

77A-540.76-1

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

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB -BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du
Diplôme de Master en chimie moléculaire
Option : Chimie Organique
Intitulé

Etude des complexes d'inclusion nitrones/ β -cyclodextrine Et leurs activités antioxydantes

Préparé par M^{me} CHIKHI Hasna sous la direction du
Pr Abdelkader Touati et Mme Ait Yahia née Hamza Kahina

Présenté devant le jury:

Mr ZOUKRI	MCA	USDB	Président du jury
Mr A. BOULAHOUACHE	MCB MAA	USDB	Examineur
Mme .K. AIT YAHIA	MAA	USDB	Directrice de thèse

Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse
Ecole Normale Supérieure, BP 92, Vieux-Kouba, Alger, ALGERIE

Octobre 2013

MA-540-76-1



REMERCIEMENTS

Au terme de cette thèse, je voudrais remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à son aboutissement.

*J'adresse tout d'abord mes plus vifs remerciements à M^{me} **AIT YAHYA née KAHINA HAMZA** pour leur accueil au sein du laboratoire de post graduation en chimie organique à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba-Alger.*

Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance et l'amitié qu'elle m'a toujours témoignées. Ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est sans sa compétence, son soutien scientifique et sa disponibilité. Qu'elle soit ici assurée de ma profonde amitié.

Je souhaite remercier Messieurs : Mr Zouikri président du Jury et Mr A.boulahouache Examineur qui me font l'honneur de juger ce travail.

*Je remercie le Professeur Monsieur **ABDELKADER TOUATI**, Responsable de recherche du Laboratoire à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba-Alger pour m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire et de m'avoir permis de profiter d'excellentes conditions de travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à Monsieur **A.AIT YAHYA**, pour son aide et soutien.*

*Un très grand merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir apporté un soutien sans faille. Merci à Laure d'avoir toujours été à mes côtés, même dans les moments difficiles, et d'avoir supporté ma mauvaise humeur. Enfin, un remerciement particulier à mon marie **Noureddine** pour avoir sans doute été « mon moteur ».*

*Enfin je remercie sincèrement mes professeurs et tous les équipes de l'université **SAAD DAHLEB** de BLIDA pour leur compréhension, leur solidarité et leur encouragement à continuer ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Ma très chère mère que je ne remercierai jamais assez pour ses sacrifices ;

Mon très cher père ;

*Une dédicace spéciale pour
Mon mari NOUREDDINE
& Mon fils IDRIS.*

*A mes frères et sœurs : Abderrahmane, Abdelghani, Assia, krimo.
A mes grands parents ;
A mes tantes et oncles ;*

A Sihem, Nawal, Bakhta, Latifa, Wissam, Khadija, Soumeia, Hania

HANNA



Résumé

Les cyclodextrines ont trouvé de nombreuses applications en synthèse organique, vu leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules insolubles, à savoir les nitrones pour favoriser la solubilité et augmenter leur biodisponibilité, pour améliorer la stabilité des complexes d'inclusion.

L'objectif de notre travail, est la synthèse des complexes d'inclusion, à partir des interactions entre les cyclodextrine et une série de nitrones.

Les analyses de complexes d'inclusion obtenus par la technique spectroscopie infrarouge FT-IR et spectroscopie de masse (SM), nous a permis de vérifier la stœchiométrie et identifier l'existence des fonctions nitrones et β -cyclodextrines dans les complexes d'inclusion.

L'évaluation de l'activité antioxydante des complexes d'inclusion et nitrones par trois méthodes a montré que les complexes possèdent une activité plus importante à celle des nitrones.

Mots clés : Nitrones, Cyclodextrine, complexes d'inclusion, stœchiométrique, antioxydante.

ملخص

يوجد العديد من التطبيقات لـ cyclodextrines في التركيب العضوي ، بسبب قدرتها على تشكيل معقدات حيث يتم إدراجها مع جزيئات غير قابلة للذوبان ، وعلى سبيل المثال مركبات nitrones بحيث يتم تشكيل معقدات الضم بهدف تحسين القابلية للذوبان و زيادة التوافر البيولوجي لتحسين استقرار معقدات الضم . والهدف من عملنا هو تحضري معقدات الضم ، من التفاعلات بين cyclodextrines وسلسلة من nitrones .

سمح تحليل معقدات الضم المتحصل عليها عن طريق تقنية التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FT-IR و التحليل الكتلي الشامل (MS) ، التحقق من القياس المتكافئ و التعرف على وجود روابط بين nitrones و β -cyclodextrine في معقدات الضم .

وأظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمعقدات الضم المحصل عليها وسلسلة nitrones بواسطة ثلاث طرق أن هناك نشاط أعلى في معقدات الضم من في nitrones .

كلمات البحث: Nitrones ، cyclodextrine و معقدات الضم ، مضادات الأكسدة.

Summary

Cyclodextrins have found many applications in organic synthesis , because of their ability to form inclusion complexes with insoluble molecules , namely nitrones to promote solubility and increase their bioavailability to improve the stability of inclusion complexes .

The objective of our work is the synthesis of inclusion complexes , from interactions between cyclodextrin and a series of nitrones .

Analysis of inclusion complexes obtained by the technique infrared FT-IR spectroscopy and mass spectroscopy (MS) , allowed us to verify the stoichiometric and identify the existence of nitrones functions and β - cyclodextrin inclusion complexes .

The evaluation of the antioxidant activity of inclusion complexes and nitrones by three methods showed that the latter has a higher activity than the nitrones .

Keywords : Nitrons , cyclodextrin , inclusion complexes , stoichiometric, antioxidant .

Liste des Abréviations

AAR	Activité Antioxydante Relative
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	hydroxytoluène butylé
CD	Cyclodextrine
°C	Degré Celsius.
DPN	C, N-diphényle nitroène.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
H	hydrogène.
IR	spectrométrie infrarouge.
K_c	Constante de stabilité
M	masse en gramme.
ml	millilitre.
m	masse en gramme
mn	minute.
nm	Nanometer.
RPE	résonance paramagnétique électronique
PBN	l' α -phényl-N-tertbutylnitroène.
PPN	N-benzylidène-1-diéthoxyphosphoryl-1-méthyléthylamine-Noxyde.
P_f	point de fusion.
Rdt	rendement
R^2	coefficient de corrélation
SM	spectrométrie de Masse
UV	spectrophotométrie UV
α -CD	Alpha-cyclodextrine
β -CD	Beta-cyclodextrine
γ -CD	Gamma-cyclodextrine
λ	Longueur d'onde.
λ_{max}	Longueur d'onde qui correspond à l'absorbance maximale.
ϵ_{max}	coefficient d'absorbance.

Liste des Tableaux

Tableau 1	Nomenclature des cyclodextrines	7
Tableau 2	Caractéristiques physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines	9
Tableau 3	produits utilisés ainsi que leur origine et degré de pureté	22
Tableau 4	volumes, concentration de β -CD utilisés et rapports molaire $[\beta\text{-CD}] / [\text{NIT}]$	23
Tableau 5	Quantités de réactifs utilisés et de complexes obtenues.....	23
Tableau 6	Concentration de nitrones et β -cyclodextrine dans les solutions analysées et leurs absorbance a λ_{max} correspondante.....	29
Tableau 7	Equations des courbes ($[\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A = f([\beta\text{-CD}])$) des complexes et leurs coefficient de corrélation.....	32
Tableau 8	Valeurs de constante des complexes Nit- β CD.....	32
Tableau 9	Rendements en complexe NIT/ β -CD à 25 °C	34
Tableau 10	Fréquences des principales bandes d'absorption en infrarouge pastille de KBr des complexes synthétisés.	37
Tableau 11	Pics moléculaires principales en impact électronique des complexes synthétisés et des nitrones pures utilisées donnés par spectroscopie de masse.	40
Tableau 12	Absorbance à 517nm des solutions de nitrone et de Complexes lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH	43
Tableau 13	Absorbance à 517nm des solutions des complexes lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH	45
Tableau 14	Absorbances des nitrones lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm	46
Tableau 15	Absorbances des complexes déterminé par la méthode FRAP à 700nm	47
Tableau 16	Absorbances des solutions des nitrones lors du test de l'activité FRAP à 700nm	48
Tableau 17	Absorbances des complexes synthétisés lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm	48
Tableau 18	Activité relative des nitrones et de leurs complexes d'insertion.....	49

Liste des figures

Figure 1	Stabilisation des nitrones par résonance	3
Figure 2	Types de nitrones existantes.....	3
Figure 3	Approches possibles pour la préparation de Nitrones.....	4
Figure 4	Principe de la technique de piégeage de spin par la PBN	5
Figure 5	Structure chimique des nitrones synthétisé	5
Figure 6	Les structures des cyclodextrines.....	7
Figure 7	Structure simplifiée montrant la forme tronconique.....	8
Figure 8	Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine	8
Figure 9	T-shirt greffé par la cyclodextrine (a) et non greffé (b) porté pendant 24 h puis analysé par chromatographie gazeuse	12
Figure 10	Schéma de l'inclusion d'une molécule dans la cavité hydrophobe de cyclodextrine	13
Figure 11	Représentation de la formation de complexe d'inclusion	14
Figure 12	Diverses structures en solution aqueuse de complexes cyclodextrines-invités.....	15
Figure 13	Structure préférée du 1:1.....	18
Figure 14	Structure préférée du 1:2.....	20
Figure 15	structure préférée des deux stœchiométries a) 2 :1 et b) 1 :1.....	26
Figure 16	Spectres d'absorbance des nitrones avec la β -CD à différentes concentrations.....	27
Figure 17	Spectres d'absorbance des nitrones avec la β -CD à différentes concentrations.....	28
Figure 18	Courbes $([\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A (\lambda_{\text{max}} \text{ nm})=f([\beta\text{-CD}])$ pour les complexes synthétisées.....	30
Figure 19	Courbes $([\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A (\lambda_{\text{max}} \text{ nm})=f([\beta\text{-CD}])$ pour les complexes synthétisées.....	31
Figure 20	histogramme des rendements de chaque complexe NIT/ β -CD.....	34
Figure 21	Spectre FT-IR de a) β -CD b) Nit P-H c) complexe Nit- β -CD en pastille de KBr.....	36
Figure 22	Spectres de masse en impact électronique de a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-H.....	39
Figure 23	Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant AH.....	43
Figure 24	principe de la technique de piégeage de spin par la nitrone.....	44
Figure 25	Comparaison de l'activité antioxydante des complexes avec celle des nitrones.....	45
Figure 26	Histogrammes comparatifs de l'absorbance des nitrones et leurs complexes lors du test FRAP	47
Figure 27	Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490nm en présence des antioxydants : nitrones (a) et complexes d'insertions (b) pondant 48 heures.....	49
Figure 28	Histogrammes de l'activité relative des nitrones et leurs complexes d'insertions.....	50

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : NITRONES

I.1. Définition des nitrones :.....	3
I.2.Types de nitrones :.....	3
I.3. Synthèse des Nitrones :.....	4
I.4. Domaine d'application des nitrones :.....	4
I.4.1.Utilisation dans la technique de (PIEGEAGE DE SPIN) :.....	4
I.4.2. Utilisation d'antioxydants de type nitrone à propriétés thérapeutiques:.....	5

CHAPITRE II : CYCLODEXTRINES

II.1. Généralités sur la chimie supramoléculaire :.....	6
II.2. Présentation générale des cyclodextrines :.....	6
II.3. Nomenclatures des cyclodextrines :.....	7
II.4. Structure et propriétés des cyclodextrines :.....	7
II.4.1. Structure.....	7
II.4.2. Propriétés physico-chimiques :.....	9
II.5. Toxicité des cyclodextrine :.....	10
II.6. Applications des cyclodextrines :.....	10
II.6.1. Domaine d'industrie :.....	10
II.6.2. Domaine d'industries chimiques et biotechnologiques :.....	12

CHAPITRE III : COMPLEXES D'INCLUSION

III.1.Formation de complexes d'inclusion :.....	13
III.1.1. Mécanisme d'inclusion :.....	13
III.1.2. « Forces conductrices » de la complexation :.....	14
III.2. Différents types de complexes :.....	15
III.3. Caractérisation des complexes d'inclusion :.....	15

III.4. Propriétés physico-chimiques :.....	16
III.4.1. Détermination de la stœchiométrie des complexes : « Méthode de Job ».....	16
III.4.2. Détermination de la constante d'association : « Méthode de Benesi-Hildebrand » .	18
III.5. Effets du complexe :.....	21

CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1 Appareillages et produits :.....	22
IV.1.1 Appareils :	22
IV.1.2 Produits :.....	22
IV.2. Détermination des constantes de formation des nitrones-CD.....	23
IV.3. Préparation de complexes nitrone-βCD	23
IV.4. Pouvoir antioxydant des nitrones et leurs complexe	24
IV.4.1. Méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (DPPH radical scavenging ability) :.....	24
IV.4.2. Méthode de blanchissement de β-carotène	24
IV.4.3. Méthode de réduction du fer ferrique FRAP (Ferric reducing antioxidant power):.	25

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE V : DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ASSOCIATION

V.1. Détermination de la constante d'association :.....	26
V.2. Conclusion	33

CHAPITRE VI : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION

VI.1. Synthèse du complexe C, aryl, N-phénylnitronne/β-CD :.....	34
VI.2. Caractérisation du complexe nitronne/ β -cyclodextrine :	35
VI.2.1. Spectroscopie Infra –Rouge (FT-IR) :.....	35
VI.2.2. Spectroscopie de masse (SM):.....	38
VI.4. Conclusion.....	41

CHAPITRE VII : ACTIVITE ANTIOXYDANT DES NITRONES ET DE LEURS COMPLEXES

VII. Activité antioxydant des nitrones libres et complexés :.....	42
VII.1. La méthode de piégeage du radical DPPH :	42
VII.1.1 Principe	42

VII.2. La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :	46
VII.2.1. Principe :	46
VII.3. Méthode de la β -carotène:.....	48
VII.3.1. Principe :	48
VII.4. Conclusion :	50

CONCLUSION	51
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

La recherche de méthodologies de synthèse toujours plus performantes est importante. Elle fournit de nouveaux outils, mieux adaptés, pour construire plus facilement et avec une plus grande efficacité des molécules cibles avec des propriétés bien définies (amélioration de la solubilité dans l'eau, activité enzymatique, catalyseur chimique,...), qui peuvent aboutir à de nombreuses applications.

Un composé d'inclusion est formé à partir d'une espèce réceptrice qui inclut plus ou moins profondément un substrat moléculaire ou ionique. Cette inclusion n'est, en général, pas accompagnée de la formation d'une liaison covalente ou de coordination.

De nombreuses classes de macromolécules peuvent ainsi interagir pour former des complexes d'inclusion, comme par exemple, les xéolithes, les clathrates, les éthers couronnes, les calixarènes, les cyclodextrines, ... etc. Ces molécules cages, qui sont capables d'encapsuler d'autres molécules et qui ont des applications aussi bien en pharmacie, en agroalimentaire qu'en agriculture, intéressent de nombreux secteurs industriels.

Parmi tous les hôtes potentiels, les cyclodextrines semblent être très intéressantes pour plusieurs raisons : Ce sont des produits "semi naturels" issus d'une simple conversion enzymatique de l'amidon. Elles sont fabriquées en grande quantité utilisant des technologies non polluantes. Leur prix initial élevé est devenu abordable grâce à une augmentation de la production.

Les cyclodextrines sont notamment utilisées pour favoriser la solubilité de substances actives insolubles en milieu aqueux et augmenter leur biodisponibilité.

Les nitrones ont trouvé de nombreuses applications en synthèse organique, à savoir comme des substrats de choix pour les réactions de cycloaddition. Elles représentent des composés intermédiaires de beaucoup de produits d'intérêt biologique. D'autre part, les nitrones sont des produits insolubles dans l'eau et leur stabilité augmente par la complexation avec des molécules cage.

Le but de notre travail est d'étudier les interactions de β -cyclodextrines avec les séries des nitrones pour améliorer la solubilité et la stabilité des nitrones dans l'eau et accroître leur activité antioxydante.

Ce travail sera présenté dans ce mémoire en trois parties :

Nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui est subdivisée en trois chapitres.

- un premier chapitre sur les nitrones, leurs synthèses et leurs applications.
- un second chapitre sur les cyclodextrine leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs applications.
- un troisième chapitre qui est consacré à la formation, caractérisation des complexes d'inclusion avec la détermination de leur stœchiométrie et leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur effet catalytique.

La deuxième partie est consacrée à la description des techniques expérimentales utilisées lors de ce travail.

La troisième partie comporte trois chapitres correspondant aux résultats et discussion de nos travaux expérimentaux réalisés au laboratoire.

- Le premier chapitre sera consacré à la détermination des constantes de complexation des complexes d'inclusion.
- Le deuxième chapitre comportera la synthèse des complexes d'inclusions et leur caractérisation par spectroscopies vibrationnelles FT-IR et Spectroscopie de masse.
- le troisième chapitre contiendra les résultats de l'activité antioxydant des nitrones et de leurs complexes d'inclusion.

Enfin, on terminera avec une conclusion générale.

*Etude
Bibliographique*

La chimie des composés à double liaison C=N représente actuellement une méthode de choix pour la synthèse de composés aminés. Parmi ces substrats, les nitrones qui offrent de nombreux avantages. Elles sont souvent stables et cristallines, et sont plus réactives que les autres composés à double liaison C=N [1].

La structure dipolaire des nitrones fait des partenaires de choix dans le cadre de la formation d'isoxazolidines par réaction 1,3-dipolaires. Plus récemment, elles ont été étudiées en tant que nucléophiles dans des réactions d'addition sur des composés carbonyles. Leur caractère électrophile permet de les engager dans des additions nucléophiles d'organométalliques ou d'hétérocycles.

I.1. Définition des nitrones :

Les Nitrones, découvertes en 1890 par Beckmann sont des composés présentant une double liaison carbone-azote et une liaison de coordinance azote-oxygène qui leur confèrent une structure de type anion allylique, possèdent un fort caractère 1,3-dipolaire et sont stabilisées par résonance [2] (**Figure 1**). Leur double liaison C=N est très polarisée et leur confère un caractère d'iminium.

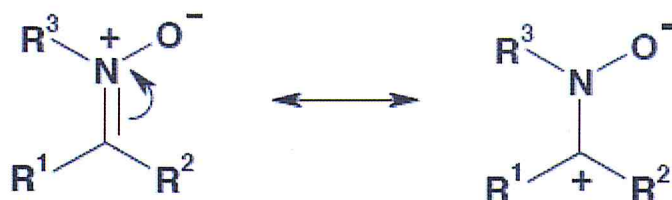


Figure 1 : Stabilisation des nitrones par résonance

I.2. Types de nitrones :

On distingue les aldo- et céto-nitrones. Les premières comportent un proton sur l'atome de carbone *Cnit.* de la fonction nitrone, contrairement aux secondes (**Figure 2**). Les cétonitrones sont réputées d'être moins stables et moins faciles d'accès.

Les nitrones acycliques existent sous la forme d'isomères (*Z*) et (*E*) qui peuvent s'interconvertir. Les cétonitrones peuvent présenter les deux types de géométrie [3]. Les aldonitrones acycliques non stabilisées par conjugaison existent uniquement sous la forme (*Z*) [4] et lorsqu'elles sont cycliques elles ne peuvent évidemment présenter que la géométrie (*E*) (**Figure 2**)



Figure 2 : Types de nitrones existantes

I.3. Synthèse des Nitrones :

Les nitrones, ou oxydes d'imes, peuvent être préparées selon différentes méthodes [5] (**figure 3**). Elles peuvent être préparées par oxydation d'imes (*a-1*, figure 3), de *N*-hydroxylamines (*a-2*, figure 3) ou d'amines (*a-3*, figure à 3) en présence de peroxyde d'hydrogène avec un catalyseur (tungstate de sodium, dioxyde de selenium), en présence d'oxyde de mercure ou de dioxyde de manganèse.

A partir d'amines et de *N*-hydroxylamines secondaires non symétriques ($R_3 \neq R_1-CH_2-R_2$), ces oxydations peuvent conduire à deux régioisomères et perdent ainsi leur intérêt. Dans ces cas, la condensation d'aldéhydes avec des *N*-alkyl hydroxylamines en présence d'un agent desséchant est préférable (*b*, figure 3) [6]. Enfin, la *N*-alkylation intramoléculaire d'oximes (*c*, Schéma3).

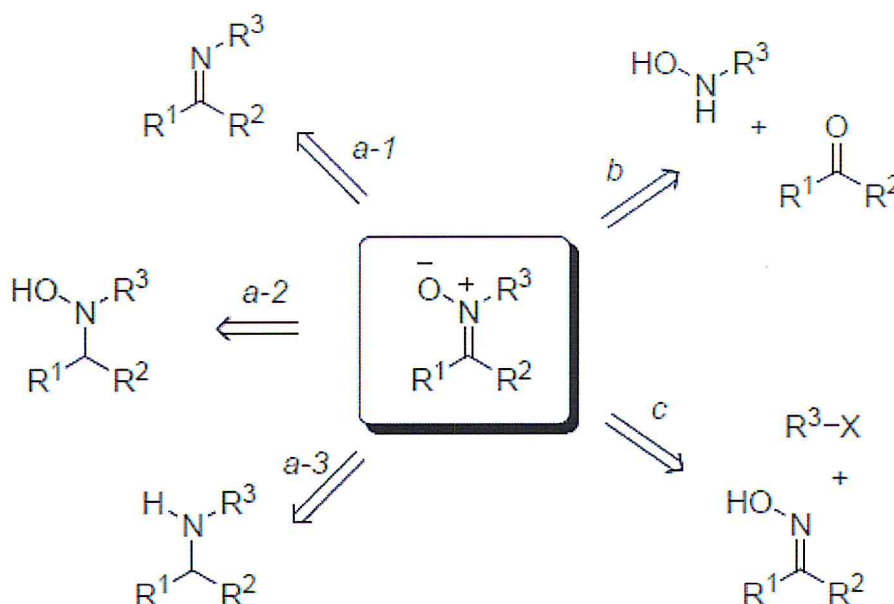


Figure 3 : Approches possibles pour la préparation de Nitrones

I.4. Domaine d'application des nitrones :

Les nitrones ont trouvé de nombreuses applications en synthèse organique, à savoir comme intermédiaires dans les réactions de cycloaddition. elles sont utilisées d'une part, dans le *spin-trapping* et d'autre part, en tant qu'agent à propriété thérapeutique[7].

Les nitrones sont aussi utilisées dans l'identification des radicaux libres dans le domaine biomédical, comme inhibiteurs pour la croissance des bactéries[8].

I.4.1. Utilisation dans la technique de (PIEGEAGE DE SPIN) :

A l'heure actuelle, les nitrones sont une classe de molécules diamagnétiques très couramment utilisée dans la technique de spin trapping. On distingue deux familles de nitrones qui sont les plus couramment employées : les nitrones linéaires de type PBN et les nitrones cycliques de type DMPO. Un exemple de piégeage d'un radical (R^{\cdot}) par la PBN est représenté sur la (**figure 4**) [9].

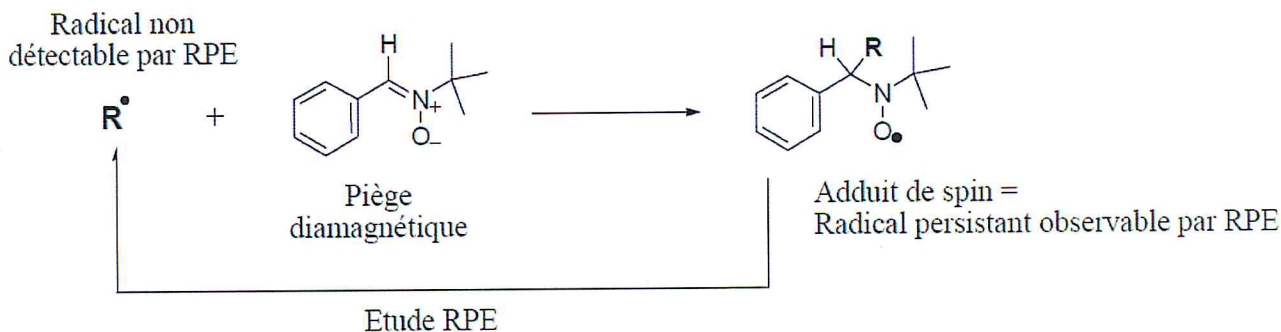


Figure 4 : Principe de la technique de piégeage de spin par la PBN.

La nitrone réagit avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote, ce qui conduit à la formation d'un adduit de spin de type nitroxyde.

Parmi ces nitrones, la 5,5 diméthylpyrroline-N-oxyde (DMPO), l' α -phényl-N-tertbutylnitron (PBN) ainsi que la α -4-pyridyl-1-oxide-N-tert-butyl nitron (POBN) se sont révélées, durant de longues années, particulièrement bien adaptées à l'étude du piégeage de nombreux radicaux libres.

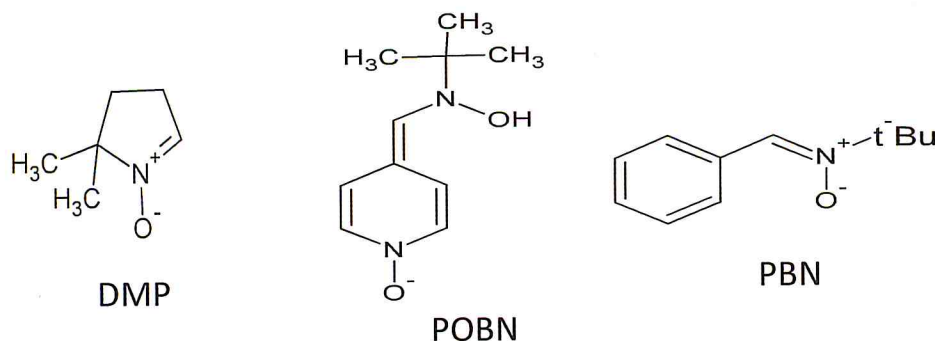


Figure 5 : Structure chimique des nitrones synthétisé

I.4.2. Utilisation d'antioxydants de type nitrone à propriétés thérapeutiques:

L'introduction des pièges à radicaux libres de type nitrones dans le cadre des expériences biologiques ont également été utilisées en tant qu'agents à propriétés thérapeutiques et ce, vu l'effet protecteur sur des cellules ou des organismes exposés à un stress oxydant.

Le stress oxydant, qui conduit à une perte cellulaire excessive néfaste pour l'organisme comme le cas des syndromes liés à l'ischémie-reperfusion (myocardique[10], cérébrale[11], intestinale[12], rénale[13]...) et d'immunodéficience et également de plusieurs maladies neurodégénératives[14] (la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson), lésions causées à l'ADN[15], les pathologies liées à l'âge, tel que le cancer[16], processus inflammatoires[17], vieillissement cellulaire[18], arthrite rhumatoïdale[19], etc.....

