

*République Algérienne Démocratique et populaire*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA*



*FACULTE DE MATHEMATIQUES, DE L'INFORMATIQUE ET DES SCIENCES*

*DE LA MATIERE*

*Département des Sciences de la Matière*

*Thèse de Doctorat*

*Option: Sciences Chimiques*

*Présentée par:*

*M<sup>me</sup> BOUZIT Habiba*

**Thème**

---

*Synthèse, Structure, et Réactivité d'une série de  
sulfonamides couplés à l'acide lipoïque et étude de leurs  
complexes d'inclusion avec la  $\beta$ -cyclodextrine*

---

**Soutenu devant le jury composé de :**

Présidente: M <sup>me</sup> MAOUI F. Zohra Née EL BERRICHI	Pr. Université de Guelma
Examineurs: Mr. DJOROUROU Abdelhafid	Pr. Université d'Annaba
Mr. GHEID Abdelhak	Pr. Université de Souk -Ahras
Membre invité: Mr. SERIDI Achour	M.C.A. Université de Guelma
Rapporteur: Mr. ABDAOUI Mohamed	Pr. Université de Guelma

**Année 2017**

## **Dédicace**

A mes chers parents,

A mon cher mari,

A mes chers enfants,

A mes sœurs et à mon unique frère,

A toute ma Famille et ma belle famille

A toutes mes amies,

A toutes les mains qui m'ont été tendues.

*Je dédie Ce Modeste Travail*

## **Remerciements**

Ce travail a été réalisé à l'Université 8 mai 1945 de Guelma, Faculté des Mathématiques, Informatique et Sciences de la Matière, département des Sciences de la Matière, au Laboratoire de Chimie Appliquée (LCA) au sein de l'équipe :Synthèse et Développement de composés d'intérêt biologique, sous la direction du **professeur Mohamed ABDAOUI**.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude au Professeur Mohamed ABDAOUI pour m'avoir accepté dans son équipe et d'avoir dirigé cette thèse. Qu'il me soit permis de le remercier pour son encadrement scientifique, ses conseils précieux, pour m'avoir indiqué les bienfaits du travail en équipe. Toute ma reconnaissance pour son engagement et encouragement.

J'attache une importance particulière à exprimer mes sincères remerciements à mon mari Monsieur le **Docteur Maâmar STITI**, Maître de conférences à l'Université de Guelma, son dynamisme et son soutien scientifique et moral, ont été déterminants pour l'aboutissement de ce travail, et cette thèse n'aurait pas été rendue possible sans sa présence. Il m'a fait bénéficier de son expérience tout le long de ces années de recherche. Il m'a prodigué conseils et encouragements constants. Je le remercie vivement aussi d'avoir su être patient surtout les derniers jours avant de présenter mon mémoire.

J'exprime ma profonde gratitude à **M<sup>me</sup> Fatima Zohra MAOUI** (Née **EL BERRICHI**) **Professeur** de l'université 08 Mai 1945, Guelma, qui m'a fait l'honneur d'accepter à présider le jury de cette thèse.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements aux membres de jury et à exprimer ma profonde et respectueuse gratitude: à **Mr DJOROUROU Abdelhafi Professeur** à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, à **Mr .GHEID Abdelhak Professeur** à l'Université M-Cherif Messaadia, Souk Ahras, à **Mr SERIDI Achour, Maître de conférence** à l'Université 08 Mai 1945, Guelma, Pour avoir accepté d'être les examinateurs scientifiques pour l'évaluation de ce travail et m'avoir donné l'opportunité d'avoir avec eux une discussion scientifique très constructive et enrichissante.

Je souhaite aussi remercier encore **Mr. Rabah Oumeddour, Professeur** à l'Université 08 mai 1945 de Guelma pour les analyses en spectroscopie d'IR.

Je n'oublierai pas d'adresser un remerciement tout particulier à **M<sup>me</sup> Madi Fatiha, M<sup>me</sup> Amal Zaboub, M<sup>me</sup> Dhaoui Nabila, à M<sup>elle</sup> S. Nigri , M<sup>me</sup> Bensouilah Nadjia et M<sup>me</sup> A.Boultif**.

J'attache une importance particulière à exprimer mes remerciements à nos enseignants qui nous ont beaucoup aidés et encouragés durant notre formation.

Enfin, Je suis honorée et il m'est agréable d'adresser mes remerciements à toutes les personnes de recherche au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) où je travaille comme Ingénieur de recherche.

Je remercie aussi mes collègues membres du laboratoire (LCA) pour leur gentillesse inoubliable, leur soutien et leur compréhension, de part leur attention et l'ambiance sympathique qu'ils ont su créer, ils ont largement contribué au bon déroulement de ces travaux de recherche et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous

## ملخص

نقدم في هذا العمل التخليق و التوصيف بالطرق الطيفية المعتادة (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, MS-ESI) لسلسلة مكونة من أربعة مركبات اقتران بين السلفوناميدات وحمض الليبويك المعروفة كمرشحات قوية للتثبيط الانتقائي لأنهيديراز الكربونيك C AIX وإن وجود شظية lipoyl داخل هذه الجزيئات يجعلها ضعيفة الانحلال في الماء وغير مستقرة تجاه الضوء والحرارة والظروف القلوية. وللتغلب على هذه العوائق الرئيسية، قمنا بالدراسة النظرية والتجريبية لمعقد الاحتواء بين-CD β والمركب الأكثر نشاطا وهو:

(SULPA): N-[(4-sulfonamidophenyl) ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide. وهكذا وباستخدام القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية تم ايجاد صيغة الارتباط للمعقد ليكون من نوع 1:1 و أعطى ثابت استقراره القيمة  $1.3415.104 \text{ (mol / l)}^{-1}$ . وعلاوة على ذلك، فان طرق الحساب النظري مثل الطريقة شبه التجريبية PM3 والأساليب الكمية مثل "وحيد النقطة" HF و B3LYP/6-31G(d) لنظرية الكثافة الوظيفية DFT والطريقة الهجينة ONIOM2 و التحليل NBO مكنتنا من تحليل اثنين من التوجهات المحتملة للجزيء الضيف SULPA في تجويف -CD β الكاره للماء وتشير إلى أن عملية الاحتواء ممكنة من وجهة النظر الديناميكية الحرارية وان معقد الاحتواء β-CD/SULPA مستقر كفاية. ومن ناحية أخرى فان المعقد A الذي يتم فيه إدخال الحلقة غير المتجانسة 1--Dithiolane 2للجزيء SULPA في الوجه الواسعة ل β-CD هو الأفضل مقارنة مع المعقد B. علاوة على ذلك فان التحقيقات النظرية عن طريق المدارات الحدودية, HOMO و LUMO و من قبل أطيف الأشعة تحت الحمراء، تبين أنه في كل من الفراغ والمحلول فان الحلقة غير المتجانسة 1-2 -Dithiolane في ا لجزيء SULPA والتي هي الأكثر حساسية لهجمات كيمائية أو فيزيائية قد حوصرت داخل تجويف ال β-CD مما يجعلها محمية كفاية.

### الكلمات المفتاحية

الأنهيديراز الكربوني التاسع، السرطان، السلفوناميدات، حمض ليبويك، معقد الاحتواء، الذوبانية، الاستقرار، β-سيكلودكسترين، النمذجة الجزيئية، NBO، ONIOM2، DFT، PM3، المطيافية.

## **Résumé**

Dans ce travail, nous rapportons la synthèse et la caractérisation aux moyen des méthodes spectroscopiques usuelles ( $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, MS-ESI) d'une série de quatre conjugués: sulfonamides-acide lipoïque candidats potentiels pour l'inhibition sélective de l'Anhydrase Carbonique ACIX. Cependant, la présence du fragment lipoyle au sein de ces molécules leur confère une faible hydrosolubilité et une instabilité envers la lumière, la chaleur et les conditions alcalines.

Pour palier à ces inconvénients majeurs, nous nous sommes donc intéressés à une étude théorique et expérimentale de la complexation avec la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) du composé le plus actif parmi ces conjugués à savoir : le N-[(4-sulfonamidophenyl) ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide(SULPA).

Ainsi, à l'aide de la spectrophotométrie UV-visible, la stœchiométrie du complexe obtenu a été trouvée égale à 1: 1 et sa constante de stabilité se chiffre à  $1.3415.104 \text{ (mol / l)}^{-1}$ .

Par ailleurs, les méthodes de calcul théorique, comme la méthode semi-empirique PM3, les méthodes quantiques ("single point" HF et (B3LYP/6-31G (d) de la théorie de la densité fonctionnelle DFT, la méthode hybride ONIOM2 et l'analyse NBO, nous ont permis d'analyser deux orientations possibles de la molécule invitée SULPA dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD et nous indiquent que le processus de l'inclusion est thermodynamiquement favorable et que le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA est assez stable.

D'autre part, le complexe A dans lequel l'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule SULPA est inséré dans le coté large de la  $\beta$ -CD s'est montré plus favorisée par rapport au complexe B. Par ailleurs, les investigations théoriques par les orbitales frontières HOMO, LUMO et les résultats structuraux de l'analyse fonctionnelle par spectroscopie IR, montrent que dans le vide et en solution, l'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule qui est particulièrement sensible aux attaques chimiques ou physiques a été piégé dans la cavité de la  $\beta$ -CD et donc a été suffisamment protégé.

## **Mots-clés**

Anhydrase Carbonique IX, Cancer, Sulfonamides, Acide Lipoïque, Complexe d'Inclusion, Solubilité, Stabilité,  $\beta$ -cyclodextrine, Modélisation moléculaire, PM3, DFT, ONIOM2, NBO, Spectrophotométrie.

## **Abstract**

In this work, we report the synthesis and characterization with usual spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS-ESI) of a series of four sulfonamide-lipoic acid conjugates potent candidates for selective inhibition of carbonic anhydrase CAIX.

However, the presence of lipoyl moiety within these molecules gives them poor water solubility and instability to light, heat and alkaline conditions.

To overcome these main disadvantages, we're interested in a theoretical and experimental study of the complexation with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) of the most active compound namely the N-[(4-sulfonamidophenyl) ethyl] - 5- (1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide (SULPA).

Thus, by using UV-Vis absorption, the stoichiometric ratio of the complex was found to be 1:1 and the stability constant was evaluated as  $1.3415 \cdot 10^4$  (mol/L) $^{-1}$ .

Furthermore, methods of theoretical calculation like the semi-empirical method PM3, quantum methods ("single spot" HF and (B3LYP / 6-31G (d) level of density functional theory (DFT), the hybrid method ONIOM2 and the NBO analysis, enabled us to analyze two possible orientations of the SULPA guest molecule into the hydrophobic cavity of  $\beta$ -CD and indicate that the process of inclusion is thermodynamically favorable and the inclusion complex  $\beta$ -CD / SULPA is enough stable.

On the other hand, the complex A in which the 1,2-Dithiolane heterocyclic ring of the SULPA molecule is inserted into the wide Face of the  $\beta$ -CD, was more favored over the B complex. Moreover, theoretical investigations by the HOMO, LUMO frontier orbitals and structural results of functional analysis by IR spectroscopy, show that in vacuum and solution, the 1, 2-dithiolane ring in the molecule that is most sensitive to chemical or physical attacks was entrapped into the  $\beta$ -CD cavity and therefore was sufficiently well protected.

## **Keywords**

Carbonic Anhydrase IX, Cancer, sulfonamides, Lipoic Acid, Inclusion Complex, Solubility, Stability,  $\beta$ -cyclodextrin, Molecular Modeling, PM3, DFT, ONIOM2, NBO, Spectrophotometry.

