'interactions membranaires. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 65 (1) (2007) 33-49.
- [2] M. E.Dalmora, A. G. Oliveira, Inclusion complex of piroxicam with betacyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. *Int J Pharm* (1999) 184 157-164.
- [3] C. Nicolazzi, S. Abdou, J. Collomb, A. Marsura C. Finance, Effect of the complexation with cyclodextrins on the in vitro antiviral activity of ganciclovir against human cytomegalovirus. *Bioorg Med Chem*. 9 (2001) 275-282.
- [4] T. Higuchi, K. A. Connors, phase solubility techniques. *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*. 4 (1965) 117-212
- [5] M-E.Brewster, T.Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59 (2007) 651-652.
- [6] H.P Hopkins, C.J Alexander, Transfer Gibbs free energies from H₂O to CH₃OH for a series of substituted phenyltropylium ions, Malachite Green, and Crystal Violet. *Journal of Solution Chemistry*. 5 (4) (1976) 249-255.

Conclusion Générale

La première problématique abordée dans cette thèse concerne l'étude de l'auto-extinction de la fluorescence qui se produit à une concentration élevée. La formation des complexes d'inclusion et l'étude de l'inhibition de l'auto-extinction par inclusion des fluorophores à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -CD ont été examinées en prenant le chlorhydrate de Tramadol comme molécule invitée. Les différents résultats de cette étude indiquent clairement que la complexation entre le Tramadol et la β -CD a été réalisée. Les méthodes de caractérisation; en l'occurrence, IR, RX, MEB et DSC confirment l'inclusion du Tramadol dans la cavité de la β -CD par les différentes méthodes proposés. La méthode d'irradiation via micro-onde a donné un bon rendement de 92%, ce qui a été confirmé par la DSC avec un pourcentage du Tramadol non cristallisé égale à 95,487%. Au terme de cette contribution sur la formation du complexe d'inclusion (Tramadol : β -CD) par l'irradiation via micro-ondes, nous comprenons mieux pourquoi l'électrothermie micro-onde est une technologie en plein essor. De toute évidence, cette technologie répond parfaitement bien aux exigences d'aujourd'hui qui sont la rapidité et l'efficacité ; la complexation par l'utilisation des micro-ondes vise à la modernisation et à la simplification des procédés tout en les rendant moins polluants. Le suivi de la formation du complexe en solution aqueuse par RMN¹H montre que les raies des protons H-3 et H-5 de β -CD sont les plus déplacées, car ces protons sont situés à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine ; par où pénètrent les molécules invitées.

Compte tenu du manque d'informations complètes sur les assignations des spectres RMN ¹H et ¹³C du Tramadol (*protons du cycle cyclohexyle*), l'analyse structurale complète a été réalisée à l'aide d'expériences HSQC-TOCSY car les méthodes classiques utilisant COSY et HSQC échouent dans la région spectrale très encombrée des méthylènes à cycle cyclohexyle.

Les meilleurs ajustements des spectres aux données expérimentales pour toutes les lignes de RMN sur toute la gamme de concentration ont montrés que le complexe avait une stœchiométrie [1:1] avec une constante d'équilibre $K_{11} = 260 \pm 10$ à 20°C.

La complexation du chlorhydrate de Tramadol par la β -cyclodextrine a augmenté l'intensité de l'émission de fluorescence. L'origine de cet effet était l'inclusion de molécules de Tramadol à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine qui empêchait l'auto-extinction. Bien que les propriétés d'absorbance et de fluorescence du Tramadol dans les gammes de concentrations classiques ne varient pas lors de la complexation par la β -cyclodextrine, des expériences menées à des concentrations élevées de Tramadol ont révélé une variation de l'émission de fluorescence.

La deuxième problématique était l'amélioration de la solubilité de HCTZ. Pour ce faire nous avons d'abord préparé des complexes à base de HCTZ et de β -CD et/ou Ac- β CD. Nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'acétylation de la β -CD par chauffage moderne (MO) et chauffage classique (reflux), l'IR et les Rayons X ont confirmé l'acétylation de la β CD par les deux méthodes. Le décalage des bandes de HCTZ et la disparition d'autres bandes ont confirmé la formation des complexes d'inclusion. Le suivi de la formation du complexe (HCTZ : β -CD) de stœchiométrie variante dans le D₂O (tampon phosphate, pH=7,4) par RMN ¹H (500 MHz) a montré que les protons H-3 et H-5 de la β -CD qui sont situés à l'intérieur de la cavité de β -CD sont les plus déplacés comme dans le cas du Tramadol. Les résultats des analyses obtenus par les rayons X montre un profil amorphe pour le complexe d'inclusion (HCTZ : β -CD) et/ou (HCTZ :Ac- β CD) et un profil semi cristallin pour la β -CD contrairement aux Ac- β CD et HCTZ qui ont montré un profil cristallin. Nous concluons que la β -CD et l'Ac- β CD ont modifié les propriétés cristallographiques d'HCTZ et nous pouvons attribuer ce changement à la formation d'un complexe d'inclusion.

Le test de solubilité fut la dernière étape de notre travail, nous avons noté une augmentation linéaire de la concentration du HCTZ en fonction des CDs (β -CD et HP- β CD) et avec les deux polymères hydrophiles utilisés : le PEG 1000 et le PEG 3500 par un rapport de $R_s = 37, 16, 11$ et/ou 10 pour HP- β CD, PEG 1000, PEG 3500 et β -CD, respectivement. La constante de stabilité K_s obtenue avec le HP- β CD (K_s HP- β CD = $846.72 M^{-1}$) étant plus élevée que celle des autres agents complexant (K_s β -CD = $611,205 M^{-1}$, K_s PEG 1000 = $279,22 M^{-1}$ et K_s PEG 3500 = $304,14 M^{-1}$) indique qu'il y'aurait des interactions plus favorables entre HP- β CD et le HCTZ qu'avec les autres agents complexant. Toutes les valeurs de K_s sont dans la gamme de $200-5000 M^{-1}$ ce qui indique la formation de complexes stables, le calcul du paramètre thermodynamique (ΔG) pour tous les agents complexants suggère la nature spontanée de la solubilisation de HCTZ. Donc il est important de noter que la complexation à l'aide de la β -CD (en particulier la HP- β CD) et de la dispersion dans les PEGs (en particulier le PEG 1000) peut être une alternative dans l'optique de la résolution des lacunes de l'HCTZ, à savoir son insolubilité et sa mauvaise biodisponibilité.

Comme perspective, l'ensemble des études expérimentales et théoriques dans cette thèse nous ont permis de mettre en évidence la formation des complexes d'inclusion via une nouvelle méthode qui est l'irradiation via micro-onde qui répond parfaitement bien aux exigences d'aujourd'hui qui sont la rapidité et l'efficacité. Nous nous intéresserons, ultérieurement, à explorer l'effet de l'encapsulation sur la libération prolongée du Tramadol et du HCTZ sous différentes conditions.