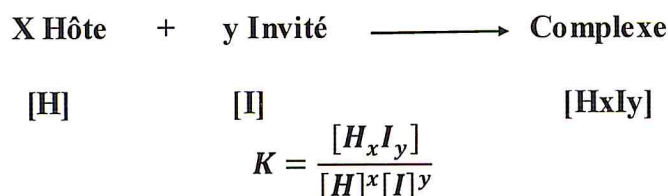
Chapitre II

cyclodextrines

Les cyclodextrines sont de séduisantes macromolécules naturelles, composées uniquement d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, qui attirent les chercheurs de diverses disciplines (en biologie, en physique, en synthèse chimique, en chimie supramoléculaire, etc). Ces oligosaccharides cycliques ont aidé à développer la voie de la chimie supramoléculaire qui se situe à l'interface de la synthèse organique, de la physico-chimie et de la chimie-biologie, et qui a complètement explosé durant les deux dernières décennies [20].

II.1. Généralités sur la chimie supramoléculaire :

Le principal intérêt de la chimie supramoléculaire réside dans la formation de complexes d'inclusion de type « hôte-invité » dans lesquels, un invité s'inclut partiellement ou totalement dans la molécule hôte, qui contient une cavité permettant cette inclusion. L'inclusion de la molécule invitée dans le composé hôte est liée d'une part, à une certaine reconnaissance moléculaire entre les deux partenaires et, d'autre part, à la création de liaisons faibles permettant la stabilité de l'association. Aucune liaison covalente n'est formée ou détruite lors de la formation d'un complexe d'inclusion. La stabilité d'un complexe d'inclusion est déterminée par sa constante de formation ou de stabilité selon l'équation suivante [21]:



II.2. Présentation générale des cyclodextrines :

La cyclodextrine (CD) a été découverte par Villiers en 1891 [22], qui a isolé une substance cristalline à partir de la dégradation de l'amidon et déterminé sa composition ($C_6H_{10}O_5$), $3H_2O$. Villiers a nommé ce produit "cellulosine", puisqu'il ressemble à la cellulose par sa résistance à l'hydrolyse acide et ses propriétés non réductrices. Il distingue deux formes cristallines qui seront identifiées plus tard comme étant les formes α et β -CD.

En 1904, Schardinger a isolé la bactérie responsable de la production de dextrines [23]. Il distingue deux produits différents, la dextrine α et la dextrine β , à l'aide d'une solution d'iode.

En 1930, Freudenberg et coll. [24] démontrent que les dextrines sont constituées d'un enchaînement d'unités D-glucopyranoses liées par des liaisons glucosidiques α 1-4 et qu'elles sont cycliques. En 1949, French [25] s'intéresse à la production de α , β , et γ -cyclodextrine et à leur caractérisation physico-chimique. Dans les années 50, Cramer [26] a étudié les propriétés de complexes d'inclusion formés par les cyclodextrines.

II.3. Nomenclatures des cyclodextrines :

De nombreuses nomenclatures (appellations IUPAC) différentes sont utilisées pour désigner les cyclodextrines [27,28], qui sont résumées dans le tableau suivant:

Tableau (1) : Nomenclature des cyclodextrines

Nomenclature	Alpha-Cyclodextrine	Bêta-cyclodextrine	Gama-Cyclodextrine
Scientifique	cyclohexaamylose	cycloheptaamylose	Cyclooctaamylose
Synonyme	Schardinger α dextrine	Schardinger β dextrine	Schardinger γ dextrine
	Cyclomaltohexose	cyclomaltoheptawose	Cyclomaltooctose
	Cyclohexaglocane	cycloheptaglocane	Cyclooctaglocane
Abréviation	α -CD	β -CD	γ -CD
	ACD	BCD	GCD
	C ₆ A	C ₇ A	C ₈ A

II.4. Structure et propriétés des cyclodextrines :

II.4.1. Structure

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques de forme torique contenant six à douze unités de glucose. Chaque unité de D-glucose en conformation chaise est liée par son carbone monomérique à l'autre unité par des liaisons glucosidiques α 1-4. Les CDs sont obtenus industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGT ase).

Les plus utilisées sont l' α , la β et la γ -CD qui sont constituées respectivement de 6, 7, et 8 unités de D- glucopyranosyl [29] (**Figure 6**). Il existe aussi des cyclodextrines plus grandes (appelées géantes) qui peuvent contenir jusqu'à 14 unités glucopyranosiques [30].

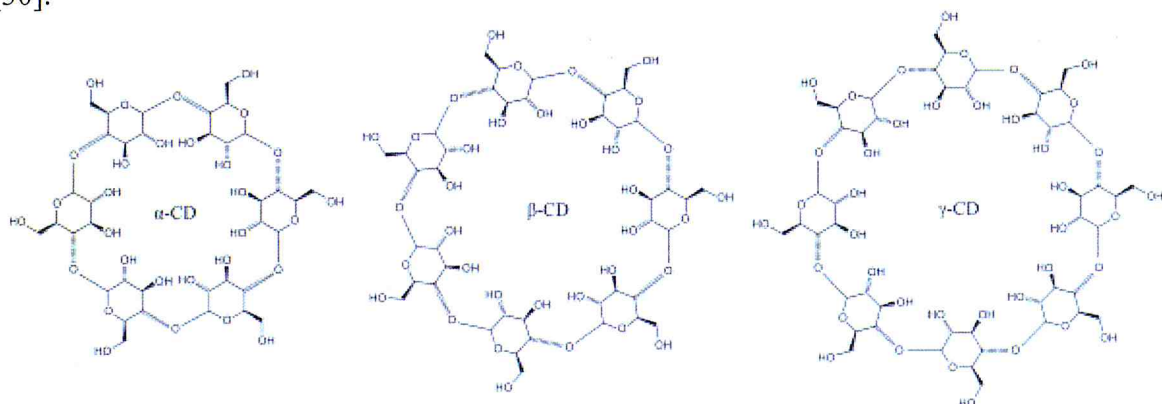


Figure 6 : Les structures des cyclodextrines.

Grâce aux structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X, la forme tronconique (**Figure 7**) des cyclodextrines a pu être déterminée, ainsi que le réseau de liaisons hydrogènes interglucosidiques des hydroxyles primaires et des hydroxyles secondaires.

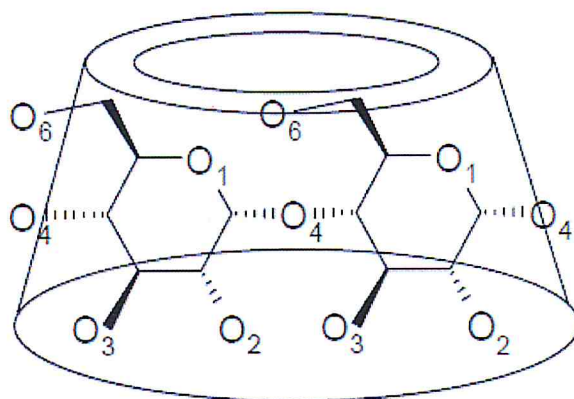


Figure 7: Structure simplifiée montrant la forme tronconique.

Les cyclodextrines ont une structure en tronc de cône, délimitant une cavité en leur centre. Cette cavité présente un environnement carboné apolaire donc hydrophobe avec un squelette carboné et oxygène en liaison éther, tandis que l'extérieur du tore présente de nombreux groupements hydroxyles qui rendent la molécule plus soluble dans l'eau (**figure8**).

Les groupes hydroxyles primaires (OH-6) de chaque unité de glucose sont localisés dans la face primaire (petite ouverture) de la cyclodextrine et sa face secondaire (grande ouverture) est tapissée par les deux groupes hydroxyles secondaires (OH-2, OH-3).

La structure des cyclodextrines est stable grâce aux liaisons hydrogènes établies entre les hydroxyles secondaires (C-2-OH, C-3-OH) des unités glucosidiques adjacentes.

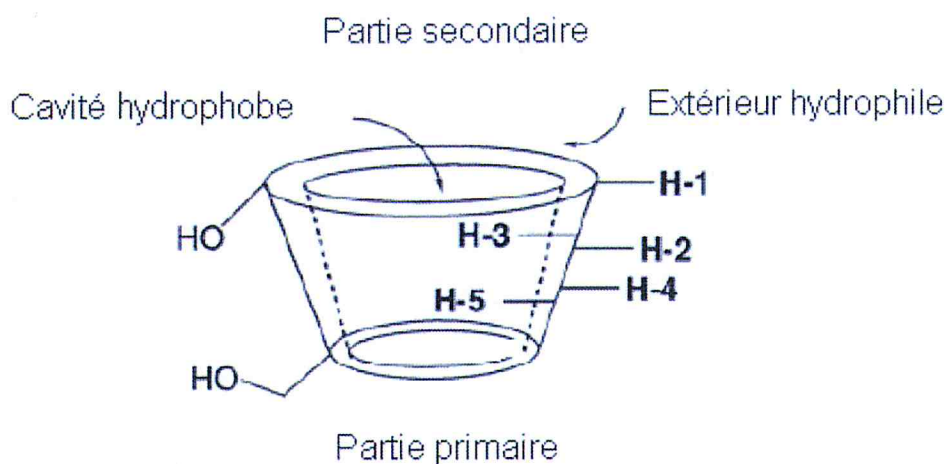


Figure 8: Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine

Le caractère des CDs, à la fois hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur, leur permet d'inclure dans leur cavité plusieurs types de molécules hydrophobes pour former des complexes d'inclusion solubles dans l'eau [29].

II.4.2. Propriétés physico-chimiques :

Comme nous l'avons déjà mentionné, les cyclodextrines les plus utilisées dans le domaine industriel sont l' α -, la β - et la γ -CD. Ce sont des produits cristallins, homogènes et non hygroscopiques, leurs caractéristiques physico-chimiques les plus importantes sont décrites dans le (**tableau 2**) [31].

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines.

Propriétés	α -cyclodextrine	β -cyclodextrine	γ -cyclodextrine
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse Molaire (g / mole)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau (g/l)	145	18,5	332
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/mol)	0,1211	0.0163	0.168
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Nombre moyen de molécule d'eau	6-8	12	13
Température de fusion (°C)	275	280	275
diamètre intérieur (Å)	4,9±0,3	6,2±0,3	7,9±0,3
diamètre extérieur (Å)	12,5±0,4	13,8±0,4	15,5±0,4
diamètre de la cavité(Å) (grande coté-petite coté)	4,3-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Hauteur du tore(Å)	7,9± 0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Volume approximative de la cavité(A ³)	174	262	427
Hauteur du cône (pm)	790 ± 10	790 ± 10	790 ± 10

Les cyclodextrines sont solubles dans l'eau et leur solubilité augmente avec la température. La β -CD est la moins soluble des cyclodextrines natives, à cause de l'orientation et l'intensité des liaisons hydrogènes établies entre les groupes hydroxyles (C2-OH) et (C3-OH) des entités glucoses adjacentes car ces groupes interagissent moins avec l'eau [32].

Pour l' α -CD, les liaisons hydrogène sont incomplètes, car l'une de ces unités de glucopyranose est distordue, par conséquent il n'y a que 4 liaisons hydrogènes formées au lieu de 6.

La γ -CD est non coplanaire, a une structure plus flexible et se caractérise par un faible degré d'interaction entre les hydroxyles, sa solubilité dans l'eau est donc plus grande que celle de l' α -CD et la β -CD [33].

En ce qui concerne les solvants organiques, l' α - et la β -CD sont insolubles dans le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol, l'acétone, le chloroforme et le tétrahydrofurane. En revanche le diméthylformamide est un bon solvant pour l' α -CD et la β -CD.

Un autre caractère important des cyclodextrines est la chiralité due à leurs unités D(+)- glucopyranose. Chaque unité de glucose contient 5 centres chiraux. La combinaison entre le pouvoir complexant des CDs et ces centres chiraux fournit l'énantiosélectivité.

II.5. Toxicité des cyclodextrine :

En général les cyclodextrines sont considérées comme relativement peu toxiques par administration par voie orale. Ces molécules ne diffusent quasiment pas au travers des membranes biologiques et ne sont pas absorbées lors du transit intestinal (DL50 oral du rat = 18800 mg/kg pour la β -cyclodextrine).

Plusieurs études ont montré que les CD ne présentent aucun effet toxique ou inhibitif sur la population bactérienne du sol [34]

Certaines CD sont utilisées dans des formulations médicamenteuses et sont ingérées par voie orale [35]. Nous pouvons alors les considérer comme des agents de formulation plutôt que comme des réactifs chimiques ordinaires (contrairement aux agents de complexation ou de solubilisation tels que les solvants organiques ou les détergents) [36].

II.6. Applications des cyclodextrines :

Les principales applications des cyclodextrines concernent les secteurs de la pharmacie (vectorisation de principes actifs...) de la cosmétique, de l'agro-alimentaire (protection d'arôme contre l'oxydation...) de l'agriculture (encapsulation d'insecticides...) et de l'analyse chimique (méthode de séparations, chromatographie, etc.). Toutes ces applications sont dues au fait que la CD peut former des complexes d'inclusion avec de nombreux composés organiques [37,38,39,40].

II.6.1. Domaine d'industrie :

Dans l'industrie, les domaines d'application des CDs sont par conséquent très nombreux et recouvrent notamment les secteurs de la pharmacie, de la cosmétique, de l'alimentaire, de l'agriculture et du textile [41].

II.6.1.1. Domaine pharmaceutique:

Les principales CDs utilisées à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutique sont des β -CD normales ou modifiées. On trouve quelques exemples avec l' α -CD et la γ -CD. La plupart des médicaments à base de CDs sont administrés par voie orale (tablettes, dragées, sirops,...).

Cependant, on remarque que toutes les spécialités administrées par voie nasale ou oculaire utilisent des CDs modifiées (Me- β -CD, HP- β -CD). Ces systèmes d'absorption font appel à des mécanismes de passage transmembranaire. Ces mécanismes sont sans doute facilités par le caractère amphiphile que confèrent les groupements alkyles greffés sur les CDs employées.

Beaucoup de ces médicaments sont utilisés comme anti-inflammatoires (Piroxicam), mais on trouve d'autres applications. Le marché des CDs est un marché mondial : les entreprises pharmaceutiques qui commercialisent ces produits sont européennes (Servier, Novartis, Fabre (France), Betafarm (Allemagne), Pfizer (Suède),...), américaines (CTD, NCI,...), japonaises (Takeda, Ono,...) et sud-américaines (Aché (Brésil), Gador (Argentine)) [42,43].

II.6.1.2. Domaine cosmétique:

De nombreuses applications industrielles existent avec les cyclodextrines. Les cyclodextrines sont encore employées dans les industries cosmétique et parfumeries. Elles sont utilisées pour diminuer la volatilité des parfums et les relarguer instantanément en se reposant sur le phénomène de relargage contrôlé. Les principaux avantages des

cyclodextrines dans ce secteur sont la stabilisation, le relargage, la protection et la livraison des arômes [44]. Utilisées aussi pour la Stabilisation de composants d'écran solaire. L'utilisation de β -CD améliore la stabilité et la solubilité dans l'eau de molécules odorantes ce qui permet leur libération progressive et évite une évaporation trop rapide de ces composants [45].

II.6.1.3. Domaine Alimentaire:

Les cyclodextrines peuvent notamment être utilisées pour l'encapsulation des arômes [46]. Ces composés volatils peuvent être encapsulés dans le but de limiter leur dégradation ou les pertes durant les étapes de fabrication et de stockage (protection contre l'oxydation, la lumière, la chaleur). L'utilisation de complexes d'inclusion cyclodextrines arômes peut aussi permettre d'utiliser les arômes en quantité moindre

On peut également utiliser des cyclodextrines pour enlever ou masquer des composés conférant une odeur ou un goût désagréable mais aussi pour enlever le cholestérol de produits d'origine animale comme les œufs et les produits laitiers. Ainsi, les caractéristiques nutritionnelles de nombreux produits laitiers comme le lait, la mayonnaise ou la crème, ont pu être améliorées via l'utilisation des propriétés complexantes de la β -CD [47].

Par ailleurs, la production du beurre pauvre en cholestérol présent sur le marché belge sous le nom Balade, implique l'utilisation de β -CD dans le procédé de fabrication[48].

II.6.1.4. Domaine Textile :

Le finissage de textile est un autre secteur dans lequel les cyclodextrine attirent de plus en plus l'attention. Wacker-Chemie a greffé un dérivé de CD substitué par monochlorotriazinyl (MCT) sur les textiles. Les cyclodextrines greffé sur les textiles ont pour but d'éliminer ou de masquer les odeurs indésirables tel que la fumée de cigarette et la sueur. Beaucoup de chercheurs pratiquent aussi le test de l'odorat en utilisant des molécules odorantes comme par exemple le camphre, le menthol, l'acétate de benzyle, etc. Le textile greffé ou non par la cyclodextrine est imbibé par une solution odorante et on suit l'intensité du parfum au cours du temps. Les fibres traitées retiennent plus la molécule du fait de son inclusion dans la cavité de la cyclodextrine.

Les cyclodextrine sont également utilisées pour renforcer la prise des colorants par le tissu et par suite de réduire la quantité de colorant perdue lors de lavage [49].

Buschmann et coll [50] suggèrent l'utilisation de textiles greffés par des cyclodextrines dans le milieu hospitalier. Grâce à un t-shirt greffé par la cyclodextrine et porté par un patient pendant 24 heures, on peut détecter les matières organiques dégagées par la personne en analysant le t-shirt par chromatographie en phase gazeuse. Cela peut remplacer une analyse urinaire (**figure 5**).

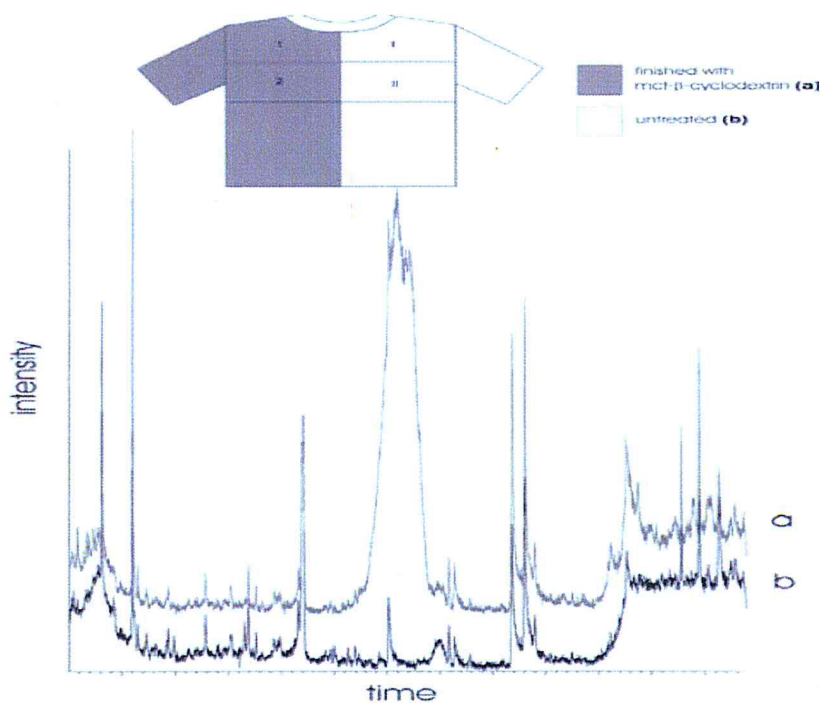


Figure 9: T-shirt greffé par la cyclodextrine (a) et non greffé (b) porté pendant 24 h puis analysé par chromatographie gazeuse [51]

II.6.2. Domaine d'industries chimiques et biotechnologiques :

Enfin, les applications des CDs dans les industries chimiques et biotechnologiques sont également en expansion [52,53].

II.6.2.1. Utilisation en chimie analytique et organique :

En chimie analytique, les CDs ont un potentiel considérable pour la séparation d'énantiomères et de molécules de masses molaires différentes (chromatographie sur couche mince, HPLC, électrophorèse capillaire...) [54,55].

D'autre part, une propriété remarquable des cyclodextrines est qu'en complexant certaines molécules photosensibles, cela augmente leur capacité de réponse à l'excitation (fluorimétrie notamment).

Les CDs sont aussi des catalyseurs chimiques efficaces [56] ; elles sont utilisées dans la conception d'enzymes artificielles [57,58]. Leur utilisation améliore le rendement dans les réactions catalytiques vu leur faculté à mimer les enzymes.

Chapitre III

Les complexes d'inclusion

Un complexe d'inclusion est une espèce chimique constituée par l'association de deux ou plusieurs molécules. La molécule hôte est capable d'inclure la molécule invitée dans sa cavité, ce qui résulte en une encapsulation stable sans formation de liaison covalente [59].

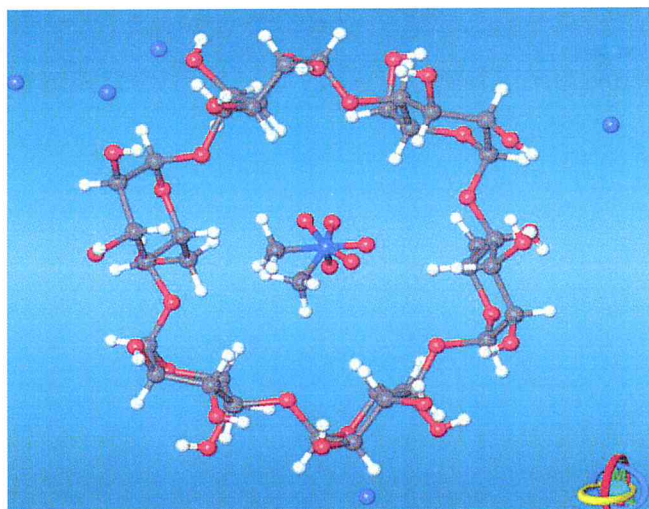


Figure 10: Schéma de l'inclusion d'une molécule dans la cavité hydrophobe de cyclodextrine

III.1. Formation de complexes d'inclusion :

Le principe général d'inclusion d'un invité dans la cavité moléculaire de la cyclodextrine est basé sur le gain énergétique réalisé par le système hôte-invité lors du processus. En effet, en solution aqueuse, la cavité légèrement apolaire de la cyclodextrine est occupée par des molécules d'eau qui engendrent des interactions énergétiques défavorables de type polaire/apolaire [60,61]. Ainsi, ces molécules d'eau peuvent être substituées par une molécule invitée moins polaire que les molécules d'eau.

III.1.1. Mécanisme d'inclusion :

Compte tenu du rôle essentiel joué par l'eau, le mécanisme d'inclusion peut être divisé en plusieurs étapes [62]:

- a- rapprochement entre l'hôte et l'invité,
- b- déstructuration du solvant au sein de la cavité impliquant l'expulsion de plusieurs molécules d'eau,
- c- déstructuration de l'eau autour de l'invité et transfert de plusieurs molécules d'eau vers le reste de la solution,
- d- interaction entre les substituants de l'invité et les groupements fonctionnels de la CD en bordure ou à l'intérieur de la cavité (interactions de van der Waals),
- e- formation possible de liaisons hydrogène entre l'invité et la CD,
- f- restructuration de l'eau autour des parties de l'invité exposées au solvant après son inclusion.

Ce processus est très rapide, mais la vitesse de formation du complexe (de même que sa stabilité) dépend néanmoins de la géométrie des molécules impliquées [63]. Les étapes (a), (d) et (e) peuvent en effet être retardées par des gênes stériques.

Cependant, il est important de préciser qu'aucune liaison covalente n'est établie entre l'hôte et l'invité.

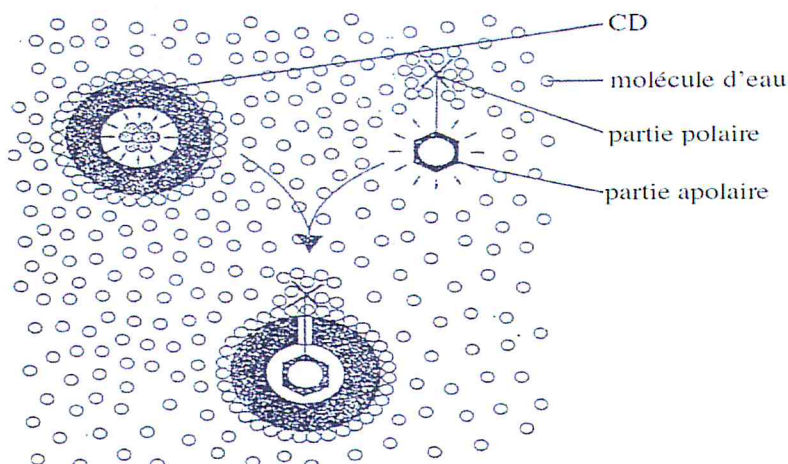


Figure 11 : Représentation de la formation de complexe d'inclusion [64]

III.1.2. « Forces conductrices » de la complexation :

Le phénomène de complexation est la résultante de nombreuses interactions mettant en jeu la molécule hôte, la molécule invitée et le solvant et conduisant à l'état thermodynamique le plus stable. La nature et l'importance relative des différents phénomènes responsables de la formation d'un complexe CD-soluté sont encore mal connues et font toujours l'objet d'une controverse. Les « forces directrices » (traduction de l'expression couramment et improprement employée « driving forces ») les plus discutées sont les suivantes [65]:

- Interactions électrostatiques (ion-ion, ion-dipôle, dipôle-dipôle),
- Interactions de van der Waals (dipôle-dipôle induit, dipôle induit-dipôle induit),
- Interactions hydrophobes,
- Liaisons hydrogènes (qui sont en fait de nature électrostatique),
- Soulagement des contraintes de conformation de la CD (tension),
- Exclusion des molécules d'eau initialement présentes dans la cavité,
- Interactions de transfert de charges (type d'interaction de van der Waals).