## Liste des abréviations utiles

- AM1** : Méthode semi-empirique (Austin Model 1)
- AZA**; Acetazolamide
- B3LYP**: Becke -3 paramètres - Lee, Yang, Parr.
- BCS**: Biopharmaceutics Classification System
- BO**: Approximation de Born-Oppenheimer.
- CA**: Carbonic Anhydrase
- CAIX** : Anhydrase carbonique 9
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CD** : Cyclodextrine
- CHCl<sub>3</sub>**: Chloroform
- CNDO**: Complete Neglect of Differential Overlap
- CSD**: Crystalline Solid Dispersions
- DCC**: 1,3-dicyclohexylcarbodiimide
- DFT**: Density Functional Theory
- DHLA** : l'acide dihydrolipoïque
- DMAP**: 4-diméthylaminopyridine
- DMF**: Diméthylformamide
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- EDC** : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- EDCI**: *N*-Ethyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
- FDA**: US Food and Drug Administration
- GTO** : Orbitales de Type Gaussienne
- hCA** : human carbonic anhydrase
- HF**: Méthode Hartree-Fock
- HOMO** : Highest Occupied Molecular Orbital
- H-RMN** : Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
- IR-TF** : Infra rouge à transformée de Fourier
- K<sub>i</sub>**: Constante d'inhibition
- K<sub>s</sub>** : Constante de stabilité
- LA**: L'acide  $\alpha$ -lipoïque
- LUMO**: Lowest Unoccupied Molecular Orbital



**MeOH:** Méthanol.

**MNDO:** Modified Neglect of Diatomic Overlap

**MO:** Molecular Orbital

**MRM :** Méthode des rapports molaires

**MVC:** Méthode des variations continues

**NDDO :** Neglect Diatomic Differential Overlap

**NBO:** Natural bond orbital

**NHS:** N-hydroxysuccinimide

**nM:** Nanomolaire

**OA:** Orbitale atomique

**ONIOM2:** Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics

**PA :** Principe actif

**PGTO :** Orbitales de Type Gaussienne primitives

**PM6:** Parametric Method 6

**PM3:** Méthode semi-empirique (Parametric Methode 3)

**QM/MM:** Quantum Mechanics / Molecular Mechanics

**Rdt:** Rendement de la réaction.

**R<sub>f</sub>:** Rapport frontal.

**RHF:** Restricted Hartree-Fock

**RMN :** Résonance magnétique nucléaire

**SULPA:** N-[(4-sulfonamidophenyl) ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide

**SM:** Spectrométrie de masse

**STO:** Orbitales de Type Slater

**SP:** Split Valence

**T:** Température

**T<sub>f</sub> :** Point (Température) de fusion.

**THF:** Tétrahydrofuranne.

**UV-vis :** ultra-violet.

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry

**VDW :** Van der Waals)

# Liste des figures et Schémas

## **PREMIERE PARTIE : Etude Bibliographique**

### **Chapitre I**

Schéma.I.1: Réaction réversible d'hydratation du CO <sub>2</sub> .....	5
Figure.I.1: Modèle général d'un inhibiteur complexé dans le site actif de l'anhydrase carbonique. ....	6
Figure.I.2.La Spermine (Saumon) en complexe avec CA II (grise)[8] .....	6
Figure.I.3: Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.....	9
Figure.I.4 : Exemple d'inhibiteurs liés à des sucres via une fonction thiourée.....	9
Figure.I.5: Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leurs structures. ....	10
Figure.I.6 : Benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle en leurs structures. ...	10
Figure.I.7: Le sulfonamidodiarylpyrazole nouveau pharmacophore affin pour le l'ACIX. ....	11
Figure.I.8 (A) Phénol; (B) Polyamine; R est un atome N ou atome C;(C) acide Carboxylique; (D) Coumarine et produit d'hydrolyse; (E) Sulfocoumarine et produit d'hydrolyse;(F) dérivé de Fullerène. ....	12

### **Chapitre II**

Figure. II. 1: Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS).....	17
Figure.II. 2: Représentation d'une cyclodextrine montrant une cavité hydrophobe et une surface extérieure hydrophile [7].....	19
Schéma.II.1:Exemple d'une prodrogue: le disoproxil fumarate.....	20
Figure.II. 3 : Représentation schématique des principaux nano objets utilisés en recherche biomédicale [17]. ....	21
Schéma.II.2 : Nanoparticule idéale et ses caractéristiques bio-physico-chimique [22].....	24

### **Chapitre III**

Figure.III.1: Structure moléculaire et forme géométrique des Cyclodextrines ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ).....	27
Figure.III.2: Représentation tridimensionnelle d'une $\beta$ -cyclodextrine.....	28
Figure.III.3: Représentations schématiques de complexes d'inclusion.....	30
De stoechiométries différentes .....	30
Figure.III.4. Stabilité des complexes d'inclusion en fonction de la polarité du solvant [9].....	32
Figure.III.5:Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion.....	33

Figure.III.6: Phases de solubilité et classification des complexes selon Higuchi et Connors. Avec S la solubilité intrinsèque du substrat en absence de CD [25] .....	36
---	----

## Chapitre IV

Figure. IV.1 : Schéma général des différentes méthodes et étapes d'une modélisation moléculaire...41	
Figure. IV.2 : Représentation schématique de la partition du système en deux régions, à niveaux de calcul différents, dans la méthode ONIOM (QM:MM) et ONIOM (QM:QM').....	49
Figure. IV.3. Schéma d'extrapolation pour un système moléculaire, lors d'un calcul ONIOM2 et ONIOM3 [22].....	50

## *DEUXIEME PARTIE : Résultats & discussion*

### Chapitre I

Figure.I. 1 : Conversion du groupement octanoyle en groupement lipoyle par la protéine LipA.....	54
Figure.I. 2 : Une protéine liée à l'acide lipoyque via un bras espaceur .....	54
Figure.I. 3 : Structure de LA et du DHLA par différents modes graphiques des logiciels « Chem 2D et 3D ».....	55
Figure.I. 4 : Les deux énantiomères R et S de l' -acide lipoyque.....	55
Figure.I. 5 : Nouvelles structures d'esters obtenues par couplage de l' acide lipoyque avec des phénols.....	57
Figure.I.6 : Nouveaux esters hydrosolubles obtenus par pégylation de l' acide lipoyque.....	58
Figure.I.7: Structures de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoyque.....	58
Figure.I.8 : Structures des chromans couplés à l'acide lipoyque doués de propriétés antioxydantes et Antiarrhythmiques .....	59
Schéma.I.1: Formation de la liaison amide.....	59
Schéma.I. 2: Activation et aminolyse d'un acide carboxylique .....	60
Schéma.I.3: Réaction entre un carboxylate et une amine. Le carboxylate est d'abord activé par EDC/NHS pour réagir avec l'amine. Les boules 1 et 2 représentent les molécules d'intérêt .....	60
Figure.I.9: Le(CPPs) un antioxydant peptidique.....	61
Figure.I.10 : la structure de Bortezomib.....	62
Figure.I.11: Dipeptide linéaire le glufanide .....	63
Figure.I.12: Structure d'un tripeptide naturel de la famille des hemiasterlines .....	63
Figure.I. 13: exemples de peptidomimétiques.....	64
Figure.I. 14: Structure générale des conjugués: sulfonamides-acide lipoyque synthétisés.....	65
Schéma.I.4: Accès aux conjugués: sulfonamides -acide lipoyque inhibiteurs de l' ACIX .....	66
Schéma.I.5: Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites.....	67

Schéma.I. 6 : Mécanisme du couplage des sulfonamides avec l'acide lipoïque en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP. ....	68
Figure.I.15: Spectres de masse MS-ES <sup>-</sup> des composé (Xa) et (Xb) .....	69
Figure.I.16: Spectre de masse MS-ES <sup>-</sup> des composé (Xc) .....	70
Figure.I.17: Spectres RMN <sup>1</sup> H des composés (Xa), (Xb) dans le DMSO-d <sub>6</sub> . ....	71
Figure.I.19: Spectre RMN <sup>13</sup> C du composé (Xa).....	72
Figure.I.20 : Spectres RMN <sup>13</sup> C des composé (Xb) et (Xc) dans le DMSO-d <sub>6</sub> . ....	73

## Chapitre II

Figure.II.1: Mise en évidence de la formation du complexe d'inclusion β-CD/SULPA dans l'acétonitrile à 1.00 x 10 <sup>-5</sup> M. a- CD libre, b- SULPA, c- Complexe β-CD-SULPA.....	78
Figure.II.2 : Evolution des spectres d'absorption pour le complexe β-CD/SULPA par la méthode des variations continues. ....	79
Figure.II.3: Détermination de la stœchiométrie du complexe β-CD/SULPA par la méthode des variations continues .....	80
Figure.II.4. Evolution des spectres d'absorption en fonction des rapports molaires pour le complexe β-CD/SULPA .....	81
Figure.II.5. : Détermination de la stœchiométrie du complexe β-CD/SULPA par la méthode des rapports molaires.....	82
Figure.II.6: Représentation de la réaction de complexation entre β-CD et SULPA.....	82
Figure.II.7.:Spectres d'absorption des complexes de SULPA (1.00 X 10 <sup>-5</sup> M) contenant différentes concentrations de β-CD (2.00 x 10 <sup>-5</sup> et 1.00 x 10 <sup>-4</sup> M) dans l'acétonitrile à température ambiante....	83
Figure.II.8. Tracé de la droite selon Benesi - Hildbrand donnant la constante de stabilité du complexe β-CD /SULPA pour une stœchiométrie 1:1 à 224 nm. ....	86
Figure.II.9. La courbe de Benesi - Hildbrand pour une stœchiométrie 2:1 du complexe β-CD/SULPA à 224 nm. ....	87
Figure. II.10. Spectres IR-TF du : (a) SULPA, (b) β-CD et (c) β-CD/SULPA dans le KBr. ....	89

## Chapitre III

Figure.III.1: Les structures moléculaires de la molécule SULPA (La numérotation des atomes sera utilisée dans ce présent travail) et la β-CD optimisées par la méthode semi-empirique PM3.....	93
Figure.III.2 : Procédure de l'inclusion de la molécule SULPA dans la β-CD selon les deux modèles (A et B). ....	94
Figure.III.3 : Structures des complexes β-CD / SULPA correspondantes aux deux modèles (A et B) obtenues par un calcul PM3.....	95
Figure.III.4 : Variation de l'énergie de complexation au cours du processus d'inclusion De la molécule SULPA dans la β-CD calculées par la méthode PM3 (a) pour différentes positions le long de l'axe Z (b) pour différentes rotations le long de l'angle (°).....	99

Figure.III.4 : Structures géométriques des complexes $\beta$ -CD/SULPA (modèles A et B) optimisées par la méthode PM3 dans L'acétonitrile. Les liaisons hydrogène intermoléculaires possibles sont indiquées par des lignes en pointillés.....	103
Figure.III.5: Représentation des orbitales frontières HOMO et LUMO du complexe $\beta$ -CD/SULPA (modèle A) dans l'acétonitrile. ....	107
Figure.III.6. : Structures géométriques optimisées au B3LYP/6-31G (d) pour les complexes ( $\beta$ -CD/SULPA). ....	108

***TROISIEME PARTIE : Appareillages, protocoles expérimentaux et programmes utilisés***

<b>Figure.1</b> : Procédure de l'inclusion du SULPA dans la $\beta$ -CD selon les deux modèles (A) et (B).....	123
--	-----

## *Liste des Tableaux*

### ***PREMIERE PARTIE : Etude Bibliographique***

<b>Tableau.III.1:</b> Propriétés physico-chimiques et structurales des principales cyclodextrines[1].	29
<b>Tableau.III. 2:</b> Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications.	37

### ***DEUXIEME PARTIE : Résultats & discussion***

<b>Tableau.I.1:</b> Rendements et caractéristiques physico-chimiques des conjugués sulfonamides acide lipoïque (X) préparés.	73
<b>Tableau.II. 1:</b> traitement des données expérimentales entrant dans les équations 2 et 3 de Benesi-Hildebrand pour le complexe $\beta$ -CD /SULPA à $\lambda_{max} = 224$ nm.	85
<b>Tableau.III.1:</b> Energies (kcal / mol) et des moments dipolaires (Debye) avec des calculs PM3 et single points évaluées à des niveaux B3LYP/6-31G (d) et HF/6-31G (d) pour les complexes d'inclusion $\beta$ -CD/SULPA.	101
<b>Tableau .III.2 :</b> Paramètres géométriques du SULPA avant et après inclusion dans la $\beta$ -CD pour les complexes les plus stables A et B calculés par la méthode PM3.	103
<b>Tableau.III.3:</b> Caractéristiques énergétiques, thermodynamiques et résultats des calculs HOMO-LUMO selon la méthode PM3 et Energies "Single point" calculée par ONIOM2 pour les complexes d'inclusion $\beta$ -CD/ SULPA.	105
<b>Tableau.III.4 :</b> Les orbitales donneuses et acceptrices d'électrons, énergies correspondantes $E^{(2)}$ , pour les orientations A et B du complexe $\beta$ -CD/ SULPA optimisés par ONIOM2.	108

### ***TROISIEME PARTIE : Appareillages, protocoles expérimentaux et programmes utilisés***

<b>Tableau.1 :</b> Préparation des différents volumes molaires utilisées dans la méthode des variations continues.	120
<b>Tableau.2 :</b> Préparation des différents volumes molaires utilisées Méthode des rapports molaires.	120
<b>Tableau.3 :</b> Variation des absorbances en fonction de l'ajout de la $\beta$ -CD.	121
<b>Tableau.4:</b> Énergies de la complexation pour les deux orientations A et B.	124

# ***TABLE DE MATIERE***

## *Table des matières*

Liste des abréviations .....	I
Liste des Tableaux.....	III
Liste des Figures et Schémas.....	IV
<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>

### *PREMIERE PARTIE :*

#### *Etude Bibliographique*

#### *Chapitre I :L' Anhydrase Carboniques, une Nouvelle Cible Thérapeutique*

I.1. Introduction .....	4
I.2. Les anhydrases carboniques et leurs rôles dans l'organisme .....	5
I.2.1. Structure.....	5
I.2.2. L' Anhydrase carbonique de type IX .....	7
I.3. Inhibiteurs non classiques de l'AC .....	12
I.4. Conclusion.....	12
Références Bibliographiques .....	13

#### *Chapitre II : Solubilité & Vectorisation des Principes Actifs*

II.1. Introduction.....	15
II.2. Définition et Importance de la solubilité des principes actifs .....	15
II.2.1. Définition .....	15
II.2.2. Corrélation entre la solubilité et de la biodisponibilité des principes actifs.....	16
II.3. Systèmes de classification des substances actives .....	17
II.4. Les différentes options de formulation pour augmenter la solubilité des substances actives .....	17
II.5. Système de vectorisation des médicaments anticancéreux .....	20
II.6. Les nanovecteurs .....	21
II.7. Caractéristiques principales des systèmes de vectorisation .....	22
II.8. Vers une nanoparticule idéale: le "tout en un" .....	23
II.9. Conclusion .....	25
Références Bibliographiques .....	26