L'importance de la contribution de chacune de ces forces dépend de la nature de l'invité. Notons qu'il existe une ambiguïté attachée au terme d'interactions de van der Waals et les auteurs qui l'emploient ne désignent pas toujours les mêmes phénomènes. Dans le domaine des CDs, les chercheurs désignent généralement par ce terme soit la combinaison des forces d'induction (forces de Debye) et des forces de dispersion (forces de London), soit les forces de dispersion uniquement [66]

III.2. Différents types de complexes :

Selon la taille des molécules invitées et des cyclodextrines, des complexes de stœchiométries diverses peuvent être formés (**figure 12**). La stœchiométrie la plus fréquemment rencontrée est de type 1:1 mais d'autres associations peuvent exister avec des stœchiométries plus élevées telles que 2:1 ou 3:1. La stœchiométrie 1 : 2, 1 : 3, ... sera obtenu si la molécule à inclure est de grande taille et que plusieurs cyclodextrines peuvent interagir avec la molécule invitée. Au contraire, une stœchiométrie 2 : 1 sera observée si la cavité de la cyclodextrine est suffisamment large pour inclure plusieurs molécules de principe actif. [67]

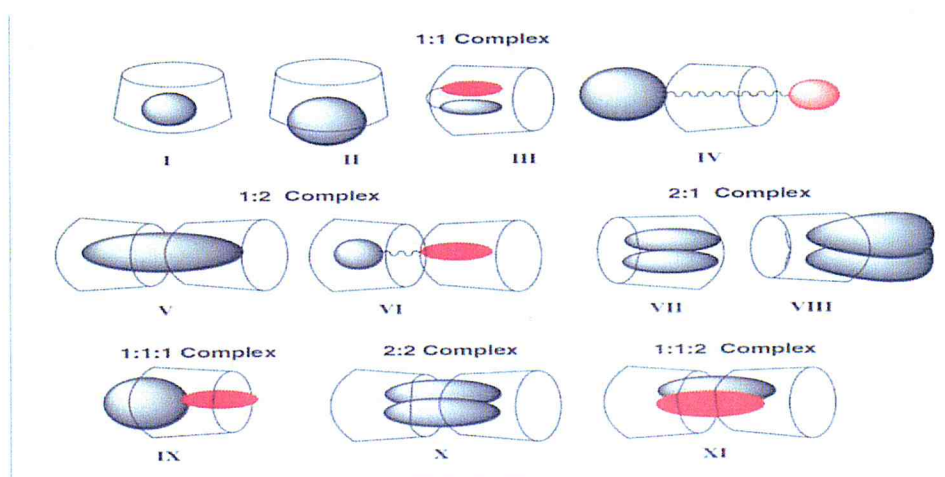


Figure12: Diverses structures en solution aqueuse de complexes cyclodextrines-invités

III.3. Caractérisation des complexes d'inclusion :

La formation d'un complexe d'inclusion entre une β -CD et une molécule invitée peut être vérifiée à l'aide de différentes méthodes d'analyse. On trouve dans la littérature des caractérisations par fluorimétrie, diffraction de rayons X, spectroscopie UV-visible, spectroscopie InfraRouge (IR), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), Analyse Calorimétrique Différentielle (ACD ou DSC), ThermoGravimétrie (TG).

Ces techniques ont des approches qualitatives (il s'agit juste de mettre en évidence qu'il y a eu inclusion) et/ou quantitatives si elles permettent de déterminer la constante d'association [29].

Les complexes d'inclusion peuvent parfois être isolés comme des substances cristallines stables. De nombreuses techniques d'analyses physico-chimiques, telles que la spectroscopie UV-visible, la spectroscopie de fluorescence, l'analyse cristallographique, la spectroscopie RMN, la spectrométrie de masse ou bien encore des méthodes d'analyses électrochimiques, permettent de mettre en évidence, de caractériser et de déterminer les constantes d'association de ces complexes [68,69,70,71,72].

Les analyses effectuées afin de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion en solution, se basent sur les modifications des caractéristiques physico-chimiques de la substance complexée. En théorie, toute méthode qui permettrait de mettre en évidence des changements au niveau par exemple, de la solubilité, de la rétention en chromatographie liquide, de l'absorbance dans l'UV-visible, de la

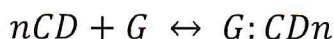
fluorescence ou des déplacements chimiques en résonance magnétique nucléaire, peut être employée pour l'étude des complexes [73]

III.4. Propriétés physico-chimiques :

L'étude des propriétés physico-chimiques d'un complexe d'inclusion consiste à déterminer la stœchiométrie du complexe formé et l'évaluation de la constante d'association qui reflète la force d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule invitée-molécule cage) et permet de connaître la proportion de la molécule complexée.

III.4.1. Détermination de la stœchiométrie des complexes : « Méthode de Job »

La méthode des variations continues ou méthode de Job [74,75] est utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines. La formation d'un complexe d'inclusion impliquant une molécule du composé à inclure (G) et n cyclodextrines (CD) sera décrite par :



La constante d'association du complexe d'inclusion sera alors décrite par :

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

Avec : $[G : CD_n]$ = concentration en complexe, $[G]$ et $[CD]$ concentrations en G et CD libre dans le mélange.

En définissant $[G]_t$ et $[CD]_t$ comme étant les concentrations totales en G et CD dans l'échantillon, nous pouvons écrire les relations suivantes :

$$[G] = [G]_t - [G:CD_n] \quad (II)$$

$$[CD] = [CD]_t - n[G : CD_n] \quad (III)$$

La méthode de Job impose 2 conditions :

- concentrations initiales des solutions mères utilisées identiques.
- mélange les deux solutions à volume constant.

Ceci se traduit par :

$$[G]_t + [CD]_t = M \quad (IV)$$

$$r = \frac{[G]_t}{[G]_t + [CD]_t} \quad (V)$$

Avec M = la concentration totale du mélange, et r = la proportion molaire de la molécule invitée ($0 < r < 1$).

Les concentrations en espèces libres peuvent alors être déduites des relations suivantes:

$$[G] = rM - [G:CD]_n \quad (VI)$$

$$[CD] = M(1 - r) - [G:CD]_n \quad (VII)$$

La concentration en complexe $[G:CD_n]$ est donc une fonction de r et elle passe par un maximum lorsque la dérivée $d[G:CD_n]/dr$ est nulle. La dérivation des équations (I), (VI) et (VII) par rapport à r conduit aux relations suivantes :

$$[CD] \frac{d[G]}{dr} + n[G] \frac{d[CD]}{dr} = 0 \quad (VIII)$$

$$\frac{d[G]}{dr} = M \quad (IX)$$

$$\frac{d[CD]}{dr} = -M \quad (X)$$

Ces trois équations peuvent être combinées en une seule:

$$[CD] = n[G] \quad (XI)$$

En utilisant les équations (VI), (VII) et (XI), nous parvenons à une solution unique et la concentration maximale en complexe est obtenue pour :

$$r = \frac{1}{1+n}$$

Cette relation ne dépend ni de la constante d'association K_a , ni de la valeur de la concentration M . Pour l'étude des complexes d'inclusion, nous sommes dans le cas d'un échange rapide par rapport au temps d'observation. Nous pouvons écrire la relation suivante :

$$P_{(G)obs}[G]_t = P_{(G)c}[G:CD_n] + P_{(G)f}[G] \quad (XII)$$

Où P_{obs} , P_f et P_c représentent, respectivement, la valeur du paramètre observé et ses valeurs à l'état libre et dans le complexe pur. Dans toutes les études suivantes, nous ne considérerons que des variations de paramètres observés avec les conventions suivantes :

$$\begin{aligned} \Delta P_{obs} &= P_{obs} - P_f \\ \Delta P_c &= P_c - P_f \end{aligned}$$

L'équation (XII) devient :

$$\Delta P_{(G)c} [G:CD_n] = \Delta P_{(G)obs} [G]_t$$

$\Delta P_{(G)obs}$, étant proportionnel à $[G:CD_n]$, il est donc une fonction de r . Le tracé de la fonction $f(r) = \Delta P_{(G)obs} [G]_t$ doit alors passer par un maximum pour $r = 1/(1+n)$ et permettre de déterminer n . La même démarche peut être effectuée pour le composé $[CD]$ et confirmer ainsi la stœchiométrie.

Cette méthode est appliquée en UV, en fluorescence, en RMN, où le paramètre P est respectivement l'absorbance, l'intensité de fluorescence ou la variation de déplacement chimique. En RMN, la détermination de n se fait par l'enregistrement

d'une série des spectres ^1H en 1D où il est possible de suivre les variations des déplacements chimiques des protons de CD ou de la molécule invitée.

Le déplacement chimique des protons doit varier en fonction des concentrations de CD et de G.

Soient :

δ_1 = le déplacement chimique d'un proton de la molécule invitée (ou de CD) libre.

δ_c = le déplacement chimique de ce même proton dans le mélange G :CD.

$$D\delta_{\text{obs}} = \delta_1 - \delta_c$$

Ainsi, en rapportant $\Delta_{\text{obs}}/[G]_0$ (ou $[\text{CD}]_0$) en fonction de r , une courbe en forme de cloche centrée sur une valeur r_{max} est obtenue. Avec :

$[G]_0$ = Concentration initiale de la molécule incluse.

$[\text{CD}]_0$ = Concentration initiale de la cyclodextrine.

Par exemple, si

$$r_{\text{max}} = 0,5$$

$$r = \frac{1}{1+n} = 0,5$$

Donc $n=1$. Nous pouvons dire qu'il y a formation d'un complexe d'inclusion de type 1:1.

III.4.2. Détermination de la constante d'association : « Méthode de Benesi-Hildebrand » :

La méthode de Benesi-Hildebrand permet de déterminer la constante d'association d'un complexe en solution. Historiquement, cette méthode a été développée par Benesi-Hildebrand pour étudier des complexes par spectrométrie UV en 1949. La constante d'association est déterminée en observant la différence d'absorption entre la molécule complexée et la molécule libre [77].

Première état :

Une stœchiométrie 1 :1 (une molécule de β -CD et une molécule invitée)

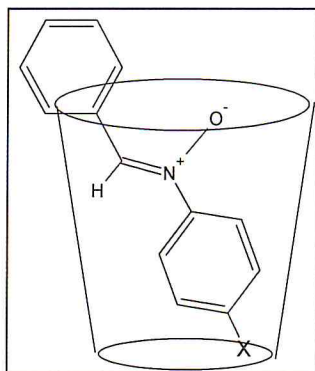


Figure (13) : Structure préférée du 1:1



La variation d'absorbance du soluté (Nit) en fonction de la concentration du complexe est :

$$\Delta A = A_0 - A_n = \epsilon l [\text{N/C}] \dots\dots\dots(1)$$

- ΔA : variation d'absorbance
- A_0 : Absorbance en absence de la β -CD
- A_n : Absorbance des nitones libre
- ϵ : Coefficient d'absorbance
- $[\text{N/C}]$: concentration du complexe
- l : la longueur de la cellule égale à 1 cm

La relation de la constante d'équilibre s'écrit :

$$K_\alpha = \frac{[\text{N/C}]}{[\beta\text{-CD}] [\text{Nit}]} = \frac{[\text{N/C}]}{([\beta\text{-CD}]_0 - [\text{N/C}]) ([\text{Nit}]_0 - [\text{N/C}])} \dots (2)$$

Ou :

- $[\text{N/C}]$: concentration du complexe
- $[\text{Nit}]$: concentration de la molécule invitée
- $[\beta\text{-CD}]$: concentration de la β -CD dans libre

Si on considère que la concentration en nitrone est faible devant la concentration de cyclodextrine, il possible de négliger le terme $[\text{N/C}]$ dans l'équation précédente ce qui conduit à :

$$K_\alpha = \frac{[\text{N/C}]}{[\beta\text{-CD}]_0 [\text{Nit}]_0 - [\beta\text{-CD}]_0 [\text{N/C}] - [\text{Nit}]_0 [\text{N/C}]} \dots\dots\dots (3)$$

De l'équation (1) on tire la valeur de $[\text{N/C}]$ que l'on reporte dans l'expression (3) :

$$K_\alpha = \frac{\Delta A / \epsilon}{[\beta\text{-CD}]_0 [\text{Nit}]_0 - \Delta A / \epsilon ([\beta\text{-CD}]_0 + [\text{Nit}]_0)} \dots\dots\dots(4)$$

A partir de cette équation en négligeant $[Nit]_0$ devant $[\beta-CD]$ ($[Nit]_0 \ll [\beta-CD]_0$)
 On obtient finalement la fonction linéaire suivant :

$$\frac{[\beta-CD]_0 [Nit]_0}{\Delta A} = \frac{1}{K\alpha\epsilon} + \frac{([\beta-CD]_0)}{\epsilon} \dots (4^*)$$

Connue sous le nom de la formule de « **Bénis-Hildebrand** » [78].

Deuxième état : complexe 1:2 (deux molécule β -CD et une molécule invitée)

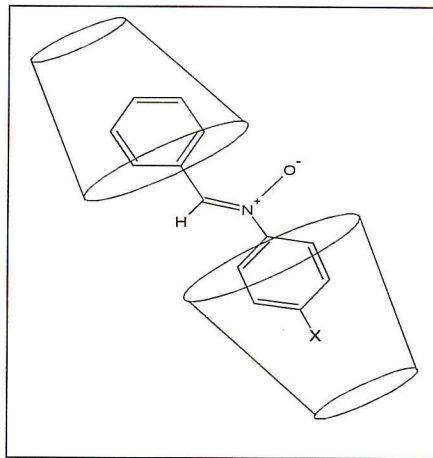
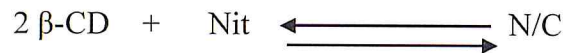


Figure (14): Structure préférée du 1:2

La relation de la constante d'équilibre s'écrit :

$$K\alpha = \frac{[N/C]}{[\beta-CD]^2 [Nit]} = \frac{[N/C]}{([\beta-CD]_0 - [N/C])^2 ([Nit]_0 - [N/C])} \dots (5)$$

Si on considère que la concentration en nitro soit faible devant la concentration en cyclodextrine, il est possible de négliger quelque terme et on remplace $[N/C]$ on obtient la relation (6) :

$$K\alpha = \frac{[\Delta A/\epsilon]}{([\beta-CD]_0^2 [Nit]_0 - \Delta A/\epsilon [\beta-CD]_0^2)} \dots (6)$$

On obtient à la fin la relation suivant :

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\epsilon K\alpha [Nit]_0} + \frac{1}{[\beta-CD]_0^2} + \frac{1}{\epsilon [Nit]_0}$$

III.5.Effets du complexe :

La complexation d'une molécule peut influencer sur ses propriétés. Tout d'abord au niveau de sa solubilité, la formation d'un complexe permet de solubiliser certaines molécules en milieu aqueux. Pour des molécules instables, la complexation de la molécule invitée permet de la protéger et la stabiliser. Mais, on peut observer aussi le phénomène inverse où la CD se comporte comme une enzyme et va accélérer diverses réactions avec la molécule complexée.

Les changements des propriétés de la molécule complexée vont avoir pour conséquence de modifier le comportement de celle-ci lors des différentes études analytiques : maximum d'absorption en spectre UV, mobilité en chromatographie, déplacement chimique en RMN, etc..... Ces différences de comportement permettront de mettre en évidence ces complexes et de les étudier. L'invité initialement hydrophobe (libre : sans complexation), devient hydrophile (sous la forme complexée), donc sa mobilité chromatographique est également modifiée.

Ces changements résultent de la modification de l'environnement de la molécule incluse. En effet, la molécule invitée passe d'un environnement polaire (eau, DMSO, DMF...) à un environnement hydrophobe (intérieur de la cavité) [79].

Chapitre IV

Partie Expérimentale

IV.1 Appareillages et produits :

IV.1.1 Appareils :

Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un appareil de marque NERMAG R 10-10 dans les conditions d'impact électronique (IE).

Les spectres Infra Rouge des nitrones et des complexes ont été réalisés à l'aide d'un appareil de marque PERKIN 550, en pastille de KBr.

Les spectres UV- visible des complexes ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, JASCO, type V-630 à doubles faisceaux.

Les différentes pesées de précision ont été faites en utilisant une balance analytique de marque Scaltec, type OSI 9001.

IV.1.2 Produits :

Les produits utilisés dans notre travail et leurs origines sont rassemblés dans le tableau 3

Les nitrones utilisées ont été synthétisées, et identifiées au laboratoire.

Tableau (3) : produits utilisés ainsi que leur origine et degré de pureté.

Produits	Origine	Pureté (%)
Ethanol	Fluka	95
Diéthyl Ether	//	99,5
Chloroforme	//	Spectroscopique
Dichlorométhane	Pro labo	99,5
DMSO	//	//
B-carotène	//	98
Tween 40	//	//
Acide linoléique	//	//
DPPH	Fluka	99
BHT	//	99
BHA	//	99
TCA	//	//
FeCl_3	//	//
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	//	//
β -Cyclodextrine	//	//

IV.2. Détermination des constantes de formation des nitrones-CD

On prépare des solutions de β -CD [$5 \cdot 10^{-2}$ M dans DMSO] et des nitrones [$2 \cdot 10^{-3}$ M dans DMSO] (le DMSO a été employé car dans l'eau, la turbidité n'a pas permis l'étude spectrophotométrique). $50 \mu\text{L}$ de la solution de nitrone a été pris dans des tubes à essais. À ceci, huit diverses quantités de la solution de β -CD [$0 \mu\text{L}$ - $800 \mu\text{L}$] ont été ajoutées. Ces solutions ont été ajusté à 2 ml avec le DMSO. Ces tubes ont été soumis à une agitation puis laissé à température ambiante pendant 4-6 heures pour atteindre l'équilibre. Une analyse par spectrophotométrie est réalisée. Le tableau 4 donne les volumes, la concentration de β -CD utilisés ainsi que les rapports molaire $[\beta\text{-CD}] / [\text{NIT}]$.

Tableau (4): volumes, concentration de β -CD utilisés et rapports molaire $[\beta\text{-CD}] / [\text{NIT}]$.

Solution	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
$V_{\beta\text{CD}} (\mu\text{l})$	0	25	50	100	150	200	300	400	600	800
$[\beta\text{CD}] 10^{-6}$ M	0	625	1250	2500	3750	5000	3500	10000	15000	20000
$[\beta\text{CD}] / [\text{NIT}]$	/	12,5	25	50	75	100	150	200	300	400

IV.3. Préparation de complexes nitrone- β CD

Dans un ballon de 100 ml, on fait introduire un mélange équimolaire $12,5 \cdot 10^{-3}$ moles de la nitrone et $12,5 \cdot 10^{-3}$ moles de la β -CD dans l'eau distillée. Le complexe est obtenu par l'agitation pendant 36 à 48 heures. Après un certain temps on remarque que la nitrone reste en suspension puis au fur et à mesure que la réaction avance, cette suspension disparaît. À la fin on obtient une précipitation. On filtre le mélange, puis on lave le filtrat avec de l'eau distillée pour éliminer le reste de la β -CD non complexé, puis on lave encore avec de l'éther froid pour dégager la nitrone non complexée. Le solide récupéré est séché à 65°C pendant 6h à 12heures puis conservé entre 0 et 4°C .

Le tableau 5 donne les masses molaires, les masses utilisées et obtenues des nitrones utilisées, ainsi que la masse théorique et expérimentale du complexe.

Tableau (5): Quantités de réactifs utilisés et de complexes obtenues

Les produits	P-NO ₂	P-cl	P-Br	P-H	P-OH	P-OCH ₃	P-OC ₂ H ₅
Masse molaire (g/mol)	242	213	231	197	213	227	241
Quantité utilisée m (mg)	90,8	80,2	84,87	74,83	79,86	85,04	90,5
Masse expérimentale (mg)	44,38	16,04	49,25	83,97	34,82	188,16	26,36
Masse théorique (mg)	516,65	518,47	548,66	523,05	516,27	518,04	517,08

IV.4. Pouvoir antioxydant des nitrones et leurs complexe

Le pouvoir antioxydant de nos nitrones et de leurs complexes a été testé par trois méthodes : la méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la méthode de blanchissement de la β -carotène et la méthode de réduction du fer ferrique.

IV.4.1. Méthode de piégeage du radical libre 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (DPPH radical scavenging ability) :

Le radical libre DPPH est solubilisé dans l'éthanol absolu à une concentration de 4mg dans 100 ml d'éthanol. Les solutions de nitrones et des complexes dans le DMSO de concentration de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ ont été fraîchement préparées. En parallèle, des solutions des antioxydants de synthèse : hydroxytoluène butylé (BHT) et Hydroxyanisole butylé (BHA) ont été préparées avec la même concentration que les nitrones.

Dans des tubes secs et stériles, on introduit un volume 0,2ml des solutions à tester et on complète à 1ml avec de l'éthanol, on ajoute 1 ml de la solution DPPH. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante (25°C) pendant 30 min. le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml. L'activité est mesurée par la relation suivante :

$$\% \text{activité} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{control}} * 100$$

Soit

$\text{Abs}_{\text{control}}$: Absorbance à la longueur d'onde de 517nm de la solution éthanol + DPPH.

Abs_{test} : Absorbance à 517nm de l'échantillon.

IV.4.2. Méthode de blanchissement de β -carotène :

La méthode décrite par Tepe et ces collaborateurs [80] a été employée. Une émulsion β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μl de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rota vapeur et 100 ml d'eau sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

Le volume de 200 μl de chaque solution de nitrones ou de complexes synthétisées (à une concentration de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ dans le DMSO) sont mélangé avec 300 μl de DMSO puis rajouté à 2ml du mélange précédent. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque solution. Les tubes à essai ont été incubés en obscurité à la température du laboratoire. Des contrôle ont été aussi préparés avec la même procédure, en remplaçant les solutions de nitrones par des solutions des antioxydants de référence BHT, BHA (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 500 μl de DMSO. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée après 48 heures selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}48\text{h (échantillon)} / \text{Abs}48\text{h (BHT)}] \times 100.$$

Où :

AAR : activité antioxydante relative ;

Abs 48h (échantillon): absorbance de l'échantillon après 48 heures ;

Abs 48h (BHT): absorbance du BHT après 48 heures.

IV.4.3.Méthode de réduction du fer ferrique FRAP (Ferric reducing antioxidant power):

Ce test a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu [81]. 200ml de des solutions des nitrones ou des complexes synthétisées à 0,5 $\mu\text{mol/L}$ dans le DMSO sont dilués dans 800 μl de DMSO. Ces dernières sont mélangées avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml FeCB (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

BHT et BHA sont utilisés comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Résultats et discussions

Les complexes d'inclusion étant régi par des forces d'interactions faibles, un équilibre s'établit entre les formes dissociées et associées. Cet équilibre thermodynamique s'exprime par une constante d'association K_a . Dans le cas d'une CD et d'une molécule invitée.

Dans notre travail, nous allons étudier les interactions entre la β -cyclodextrine et une série des nitrones. Ainsi, les constantes de stabilité (K_a) de chaque complexe d'inclusion seront déterminées en employant la spectroscopie UV-Visible.

V.1. Détermination de la constante d'association :

Les constantes d'association nitrones/ β -cyclodextrine seront étudiées par la méthode de « Benesi-Hildebrand) ». Deux cas de stœchiométrie peuvent être obtenus (**figure 15**):

- la stœchiométrie 1 :1 (une molécule de β -CD et une molécule de nitron).
- la stœchiométrie 2 :1 (deux molécules de β -CD et une molécule de nitron).

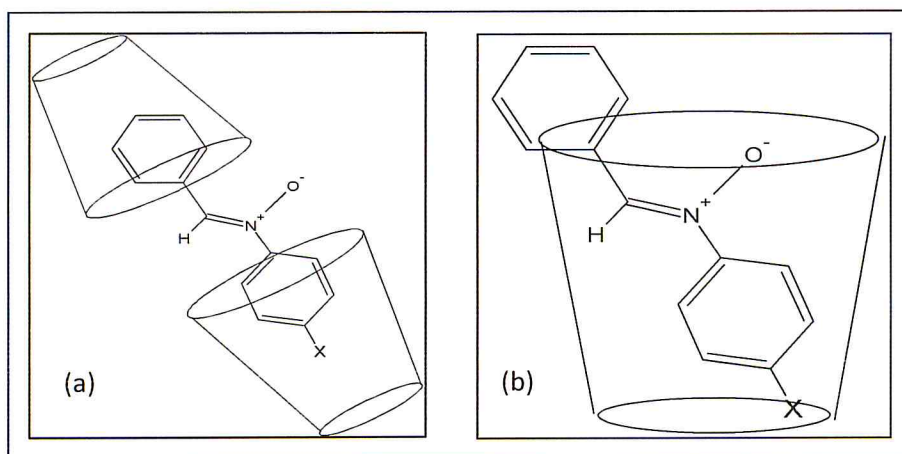


Figure (15) : structure préférée des deux stœchiométries a) 2 :1 et b) 1 :1

Les principales étapes menant à ce calcul sont données dans la partie théorique. Si on suppose que la complexation est de stœchiométrie 1 :1, on applique la loi suivante :

$$\frac{[\beta\text{-CD}]_0 [\text{Nit}]_0}{\Delta A} = \frac{1}{K_a \epsilon} + \frac{([\beta\text{-CD}]_0)}{\epsilon} \dots\dots(I)$$

le constant d'association du complexe est déterminé à l'aide du tracé de la fonction $([\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A (\lambda_{\text{max}} \text{ nm})=f([\beta\text{-CD}])$, La pente $1/ \epsilon$ et l'ordonnée à l'origine $1/\epsilon K_a$ des droites obtenues permettent d'atteindre les deux paramètres recherchés K_a et ϵ .

Pour tracer ces courbes, on prépare deux solutions de nitron et β -CD aux concentrations respectives 2.10^{-3} mol/l et 5.10^{-2} mol/l. On prend un volume fixe de la première solution qu'on mélange à différents volumes de la solution de β -CD . La solution obtenue est agité à l'aide d'un Vortex puis on la laisse reposer pendant six heures pour faire une lecture par UV-Visible. Les spectres obtenus sont représentées dans les figures (16) et (17).