### **Chapitre III : Les Cyclodextrines**

III.1. Introduction .....	27
III.2. Caractéristiques structurales des Cyclodextrines .....	27
III.3. Propriétés physico-chimiques des Cyclodextrines .....	29
III.3.1. Solubilité dans l'eau .....	29
III.3.2. Propriétés de complexation des CDs et stœchiométrie .....	30
III.3.3. Facteurs influençant la complexation des molécules organiques par les CDs .....	31
III.3.4. Forces stabilisantes les complexes d'inclusions .....	32
III.3.5. Mécanisme de complexation .....	33
III.4. Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion .....	34
III.5. Détermination de la stœchiométrie et la constante de stabilité des complexes d'inclusion .....	35
III.5.1. Détermination de la stœchiométrie .....	35
III.5.1.1. Méthode des variations continues .....	35
III.5.1.2. Méthode des rapports molaires .....	35
III.5.2. Détermination de la constante de stabilité .....	36
III.5.3. Profil de solubilité des complexes d'inclusion: .....	36
III.6. Conséquences de la complexation et applications .....	37
III.7. Conclusion .....	37
Références Bibliographiques .....	38

### **Chapitre IV : La modélisation moléculaire**

IV.1. Introduction .....	40
IV.2. La méthode Ab-initio .....	42
IV.2.1. La méthode de Hartree-Fock (HF) : .....	43
IV.2.2. La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité DFT .....	43
IV.2.3. Bases d'orbitales atomiques: .....	44
IV.2.3.a. Les Orbitales de Type Slater (STO): .....	44
IV.2.3.b. Les Orbitales de Type Gaussienne (GTO): .....	44
IV.2.2. Les méthodes semi-empiriques .....	47
IV.2.3. La méthode Hybride ONIOM .....	48
IV.2.4. L'analyse NBO (Natural Bond Orbital) .....	50
IV.3. Conclusion: .....	51
Références Bibliographiques .....	52

**DEUXIEME PARTIE :**  
**Résultats & discussion**

**Chapitre I : Synthèse et Caractérisation des Conjugués Sulfonamides-Acide Lipoïque**

I.1- Introduction.....	53
I.2-Fonction, propriétés physiques et chimiques de l'Acide Lipoïque .....	54
I.3. Exemples de composés d'intérêt thérapeutique dérivés de à l' Acide Lipoïque .....	56
I.4. Couplage peptidique d'intérêt thérapeutique.....	59
I.5.Activité biologique des composés peptidiques.....	60
I.6. Peptides naturels.....	62
I.7. Les peptidomimétiques .....	63
I.8. Synthèse de conjugués sulfonamides -Acide Lipoïque.....	64
I.9. Caractérisations des composés obtenus. ....	68
I.10. Conclusion.....	74
Références Bibliographiques .....	75

**Chapitre II : Etude par Spectroscopie UV-Visible et IR de la Complexation du conjugué SULPA avec la  $\beta$ -Cyclodextrine**

II.1. Introduction.....	76
II.2. Etude en solution des complexes d'inclusion $\beta$ -CD/SULPA.....	77
II.2.1 Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion - $\beta$ CD/SULPA .....	77
II.2.2. Détermination de la stœchiométrie .....	79
II.2.2.1. La méthode des variations continues (ou méthode de Job) .....	79
II.2.2.2.Méthode des rapports molaires.....	81
II.2.4. Effet de l'ajout de la $\beta$ -CD sur l'absorbance des molécules SULPA .....	83
II.2.5. Détermination de la constante de stabilité.....	84
II.2.5.1. Détermination l'énergie libre $\Delta G^\circ$ .....	87
II.4. Etude à l'état solide du complexe d'inclusion $\beta$ -CD/SULPA par Spectroscopie Infra-rouge(IR)88	
II.4. Conclusion.....	90
Références bibliographiques .....	91

**Chapitre III : Etude par Modélisation Moléculaire de la Complexation du Conjugué SULPA avec la  $\beta$ -cyclodextrine**

III.1. Introduction .....	92
III.2. Méthodologie de travail et logiciels utilisés.....	92
III.2.1. Construction du modèle.....	93

III.2.2. Traitement semi- empirique, quantique, hybride ONIOM2 et analyse NBO .....	95
III.3. Discussion des résultats.....	97
III.3.1. Calculs semi-empiriques et de mécanique quantique.....	97
III.3.2. L'Effet de solvants .....	99
III.3.3. Moment dipolaire .....	100
III.3.4. Détermination des paramètres géométriques et de l'énergie de déformation.....	100
III.3.5. Liaisons hydrogène dans le complexe .....	101
III.3.6. DFT single point et les calculs Hartree-Fock.....	104
III.3.6. Les calculs via la méthode ONIOM2.....	104
III.3.7. les paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusion.....	105
111.3.8. Étude par les orbitales moléculaire frontières (FMO).....	106
III.3.9. Analyse NBO .....	107
III.4. Conclusion.....	109
Références bibliographiques .....	110

## **TROISIEME PARTIE**

### ***Appareillages, Protocoles Expérimentaux et Programmes utilisés***

I. Conditions générales et Méthodes de caractérisation.....	114
I. Conditions générales et Méthodes de caractérisation.....	114
II-Protocoles Expérimentaux .....	115
II.1. Synthèse des conjugués sulfonamides-acide lipoïque .....	115
II.1.1. Synthèse de: N-(4-Sulfonamidophenyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide. ....	115
II.1.2. Synthèse de: N-[(4-Sulfonamidophenyl)-methyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide .....	116
II.1.3. Synthèse de: N-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide. 116	
II.1.4. Synthèse de: N-[(4-(Thiazol-2-yl)-sulfonamidophenyl)]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide. ....	117
II.2. Préparation du complexe d'inclusion SULPA/ $\beta$ -CD à l'état solide : .....	117
II.3. Etude en solution du complexe d'inclusion $\beta$ -CD/SULPA .....	119
II.3.1. Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion - $\beta$ CD-SULPA.....	119
II.3.2. Détermination de la stoechiométrie du complexe d'inclusion $\beta$ -CD-SULPA .....	119
II.3.2.a. Méthode des variations continues (méthode de Job) .....	119
II.3.2. b Méthode des rapports molaires .....	119
II.3.3. Détermination de la constante de stabilité du complexe.....	121
III.Protocoles Théoriques .....	122
III.1. Programmes utilisés: .....	122
III.2. Recherche du minimum.....	122
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>112</b>

# ***INTRODUCTION GENERALE***

## INTRODUCTION GENERALE

Au cours de ce nouveau siècle, l'importance croissante des maladies non transmissibles, y compris le cancer, représente pour le développement mondial l'un des défis majeurs en matière de santé.

Le «cancer» est le nom donné à un groupe de maladies qui se caractérisent par la multiplication et la prolifération anarchiques de cellules anormales, qui aboutissent à la formation de tumeurs, et sont susceptibles de coloniser d'autres organes pour générer des cancers secondaires, les fameuses métastases.

La multiplicité des causes du cancer explique qu'aujourd'hui, les malades sont pris en charge par des équipes multidisciplinaires (chirurgiens, radiologues, oncologues, etc) qui mettent en œuvre et combinent différentes approches et stratégies thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie...) pour vaincre la maladie, ou à tout le moins retarder son développement.

Alors que la chirurgie et la radiothérapie ont une action locale, la chimiothérapie est une combinaison de traitements médicamenteux dont l'action est systémique: elle opère dans tout le corps, ce qui engendre souvent des effets secondaires ou même des phénomènes de résistance. C'est la raison pour laquelle de nouvelles stratégies et techniques médicales ont été développées au cours de ces dernières décennies.

On a ainsi vu apparaître l'hormonothérapie, l'immunothérapie, les premiers vaccins anti-cancers et les thérapies biologiques ciblées à savoir : les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs de tyrosine kinases, les inhibiteurs de l'angiogenèse ou encore les inhibiteurs de l'Anhydrase Carbonique, qui exploitent les différences biologiques entre les cellules cancéreuses et les cellules saines pour s'attaquer préférentiellement aux premières.

En effet, les cellules au centre de la tumeur deviennent hypoxiques, ce qui favorise la progression tumorale, la radio et/ou la chimiorésistance et entraîne la libération d'enzymes comme l'Anhydrase Carbonique IX (ACIX). Cette enzyme très peu exprimée dans les cellules saines est en partie responsable de l'acidification plus importante de l'environnement extracellulaire des cellules tumorales (pH ≈ 6,8) en catalysant la réaction de formation de protons. Par conséquent, l'inhibition de l'activité de cette enzyme par l'intermédiaire d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et

sélectifs pourrait constituer une nouvelle approche pour le management des tumeurs hypoxiques.

Divers composés, inhibiteurs potentiels de l'Anhydrase Carbonique IX appartenant à diverses familles chimiques telles que les sulfonamides, les coumarines, les phénols, les polyamines et les anticorps ont été conçus et synthétisés. Certains de ces inhibiteurs peuvent avoir des constantes d'inhibition ( $K_i$ ) de l'ordre du nanomolaire.

Ces dernières années, de nombreux dérivés de sulfonamides affins pour l'ACIX ont été identifiés. La majorité de ces inhibiteurs sont insolubles dans l'eau et très peu sélectifs vis-à-vis des différentes isoformes de l'AC, provoquant ainsi d'innombrables effets indésirables. Donc, le développement d'inhibiteurs plus sélectifs constitue un grand challenge pour l'obtention de nouveaux types d'inhibiteurs.

Les recherches actuelles dans le cadre de la chimiothérapie s'orientent vers la découverte de nouvelles molécules mais aussi vers l'amélioration de l'efficacité des molécules existantes.

Aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Par exemple, certaines molécules sont inefficaces car elles ne diffusent pas spontanément à l'intérieur de la cellule alors que leur cible thérapeutique est à localisation intracellulaire.

La forme d'une drogue, la topologie de ses motifs structuraux, en d'autres termes sa configuration et sa liberté conformationnelle sont des éléments clés du contrôle de son interaction avec son récepteur et, par conséquent des réponses biologiques et thérapeutiques qui peuvent en résulter. De nombreuses études expérimentales et théoriques ont été réalisées pour mieux prédire et comprendre les structures, les propriétés et les interactions moléculaires des systèmes moléculaires et supramoléculaires.

Notre travail de thèse a été consacré à la fois à la synthèse d'une série de sulfonamides candidats potentiels pour l'inhibition sélective de l'anhydrase carbonique IX et également à l'étude de leur complexes d'inclusion avec  $\beta$ -cyclodextrine dans le but d'améliorer leur solubilité et leur sélectivité.

Le travail présenté dans ce mémoire est scindé en **trois parties distinctes** qui commencent par une introduction générale et se terminent par une conclusion.

Les deux premières parties sont découpées en plusieurs chapitres, la troisième concernant la Partie Expérimentale.

**La première partie** présente une mise au point bibliographique sur les différents aspects du thème de sujet de thèse à savoir :

- Les Anhydrases Carboniques comme nouvelle cible thérapeutique
- La solubilité et la vectorisation des principes actifs
- Les Cyclodextrines
- La modélisation moléculaire

**La deuxième partie** du mémoire rapporte les résultats obtenus au cours du travail réalisé. Cette partie est divisée en trois chapitres:

Le premier chapitre présente les travaux sur la reprise de la synthèse et la caractérisation d'une série de sulfonamides couplés à l'acide lipoïque.

Le deuxième chapitre décrit une étude expérimentale par spectroscopie UV-Visible et IR de la Complexation du conjugué le plus actif en l'occurrence le N-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide(SULPA) avec la  $\beta$ -cyclodextrine.

Le troisième chapitre rapporte une étude théorique par modélisation moléculaire de la complexation du conjugué (SULPA) avec la  $\beta$ -cyclodextrine.

**La troisième partie** est réservée à la description de l'appareillage utilisé et des protocoles théoriques et expérimentaux que nous avons conduits au cours de ce travail, ainsi que les caractéristiques des produits obtenus.

***PREMIERE PARTIE***  
***Etude Bibliographique***



## *Chapitre I*

# *L'Anhydrase Carboniques, une Nouvelle Cible Thérapeutique*

## **I.1. Introduction**

Toutes les molécules des êtres vivants sont formées et dégradées en permanence par des réactions chimiques dont elles sont presque toutes catalysées par des enzymes (les réactions spontanées, se produisant sans intervention d'une enzyme chez un être vivant sont rares). Il y a au moins une enzyme différente par réaction catalysée et chaque enzyme ne transforme spécifiquement qu'une seule structure chimique, qu'un seul type de molécule. Ce qui représente des milliers d'enzymes pour chaque organisme.

L'activité de nombreuses variétés d'enzymes peut être également régulée par voie externe aux moyens d'activateurs ou d'inhibiteurs d'enzymes. En effet, on peut concevoir une molécule qui ressemble fort au substrat naturel et qui est capable de s'emboîter dans le site actif de l'enzyme, mais en s'y attachant plus fortement. Cette molécule serait en outre conçue de manière à ce qu'elle ne puisse subir aucune réaction dans le site actif. Mais tant qu'elle y réside, elle empêche au substrat naturel d'y accéder, de sorte que la réaction enzymatique est arrêtée [1].

Le meilleur moyen de concevoir un inhibiteur enzymatique est d'élaborer un analogue du substrat naturel de l'enzyme ou de son état de transition qui présente une affinité plus importante pour cette enzyme. On parle d'inhibition compétitive puisque la molécule médicamenteuse est réellement en compétition avec le substrat naturel pour occuper le site actif.

Le défi actuel consiste donc à trouver un produit chimique qui serait capable d'interagir avec des enzymes cibles en vue de comprendre quel est leur rôle et si on pourrait les mettre à profit comme cibles de médicaments.

En médecine, un grand nombre d'enzymes propres aux malades peuvent être inhibées par des médicaments en vue de modifier les réactions chimiques intervenant au cours des processus métaboliques. Ainsi, les sulfonamides inhibent les enzymes des bactéries, tandis que les anticholinestérases inhibent une enzyme qui s'appelle l'acétylcholinestérase. Et il en va de même pour certains autres médicaments spécifiques à inhiber d'autres enzymes [2,3].

## I.2. Les anhydrases carboniques et leurs rôles dans l'organisme

Les anhydrases carboniques (ACs) sont des métalloenzymes omniprésentes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

En plus du rôle bien établi des inhibiteurs de l'AC comme diurétiques et médicaments anti-glaucome, il a été montré récemment que les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique pourraient être une cible potentielle pour la découverte d'anticancéreux [4,5].

Jusqu'ici 16 isoformes de l'AC ont été mises en évidence. Elles se distinguent par des localisations subcellulaires et tissulaires différentes, ainsi que par une variation de leurs activités catalytiques. Plusieurs ACs sont cytosoliques (AC I, II, III, VII, XIII), cinq sont transmembranaires (AC IV, IX, XII, XIV, XV), deux mitochondriales (AC VA et VB) et une est sécrétée (AC VI). Les anhydrases carboniques catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton, selon la réaction suivante :



**Schéma.I.1:** Réaction réversible d'hydratation du CO<sub>2</sub>.

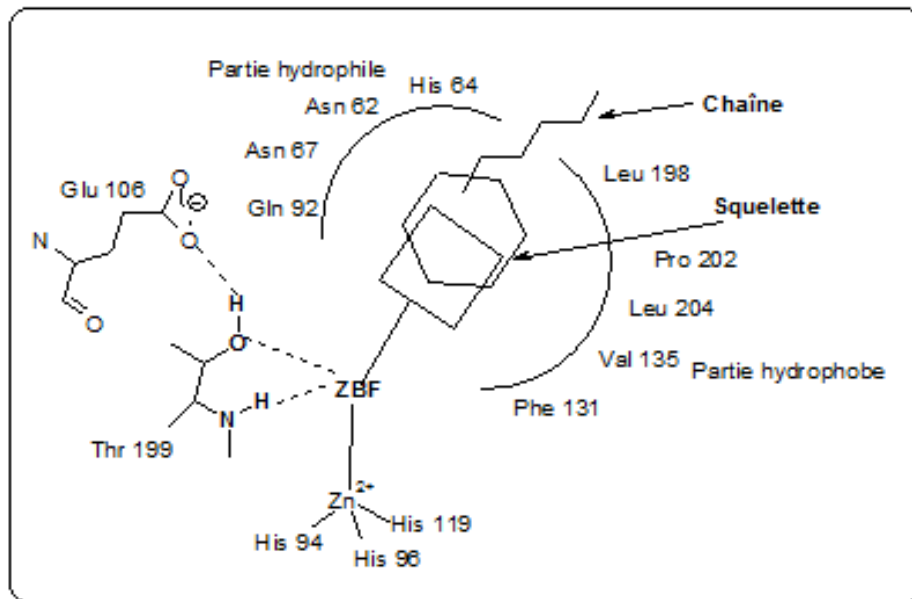
Elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques comme la régulation des échanges gazeux, la respiration, la calcification, la résorption osseuse, la sécrétion de fluides ou encore la régulation des échanges ioniques rénaux.

Les isoformes I et II sont principalement responsables des rôles physiologiques alors que d'autres isoformes sont impliquées dans des phénomènes pathologiques comme, le cancer (AC IX et XII), l'épilepsie (AC VII), l'obésité (AC IX), la diurèse (AC II, AC IV, AC XII and AC XIV) ou l'ostéoporose (AC IV et AC XIV) [6].

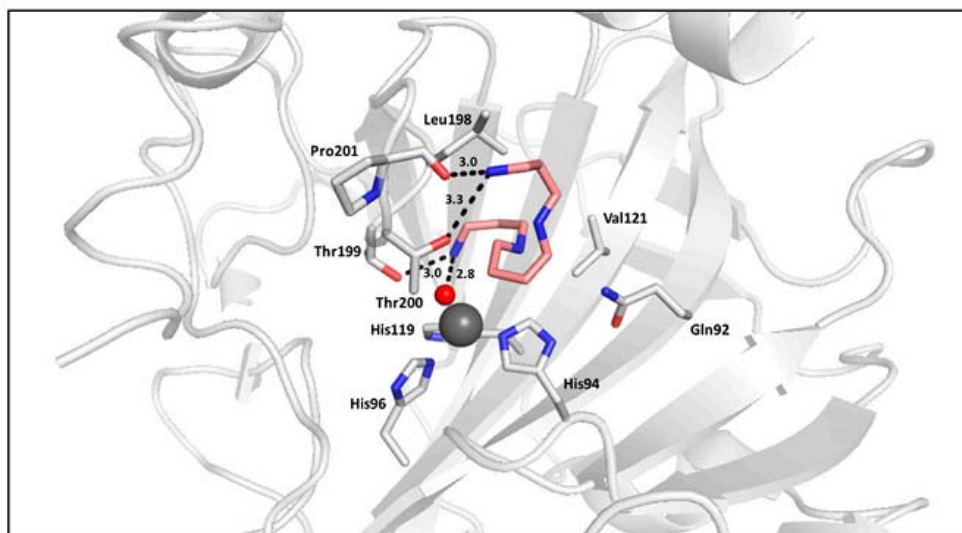
### I.2.1. Structure

La structure globale des isoformes des anhydrases carboniques est similaire. Le site actif est en forme de cône avec à son sommet l'ion zinc II, coordonné à trois résidus d'histidine (Figure.I.1). A proximité du zinc, une poche à résidus hydrophiles et une

poche à résidus hydrophobes sont définies. Leur composition en acides aminés est proche d'une isoforme à une autre [7].



**Figure.I.1:** Modèle général d'un inhibiteur complexé dans le site actif de l'anhydrase carbonique.



**Figure.I.2.** La Spermine (Saumon) en complexe avec CA II (grise)[8]

On peut constater que pour une interaction optimale avec le site actif, des interactions électrostatique de type liaisons hydrogènes ou liaisons de Van der Waals

complémentaires avec les sites hydrophiles et hydrophobes du site actif de l'enzyme semblent être un atout pour une bonne inhibition de l'CA.

### **I.2.2. L'Anhydrase carbonique de type IX**

#### **a)-Expression**

Deux isoformes d'AC sont surexprimées dans certains cancers. La première est l'AC IX, caractérisée par Pasterokeya et son équipe en 1992 ; la seconde est l'AC XII. L'AC IX est très peu exprimée dans les cellules saines, par contre, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses (notamment dans les tumeurs solides), suggérant la possibilité d'une action thérapeutique sélective, Sa surexpression a été reportée dans des carcinomes cellulaires de plusieurs organes, dont l'œsophage, le poumon, le rein, le côlon, le sein,... [9].

#### **b)- Cause de surexpression**

Les cellules cancéreuses formant une tumeur solide sont caractérisées par un état d'hypoxie. Les cellules situées au centre de la masse cancéreuse se retrouvent éloignées des capillaires sanguins les approvisionnant en oxygène et en glucose. L'hypoxie régule ainsi l'expression de différents gènes comme celui de l'AC IX[10]. Deux facteurs sont impliqués dans l'expression de l'AC IX :

la protéine suppressive de tumeurs VHL (Von Hippel-Lindau : régulation négative) et HIF-1 (Hypoxie Inducible Factor : régulation positive) .

En raison de sa surexpression en milieu hypoxique, l'AC IX a été proposée comme marqueur de l'hypoxie tumorale [11].

#### **c)- Rôle de l'AC IX dans la tumorigenèse**

L'AC IX catalyse la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone. Lors de cette réaction, elle favorise les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire. Par ailleurs, elle participe à l'acidification du milieu extracellulaire ce qui contribue à l'induction d'une chimiorésistance en diminuant l'efficacité des agents anticancéreux, comme certains inhibiteurs de topoisomérases (doxorubicine, bléomycine, mitomycine, irinotécan,...) (12).

En effet, certains médicaments (tels que des anthracyclines) étant des bases faibles, le milieu extracellulaire acide augmente la proportion de formes ionisées et réduit ainsi

leur passage membranaire passif. Une étude récente démontre que, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein précoce et traitées par la doxorubicine, l'expression de l'ACIX est corrélée à un mauvais pronostic thérapeutique.

De façon générale, la surexpression de l'AC IX est souvent associée à une réponse faible des thérapies classiques de radiothérapie ou de chimiothérapie. Dans des modèles de tumeurs du sein, une diminution de la croissance tumorale et du processus métastatique a été observée lors de l'inhibition de l'AC IX. En conséquence, l'ACIX a été proposée comme une cible thérapeutique potentielle et une des approches possibles serait d'inhiber son activité enzymatique avec des « petites molécules » inhibitrices [13].

#### **d)- Inhibiteurs Classiques de l'anhydrase carbonique IX dans la série des sulfonamides**

Selon les données rapportées dans la littérature, les ACs peuvent être inhibés essentiellement par deux classes de composés de bas poids moléculaire [14].

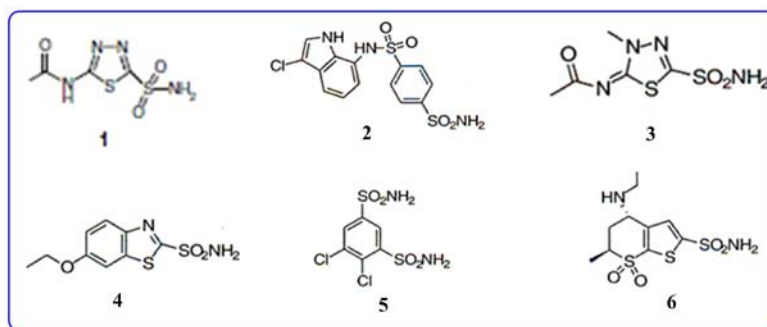
- La première classe renferme des anions susceptibles de former des complexes métalliques comme les halides, les azides, et les thiocyanates.
- La deuxième classe comprend les sulfonamides / sulfamates/sulfamides répondant à la formule générale suivante : $RXSO_2NH_2$ , avec : (R = aryle; hétéroaryle; perhaloalkyl; X = rien, O ou NH).

Les sulfonamides correspondent à la famille la plus représentée d'inhibiteurs d'AC. Ils sont caractérisés par une constante d'inhibition ( $K_i$ ) de l'ordre du nanomolaire.

Afin de limiter les effets secondaires, une inhibition sélective est nécessaire envers les autres isoformes de l'AC, en particulier pour l'ACII, qui est ubiquitaire.

Ces dernières années, de nombreux dérivés sulfonamides affins pour l'AC IX ont été identifiés, avec des  $K_i$  de l'ordre du nanomolaire. Ces inhibiteurs sont très peu sélectifs et inhibent différentes isoformes de l'AC, susceptibles de provoquer de nombreux effets secondaires comme des calculs rénaux et des troubles digestifs.

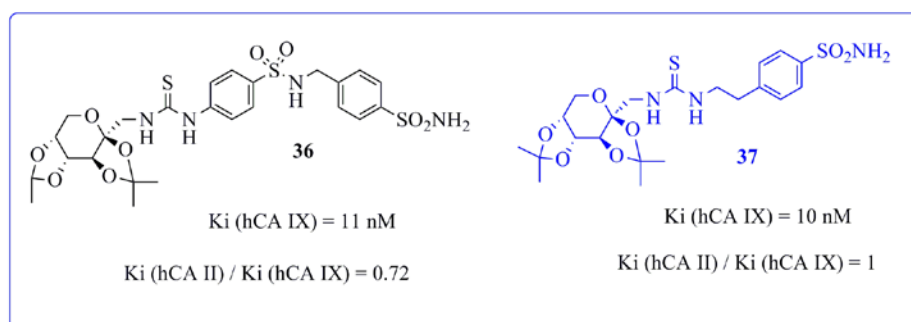
L'inhibition de l'isozyme transmembranaire IX associé aux tumeurs a été d'abord étudiée avec une série de sulfonamides aromatiques et hétérocycliques [15], y compris les six dérivés utilisés en clinique : l'acetazolamide(AZA) **1**, le methazolamide **3**, l'ethoxzolamide **4**, le dichlorophenamide **5**, et le dorzolamide **6** (figure.I.3).