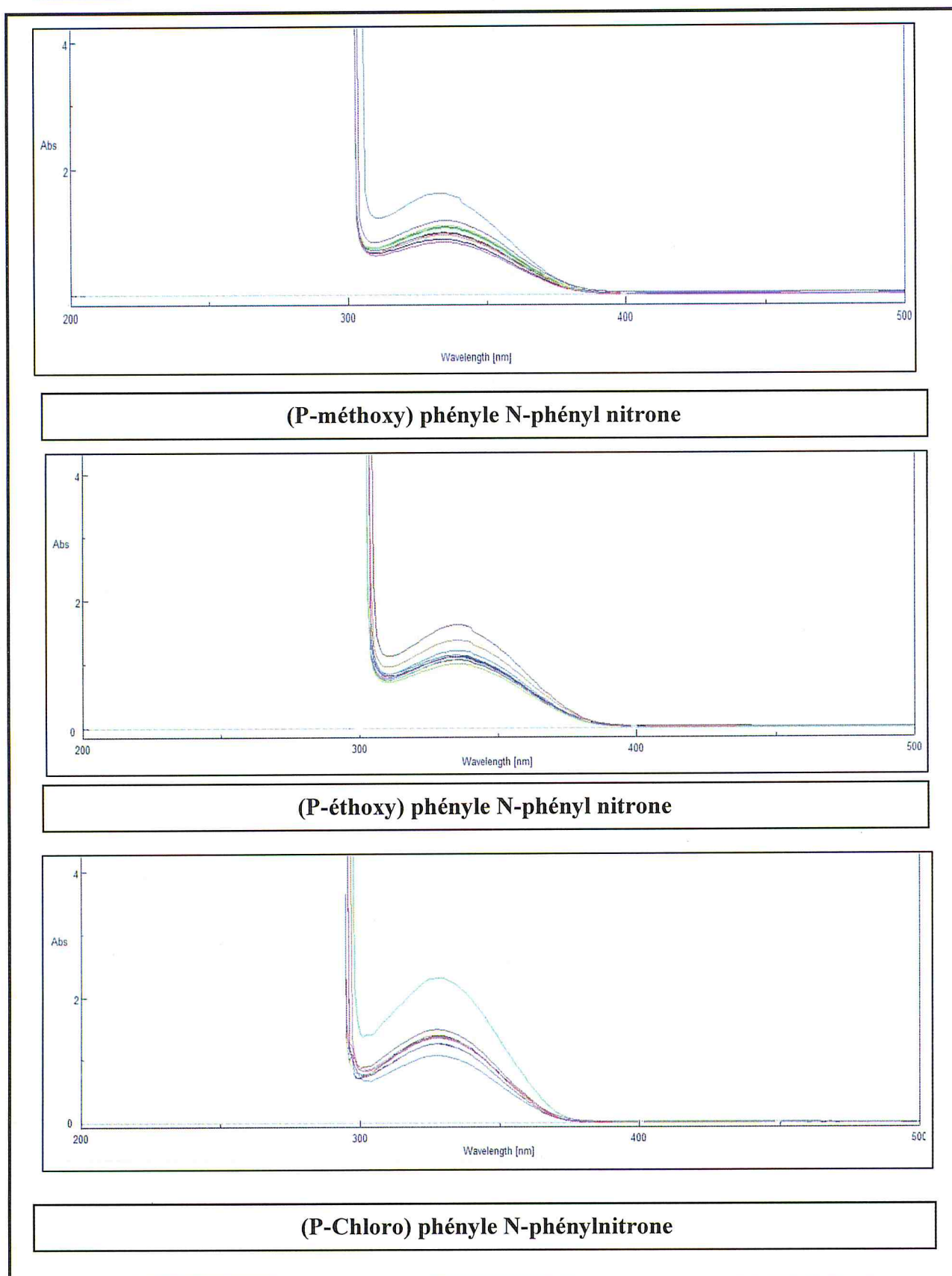


Figure (16) : Spectres d'absorbance des nitrones avec la β -CD à différentes concentrations.

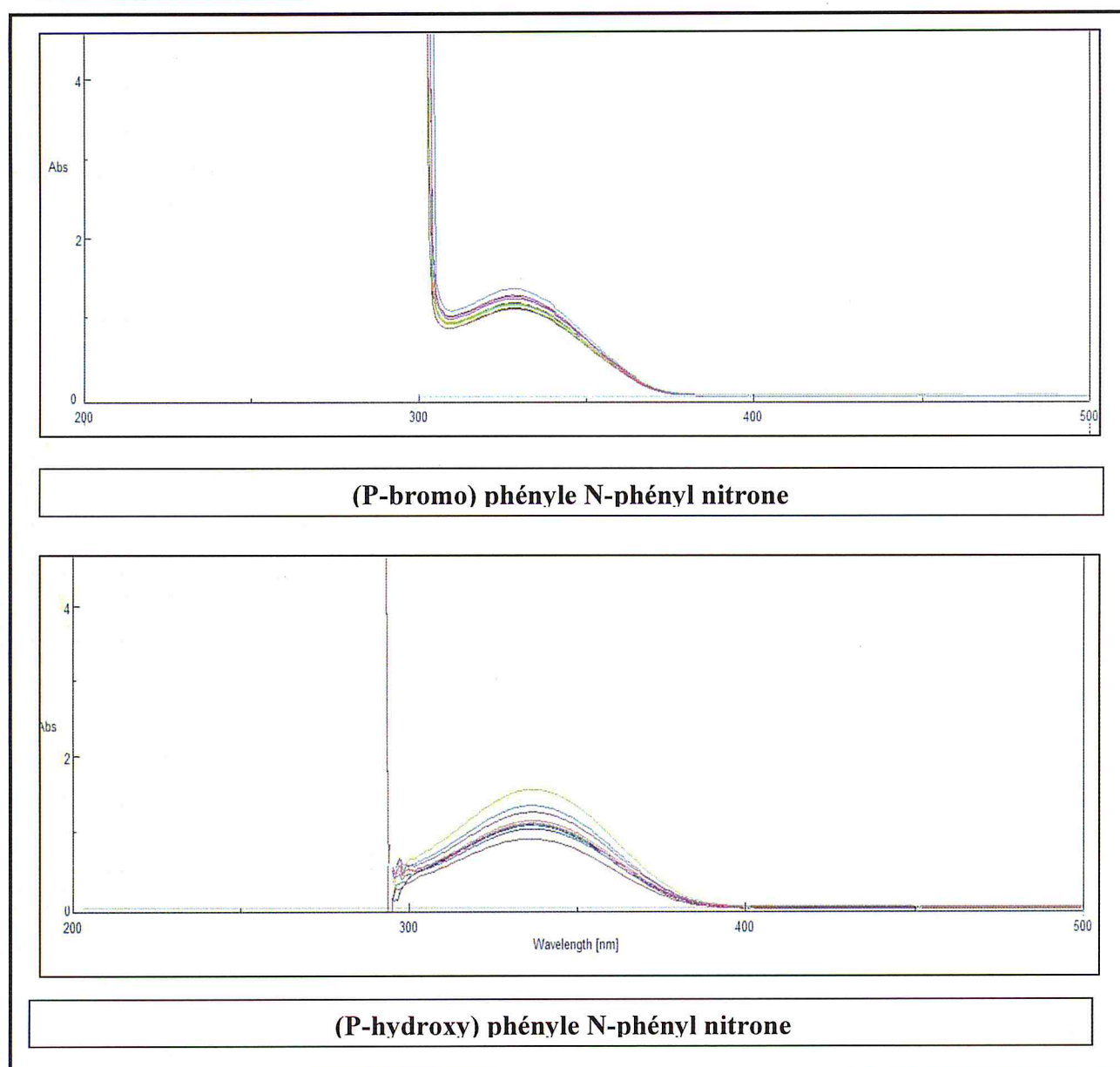


Figure (17) : Spectres d'absorbance des nitrones avec la β -CD à différentes concentrations.

On remarque que le spectre de nitrone est le même que celui de la nitrone complexée avec un coefficient d'absorbance plus faible. La solution de la nitrone présente une absorbance maximale à une longueur d'onde entre 300 et 400 nm. La diminution de la valeur d'absorbance de la solution de nitrone témoigne de la diminution de la concentration de la nitrone. Cela ne peut être expliqué par l'inclusion de la nitrone dans la cavité de la β -cyclodextrine dans la solution. Ces résultats mis en évidence que la nitrone est effectivement complexé par la β -cyclodextrine.

Dans les spectres des figures (16) et (17), nous avons déterminés l'absorbance à λ_{\max} de la nitrone à différentes concentrations en β -CD. les resultats obtenues sont données dans le tableau (6). A partir des valeurs obtenues, on trace $([\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A = f([\beta\text{-CD}]))$ pour obtenir la courbe de « Benesi-Hidebrand », qui sont représentés dans les figures (18) et (19):

Tableau (6) : Concentration de nitrones et β -cyclodextrine dans les solutions analysées et leurs absorbance a λ_{max} correspondante.

NIT	SOLUTION	V CD (μ l)	[CD]	1/[CD]	[Nit]	[B-CD]/[Nit]	Abs (nm)	D Abs	[CD][nit]/D Abs
P-OC2H5	1	0	0,00E+00	0,000	5,00E-05	0,00E+00	1,364	0	0,00E+00
	2	25	6,25E-04	1600,000	5,00E-05	1,25E+01	0,571	0,559	5,59E-08
	3	100	2,50E-03	400,000	5,00E-05	5,00E+01	0,94	0,19	6,58E-07
	4	150	3,75E-03	266,667	5,00E-05	7,50E+01	0,814	0,316	5,93E-07
	5	200	5,00E-03	200,000	5,00E-05	1,00E+02	0,859	0,271	9,23E-07
	6	400	1,00E-02	100,000	5,00E-05	2,00E+02	0,861	0,269	1,86E-06
P-OCH3	1	0	0,00E+00	0,000	5,00E-05	0,00E+00	1,08	0	0,00E+00
	2	25	6,25E-04	1600,000	5,00E-05	1,25E+01	0,917	0,163	1,92E-07
	3	50	1,25E-03	800,000	5,00E-05	2,50E+01	0,765	0,315	1,98E-07
	4	100	2,50E-03	400,000	5,00E-05	5,00E+01	0,775	0,305	4,10E-07
	5	150	3,75E-03	266,667	5,00E-05	7,50E+01	0,706	0,374	5,01E-07
	6	300	7,50E-03	133,333	5,00E-05	1,50E+02	0,847	0,233	1,61E-06
	7	400	1,00E-02	100,000	5,00E-05	2,00E+02	0,842	0,238	2,10E-06
	8	600	1,50E-02	66,667	5,00E-05	3,00E+02	0,775	0,305	2,46E-06
	9	800	2,00E-02	50,000	5,00E-05	4,00E+02	0,799	0,281	3,56E-06
P-CI	1	0	0,00E+00	0,000	5,00E-05	0,00E+00	1,429	0	0,00E+00
	2	25	6,25E-04	1600,000	5,00E-05	1,25E+01	1,212	0,217	1,44E-07
	3	100	2,50E-03	400,000	5,00E-05	5,00E+01	1,2078	0,2212	5,65E-07
	4	150	3,75E-03	266,667	5,00E-05	7,50E+01	1,129	0,3	6,25E-07
	5	200	5,00E-03	200,000	5,00E-05	1,00E+02	1,28	0,149	1,68E-06
	6	400	1,00E-02	100,000	5,00E-05	2,00E+02	1,252	0,177	2,82E-06
	7	600	1,50E-02	66,667	5,00E-05	3,00E+02	1,213	0,216	3,47E-06
P-Br	1	0	0,00E+00	0,000	5,00E-05	0,00E+00	1,268	0	0,00E+00
	2	25	6,25E-04	1600,000	5,00E-05	1,25E+01	1,088	0,18	1,74E-07
	3	50	1,25E-03	800,000	5,00E-05	2,50E+01	1,128	0,14	4,46E-07
	4	100	2,50E-03	400,000	5,00E-05	5,00E+01	1,052	0,216	5,79E-07
	5	150	3,75E-03	266,667	5,00E-05	7,50E+01	1,05	0,218	8,60E-07
	6	200	5,00E-03	200,000	5,00E-05	1,00E+02	1,055	0,213	1,17E-06
	7	300	7,50E-03	133,333	5,00E-05	1,50E+02	1,022	0,246	1,52E-06
	8	400	1,00E-02	100,000	5,00E-05	2,00E+02	1,013	0,255	1,96E-06
P-OH	1	0	0,00E+00	0,000	5,00E-05	0,00E+00	0,825	0	0,00E+00
	2	25	6,25E-04	1600,000	5,00E-05	1,25E+01	1,091	0,177	1,77E-07
	3	50	1,25E-03	800,000	5,00E-05	2,50E+01	1,0891	0,1789	3,49E-07
	4	100	2,50E-03	400,000	5,00E-05	5,00E+01	1,163	0,105	1,19E-06
	5	200	5,00E-03	200,000	5,00E-05	1,00E+02	1,135	0,133	1,88E-06
	6	300	7,50E-03	133,333	5,00E-05	1,50E+02	1,14	0,128	2,93E-06
	7	400	1,00E-02	100,000	5,00E-05	2,00E+02	1,118	0,15	3,33E-06

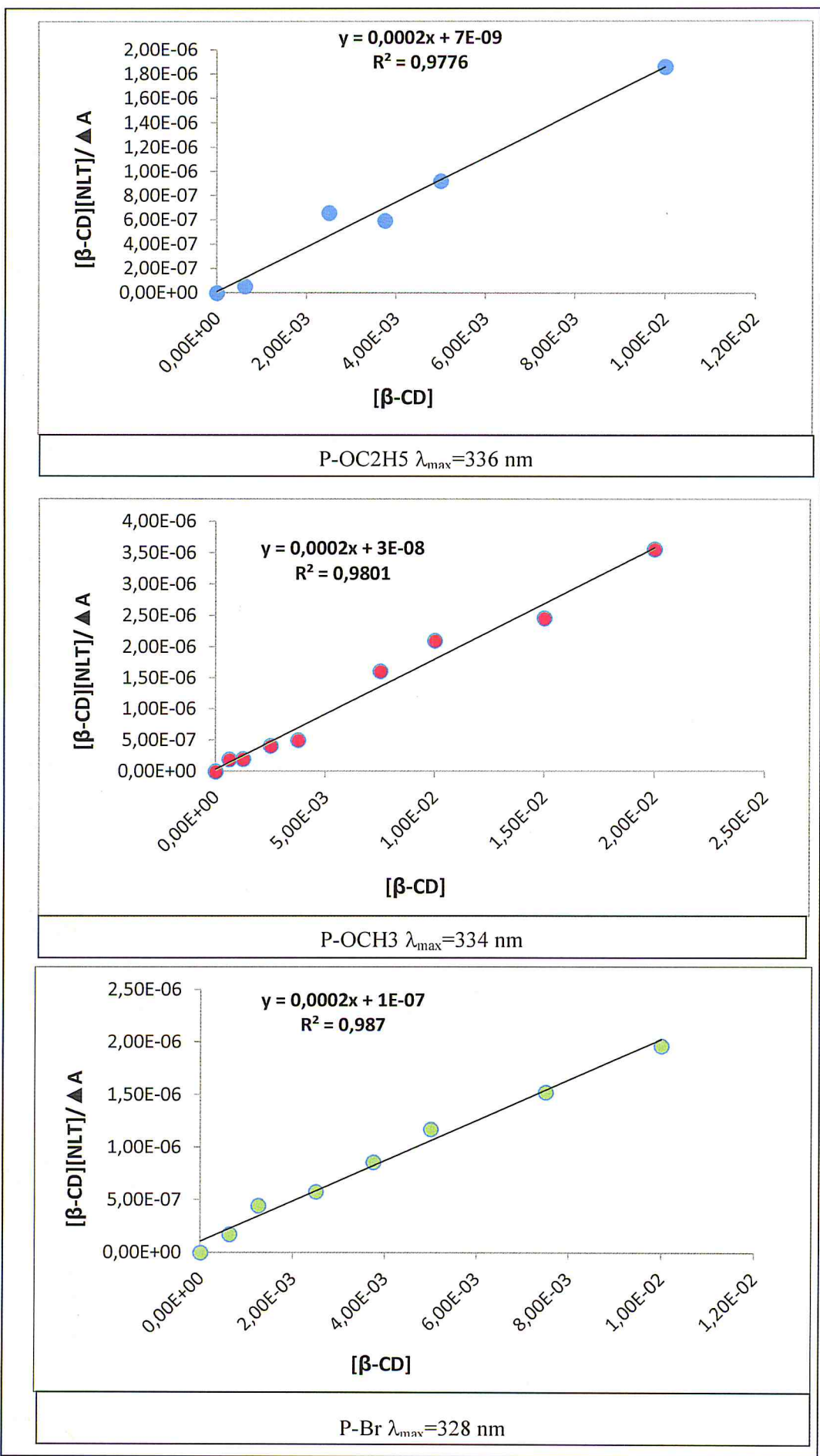


Figure (18) : Courbes ([β-CD][Nit]/ΔA (λ_{max} nm)=f([β-CD])) pour les complexes synthétisées.

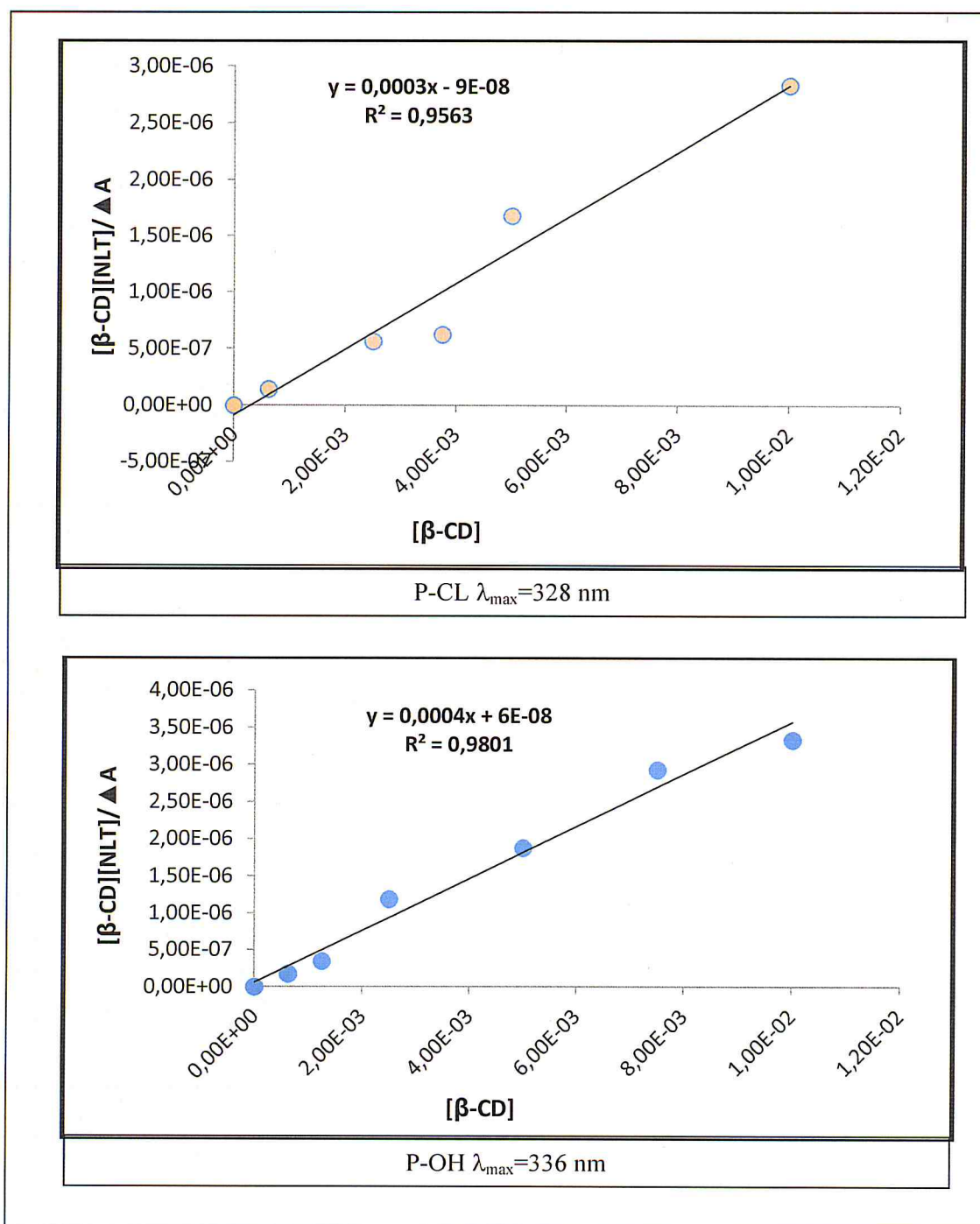


Figure (19) : Courbes $([\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A (\lambda_{\text{max}} \text{ nm}))=f([\beta\text{-CD}])$ pour les complexes synthétisées.

D'après les figures (18) et (19), on remarque que les courbes obtenues sont des droites, donc l'hypothèse que les complexes Nit-β-CD sont de stichométries (1G : 1H) est vérifié. Les équations de ces courbes sont données dans le tableau (7) avec leurs coefficients de corrélation.

Tableau (7) : Equations des courbes ($[\beta\text{-CD}][\text{Nit}]/\Delta A = f([\beta\text{-CD}])$) des complexes et leurs coefficient de corrélation.

Complexes	Equation	Coefficient de corrélation
P-OH	Abs = 0,0004c + 6E-08	0,9801
P-Cl	Abs = 0,0002c + 3E-08	0,9586
P-Br	Abs = 0,0002c + 1E-07	0,987
P-OCH3	Abs = 0,0002c + 3E-08	0,9801
P-OC2H5	Abs = 0,0002c + 7E-09	0,9776

À partir de ces équations et équation (I), donné ci-dessus, on déduit la valeur de la constante de complexation à partir de la pente P et le coefficient d'absorbance à partir de l'ordonnée a l'origine A comme le montre les équations suivant :

$$A = 1/ K\alpha\epsilon \quad , \quad P = 1/\epsilon$$

Donc, la valeur de la constante d'association est : $K\alpha = P/A$

Ainsi pour le complexe Nit-β-CD, nous avons obtenue des constantes d'association données dans le tableau 8.

Tableau (8) : Valeurs de constante des complexes Nit-βCD.

complexe	Structure	Constante d'association (M ⁻¹)
βCD/P-Cl	ClC ₁₃ H ₁₁ NO	3333,333
βCD/P-Br	BrC ₁₃ H ₁₁ NO	2000
βCD/P-OH	OHC ₁₃ H ₁₁ NO	6666,667
βCD/P-OCH3	OCH ₃ C ₁₃ H ₁₁ NO	6666,667
βCD/P-OC ₂ H ₅	OC ₂ H ₅ C ₁₃ H ₁₁ NO	28571,429

La constante d'association des complexes d'inclusions formées à partir des nitrones et β-CD sont obtenues avec des valeurs très proches et grandes, ce qui confirme la stabilité des complexes Nit/β-CD. Cela nous laisse espérer la possibilité de synthétiser et isoler pour les identifiées.

V.2. Conclusion

Nous avons donc synthétisé des complexes Nit/ β -CD qui nous a permis, d'une part, la mise en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion entre la β -cyclodextrine (la molécule hôte) et la molécule de la nitroène (la molécule invitée), avec une constante d'association élevée. D'autre part, la détermination des constantes de stabilité (k_a) met en évidence l'interaction entre la β -cyclodextrine et le nitroène qui semble très forte.

Chapitre VI

Synthèse et caractérisation Des complexes d'inclusion

Les CDs sont entourés de molécules d'eau d'hydratation et leur cavité apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau, ce qui est énergétiquement défavorable (interactions polaire – apolaire). Ces molécules d'eau peuvent être facilement substituées par une ou plusieurs molécules "invitées" hydrophobes comme la C,aryl,N- phénylnitrone pour former des complexes d'inclusion avec la β-cyclodextrine et la C, aryl, N-phénylnitrone de type "hôte-invité".

Il existe une grande famille de complexes moléculaires : les complexes d'inclusion de type "hôte-invité", à base de molécules de cyclodextrine. Ces complexes peuvent conduire à l'élaboration d'architectures supramoléculaires tout à fait originales.

Dans notre travail, une part importante sera consacrée aux facteurs physico-chimiques qui conditionnent la complexation d'une série des nitrones avec la β- cyclodextrine.

VI.1. Synthèse du complexe C, aryl, N-phénylnitrone/β-CD :

La complexation a été effectuée en utilisant la méthode standard , Le complexe a été obtenu par agitation pendant 36 à 48 heures à 25°C d'une quantité équimolaire de nitrone avec une solution saturée de β-CD dans l'eau distillée. Lors de la formation du complexe, nous avons remarqué que la nitrone qui flottait au début de la réaction sur la surface de l'eau disparaît dans la solution qui devient trouble. Après un certain temps, on obtient un précipité et la solution devient claire. Ce dernier a été séparé par filtration.

Un tableau récapitulatif des rendements obtenus du chaque complexe NIT/ β-CD est donné ci-dessous (tableau 9).

Tableau (9) : Rendements en complexe NIT/ β -CD à 25 °C

Complexe	P-No2	P-CL	P-Br	P-OH	DFN	P-OCH ₃	P-OC ₂ H ₅
Rdt (%)	10,49	4,58	2,81	4,47	16,05	16,48	6,27

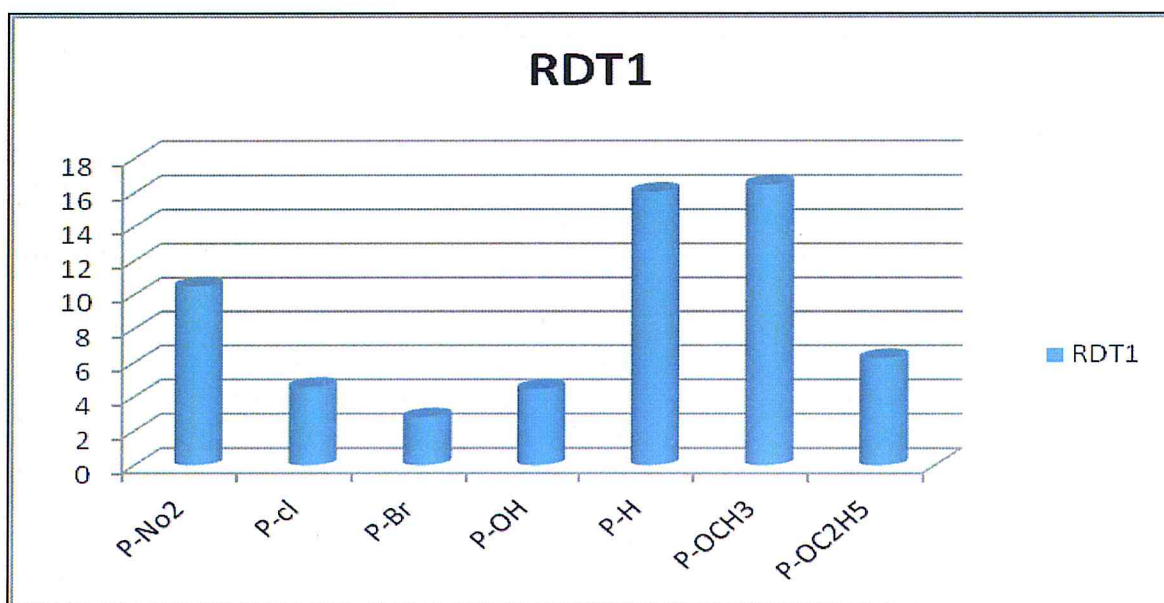


Figure 20 : histogramme des rendements de chaque complexe NIT/ β -CD

On remarque, que nous avons obtenu de bons rendements lors du processus de complexation entre la β -cyclodextrine et les nitrones utilisées. Ces rendements sont globalement satisfaisants et dépendent de la stabilité des complexes.

VI.2. Caractérisation du complexe nitrone/ β -cyclodextrine :

La formation d'un complexe d'inclusion entre la β -CD et une molécule invitée peut être vérifiée à l'aide de différentes techniques d'analyse.

Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier ces complexes d'inclusion. Elles permettent, d'une part de mettre en évidence leur formation et d'autre part, de déterminer leur stœchiométrie et leur stabilité.

Ces différentes techniques reposent sur les modifications des propriétés physicochimiques ou optiques de la molécule complexée liées à la modification de sa solubilité ou de son microenvironnement. Les techniques couramment utilisées sont : la spectroscopie d'absorbance (UV-visible), la spectroscopie de masse (SM), la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), spectroscopie Infrarouge (IR), diffraction de rayons etc.....