**Figure.I.3:** Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.

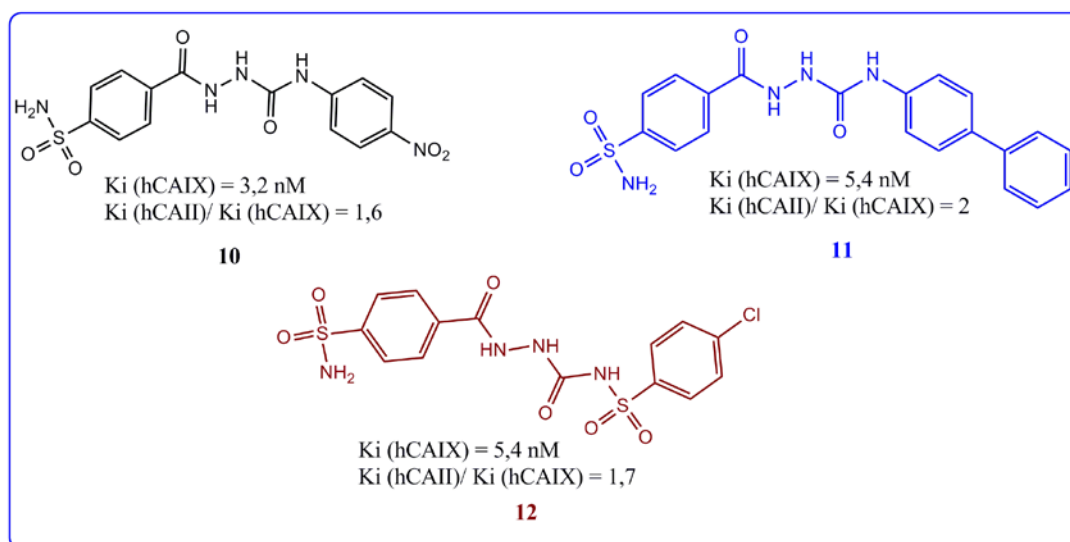
Ces composés phares manifestent un profil pharmacologique très intéressant pour l'inhibition du CAIX avec des constantes d'inhibition.  $K_i$  situées dans la gamme de 14-50 nM. Ils peuvent être considérés comme des chefs de file intéressants pour le développement de nouveaux dérivés anticancéreux. Ainsi, l'Indisulam **2**, (E7070), qui est parmi les sulfonamides anticancéreux les plus efficaces, avec une constante d'inhibition  $K_i$  de l'ordre de 24 nM contre le ACIX, a été déjà développé jusqu'aux stades des essais cliniques en Europe et au Etats-Unis [16].

Par ailleurs, une approche **sucre** très prometteuse qui s'est développée récemment dans le but de cibler sélectivement les différentes isoformes de l'AC, consiste à greffer des parties osidiques aux sulfonamides / sulfamides / sulfamates aromatiques ou hétérocycliques; En effet, la synthèse d'une série de dérivés incorporant une partie protégée de fructopyranose présente dans le topiramate (Figure.I.4) et étant liée aux arylsulfonamides via une fonction thiourée, a été rapportée [17]. La même étude montre que cette pharmacomodulation conduit à des inhibiteurs efficaces de l'AC ( $K_i$ s=10<sup>-4</sup>.500 nM) parmi lesquels on peut citer les composés **36** et **37** (Figure.I.4) intervenant comme inhibiteurs potentiels efficaces contre l'isoforme transmembranaire hCAIX.



**Figure.I.4 :** Exemple d'inhibiteurs liés à des sucres via une fonction thiourée

Pour rester toujours dans la pharmacomodulation des sulfonamides récemment rapportée [18], on se doit de citer une série de dérivés de sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leur structure (figure .I.5). Tous les composés de cette série se sont révélés posséder une activité inhibitrice contre le hCAIX meilleure ou égale à celle de l'indisulam qui se trouve actuellement au stade des essais cliniques. Trois composés de cette série possédant des constantes d'inhibition situées dans la gamme de 3.2-5.4 nM, étant considérés parmi les inhibiteurs du hCA IX les plus efficaces et leur pouvoir d'inhibition comparé à celui de l'indisulam est de cinq à sept fois plus élevé.



**Figure.I.5:** Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leurs structures.

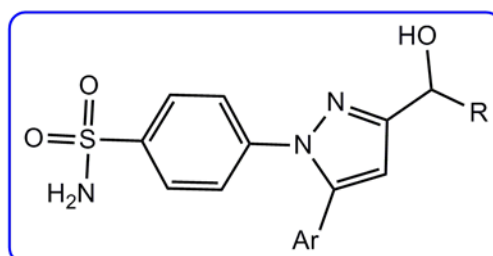
Récemment, l'affinité exceptionnelle de divers benzenesulfonamides incorporant des parties triazinyle a été indiquée dans les travaux rapportés par Garaj et al [19]. Trois composés têtes de séries: Le chlorotriazinyl-sulfanilamide **13** aussi bien que les dérivés bis-éthoxytriazinyle du sulfanilamide **14** et l'homosulfanilamide **15** (figure .I.6) étaient parmi les inhibiteurs du hCA les plus efficaces et les plus sélectifs pour le ACIX jamais obtenus jusqu' à présent avec des *K<sub>i</sub>*s dans la gamme subnanomolaire de 0.12-0.34 nM.





**Figure.I.6 :** Benzenesulfonamides incorporant des parties triazinyle en leurs structures.

Divers composés permettant de déterminer des relations structure activité ont été récemment synthétisés au sein du laboratoire de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL) à Lille [20]. Ces études ont permis de mettre en évidence un pharmacophore affiné pour le site actif de l'ACIX (Figure .I.7). Celui-ci possède un squelette sulfonamidodiarylpyrazole constitué des groupements suivants :



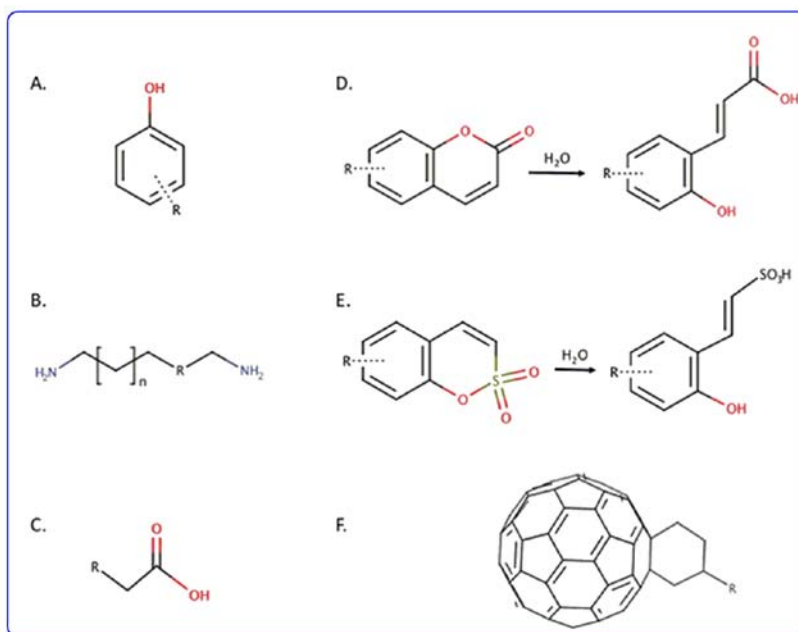
**Figure.I.7:** Le sulfonamidodiarylpyrazole nouveau pharmacophore affiné pour le l'ACIX.

- \* Une fonction sulfonamide portée par un aryle qui interagira sous sa forme anionique avec le zinc.
- \* Un hétérocycle de type pyrazole permettant de rigidifier la structure et ainsi orienter les substituants.
- \* Un groupement aryle (Ar) substitué ou non par des halogènes ou des fonctions éthers, nécessaire à l'interaction avec les résidus de la poche hydrophobe.
- \* Une fonction alcool (primaire, secondaire ou tertiaire) interagissant avec l'acide aminé Tryptophane 5 du site actif de l'AC IX.

Différentes modulations autour de ces produits ont été réalisées afin d'améliorer leur activité et leur sélectivité et d'élargir les relations structure activité.

### I.3. Inhibiteurs non classiques de l'AC

Des performances dignes d'intérêt dans le domaine pharmaceutique ont permis ces dernières années d'identifier de nouvelles classes de composés inhibiteurs de l'AC qualifiées comme non classiques, comprenant ; phénols, polyamines, acides carboxyliques, coumarines et leurs dérivés, En plus de fullerènes [21] Figure.I.8).



**Figure.I.8** (A) Phénol; (B) Polyamine; R est un atome N ou atome C; (C) acide Carboxylique; (D) Coumarine et produit d'hydrolyse; (E) Sulfocoumarine et produit d'hydrolyse; (F) dérivé de Fullerène.

### I.4. Conclusion

Les ACs constituent actuellement une nouvelle approche thérapeutique pour le ciblage de plusieurs pathologies impliquant leur surexpression. Le mécanisme catalytique et le mécanisme d'inhibition des ACs sont connus en détail et beaucoup de données biochimique, physiologique et pharmacologique sont maintenant suffisantes pour justifier la possibilité d'utiliser l'isozyme transmembranaire ACIX comme cible dans le management des tumeurs hypoxiques qui ne répondent pas, ou répondent mal à la chimio et à la radiothérapie classique.

De nombreux exemples de composés appartenant à une variété de classes chimiques en particulier les sulfonamides sont actuellement disponibles pour l'inhibition de l'ACIX. Mais le problème majeur de ces inhibiteurs est leur faible solubilité et manque de sélectivité, ce qui nécessite la mise au point de nouveaux inhibiteurs plus solubles et hautement sélectifs.

## Références bibliographiques

- [1] M. Borel, R. Le Peuch, M. Gillery-Bellon, Biochimie Dynamique, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1997.
- [2] L.P. Graham, Chimie pharmaceutique, Traduction de la 2eme édition anglaise par Paul Depovere, édition De Boeck université, Paris, Bruxelles, 2003.
- [3] M. Adenot, Initiation à la chimie médicinale, Ellipses Edition Marketing S.A., 2000.
- [4] C.T. Supuran, A. Scozzafava, A. Casini, Med. Res. Rev, 2003, 23, 146-18.
- [5] V. M. Krishnamurthy, G. K. Kaufman, A. R. Urbach, I. Gitlin, K. L. Gudiksen, D. B. Weibel, G. M. Whitesides, Chem. Rev, 2008, 108, 946–1051.
- [6] C.T. Supuran, A. Scozzafava, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15, 4336–4350.
- [7] J.Y. Winum, A. Scozzafava, J-L. Montero, C.T. Supuran, Mini Rev. Med. Chem, 2006.
- [8] F. Carta, C. Temperini, A. Innocenti, A. Scozzafava, K. Kaila, C.T. Supuran, J. Med. Chem, 2010, 53, 5511–5522.
- [9] D. Vullo, M. Franchi, E. Gallori, J. Pastorek, A. Scozzafava, S. Pastorekova, C.T. Supuran, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 1005-1009.
- [10] C.T. Supuran, Biochem. J, 2016, 473, 2023–2032.
- [11] C.T. Supuran, J. Enzyme Inhib. Med. Chem, 2015, 1–16.
- [12] Y. Li, C. Tu, H. Wang, D.N. Silverman, S.C. Frost, J. Biol. Chem. 2011, 286, 15789–15796.
- [13] Y. Lou, P.C. McDonald, A. Oloumi, S.K. Chia, C. Ostlund, A. Ahmadi, A. Kyle, U. Auf dem Keller, S. Leung, D. Huntsman, B. Clarke, B.W. Sutherland, D. Waterhouse, Cancer Res, 2011, 71, 3364–3376
- [14] C.T. Supuran, Bioorg. Med. Chem. Lett, 2010, 20, 3467–3474.
- [15] D. Vullo, M. Franchi, E. Gallori, J. Pastorek, A. Scozzafava, S. Pastorekova, C.T. Supuran, Bioorg Med Chem Lett, 2003; 13, 1005-1009.
- [16] C.T. Supuran, Expert Opin Investig Drugs, 2003, 12, 283-287.
- [17] J.Y. Winum, A. Thiry, K.E. Cheikh, J.M. Dogne, J.L. Montero, D. Vullo, A. Scozzafava, B. Masereel, C.T. Supuran, Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17, 2685-2691.
- [18] J.Y. Winum, J.M. Dogne, A. Casini, X. de Leval, J.L. Montero, A. Scozzafava, D. Vullo, A. Innocenti, C.T. Supuran, J Med Chem, 2005, 48, 2121-2125.

- [19] V. Garaj, L. Pucetti, G. Fasolis, J.Y. Winum, J.L. Montero, A. Scozzafava, D. Vullo, A. Innocenti, C.T. Supuran, *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14, 5427-5433.
- [20] T. Rogez-Florent, N. Azaroual, L. Goossens, J.F. Goossens, C. Danel, *Carbohydr Polym*, 2015, 115, 598-604.
- [21] L. Carrie, L. Lomelino, C.T. Supuran and R. McKenna, *Int. J. Mol. Sci*, 2016, 17, 1150.

## *Chapitre II*

### *Solubilité & Vectorisation des Principes Actifs*

## **II.1. Introduction**

Malgré l'efficacité prouvée de certains principes actifs in vitro, des contraintes sont rencontrées lors de la mise en place d'une application in vivo. Bien que des progrès significatifs dans la pharmacologie moderne aient été réalisés, il y a encore des domaines où des améliorations substantielles doivent être apportées, pour atteindre un niveau supérieur d'efficacité thérapeutique. En particulier, une faible biodisponibilité et de mauvaises caractéristiques pharmacocinétiques sont toujours au cœur des principales causes d'échec du développement de nouveaux médicaments.

Au fil des ans, beaucoup de principes actifs (PA) prometteurs ont ainsi vu leur mise sur le marché compromise en raison de problèmes au niveau de la solubilité, la taille, la sélectivité d'action et de la sensibilité à la dégradation. Par exemple, le premier obstacle majeur à contourner – une solubilité faible dans l'eau. En effet, en milieu biologique, une concentration optimale en molécules actives doit être délivrée sur le site d'action désiré pour que la thérapie soit bénéfique au patient.

La vectorisation, ou délivrance spécifique de principes actifs vers un organe, un tissu ou une cellule malade grâce à des transporteurs est un des défis majeurs de la recherche thérapeutique. Certains médicaments se heurtent aussi à des barrières enzymatiques entraînant leur dégradation et métabolisation rapide. La distribution de ces molécules actives vers les zones cibles malades peut donc être déficiente. De plus, une accumulation de thérapeutiques dans les tissus sains peut entraîner une toxicité rédhibitoire, entraînant l'abandon du traitement malgré son efficacité.

Par l'application du principe de la vectorisation, la pharmacie galénique moderne développe donc des systèmes d'administration susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire vers la cible souhaitée tout en protégeant le principe actif de la dégradation par les enzymes.

## **II.2. Définition et Importance de la solubilité des principes actifs**

### **II.2.1. Définition**

La solubilité est la propriété d'une substance chimique solide, liquide ou gazeuse appelée soluté à se dissoudre sous forme solide, liquide ou gazeuse dans un solvant pour former une solution homogène de soluté dans le solvant. La solubilité d'une substance dépend essentiellement du solvant utilisé, ainsi que sur la température et la pression. On peut définir la solubilité comme étant la quantité d'équilibre maximum de soluté qu'on peut dissoudre dans l'unité de masse ou de volume du solvant dans les conditions bien

spécifiées [1]. L'avantage d'exprimer la solubilité de cette manière est sa simplicité, alors que l'inconvénient est qu'il peut fortement dépendre de la présence d'autres espèces dans le solvant.

Le problème principal de l'utilisation de composés en tant qu'agents thérapeutiques est liée à leur manque de solubilité dans les conditions physiologiques. En effet, pour être de bons candidats médicaments, les dérivés doivent être lipophiles pour permettre le passage des membranes cellulaires et doivent également posséder une solubilité suffisante dans les conditions physiologiques pour être pharmacologiquement actifs. Dans le but d'augmenter leur solubilité aqueuse ainsi que leur biodisponibilité, en termes d'hydrophilie (ou hydrophobie), on peut utiliser le coefficient de partage ou de partition (LogP) pour mesurer la différence de solubilité d'un composé dans un solvant hydrophobe (Octanol) et un solvant hydrophile (eau). L'étendue de la solubilité varie largement, de l'infiniment soluble (totalement miscible) tel que l'éthanol dans l'eau, au peu soluble, comme le chlorure d'argent dans l'eau. Le terme insoluble est souvent appliquée aux composés faiblement ou très faiblement solubles [2]. IUPAC définit la solubilité comme la composition analytique d'une solution saturée exprimée en proportion d'un soluté désigné dans un solvant désigné. La solubilité peut être exprimée en unités de concentration molaire, molalité, fraction molaire, rapport molaire, et d'autres unités [3].

### **II.2.2. Corrélation entre la solubilité et la biodisponibilité des principes actifs**



La solubilité qui est le phénomène de dissolution du soluté dans le solvant pour obtenir un système homogène, est l'un des paramètres importants pour atteindre une biodisponibilité attendue du médicament.

La biodisponibilité se définit par la quantité de principe actif qui parvient à son site d'action et la vitesse avec laquelle il y accède. Elle dépend de plusieurs facteurs comme sa vitesse de dissolution, sa solubilité ou sa vitesse d'absorption intestinale.

### **II.3. Systèmes de classification des substances actives**

Afin d'optimiser le travail de pré-formulation et de passer plus rapidement à l'étape de la formulation, il est intéressant de classer les substances actives en fonction de leurs propriétés physicochimiques clés. C'est entre autre le rôle joué par le système de classification biopharmaceutique (Biopharmaceutics Classification System, BCS) qui permet d'estimer la biodisponibilité *in vivo* des substances actives en se basant sur leur

solubilité et leur perméabilité in vitro [4]. Il définit 4 classes de substances actives (figure.II1).

 <b>Perméabilité</b>	<b>Casse II</b> Faible solubilité Haute perméabilité	<b>Calasse I</b> Haute solubilité Haute perméabilité
	<b>Classe IV</b> Faible solubilité Faible perméabilité	<b>Classe III</b> Haute solubilité Faible perméabilité
	 <b>Solubilité</b>	

**Figure. II.1:**Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS)

Une substance active est considérée comme ayant une haute solubilité lorsque la dose administrable maximale par libération immédiate est soluble dans 250mL d'un milieu aqueux avec un pH allant de 1 à 6,8 à  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Quand plus de 85% de la dose de substance active initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité [5].

#### **II.4. Les différentes options de formulation pour augmenter la solubilité des substances actives**

La faible solubilité aqueuse est le principal problème rencontré avec le développement de la formulation de nouvelles entités chimiques. Ainsi, 70% des nouvelles substances actives candidates, présentent une faible solubilité dans l'eau. Il apparait donc primordial de développer différentes options de formulations dans le but d'améliorer la solubilité des substances actives. Il existe de nombreuses approches disponibles et rapportées dans la littérature pour améliorer la solubilité des médicaments faiblement solubles dans l'eau. En effet, En se basant sur l'équation de Noyes-Whitney qui présente les différents facteurs physicochimiques influençant la vitesse de dissolution d'une



substance active, Kawabata a décrit les techniques suivantes permettant l'augmentation de la solubilité et la biodisponibilité des principes actifs [6]:

**\*Modifications des cristaux**

Des formes polymorphes ont la même composition chimique mais présentent des réseaux cristallins ou des conformations moléculaires différentes. Ainsi elles ont des propriétés physicochimiques différentes, telles que le point de fusion, la densité, la stabilité ou la solubilité. L'utilisation d'une forme métastable plus soluble que la forme thermodynamiquement la plus stable, peut donc améliorer la biodisponibilité d'une substance active.

**\* Formation de sels:**

Cette approche communément utilisée pour les substances actives ionisables, permet d'en augmenter la solubilité et la vitesse de dissolution.

**\*Formation de co-cristaux:** Un co-cristal est un matériel cristallin comprenant au moins 2 composés différents. La substance active est associée à une molécule non toxique en quantité stœchiométrique. La mise en place de co-cristaux permet d'augmenter la vitesse de dissolution, notamment des substances actives non ionisables aux pH physiologiques.

**\*Amorphisation :** De façon générale, la solubilité des substances actives amorphes est plus grande que celle des cristaux correspondants. La formulation de systèmes amorphes stables peut être obtenue par les techniques de dispersions solides, conduisant aux dispersions solides amorphes (Amorphous Solid Dispersions, ASD). De façon générale les ASD sont moins stables que les CSD. Les ASD sont donc moins adaptées que les CSD aux substances actives amorphes peu stables.

**\* Modification du pH**

Modifier le pH dans une formulation contenant une substance active ionisable, est aussi une solution pour en augmenter la solubilité et la vitesse de dissolution.

**\*Formulations lipidiques et auto-émulsification**

Les formulations lipidiques sont des formulations dans lesquelles les substances actives sont à un état dissous, ce qui est favorable à une bonne biodisponibilité. Certains agents tensioactifs procurent aux formulations lipidiques des capacités d'auto-émulsification qui participent aussi à la dissolution des substances actives.

**\*Réduction de la taille des particules**

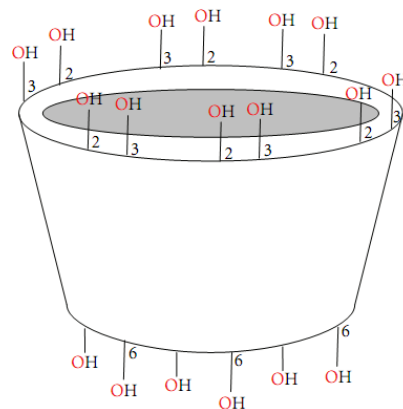
- **Micronisation:** La diminution de la taille des particules en augmente la surface développée et diminue l'épaisseur de la couche de diffusion, ce qui accroît la vitesse de

dissolution de la substance active. Cependant la micronisation peut aussi générer l'agglomération des particules pouvant alors nécessiter l'ajout d'agents mouillants.

- **Nanocristaux:** La formation de nanocristaux conduit à des particules de taille inférieure à 1 $\mu$ m. Par les mêmes mécanismes que la micronisation, les nanocristaux augmentent la vitesse de dissolution des substances actives, mais aussi la solubilité saturante. Les formulations de nanocristaux peuvent être définies comme des dispersions solides cristallines (Crystalline Solid Dispersions, CSD).

#### \* **Complexation par des Cyclodextrines**

L'encapsulation d'un principe actif dans le cœur hydrophobe des cyclodextrines (CDs) permet d'augmenter sa solubilité aqueuse, sa vitesse de dissolution et par conséquent d'accroître sa biodisponibilité.



**Figure.II. 2:** Représentation d'une cyclodextrine montrant une cavité hydrophobe et une surface extérieure hydrophile [7].

#### \* **Prodrogues**

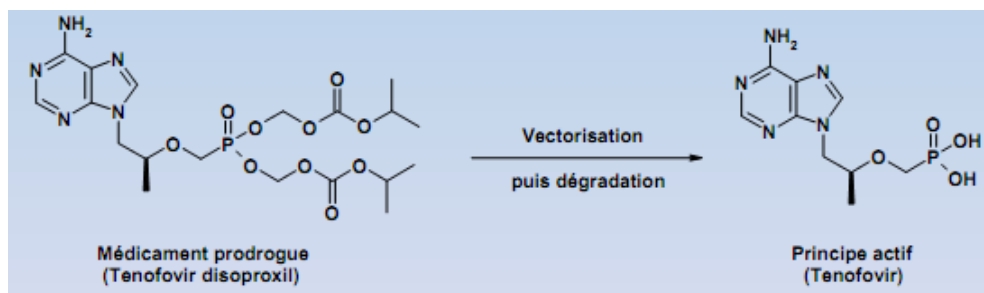
Il est possible d'augmenter la solubilité d'un principe actif par couplage covalent réversible avec des groupes hydrophiles (Prodrogues).

Le mot Prodrogue désigne donc un composé destiné à agir sur une cible thérapeutique qui doit subir une biotransformation après sa diffusion, afin qu'elle exerce son activité pharmacologique. La molécule se dégrade sous l'effet d'enzymes, libérant ainsi le principe actif (également appelé drogue) sur la cible, et une molécule facilement métabolisable. Trois points sont à considérer en particulier :

\* Le passage des membranes biologiques, de type lipidiques, comme la paroi du tube digestif ou les parois cellulaires, etc...

- \* La solubilité du composé en milieu aqueux, pour une bonne circulation Systémique
- \* La biotransformation pour libérer le composé actif sur la cible.

C'est ainsi que les analogues nucléosidiques utilisés dans le cas de thérapies antivirales, comme le Ténofovir sont des composés fortement hydrosolubles. Leur faible biodisponibilité, due à une pénétration intracellulaire très limitée (difficulté à franchir la paroi cellulaire phospholipidique), ont entraînée sa commercialisation sous forme de prodrogue: disoproxil fumarate (Schéma.II.1) [8]. Une fois la molécule dans le milieu intracellulaire, celle-ci est hydrolysée par voie enzymatique (les estérases), libérant ainsi le principe actif.