Ces techniques ont des approches qualitatives (il s'agit juste de s'assurer qu'il y ait eu inclusion) et/ou quantitatives si elles permettent de déterminer la constante d'association.

L'objectif dans cette partie nous sommes limités la caractérisation de complexes d'inclusion obtenus par deux techniques :

- a) spectroscopie vibrationnelle FT-IR,
- b) spectroscopie de masse (SM),

VI.2.1. Spectroscopie Infra-Rouge (FT-IR) :

La technique d'analyse par spectroscopie infrarouge permet d'étudier l'arrangement des atomes et les distances interatomiques. Ces mesures sont généralement réalisées avec un échantillon à l'état solide. Les spectres obtenus montrent une superposition des spectres de chacun des constituants si on étudie leur mélange physique, en revanche les spectres des complexes présentent généralement un léger déplacement des pics [82].

D'après la littérature, la bande OH caractéristique des cyclodextrines est influencée par la formation du complexe. Aussi les bandes de la partie incluse de la molécule invitée sont généralement déplacées avec diminution de leur intensité suite à la modification de l'environnement de l'invité.

Dans la figure (21), on représenté à titre d'exemples les spectres de la β -Cyclodextrine (β -CD), la C, N-diphényl nitrone et du complexe Nitrone- β -CD respectivement (les spectres des autres complexes et nitrones seules sont données en Annexe I).

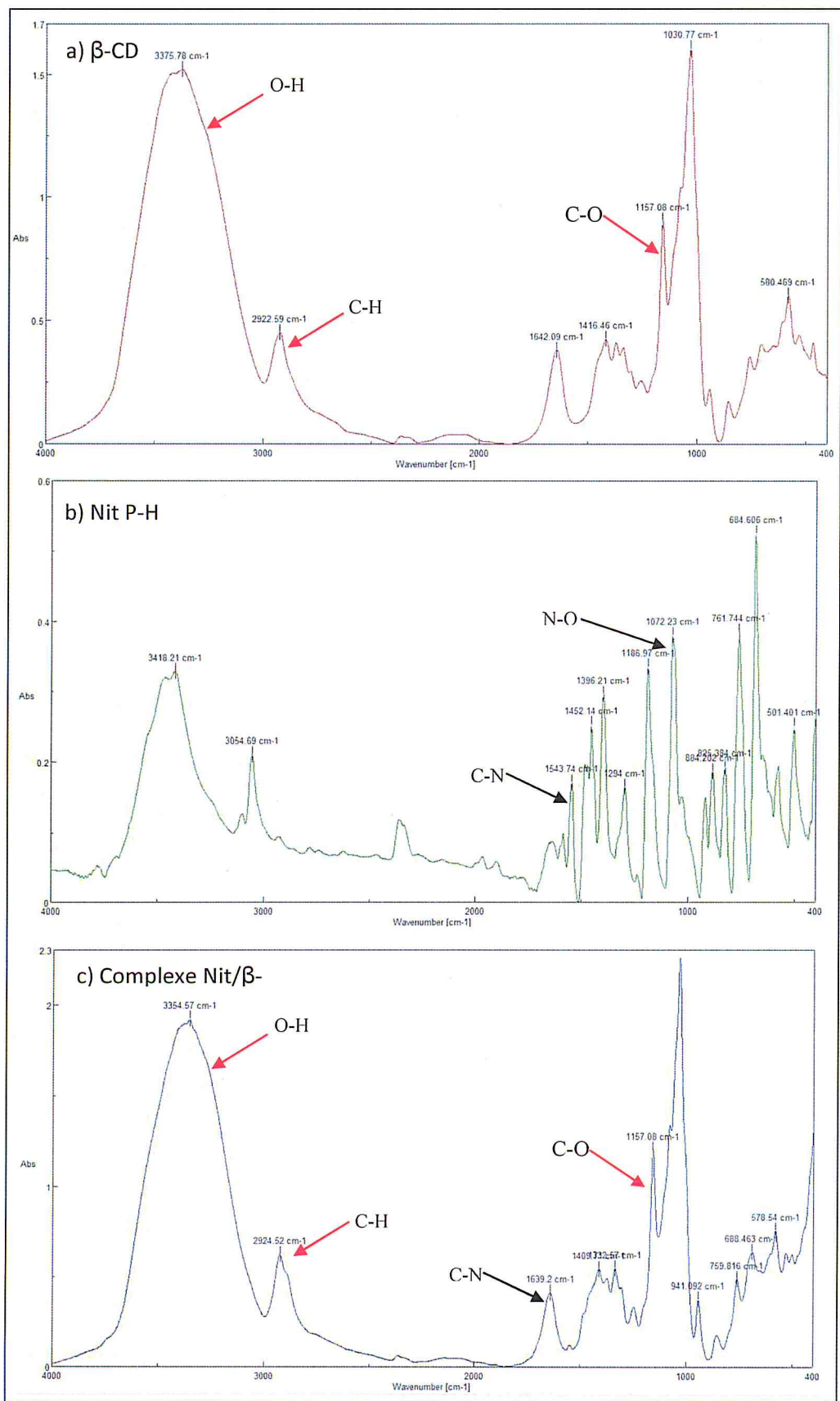


Figure (21) : Spectre FT-IR de a) β -CD b) Nit P-H c) complexe Nit- β -CD en pastille de KBr

Les fréquences des principales bandes d'absorption en infrarouge des complexes synthétisées sont rassemblées dans le tableau 10.

Tableau 10: Fréquences des principales bandes d'absorption en infrarouge pastille de KBr des complexes synthétisées.

composé		Fréquence d'absorption (cm ⁻¹)						
		N-O	C=N	C-X		C-O	O-H	C-H
B-CD		/	/	/		1157.08	3375.78	2922.59
P-CL	complexe	1075.12	1545.67	C-CL	840.12	1192.76	3451.96	/
	nitrone	1071.26	1543.74	C-CL	841.26	/	/	/
P-Br	complexe	1069.33	1482.99	C- Br.	686.534	1188.9	3444.24	/
	nitrone	1068.37	1638.23	C- Br.	684.6	/	/	/
P-NO₂	complexe	1073.19	1594.84	C-NO ₂	1400.07- 1510.95	/	3418.21	/
	nitrone	1074.16	1595.81	C-NO ₂	1343.18- 1511.92	/	/	/
P-OH	complexe	1054.87	1603.52	C- OH	3448.1	/	34481	2671.89
	nitrone	1054.87	1602.56	C- OH	3454.85	/		2588
P-H	complexe	/	1639.2	C- H	2924.52	1157.08	3354.57	2924.52
	nitrone	1072.23	1543.74	C- H	3054.69	/	/	3054.69
P-OCH₃	complexe	1030.44	1605.45	C- OCH ₃	1261.22	1158.04	3408.57	/
	nitrone	/	1474.31	C -OCH ₃	1281.47	/	/	/
P-OC₂H₅	complexe	1033.66	1603.52	C- OC ₂ H ₅	1256.4	1159.01	3399.89	2926.45
	nitrone	1072.23	1601.59	C- OC ₂ H ₅	1257.36	/	/	/

- Les bandes à 1157.08 cm⁻¹, 3375.78cm⁻¹ et 2922.59 de la Figure 21(a) sont caractéristiques de la cyclodextrine (C-O-C). Ces mêmes bandes sont observées sur le spectre du complexe d'inclusion 21 (c).

- La bande à 1157.08 cm⁻¹ dans la Figure 21 (c) caractéristique des groupements Carbonyles (C-O), confirme la fixation de la diphenyle nitrone dans la cavité de la β-cyclodextrine. L'apparition de la bande à 2924.52cm⁻¹ est caractéristique des groupements alcane.

- La bande à 1543.74 cm⁻¹ dans les spectres 21 (b) et 21 (c) est caractéristique du groupement C=N de la nitrone ; Ce qui confirme l'inclusion de la nitrone dans la cavité de la β-cyclodextrine.

- La bande à 1072.23 cm⁻¹ dans le spectre 21 (b) est caractéristique du groupement N-O de la nitrone confirme aussi l'inclusion de la nitrone dans la cavité de la β-cyclodextrine.

-En fin, les bandes entre 3300 et 3400 cm⁻¹ sont caractéristiques des groupements OH.

VI.2.2. Spectroscopie de masse (SM):

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines de la chimie appliquée [83].

Les spectres de masses du complexe d'inclusion analysés β -CD/Nit P-H sont données dans la figure (22). (Les spectres de masse des autres complexes et nitrones pures sont données en annexe **II**).

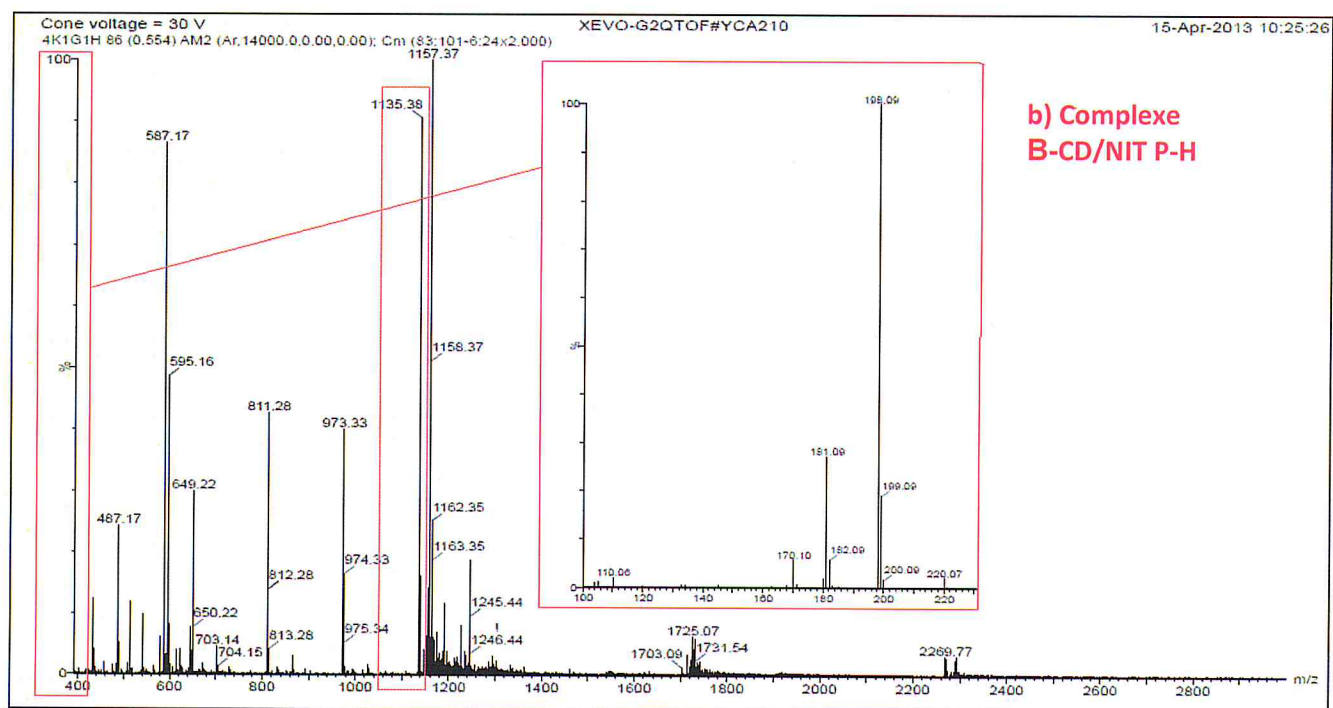
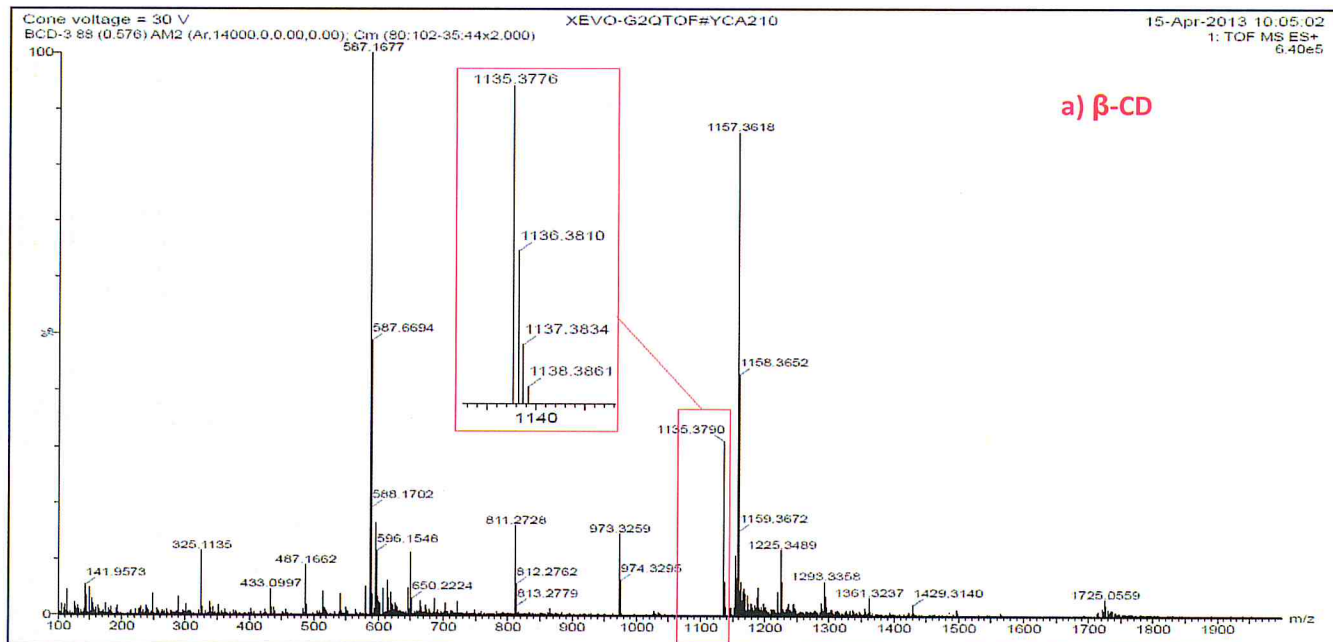


Figure (22) Spectres de masse en impact électronique de a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-H,

L'examen des spectres de masse en impact électronique de la figure (22) nous a permis d'identifier les pics moléculaires caractéristique des complexes β -CD/Nitronne synthétisés qui sont rassemblés dans le tableau 11.

Tableau 11: Pics moléculaires principales en impact électronique des complexes synthétisés et des nitrones pures utilisés donnés par spectroscopie de masse.

compose	Masse molaire théorique		Masse (M/Z)	remarques
B-CD	1135		1135.3776	/
Complexes1	Nit P-CL	213	/	Absence du : 1/ pique moléculaire du complexe 2/pique moléculaire de la nitronne
	β -CD	1135	1135.38	
	complexe β -CD/Nit P-CL	1348	/	
Complexes2	NIT P-Br	231	/	Absence du : 1/ pique moléculaire du complexe 2/pique moléculaire de la nitronne
	β -CD	1135	1135.39	
	complexe β -CD/Nit P-Br	1366	/	
Complexes3	NIT P-NO ₂	242	243.08	Absence du : 1/ pique moléculaire de la β -CD 2/complexe 1-1
	β -CD	1135	/	
	complexe β -CD/Nit P-NO ₂	1376	1377.45	
Complexes4	NIT P-OH	213	214.09	/
	β -CD	1135	1135.38	
	complexe β -CD/Nit P-OH	1348	/	
Complexes5	NIT P-H	197	198.09	/
	β -CD	1135	1135.38	
	complexe β -CD/Nit P-H	1332	/	
Complexes6	NIT P-OCH ₃	227	228.10	Complexe 1-1
	β -CD	1135	1135.38	
	complexe β -CD/Nit P-OCH ₃	1362	1362.48	
Complexes7	NIT P-OC ₂ H ₅	241	242.12	Complexe 1-1
	β -CD	1135	1135.39	
	complexe β -CD/Nit P-OC ₂ H ₅	1376	1376.49	

La présence des pics moléculaires correspondant à la nitronne, la β -CD et/ou le complexe dans le spectre de masse des complexes analysés confirme bien la formation des complexes.

Cette méthode est être intéressante et efficace pour l'identification du complexe puisque par la donne des masses de la nitrone et de la β -CD permet de déduire la stœchiométrie du complexe dans certain cas.

Dans certain cas, on remarque l'absence du pique moléculaire du complexe analysé, ceci ne signifie pas automatiquement l'absence de ce dernier, mais il pourrait être du soit à l'instabilité du complexe lors de l'analyse ou à la performance du spectromètre utilisé.

VI.4.Conclusion

Dans ce chapitre, Nous avons synthétisé les complexe d'inclusion nitrones/ β -CD avec de bon rendement, ces dernier dépendent de la stabilité de complexe. La caractérisation du complexe a été réalisée par méthode de spectrophotométrie de vibration FT-IR, et par spectroscopie de masse SM.

L'analyse par FT-IR, nous a permis l'identification des piques moléculaires correspondants aux nitrones et β -CD dans le spectre du complexe, donc, confirmation de la complexation.

L'analyse pare SM, nous a permis la confirmation de la stœchiométrie obtenu dans le chapitre III.

Chapitre VII

L'activité antioxydant

VII. Activité antioxydant des nitrones libres et complexés :

Selon la définition générique, les antioxydants sont des substances qui, à faible concentration, sont capables d'inhiber ou de retarder de manière significative les oxydations des molécules. Les antioxydants protègent les molécules *in vitro* mais également au sein de notre organisme en empêchant le vieillissement prématuré des cellules.

Si l'équilibre entre la formation des radicaux libres et la protection assurée par les antioxydants est rompu, les radicaux libres peuvent devenir nocif pour l'organisme, il est alors question de stress oxydatif [84]

Les nitrones ont trouvé de nombreuses applications en synthèse organique, à savoir comme des substrats de choix pour les réactions de cycloaddition. Elles sont utilisées d'une autre part, comme de bonnes sondes pour la mise en évidence des radicaux libres en recherche par RPE et d'autre part, comme des antioxydants en médecine. Ce sont généralement des antioxydants "chain-breaking".

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos échantillons est réalisée par trois tests chimiques, chacun de ces tests correspond à un des trois mécanismes de réaction qui sont :

- Mécanisme de réaction HAT « transfert d'atome d'hydrogène » réalisé par la méthode de β carotène.
- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode de FRAP « ferric reducing antioxydant ».
- Mécanisme de réaction HAT et SET à la fois réalisé par la méthode de DPPH « 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole ».

VII.1. La méthode de piégeage du radical DPPH :

VII.1.1 Principe

Le principe de cette méthode, tel qu'il est décrit par BLOIS et coll. En 1958 [85], est basé sur la mesure du piégeage du radical libre DPPH (Diphényl picryl hydrazyl) en solution dans l'éthanol ou le méthanol. Ce dernier possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote Figure (23). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée, caractérisé par une absorbance en solution d'éthanol centré à environ 517 nm.

L'addition d'un antioxydant qui peut céder un atome d'hydrogène ou un électron libre conduit à la formation de la forme réduite DPPH-H (2) avec une décoloration de la solution. Cette décoloration est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Elle peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Cette méthode fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydante des nitrones et de leurs complexes.

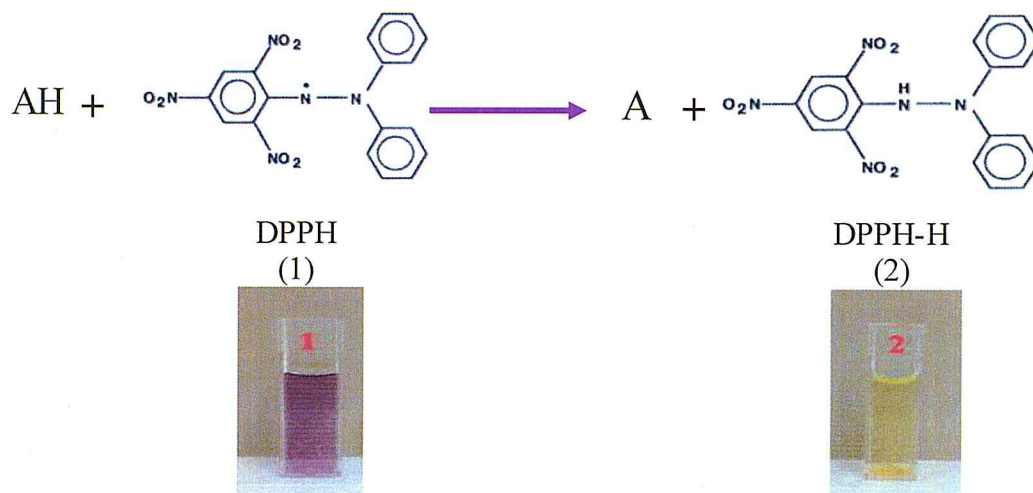


Figure (23) : Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant AH.

Les résultats de l'activité de piégeage du radical libre DPPH par la série des C- Aryl, N-phényle nitrone sont donnés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Absorbance à 517nm des solutions de nitrone Lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH

Nitrones	Abs	A%
nitrone P-NO ₂	0,535	4,357
nitrone P-Cl	0,526	5,946
nitrone P-Br	0,539	3,732
nitrone P-H	0,534	4,625
nitrone P-OH	0,461	17,661
nitrone P-OC ₂ H ₅	0,531	5,232
nitrone P-OCH ₃	0,534	4,607
BHA	0,056	89,910
BHT	0,084	84,928
PBN	0,509	9,071

Les résultats montrent que l'activité de piégeage du radical libre DPPH varie d'une nitrone à une autre selon le substituant porté par l'aryle de la nitrone. La nitrone hydroxylé présente la meilleure activité (17,66%), ces bons résultats sont dus à son double action de piégeur.

La première action est due à la présence de la fonction nitrone qui réagit avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote, ce qui conduit à la formation d'un adduit de spin de type nitroxyde de l'atome d'hydrogène qui se trouve à deux liaisons du groupement nitroxyde est nommé hydrogène β Figure (24).

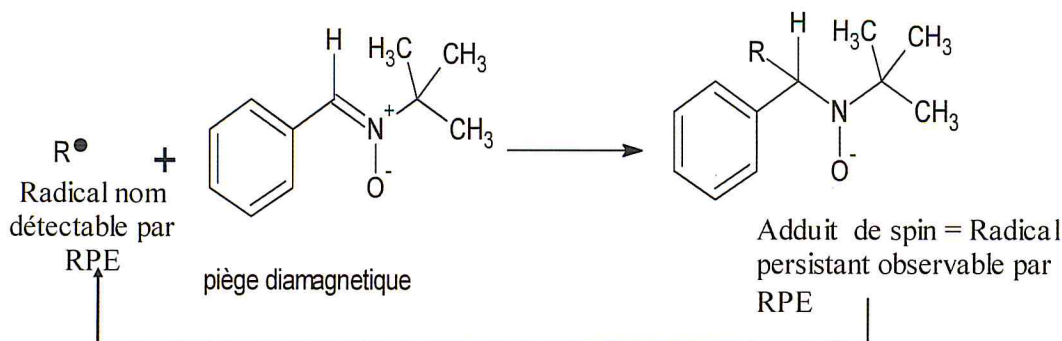


Figure (24): principe de la technique de piégeage de spin par la nitron

La deuxième action est due à la présence de la fonction phénol. Les composés phénoliques connus par leurs fortes activités à piéger les radicaux libres selon le mécanisme présenté par la figure (25) :

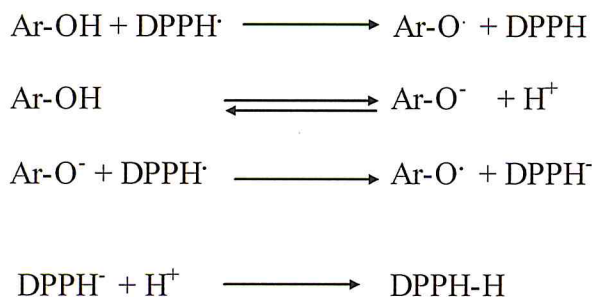


Figure (25) : mécanisme expliquant l'activité antiradicalaire des phénols.

Le classement de cette activité selon la substitution est comme suit : Hydroxy (17,660) chloro (5,94), éthoxylé (5,23), C, N-diphényle nitron (4,625), méthoxyle (4,60), nitro (4,35), Bromo (3,73). Même si l'activité de ces nitrones est inférieure à celle des antioxydants standards (BHT (84,928) et BHA (89,910)). Ces résultats sont très promoteurs, puisque malgré leurs faibles solubilités, ils se rapprochent ou dépassent, dans le cas de la nitron hydroxyle, l'activité de la PBN utilisé comme antioxydant de référence de la même famille. En plus d'avoir des effets protecteurs varies sur l'organisme, la PBN possède un caractère partiellement amphiphile qui serait à l'origine de sa bonne biodisponibilité in vivo. En effet, si par opposition à la DMPO, la PBN s'est révélée plus efficace en tant qu'agent à propriétés thérapeutiques, c'est par la grande facilité qu'elle possède à se solubiliser dans les fluides biologiques [86].

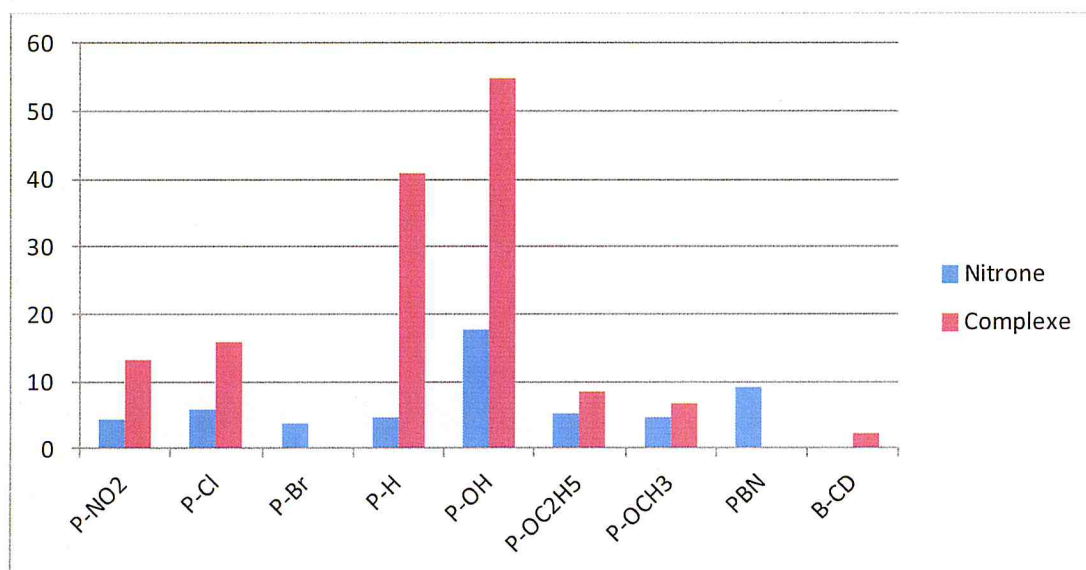
Ces résultats nous ont permis alors d'espérer avoir une meilleure activité si on améliore leur solubilité dans les milieux aqueux. Nous avons alors pensé à insérer ces nitrones dans des molécules cages. Cette technique devrait en principe améliorer leur solubilité sans modifier leur structure. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (13).

Tableau 13 : Absorbance à 517nm des solutions des complexes lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH

complexes	Abs (517nm)	A%
complexe P-NO ₂	0,486	13,196
complexe P-Cl	0,471	15,892
complexe P-Br	(a)	(a)
complexe P-H	0,339	41,036
Complexe P-OH	0,253	54,857
Complexe P-OC ₂ H ₅	0,511	8,678
Complexe P-OCH ₃	0,521	6,911
B-CD	0,546	<u>2,375</u>
PBN	0,509	9,0717

(a) : le complexe de la nitroène bromo n'est pas soluble dans le mélange (il forme un précipité).

La comparaison de l'activité antioxydante des complexes avec celle des nitrones est présentée dans les histogrammes (figure 26)

**Figure (26)** : Comparaison de l'activité antioxydante des complexes avec celle des nitrones

La figure montre l'intérêt majeur de la complexation. En effet, l'activité des nitrones est augmentée d'un facteur de 3 ou même de dix comme c'est le cas pour la nitroène hydroxylée et la C, N-diphényle nitroène. Cette augmentation n'est pas due à l'activité de la β -cyclodextrine, puisque cette dernière ne présente qu'une activité faible de 2,375%. Cette hypothèse est confirmée par la littérature. Il est en effet décrit que la β -cyclodextrine ne présente aucune activité. L'amélioration de l'activité est due alors à la complexation de ces nitrones dans la cavité de la β -cyclodextrine. Le complexe obtenu a augmenté donc la solubilité (étant plus soluble) de ces nitrones dans l'éthanol (ou tout milieu biologique ou aqueux) et par conséquent le contact avec le radical libre.

VII.2. La méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

VII.2.1. Principe :

C'est une méthode universel, le principe de cette méthode crier par « Oyaizu, 1986 » est basé sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virage de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'absorbance à 700nm et en surveillant l'augmentation de l'intensité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel. Une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des antioxydants testés.

Le pouvoir réducteur des nitrones est très intéressant puisqu'il atteint le même ordre que celui des antioxydants de référence. Cette activité est presque identifiée pour l'ensemble des nitrones ; elle varie de 1.36 à 1.39. Comme pour l'activité de piégeage du radical DPPH, la nitroxe hydroxyle a la meilleure activité qui atteint 1.43. D'autre part, la DPN a un pouvoir réducteur plus faible que celui des nitrones synthétisées ; cela est dû à la présence du cycle aromatique qui stabilise le radicale libre après le départ de l'électron.

Tableau 14 : Absorbances des nitrones lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm

Nitroxe	Abs
Nitroxe NO ₂	1,366
Nitroxe Cl	1,377
Nitroxe Br	1,363
Nitroxe H	1,376
Nitroxe OH	1,436
Nitroxe OCH ₃	1,386
Nitroxe OC ₂ H ₅	1,393
PBN	0,761
BHT	1,402
BHA	1,351
contrôle	0,134

Les résultats du test FRAP des complexes préparés sont donnés dans le tableau (15) :

Tableau 15 : Absorbances des complexes déterminé par la méthode FRAP à 700nm

Complexes	Abs
complexe NO ₂	1,465
complexe Cl	1,553
Complexe Br	(a)
complexe H	1,292
complexe OH	2,040
complexe OCH ₃	1,537
complexe OC ₂ H ₅	1,737
PBN	0,761
BCD	0,131
contrôle	0,1343

La figure (27) représente les histogrammes comparatifs de l'absorbance des nitrones et leurs complexes lors du test FRAP :

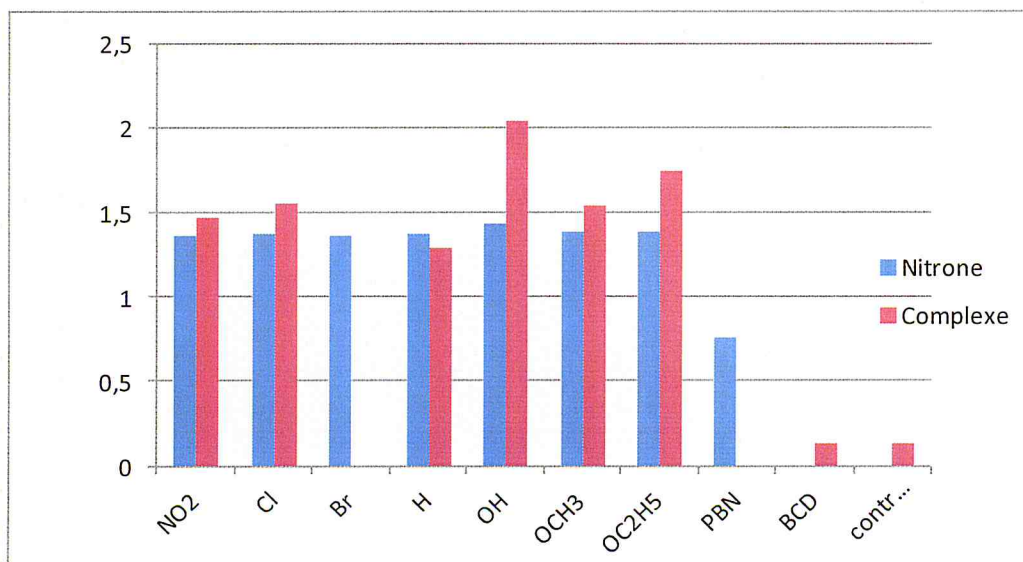


Figure (27) : Histogrammes comparatifs de l'absorbance des nitrones et leurs complexes lors du test FRAP

On remarque que les complexes présentent un pouvoir réducteur meilleur que celui des nitrones libres. Cette activité n'est pas due à la présence de la β -CD puisque cette dernière possède la même absorbance que le contrôle négatif.

VII.3. Méthode de la β -carotène:

VII.3.1. Principe :

Cette méthode se base sur la décoloration de la β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween 40. L'addition d'antioxydant induit un retard de la cinétique de la décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. La couleur jaune si elle persiste, indiquent la présence de substances antioxydants .

Cette méthode a été appliquée sur les nitrones et les complexes d'inclusion avec un suivi de perte de la couleur du β -carotène pendant 48 heures. Ce suivi est estimé par la mesure de l'absorbance des échantillons par spectrophotomètre UV-vis à une longueur d'onde de 490nm. L'ensemble de ces absorbances est donnée dans la figure (28).

Tableau 16 : Absorbances des solutions des nitrones lors du test de l'activité FRAP à 700nm

Temps (h)	0	1	2	24	48
P-NO ₂	0,2841	0,2841	0,2043	0,0972	0,0561
P-Cl	0,2841	0,2751	0,1535	0,0996	0,0542
P-Br	0,2841	0,2390	0,2134	0,1491	0,0792
P-OH	0,2841	0,2197	0,1561	0,0309	0,0114
P-OC ₂ H ₅	0,2841	0,2195	0,1346	0,0333	0,0250
P-OCH ₃	0,2841	0,2146	0,0907	0,0435	0,0431
BHA	0,2841	0,2917	0,2781	0,252	0,2106
B-CD	0,2841	0,1843	0,116	0,0655	0,0241
PBN	0,2841	0,2343	0,1908	0,0595	0,0412
blanc	0,2841	0,2207	0,1369	0,0262	0,0151

Tableau 17 : Absorbances des complexes synthétisés lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm

Temps (h)	0	1	2	24	48
P-H	0,2841	0,1988	0,1265	0,0596	0,0329
P-OH	0,2841	0,1236	0,1015	0,0875	0,0899
P-OC ₂ H ₅	0,2841	0,2383	0,1730	0,1341	0,1096
P-OCH ₃	0,2841	0,2279	0,0953	0,0719	0,0617
BHA	0,2841	0,2917	0,2781	0,252	0,2106
B-CD	0,2841	0,1843	0,116	0,0655	0,0241
PBN	0,2841	0,2343	0,1908	0,0595	0,0412
blanc	0,2841	0,2207	0,1369	0,0262	0,0151

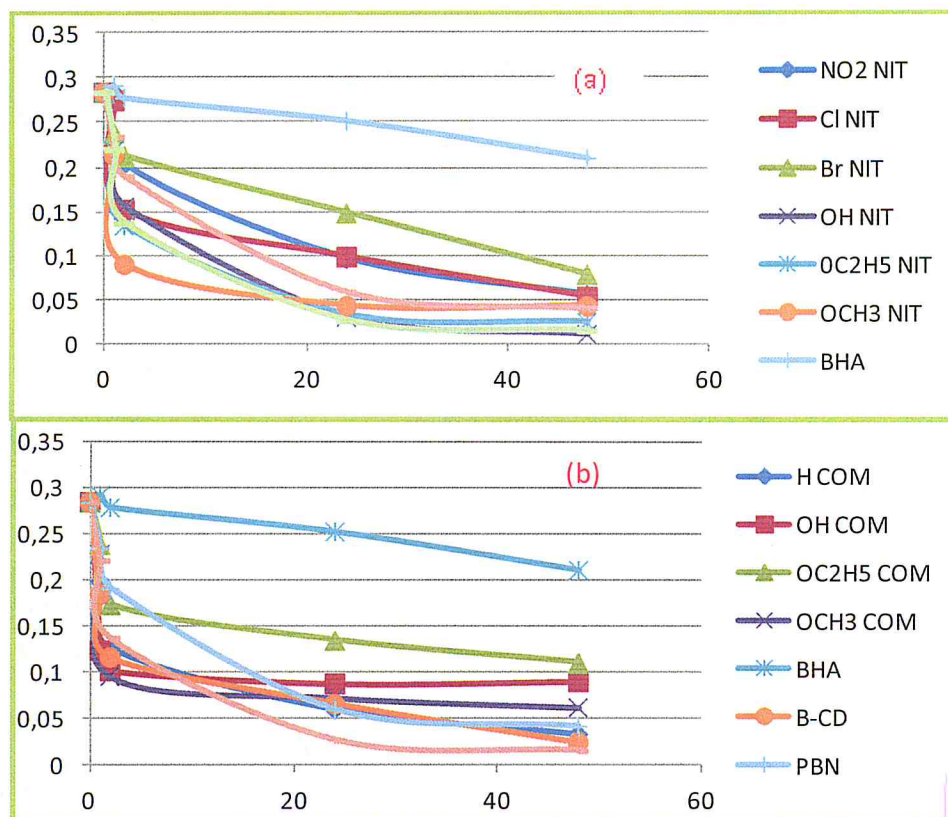


Figure (28) : Cinétique de blanchissement du β-carotène à 490nm en présence des antioxydants : nitrones (a) et complexes d'insertions (b) pendant 48 heures.

Le suivi de l'absorbance de β-carotène en présence de nos nitrones ou de complexes d'insertion, de contrôle positif (standards de référence BHT et BHA) et de contrôle négatif a donné des courbes qui montrent une diminution appréciable en un temps très court.

L'activité des nitrones n'est pas très importante par rapport à celle de la BHT et BHA. Même si les complexes semblent améliorer cette activité, celle-ci reste faible.

Dans le but de connaître le degré d'activité antioxydante de nos nitrones par rapport à celle de nos complexes d'insertion, on a calculé l'activité relative. L'ensemble des résultats obtenu sont représentés dans le tableau 18 et représenté sur la figure (29) :

Tableau 18: Activité relative des nitrones et de leurs complexes d'insertion.

	Activité relative (%)	
	Nitrones	Complexes
P-NO2	26,638	ND*
P-Cl	25,735	ND*
P-Br	37,606	ND*
P-H	ND*	15,622
P-OH	5,413	42,687
P-OC2H5	11,871	52,041
P-OCH3	20,465	29,297
β-CD	ND*	11,443
PBN	19,563	ND*

ND* : Non disponible

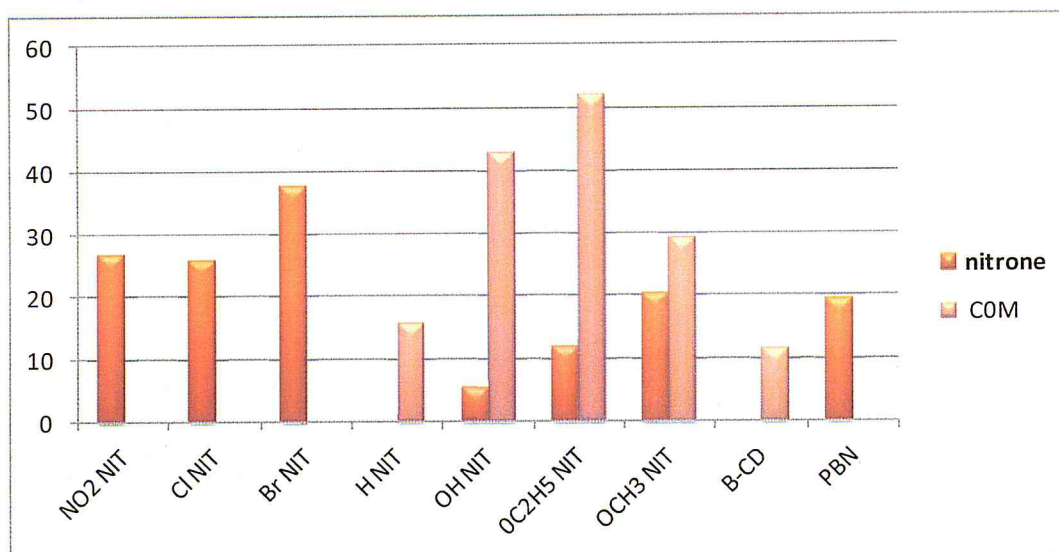


Figure (29): Histogrammes de l'activité relative des nitrones et leurs complexes d'insertions.

Comme pour les méthodes FRAP et DPPH, les complexes présentent une meilleure activité que celle des nitrones. Cela peut être expliquée par le fait que ces nitrones sont des bon donneurs d'électron et non pas de radical H[•]

VII.4. Conclusion :

L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones par trois méthodes qui reposent sur des différents mécanismes, nous a permis de conclure que les nitrones sont de bon donneurs d'électrons et non pas de radicaux libres H[•]. D'autre part, les complexes ont permis d'améliorer cette activité en augmentant leur solubilité dans les différents milieux aqueux utilisés.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a principalement été consacré à la synthèse et à l'étude des complexes d'inclusion nitrones/ β -Cyclodextrine et leurs activités Antioxydantes.

Nous avons préparé des complexes à partir d'une série des nitrones et β -cyclodextrine, le rendement obtenu entre 2,81% et 16,48%. Ces derniers dépendent de la stabilité de complexe.

Les complexes obtenu est analysé par spectroscopie Infrarouge (FT-IR) et spectrométrie de masse (SM).

L'analyse qualitative et quantitative par SM a permis de relever les constatations suivantes :

- La mis en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion entre la β -cyclodextrine (la molécule hôte) et la molécule de la nitrone (la molécule invitée).
- La stœchiométrie des complexes est sous la forme 1-1.

Notre apport dans cette étude concerne l'utilisation de la spectrométrie IRTF pour vérifier l'inclusion des nitrones dans la cavité de cyclodextrine.

La détermination de constante d'association (k_a) des complexes a obtenu par la méthode de « Benesi-Hildebrand », Les valeurs de cette dernière sont relativement grandes. Cela nous a permis de conclure que l'interaction entre la β -CD et les nitrones peuvent être très forte.

L'évaluation de l'activité antioxydante des complexes et nitrones par trois méthodes qui reposent sur des différents mécanismes, a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les complexes. Cela nous a permis d'améliorer cette activité en augmentant leur solubilité dans les différents.

Bibliographie

- [1] Breuer, E. Nitrones, Nitronates and Nitroxides, Patai, S.; Rappoport, Z. Ed. Wiley : Chichester, 1989, Chap. 3, 245-312
- [2] Patai, S.; Rappoport, Z. Ed. Wiley : Chichester, Breuer, E. Nitrones, Nitronates and Nitroxides, Chap. 3, 245-312, (1989)
- [3] Smith, L. I. Chem. Rev. 1938, 23, 193-285.
- [4] Thesing, J.; Sirremberg, W. Chem. Ber. 1958, 91, 1978-1980.
- [5] Merino, P. C. R. Chim. 2005, 8, 775-788.
- [6] Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, F.; Merchan, F.; Merino, P.; Tejero, T. Synth. Commun. 1994, 24, 2537-2550.
- [7] Thèse Doctorat « Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitrone utilisables comme sondes et agents thérapeutiques », Fanny choteau-mary, université d'avignonnet des pays de vaucluse, Juin 2011.
- [8] Colloque Scientifique « Option Génie », Synthèse d'une série d'isoxazolidines et leurs effets microbiologiques, n. saidjil, a. zeghdaoui, Avril 2006.
- [9] Janzen E. G., Blackburn B. J., Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping techniques (spin trapping). Photolysis of organolead, -tin, and -mercury compounds, J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 4481-4490.
- [10] Bolli. R. J. AM. call. Cardiol. 1988, 12, 239-249
- [11] Halliwell. B., gutteridge. J. M. C. Trends Neurosci. 1985, 8, 22-26.
- [12] Mc cord. J. M. N. Eng. J. Med. 1985, 312, 159-153.
- [13] Paller. M. S., Hoidal. J. R., Ferris. T. F. Jour. clin. Inverst. 1985, 8, 22-26.
- [14] Richardson, J. S. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993, 965, 73.
- [15] Oberley. L. W., Buettner, G. R. Cancer Research. 1979, 39, 1141-1194.
- [16] Hiramoto. K., Johkoh. H., Sako. K. I., Kikugawa. K. Free Rad. res. Comms.
- [17] Mc Cord. J. M. Science. 1974, 185, 529-531.
- [18] Harman. D. age, 1983, 6, 86-94.
- [19] Sakiniene. E., Collins. L. V. Arthritis. Res. 2002, 4, 196-200.
- [20] Pascal Bonnet, Carlos Jaime, Luc Morin-Allory ; α -, β - and γ -cyclodextrin dimers. Molecular modeling studies by molecular mechanics and molecular dynamics simulations, Journal of Organic Chemistry 2001, 66, 689-692.
- [21] Szejtli J. Chem. Rev. 1998, 98(5), 1743.
- [22] A. Villiers, Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique, C. R. Acad science, 1891, 536
- [23] F. Schardinger, Wien. Klin. Wochschr, 1904, 17, 207
- [24] K. Freudenberg, G. Blomquist, L. Ewald, K. Soff, Ber. Dtsch. Chem. Ges, 1936, 69, 1258
- [25] D. French, Adv. Carbohydrate Chemistry, 1957, 12, 189
- [26] F. Cramer, Einschlussverbindungen, Springer, Berlin, 1954
- [27] S. I. Murahashashi, et At, Tetrahedron lett, 1049, 1983.
- [28] S. Kobashi, T. Busujima, S. Nagayama, Synlett. 1999, 545.
- [29] S. BENHADI; Thèse de doctorat « Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux celluloseux »; Université de Nancy ; Novembre 2010

- [30] Jacob, J. ; Geßler, K. ; Hoffmann, D. ; Sanbe, H. ; Koizumi, K. ; Smith, S. M. ; Takaha, T. ; Saenger, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 606.
- [31] J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1988, p 450
- [32] K.-H. Frömming, J. Szejtli, *Cyclodextrin inclusion complexes, cyclodextrins in pharmacy*, Klumer Academies Publishers, Dodrecht/Boston/London, 1994
- [33] K.B. Lipkowitz, *Chemistry Review*, 1998, 98, 1829-1873
- [34] Research ,Fava et al., 1998 ; Reid et al., 2000.
- [35] Research Stella et Rajewski, 1997
- [36] K. Hanna; Thèse de doctorat « Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : Solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines »; L'INSA de Lyon ; Novembre 2004 ,38.
- [37] Research ;Kamiya et al., 1994, 1995 ;
- [38] Research ,Rajewski et Stella, 1996 ;
- [39] Research ,Prasad et al., 1999 ;
- [40] Research ,Zhang et al., 2002).
- [41] Hedges, A.R. (1998) Industrial applications of cyclodextrins, *Chem. Rev.*,98,2035- 2044.
- [42] Rajewski R. A., Stella V. J., *J. Pharm. Sci.* 1996, 85(11), 1142-1159
- [43] Fröming K.-H., Szejtli J., *Cyclodextrins in pharmacy*, Kluwer Academic Publishers :Dordrecht, 1994, p 224
- [44] Bushmann. HJ, Schollmeyer. E,*J.Cosmet.Sic*, 53,185-191,2002.
- [45] Numanoglu, U., T. Sen, N. Tarimci, M. Kartal, O. M. Koo, and H. Onyuksel. 2007. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS PharmSciTech* 8:E85.
- [46] Research ,Szente and Szejtli, 2004
- [47] Research ,Astray et al., 2009
- [48] D.CASTAGNE, Thèse de doctorat «Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques », Université de Liège, 2010,33.
- [49] Hedges. RA.*Chem.Rev*, 98, 2035-2044,1998.
- [50] H.-J. Buschmann, D. Knittel, E. Schollmeyer, New textile applications of cyclodextrins, *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 2001, 40, 169-172,
- [51] H.-J. Buschmann, D. Knittel, E. Schollmeyer, New textile applications of cyclodextrins, *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 2001, 40, 169-172,
- [52] Szejtli J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers :Dordrecht,1988, p 450
- [53] *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Atwood J. L., Lehn J.-M., Eds., vol. 3,Cyclodextrins, Szejtli J., Osa T., Eds., Pergamon : Oxford, U.K., 1996, p 693
- [54] Li, S.; Purdy, W.C.(1992) Cyclodextrins and their applications in Analytical chemistry, *Chem. Rev.*, 92.
- [55] Armstrong, D.W.;He,F.Y.;Han,S.M.(1988) Planar chromatographic separation of enantiomers and diastereomers with cyclodextrin mobile phase additives, *J.Chromatogr.*,448, 345-354.
- [56] Takahashi, K.(1998) Organic reactions mediated by cyclodextrins,*Chem.Rev.*,2013-2034.

- [57] Breslow, R.; Zhang, B. (1992) Very fast ester hydrolysis by a cyclodextrin dimer with a catalytic linking group, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5882-5883.
- [58] Breslow, R.; Dong, S.D. (1998) Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives, *Chem. Rev.*, 98, 1997-2012.
- [59] (Fromming and Szejtli: *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Acad. Press, Dordrecht, 1994).
- [60] Tabushi I., Kuroda Y., Mizutani T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 4514-4518.
- [61] Van Etten R. L., Clowes G. A., Sebastian J. F., Bender M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 3253-3262.
- [62] Cramer F., Saenger W., Spatz H.-C. Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics
- [63] Szejtli J. *Cyclodextrin technology*, Editor: Davies J. E. D., Kluwer academic: Dordrecht (1988). And kinetics, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 14 (1967).
- [64] J.Szejtli, Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Review*, 1998, 98, 1743-1753
- [65] L. Liu, Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom.* 42 (2002) 1-14.
- [66] K. Connors, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1325-1357.
- [67] Research, Davis, et al. 2004.
- [68] Schneider H.-J., Hacket F., Rüdiger V., Ikeda H., *Chem. Rev.* 1998, 98(5), 1755-1786
- [69] Rekharsky M. V., Inoue Y., *Chem. Rev.* 1998, 98(5), 1875-1918
- [70] Szente L., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F., Lehn J.-M., Eds., vol. 3, *Cyclodextrins*, chap. 8, Pergamon : Oxford, U.K., 1996, 253-278
- [71] Tsukube H., Furuta H., Odani A., Takeda Y., Kudo Y., Inoue Y., Liu Y., Sakamoto H., Kimura K., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F., Lehn J.-M., Eds., vol. 8, 1996, 425-482.
- [72] Connors K.A., *Chem. Rev.* 1997, 97, 1325-1357.
- [73] Research, Loftsson et al., 2005.
- [74] Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004;48:411-24.
- [75] Berthelot T, Lain G, Latxague L, Deleris G. Synthesis of novel fluoro genic L-Fmoc lysine derivatives as potential tools for imaging cells. *J Fluoresc.* 2004;14:671-5.
- [76] Y.BAKKOUR; Thèse de doctorat « étude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées »; Université des Sciences et Technologies de Lille 1 ; Juillet 2005 ,10.
- [77] J.Vaysse-Dufaure; Thèse de doctorat « Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires »; Université de Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), Décembre 2012
- [78] Hildebrand, J.A. & Benesi, H.A. A graphical method for the determination of binding constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 2703-2710.
- [79] Y. BAKKOUR ; Thèse de doctorat « Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des

cyclodextrines natives et polymérisées » Université des Sciences et Technologies de Lille 1
UFR de Chimie, juillet 2005,10.

[80] Moure, A ; Franco, D ; Sineiro, J ; Dominguez, H ; Nunez, M.J, Lema, J.M. (2000).

[81] Pulido, R; Bravo, L; Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, J Agric Food Chem, 48 (8): 3396 -3402.