**Schéma.II.1:**Exemple d'une Prodrogue: le disoproxil fumarate

## II.5. Système de vectorisation des médicaments anticancéreux

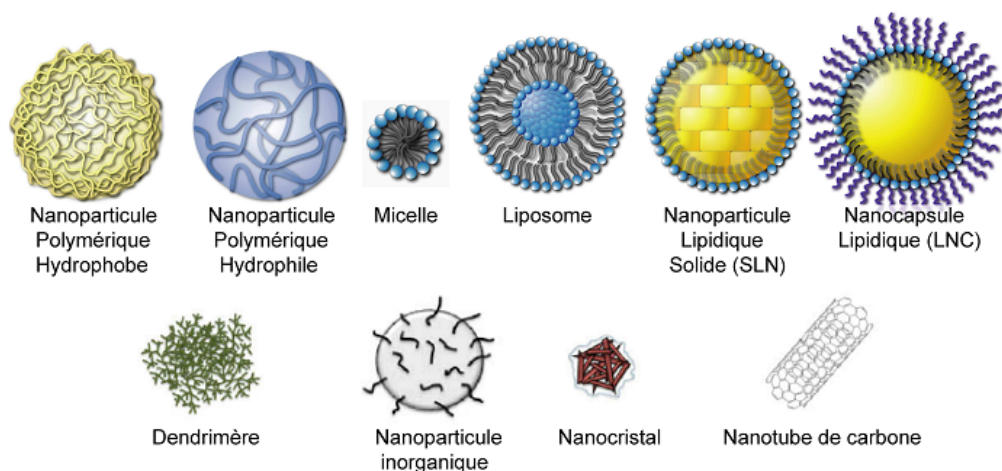
Les médicaments sont traditionnellement administrés dans l'organisme soit par voie orale soit par injection, intramusculaire ou intraveineuse, en fonction des propriétés intrinsèques liées à leur structure moléculaire. La quantité finale de médicaments atteignant un site d'intérêt correspond généralement à une très faible proportion de la dose administrée. L'accumulation de ces substances dans des tissus qui ne sont pas impliqués dans la maladie, peut provoquer des réactions et conduire à des effets secondaires indésirables. De ce fait, l'administration de ces substances est adaptée en fonction de la balance risque/bénéfice. Pour remédier à ce type de problème, une approche consiste à appliquer des médicaments dirigés directement aux sites d'action en utilisant des moyens d'administration locale (sprays, inhalateurs, crèmes, solutions nasales ou oculaires, etc). Cependant, ce mode d'administration n'est possible que dans la mesure où les tissus sont aisément accessibles.

Cette approche n'est donc pas utilisable comme thérapie anticancéreuse, car les tumeurs et surtout les métastases ne sont pas accessibles directement. La vectorisation des

médicaments constitue une voie prometteuse permettant de pallier à ces problèmes [9]. Cette méthode consiste à associer des principes actifs à un système de transport pour les transporter à travers l'organisme jusqu'au site à traiter. Dans ce cas, les principes actifs sont encapsulés et protégés par un vecteur, puis délivrés de façon contrôlée sur un laps de temps optimal, ce qui conduit à une augmentation de leur efficacité après injection. En conséquence, les concentrations et fréquences d'injection peuvent être diminuées permettant ainsi une meilleure tolérance vis à vis du traitement.

## II.6. Les Nanovecteurs

De nos jours, beaucoup d'espoirs ont été mis dans les systèmes de livraison de PA à l'échelle nanométrique (nanovecteurs). De nombreux types de systèmes ont été proposés pour la nanovectorisation: liposomes, micelles, nanocapsules polymériques et lipidiques solides, nanogels, dendrimères, ainsi que les nanotubes de carbone etc (figure.II.3) [10, 11]. Parmi ceux-ci, les vecteurs les plus étudiés sont les liposomes et les nanocapsules polymériques [12-15]. Chacune de ces nanosystèmes a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, dans le cas de liposomes, plusieurs formulations sont déjà approuvées par US FDA et même produites à l'échelle industrielle [16], en raison de l'amélioration revendiquée par rapport à l'utilisation de PA non formulés. Néanmoins, les problèmes de stabilité dans les milieux biologiques, ainsi que de la préparation, nécessitant d'utiliser l'appareillage très sophistiqué et coûteux (pour assurer la reproductibilité au niveau de la taille et la composition), restent toujours actuels.



**Figure.II. 3 :** Représentation schématique des principaux nano objets utilisés en recherche biomédicale [17].

Les Nanovecteurs à base de polymères sont généralement plus stables que les liposomes, cependant, la distribution de taille des nanoparticules résultantes constitue un obstacle très important à contourner. Présentement, plusieurs systèmes de livraison polymériques biodégradables se retrouvent sur le marché [18].

Encore de nos jours, il n'existe pas de vecteur idéal avec les propriétés du concept hypothétique de « magicbullets » de Paul Ehrlich, permettant de livrer la majorité, sinon la totalité, d'une charge thérapeutique sans avoir d'effets significatifs sur des tissus non ciblés[19].

## **II.7. Caractéristiques principales des Systèmes de Vectorisation**

Dans un système de vectorisation, le vecteur est l'élément clé. C'est un objet conçu pour transporter une grande quantité de principes actifs tout en les protégeant et en limitant son activité pendant le trajet vers les zones ciblées. Pour être efficace et utilisable en clinique, le vecteur idéal doit présenter certaines caractéristiques :

- \* Sa composition doit faire intervenir des composés relativement stables en milieu physiologique, non toxiques pour l'organisme, biocompatibles et biodégradables, de manière à faciliter leur élimination ultérieure.
- \* Sa taille doit permettre à la fois le transport d'une quantité suffisante de principe actif et sa diffusion à travers certaines barrières physiologiques (barrière de l'endothélium, barrière hémato-encéphalique, organe, tissu, cellule, noyau cellulaire, etc.) pour atteindre la cible.
- \* Il doit garder le principe encapsulé de façon stable et active, posséder une grande spécificité vis-à-vis des cellules ciblées et rester le plus longtemps possible dans la circulation sanguine pour pouvoir atteindre sa cible.
- \* Le vecteur doit être suffisamment stable face à toutes les dégradations et interactions avec les biomolécules pendant son transport (notamment les protéines plasmatiques dans le cas d'une administration intraveineuse) et éviter les interactions en dehors de la zone visée.
- \* Une fois arrivé au niveau de la zone à traiter, il doit délivrer le médicament à proximité ou à l'intérieur des cellules ciblées. Ce processus de libération contrôlée est envisageable grâce aux propriétés de composés associés au vecteur (rupture enzymatique, liaison réversible, sensibilité à une variation du milieu comme le pH, la température, la force ionique, l'état d'oxydoréduction).

\* Enfin, il doit résister à la stérilisation et être aisément stocké et administré.

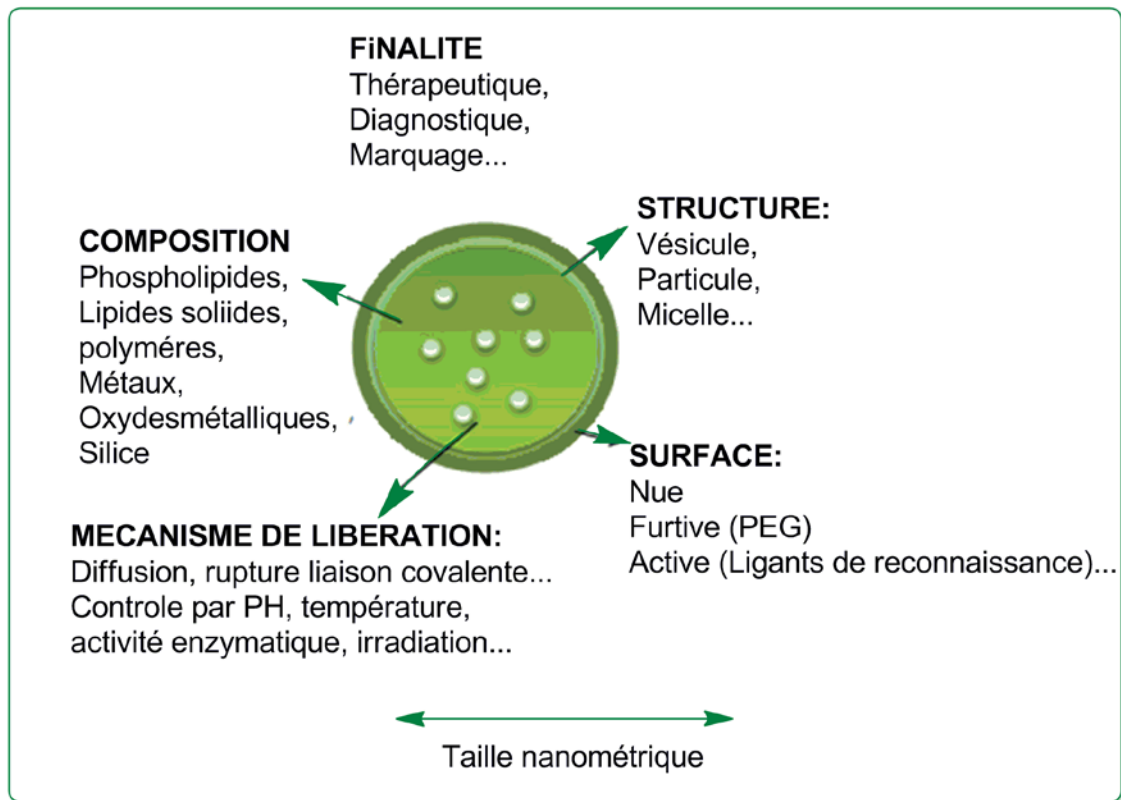
Le principe actif encapsulé dans le vecteur est un élément tout aussi important dans la vectorisation. Il peut être de différente nature selon le type de thérapie envisagée: il peut s'agir de molécules d'ADN ou d'oligonucléotides dans le cadre de la vectorisation de gènes ou « thérapie génique », d'agents anticancéreux pour la chimiothérapie, de facteurs de croissance, par exemple dans le cadre d'une thérapie réparatrice de lésions du système nerveux central ou encore de marqueurs radioactifs, magnétiques ou fluorescents en vue d'une application diagnostique. La méthode d'encapsulation varie en fonction du principe actif.

## **II.8. Vers une Nanoparticule Idéale: le « Tout En Un »**

Bien que les nanoparticules ciblantes soient entrées tardivement en phase clinique, leur potentiel en tant que nouvelle génération d'agents d'imagerie, de thérapie ou **théranostiques** reste immense. Ces nouveaux systèmes comprenant des ligands ciblant inoffensifs, efficaces et spécifiques, des matériaux biocompatibles et un choix approprié d'agents d'imagerie et/ou de thérapie, sont susceptibles de fournir des traitements plus efficaces pour un grand nombre de maladies humaines et plus particulièrement, le cancer [20].

La nanoparticule idéale répond à trois critères essentiels:

- (i) elle associe différentes modalités d'imagerie de manière à aboutir à un diagnostic plus précoce et plus précis.
- (ii) elle rend la thérapie plus efficace.
- (iii) elle permet de suivre l'évolution du traitement par ces mêmes modalités d'imagerie [21].



**Schéma.II.2** : Nanoparticule idéale et ses caractéristiques bio-physico-chimique [22].

Le développement de nanoparticules à visée thérapeutique doit également prendre en considération les critères suivants :

- \* L'utilisation de matériaux biocompatibles et biodégradables ou bio-éliminables.
- \* L'utilisation de méthodes de bio-conjugaison des vecteurs à la nanoparticule simples, efficaces et reproductibles avec un minimum d'étapes et de purification.
- \* L'optimisation des propriétés physicochimiques des nanoparticules (Schéma.II.2) pour atteindre une libération optimale, un temps de circulation long au sein de l'organisme.
- \* Une biodistribution adaptée, ainsi qu'une accumulation dans les tissus cibles maximale et une exposition systémique faible.
- \* La validation de la stabilité et une durée de vie prévisible des nanoparticules in vivo.
- \* Le développement de processus adaptables à grande échelle pour la fabrication des nanoparticules en grande quantité pour le développement clinique et la commercialisation.

Les recherches dans le domaine des nanomédecines ciblantes sont nombreuses et ces efforts doivent être perpétués dans l'idée de les transposer du laboratoire au chevet du patient.

## **II.9. Conclusion**

Le concept de vectorisation a largement prouvé aujourd'hui sa pertinence et l'imagination des chercheurs a permis l'émergence d'une variété considérable d'outils utiles à la thérapie comme au diagnostic. Le chemin a été balisé d'enjeux successifs, sources de nouveaux progrès à chaque étape, comme l'amélioration de l'index thérapeutique, le franchissement de barrières biologiques, l'administration de molécules fragiles, de molécules insolubles dans l'eau, ... etc.

Aujourd'hui, les enjeux résident dans la combinaison d'approches permettant à la fois de sécuriser encore mieux les traitements et de créer une synergie entre différentes modalités de traitement, avec un seul et unique vecteur. Ces développements n'ont été possibles que grâce au rapprochement de communautés Scientifiques différentes apportant leur expertise à la résolution de problèmes toujours plus pointus: Biologistes, physi-cochimistes, pharmacologues, chimistes organiciens, chimistes minéralistes, physiciens, cliniciens, etc. l'application des systèmes de nanoencapsulation non covalente (liposomes, micelles, nanocapsules, dendrimères, Cyclodextrines, ...etc) pour remédier au problème de mauvaise biodisponibilité de PA hydrophobes constitue une approche très prometteuse sur le plan à la fois médical et économique. Les méthodes nanométriques rendent le processus de recherche thérapeutique moins hasardeux et moins empirique et de ce fait plus fiable. La lutte contre le cancer en est l'exemple le plus parlant. Et dont le diagnostic précoce et la prise en charge de la maladie en appliquant une thérapie efficace mène rapidement à la guérison.