[82] Site Web: http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_infrarouge

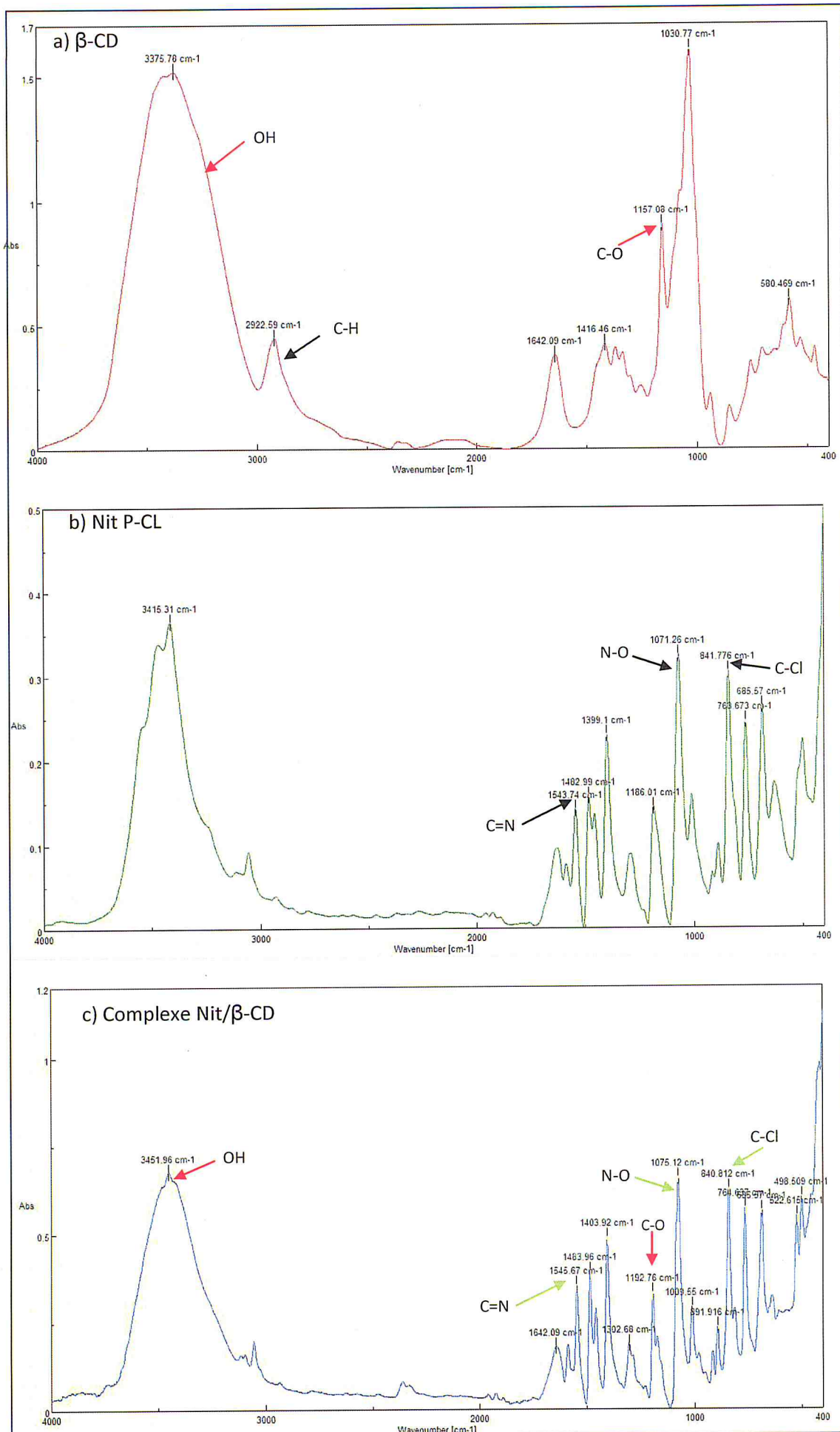
[83] Site Web: http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrometrie_de_masse

[84] CILLARD, 2007.

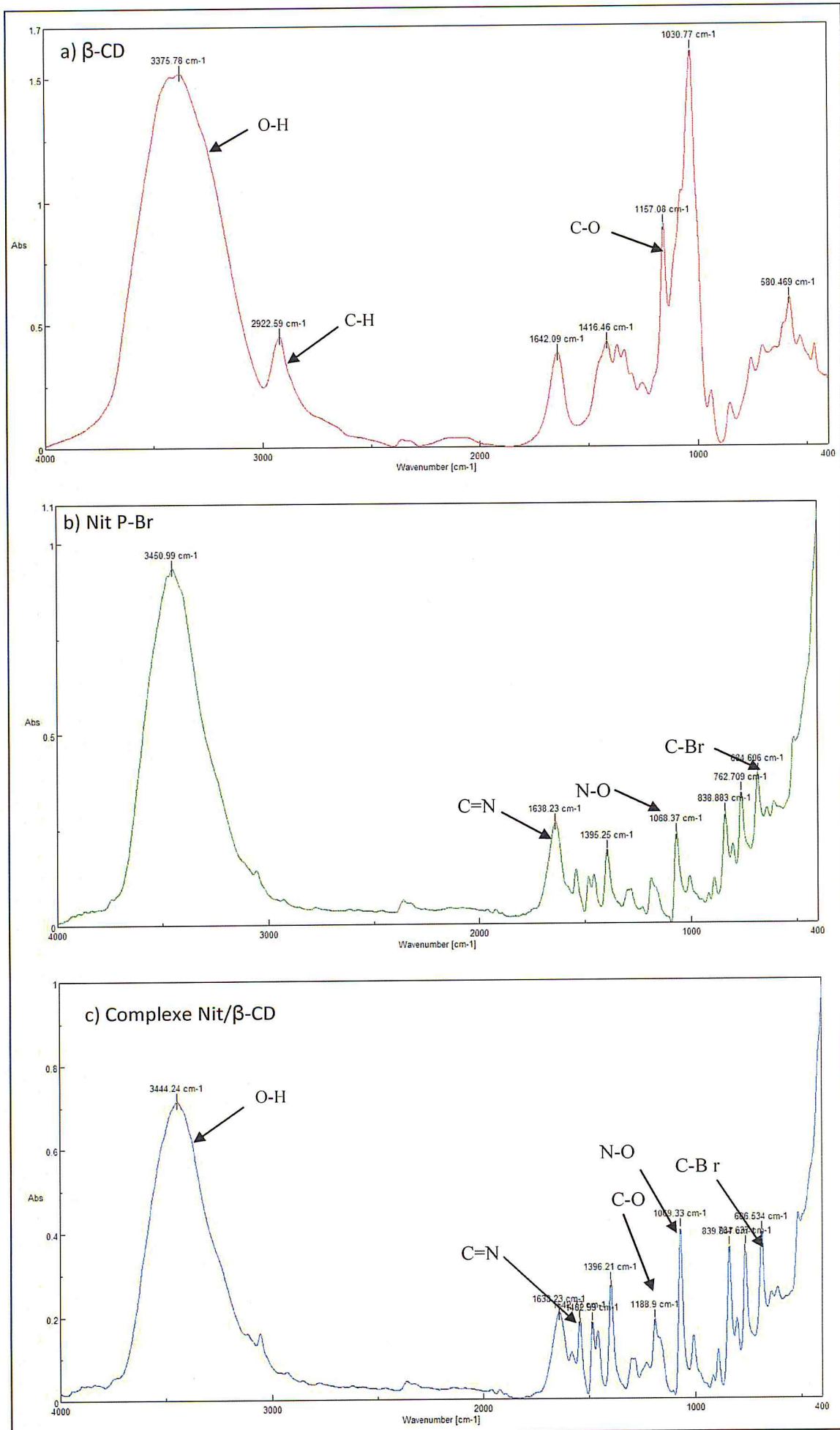
[85] Brand-Willims, W; Cuvelier, M. E; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 28 :25-30.

[86] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of stable free radical, Nature, 181.

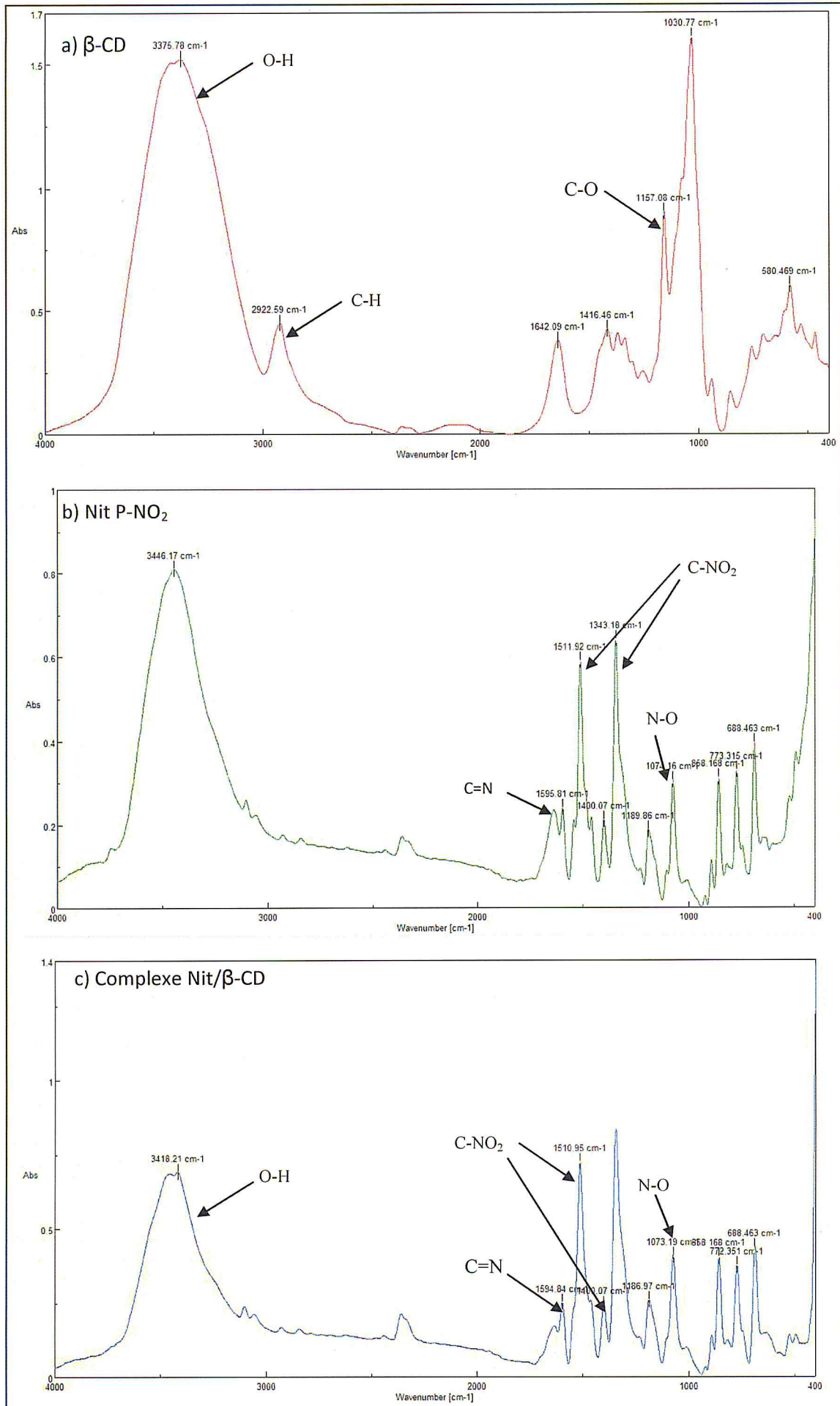
Annexes



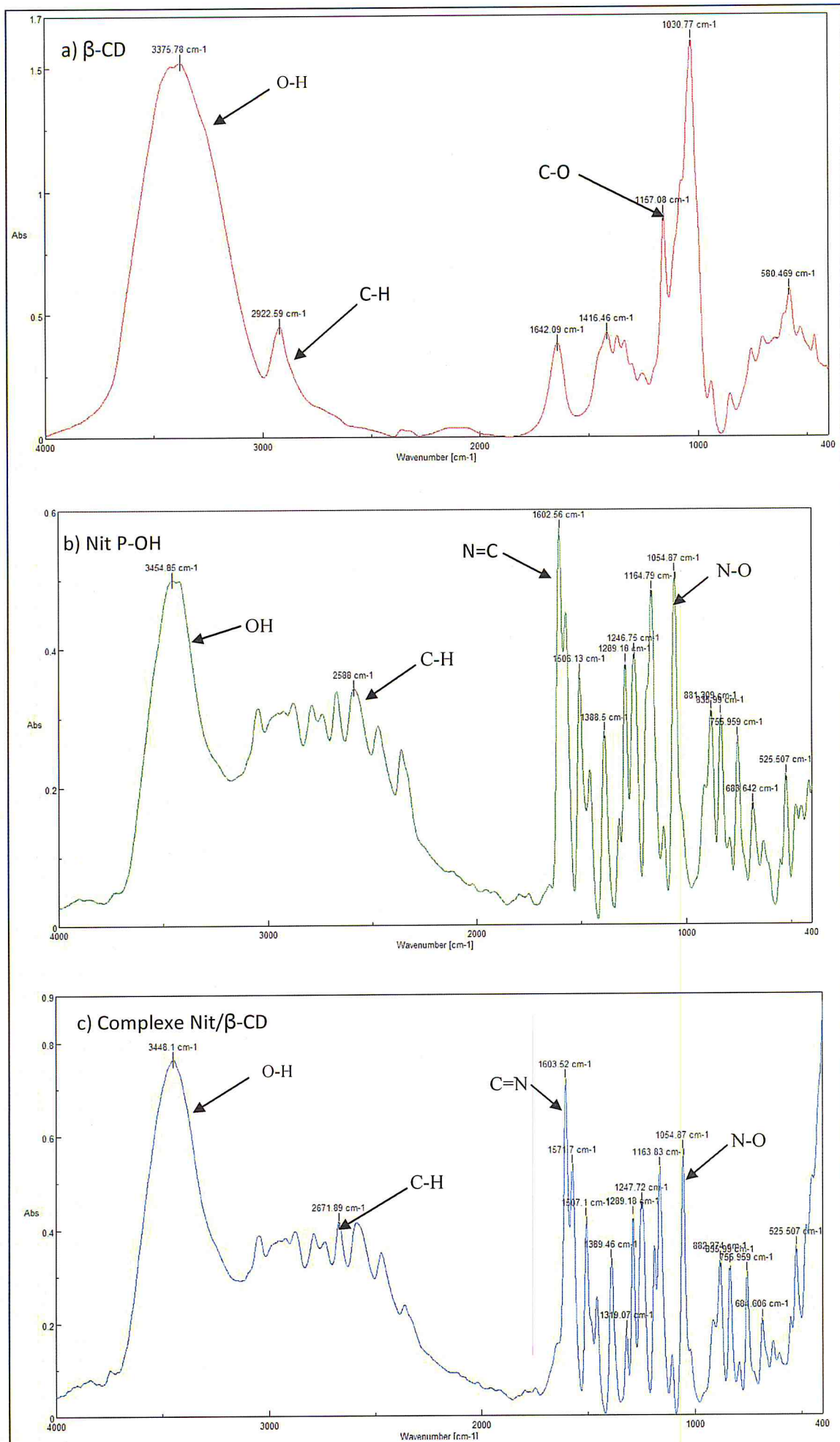
Figure(1) spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P-Cl c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



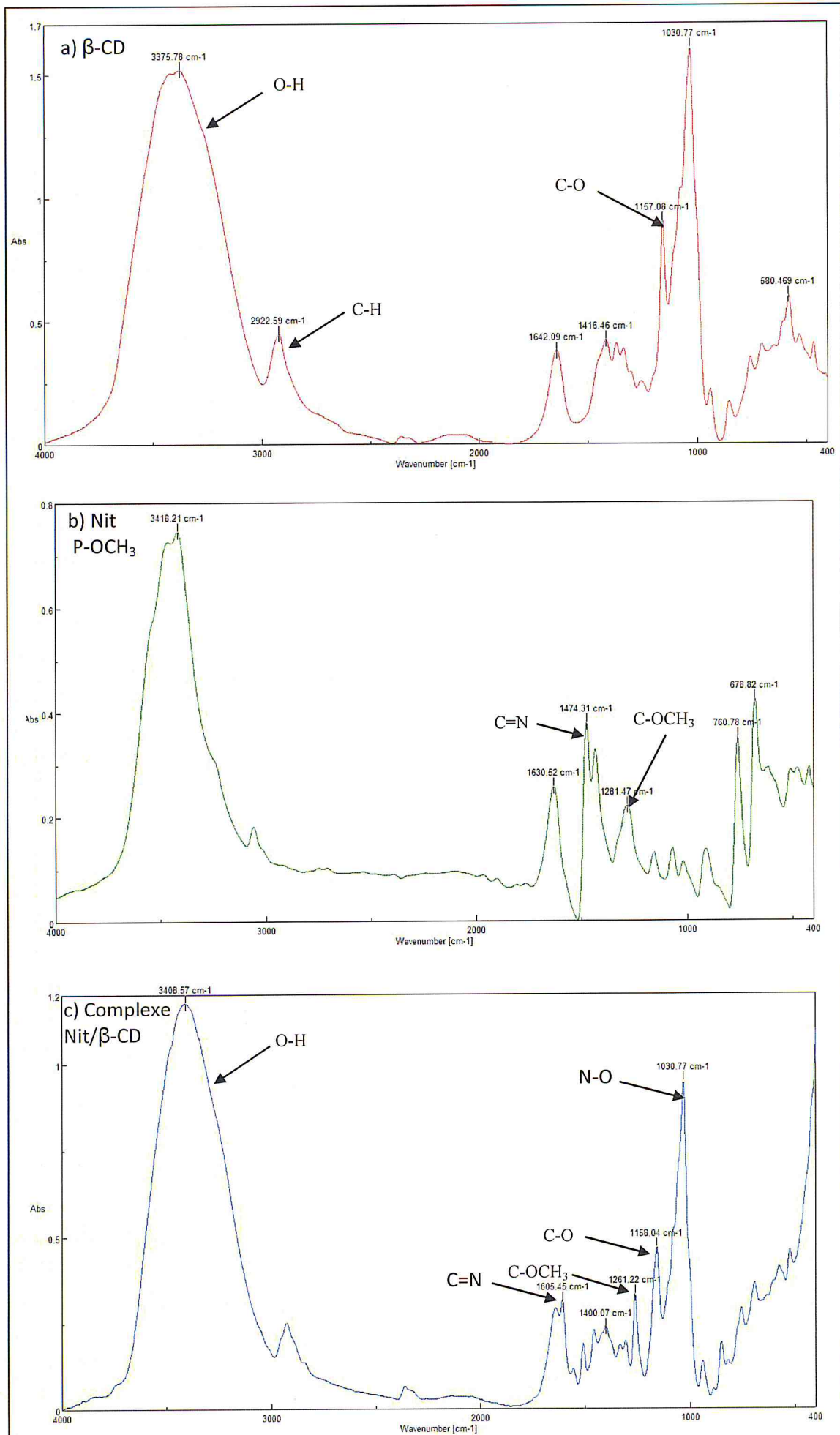
Figure(2) spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P-Br c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



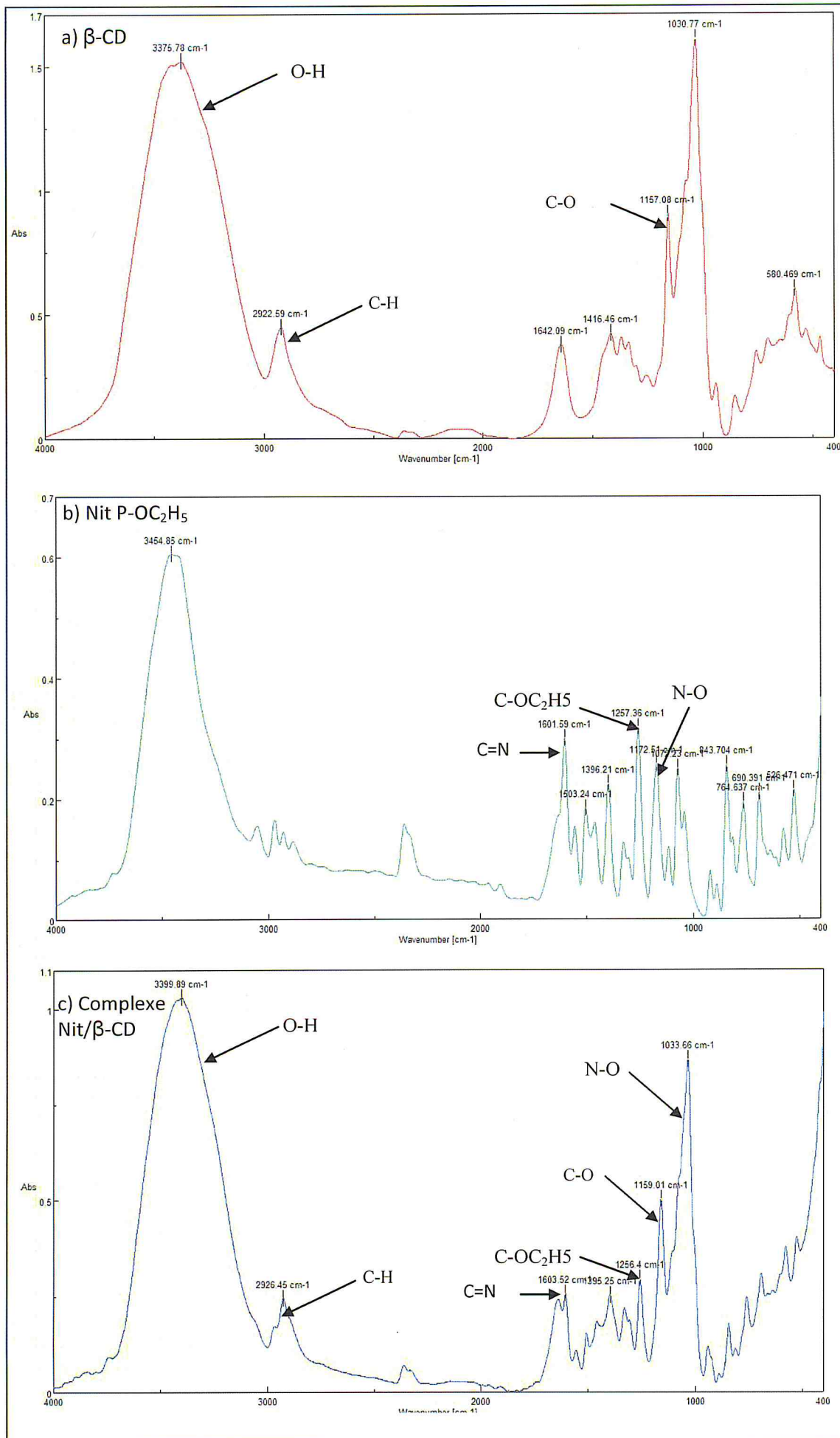
Figure(3) Spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P-NO₂ c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



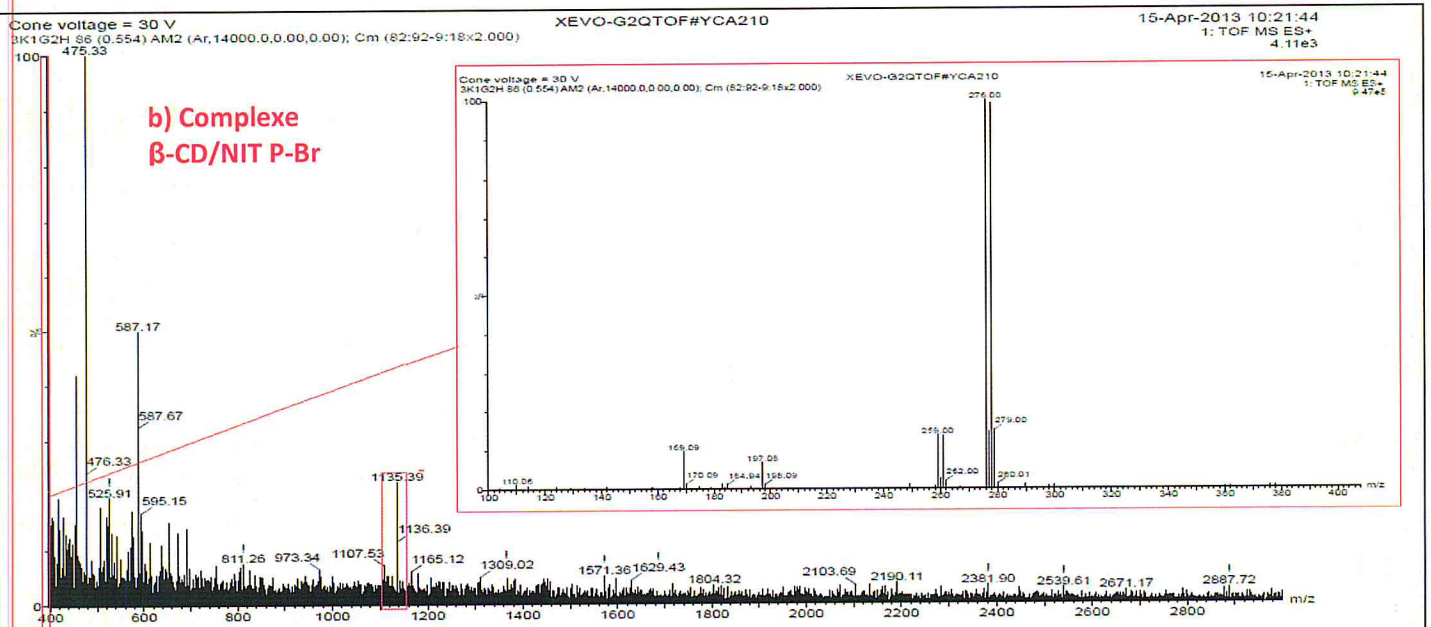
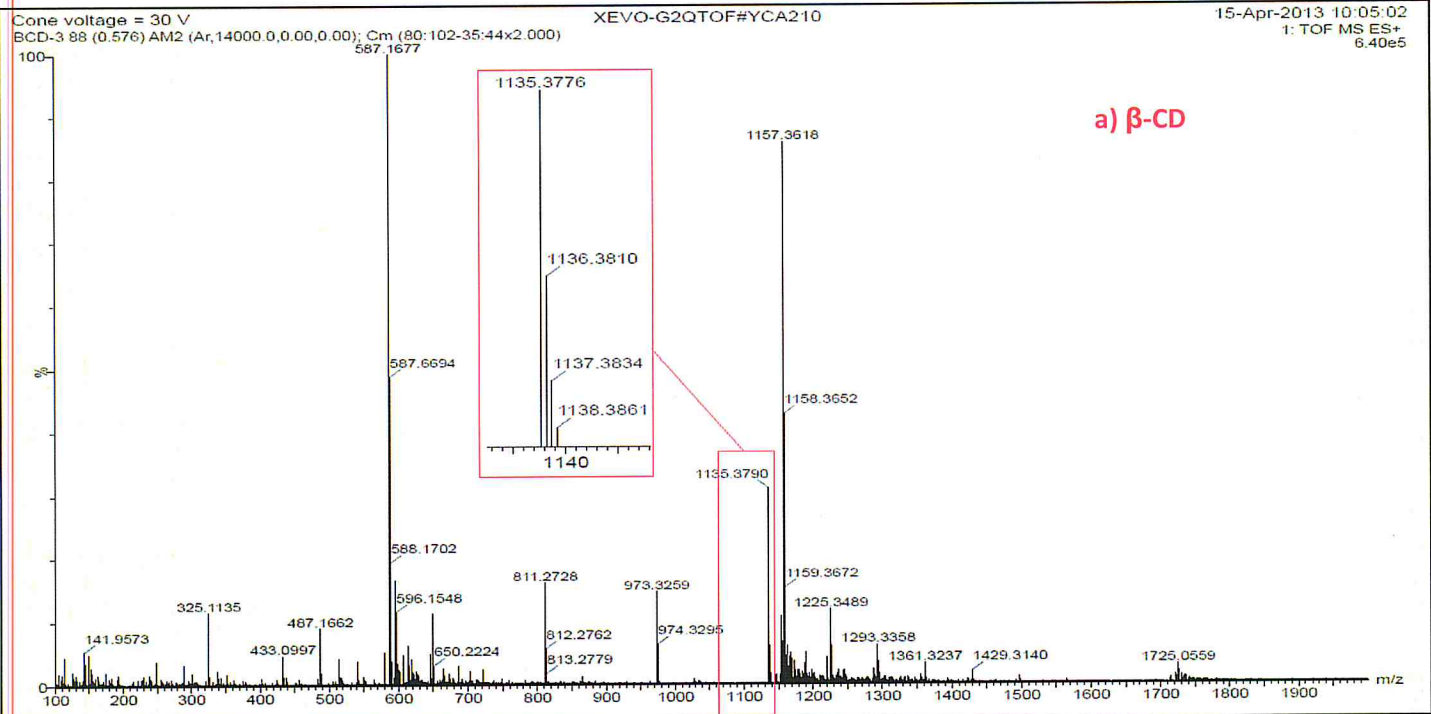
Figure(4) spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P-OH c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



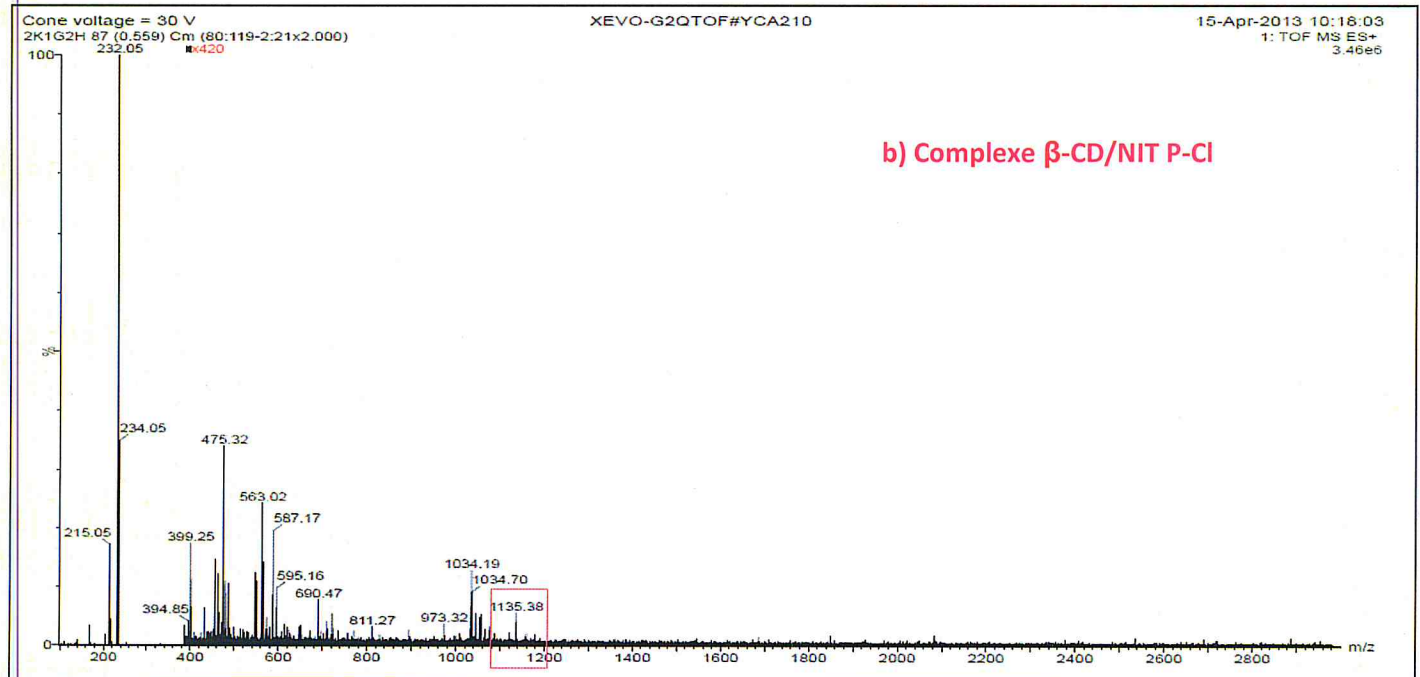
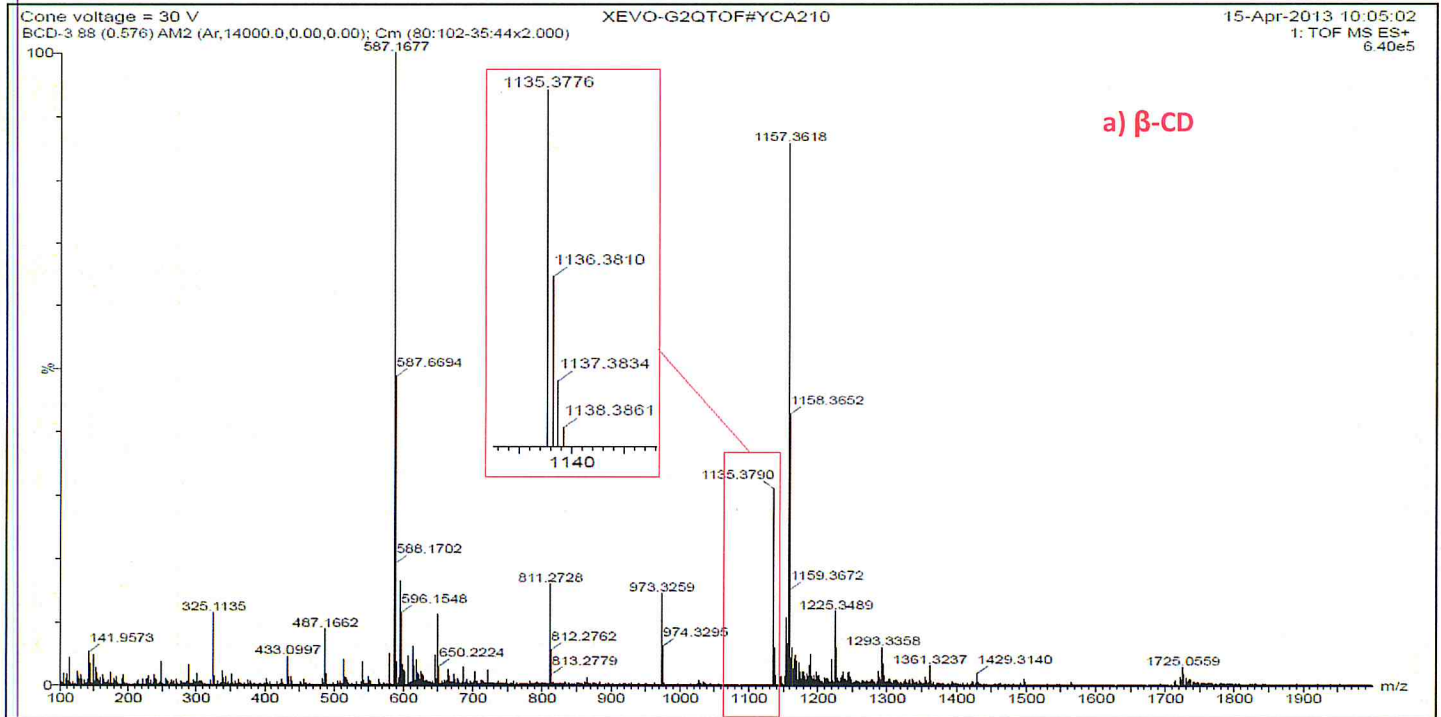
Figure(5) spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P-OCH₃ c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



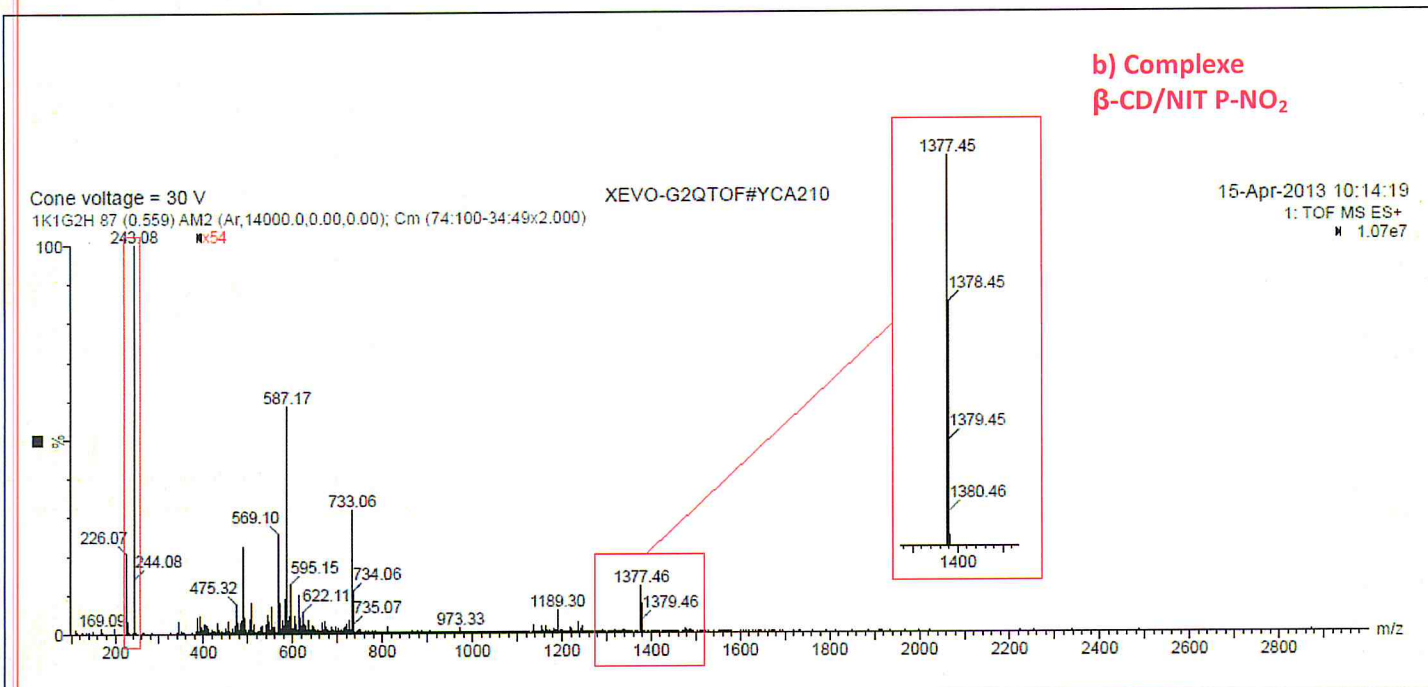
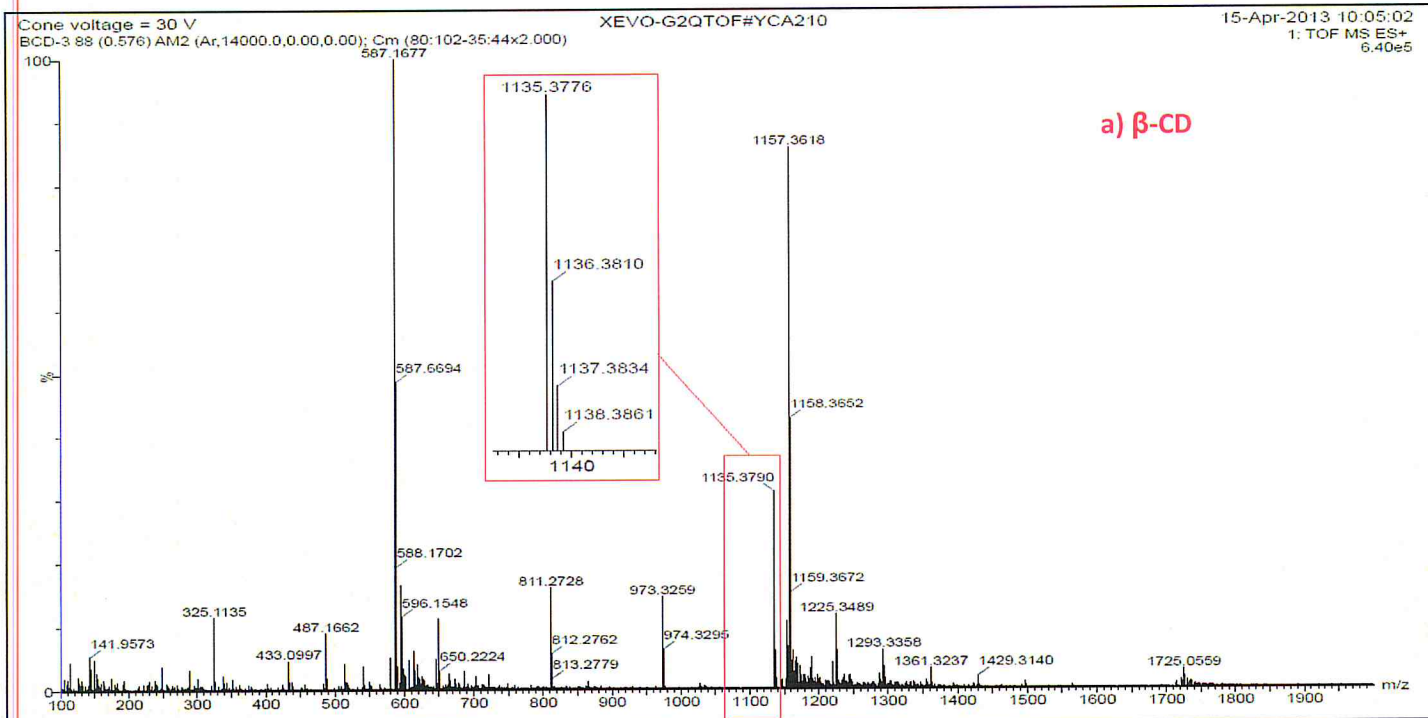
Figure(6) spectre en infrarouge de a) β -CD b) Nit P- OC₂H₅ c) complexe Nit- β -CD, en pastille de KBr, à 25°C.



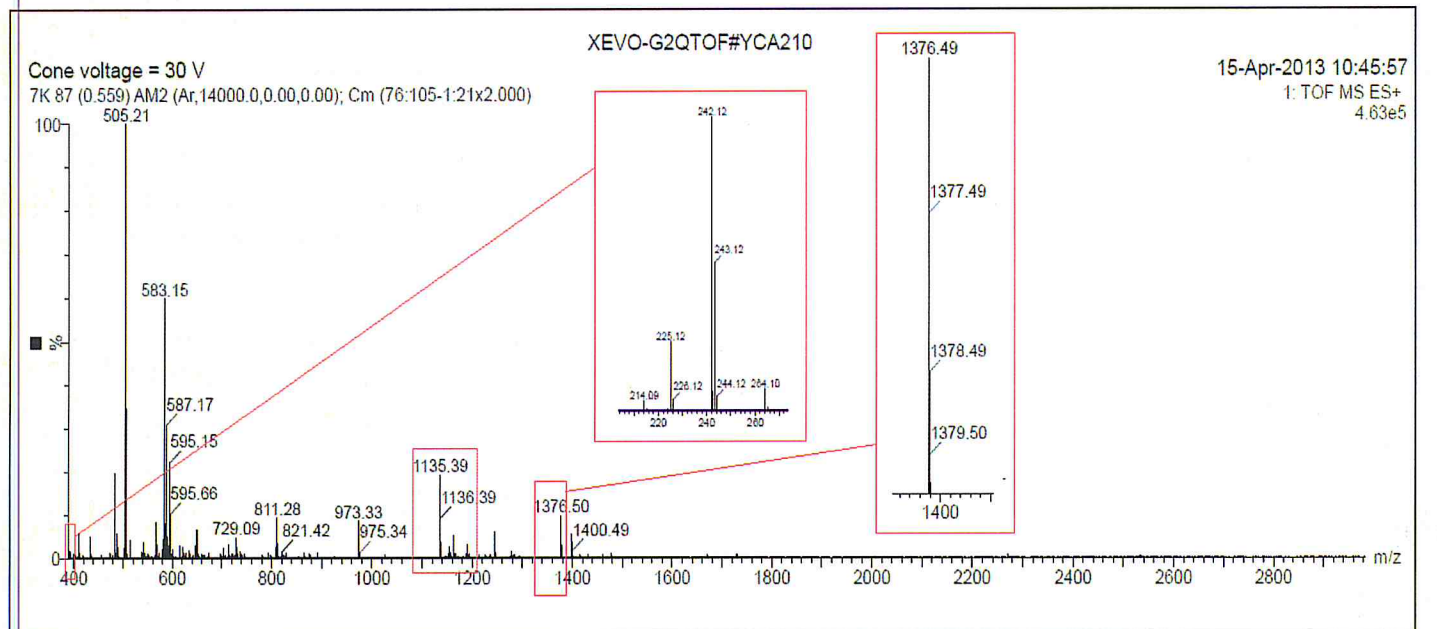
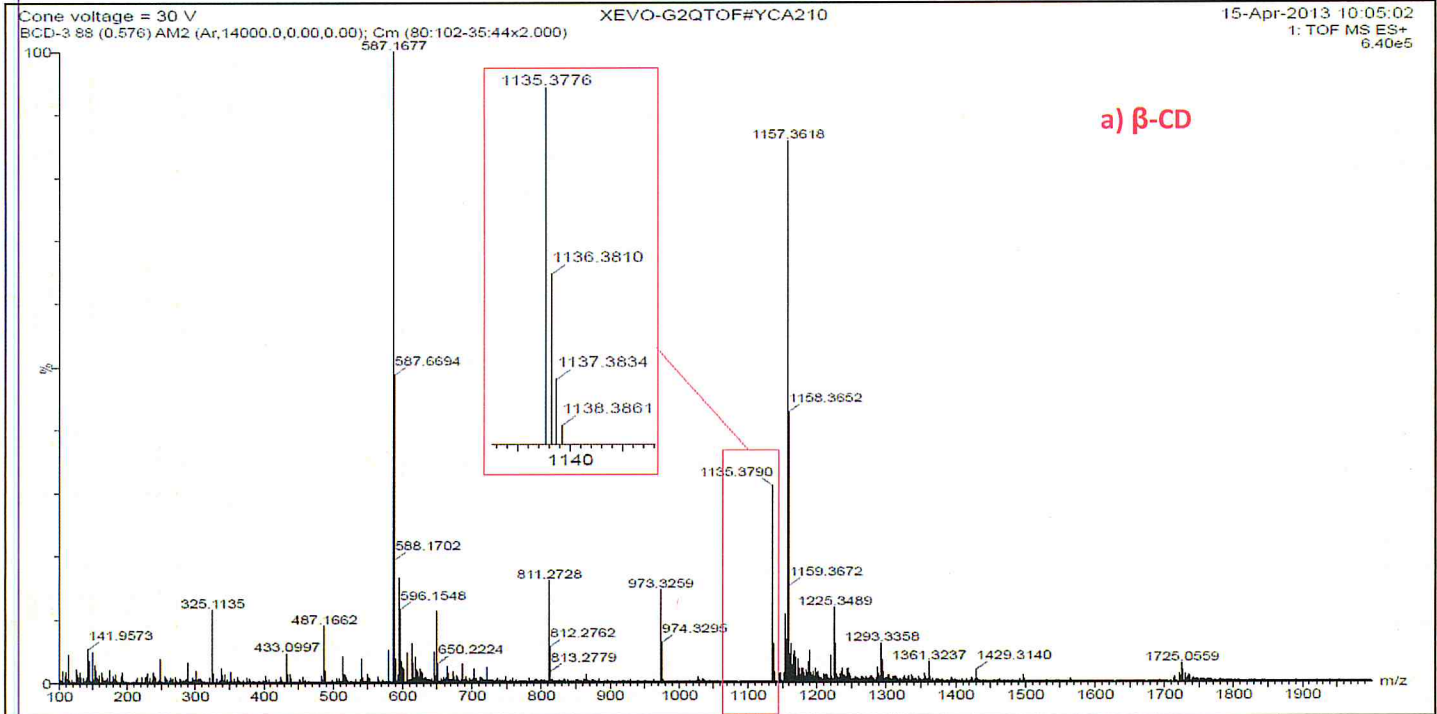
Figure(1) spectre de masse a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-Br, en impact électronique.



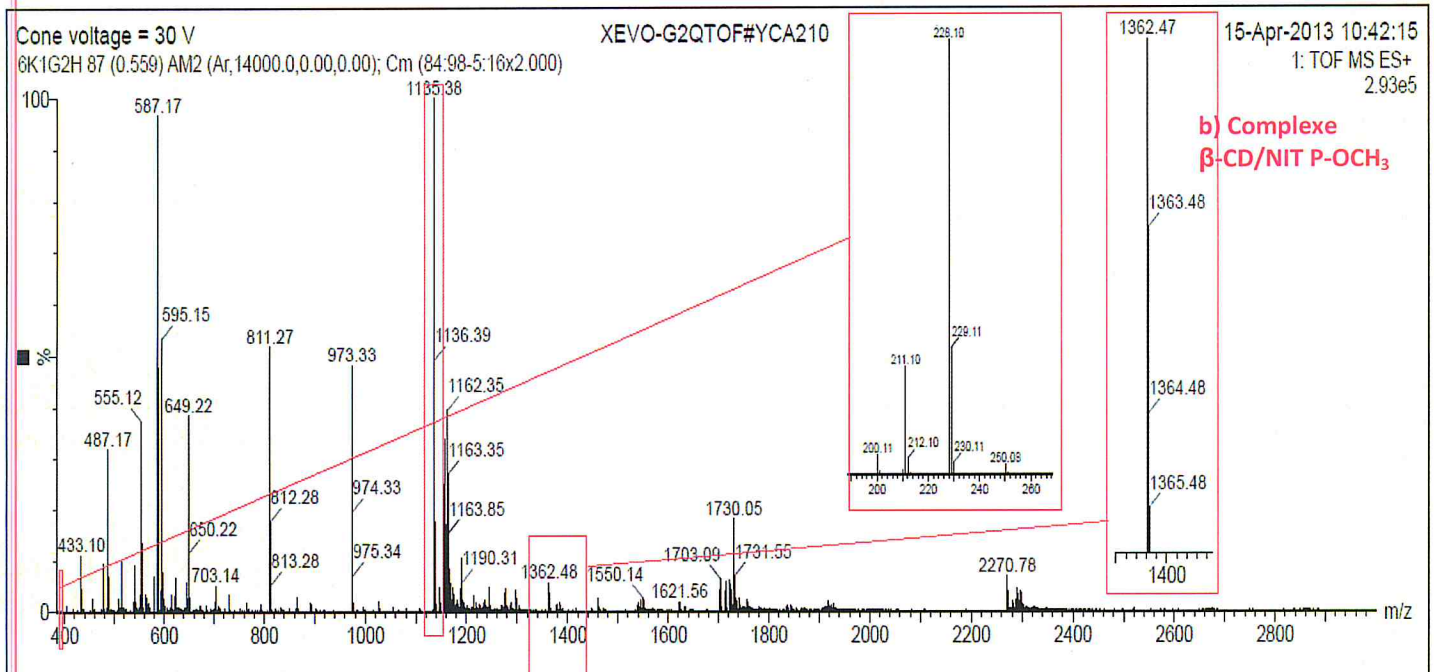
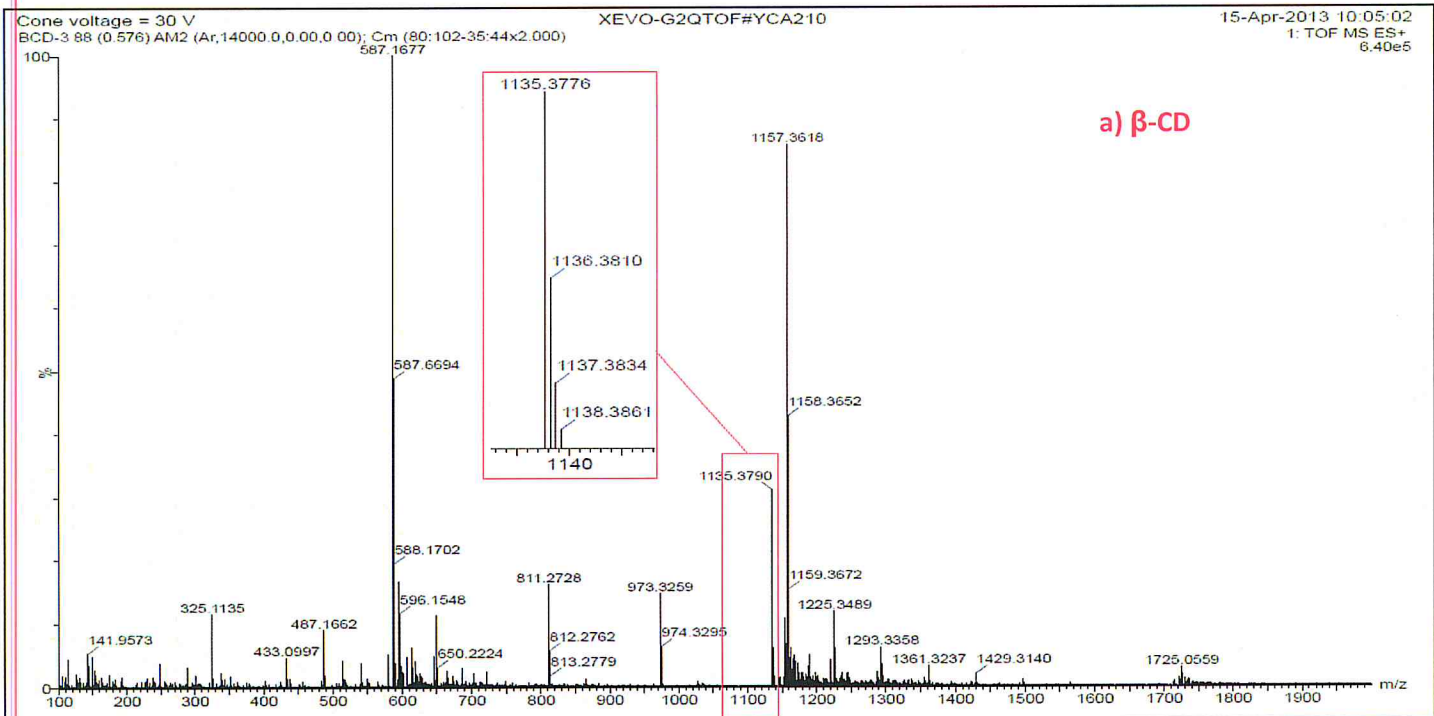
Figure(2) spectre de masse a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-Cl, en impact électronique.



Figure(4) spectre de masse a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-NO₂, en impact électronique.



Figure(5) spectre de masse a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-OC₂H₅, en impact électronique.



Figure(6) spectre de masse a) β -CD b) complexe β -CD/Nit P-OCH₃, en impact électronique.