## Références bibliographiques

- [1] M. Aulton, "Dissolution and solubility," in *Pharmaceutics: The Science of Dosage form Design*, M.E.Aulton, Ed, Churchill Livingstone, 2nd edition, 2002. p.15
- [2] M. Clugston and R. Fleming, *Advanced Chemistry*, Oxford Publishing, Oxford, UK, 1st edition, 2000.
- [3] "IUPAC gold book," <http://goldbook.iupac.org/S05740.html>
- [4] R. Panchagnula, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 172(1-2), 1-15.
- [5] G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, and J. R. Crison, *Pharmaceutical Research*, 1995, 12, 413-420.
- [6] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, and S. Onoue, *Journal of Pharmaceutics*, 2011, 420, 1-10.
- [7] "Cyclodextrins in pharmaceuticals: an overview," <http://www.pharmainfo.net /pharma-student-magazine/cyclodex-trins-harmaceuticals-overview-0>.
- [8] W.E. Delaney, A.S. Ray, H. Yang, et al, *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50:2471-7.
- [9] P. Couvreur, *Annales pharmaceutiques françaises*, 2001, 59(4) 232- 238.
- [10] J.M. Rabanel, et al., *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(19), 3070-3102.
- [11] T.M. Allen, and P.R. Cullis *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1), 36-48.
- [12] E Soussan, et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(2), 274-288.
- [13] K. Kohli, et al., *Drug Discovery Today*, 2010, 15(21-22), 958-965.
- [14] C. Kumar. *Nanotechnologies for the Life Sciences*, 2006, 2.
- [15] V.J. Venditto, and F.C. Szoka, *Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1), 80-88.
- [16] M. RezaMozafari, et al. *Journal of Liposome Research*, 2008, 18(4), 309-327.
- [17] Y. Zhang, H.F. Chan, and K.W. Leong, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. 65(1), 104-120.
- [18] Y.H. Bae, and K. Park. *Journal of Controlled Release*, 2011. 153(3), 198-205.
- [19] M. Cianfrocca, V. Kaklamani, S. Rosen, J. von Roenn, A. Rademaker, S. Rubin, R. Friedman, R. Uthe, W. Gradishar, *Cancer Res*, 2009, 69, 24-3.
- [20] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharm. Res*, 2006, 23, 1417-1450.
- [21] K. Kohli, et al., *Drug Discovery Today*, 2010. 15(21-22), 958-965.
- [22] C. Dubernet, *Bull Cancer*, 2011, 98 (11).

## *Chapitre III*

### *Les Cyclodextrines*

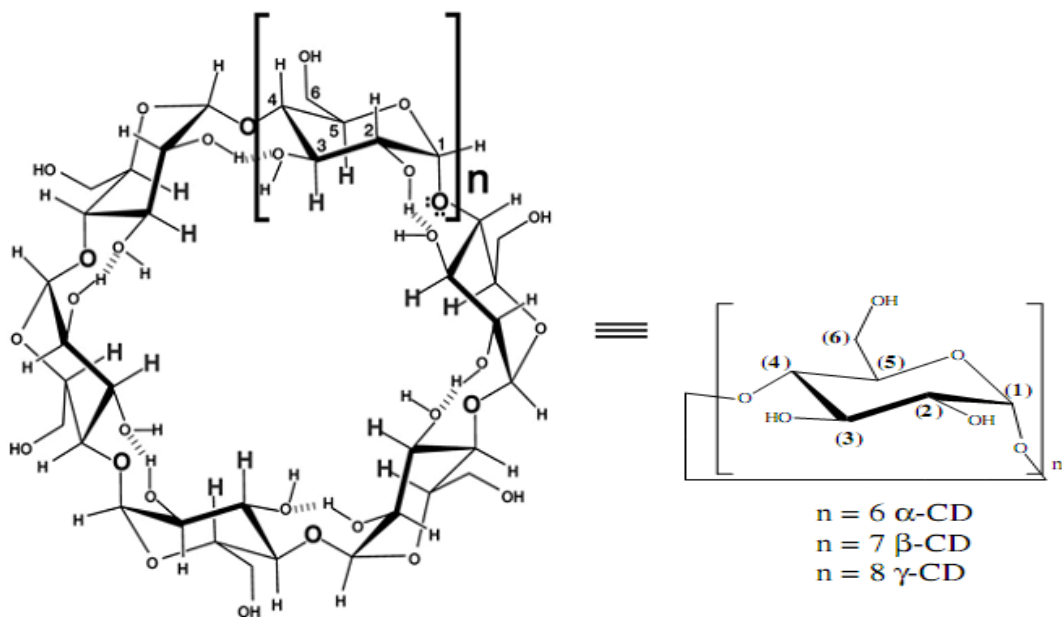
### III.1. Introduction

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques non-réducteurs obtenues industriellement par la dégradation enzymatique de l'amidon, ou plus précisément de l'amylose. L'enzyme impliquée, la Cyclodextrine Glycosyl Transférase (CGTase) est produite par différents microorganismes comme *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*,...etc [1]. Les trois types de CD les plus couramment rencontrés sont les hexamères ( $\alpha$ -CD), héptamères ( $\beta$ -CD) et octamères ( $\gamma$ -CD) contenant respectivement 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques liées entre elles par des liaisons glucosidiques  $\alpha$  1-4 (Figure.III.1). La  $\beta$ -CD étant la plus accessible, la moins chère et la plus utile.

Pour nos travaux, nous avons essentiellement utilisé la  **$\beta$ -cyclodextrine**.

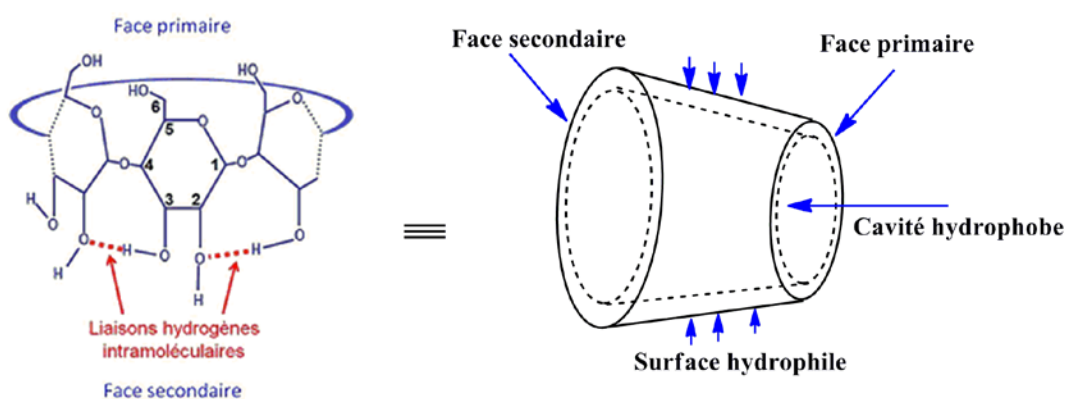
### III.2. Caractéristiques structurales des Cyclodextrines

Les structures tridimensionnelles des CDs ont pu être obtenues à partir de l'étude de leurs monocristaux par diffraction des rayons X, ce qui a permis de mettre en évidence la structure tronconique des CDs ainsi que de déterminer les dimensions des cavités de chacune d'elles [2]. La paroi de ces cônes est constituée par les unités glucoses, en conformation chaise  ${}^4C_1$  [3,4]. Les cyclodextrines sont des molécules chirales, chaque unité de glucose ( $C_6H_{10}O_5$ ) contient 5 atomes de carbone asymétriques. La  $\beta$ -CD contient donc 35 atomes de carbone asymétriques.



**Figure.III.1:** Structure moléculaire et forme géométrique des Cyclodextrines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

Conformément aux figures.III.2, les hydroxyles secondaires O2H et O3H se trouvent sur la partie la plus large du cône appelée face secondaire et peuvent présenter des ponts Hydrogène conduisant à la rigidité du macrocycle et stabilisant la forme tronconique. Sur l'extrémité la plus étroite (face primaire) se trouvent les hydroxyles primaires O6H, les oxygènes interglucosidiques (O4) sont situés sur l'équateur du cône et dirigés vers l'intérieur de la cavité. Ils produisent une forte densité électronique donnant aux cyclodextrines le caractère d'une base de «Lewis». Les hydrogènes H1, H2 et H4 sont dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que les hydrogènes H3 (près de la face secondaire), et H5 (près de la face primaire) sont orientés vers l'intérieur. Ces derniers sont les seuls pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité. A cause de la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarité distinctes: L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires: Ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires. En revanche, l'intérieur de la cavité où se trouvent uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire (polarité de type éther) et cette zone est plus hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée).



**Figure.III.2:** Représentation tridimensionnelle d'une  $\beta$ -cyclodextrine

### III.3. Propriétés physico-chimiques des Cyclodextrines

#### III.3.1. Solubilité dans l'eau

Malgré la forte similitude structurale, les cyclodextrines n'ont pas un comportement comparable vis à vis des molécules d'eau. La solubilité en milieu aqueux dépend des contraintes dans les anneaux, de l'orientation et de l'intensité des liaisons hydrogène.

Justement, il est à remarquer la faible solubilité de la  $\beta$ -CD en comparaison avec celles de l' $\alpha$  et de la  $\gamma$ -CD (Tableau III.1). Cette perte de solubilité, dont les causes n'ont pas été totalement éclaircies, semble due au réseau de liaisons hydrogène particulièrement fort au sein de la  $\beta$ CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau [5]. Sa limitation a aussi été attribuée à la formation d'agrégats  $\beta$ -CD [6]. Lors de la synthèse de  $\beta$ -cyclodextrines modifiées, de mono ou poly-modifications, les solubilités obtenues sont alors très largement augmentées par rapport à la cyclodextrine naturelle, y compris après greffage de groupements relativement hydrophobes renforçant l'hypothèse du réseau stabilisant. Dans le cas de  $\alpha$ CD, la ceinture de liaisons H est incomplète, l'une des unités étant dans une position distordue, il n'y a donc que 4 liaisons formées (au lieu des 6 prévues). La  $\gamma$ -CD non planaire et plus flexible, possède la plus grande solubilité dans l'eau. Cette déformation va en s'accroissant avec les CDs dont le nombre d'unités glucose est supérieur à 8 et agit de façon défavorable sur leurs propriétés d'inclusion.

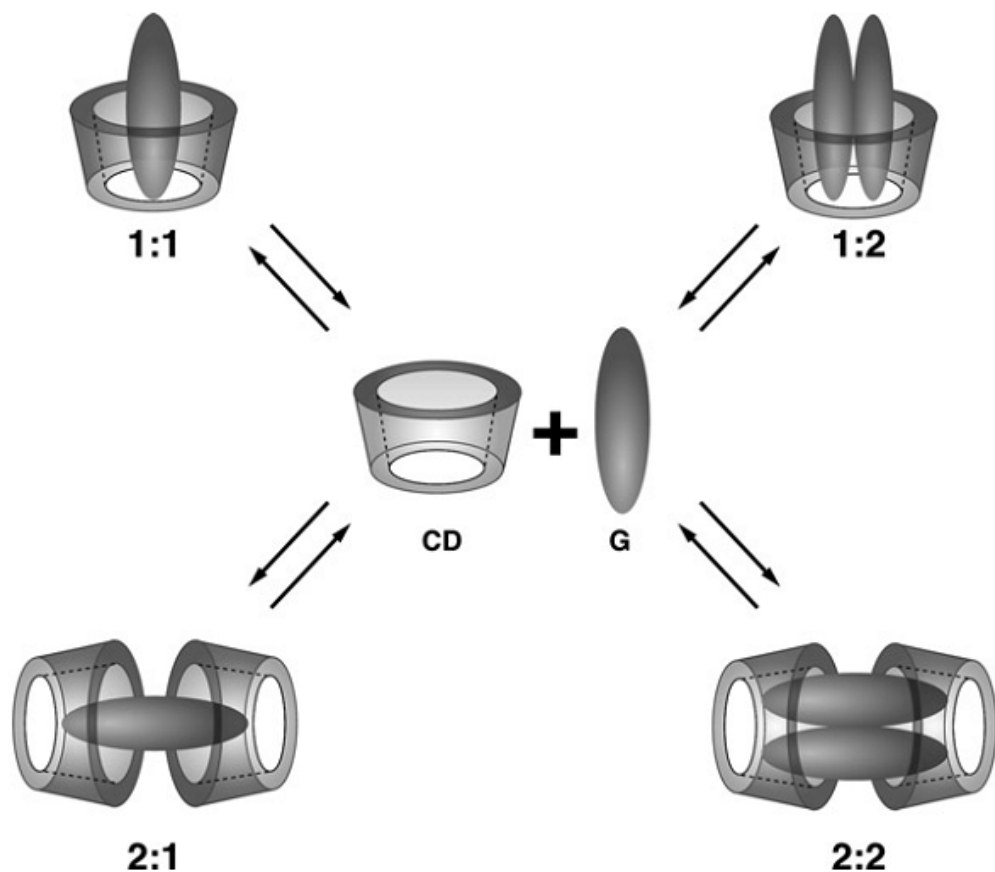
**Tableau.III.1:** Propriétés physico-chimiques et structurales des principales cyclodextrines [1].

	$\alpha$ -cyclodextrine	$\beta$ -cyclodextrine	$\gamma$ -cyclodextrine
<b>Nombre des unités glucosidiques</b>	6	7	8
<b>Formule brute</b>	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
<b>Masse molaire (g/mol)</b>	972	1135	1297
<b>Solubilité dans l'eau (g/L)</b>	145	18.5	232
<b>Le diamètre de la cavité (Å) (petite face –grande face)</b>	4,3 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
<b>Hauteur du cône (Å)</b>	$7,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$
<b>Volume approximatif de la cavité (Å<sup>3</sup>)</b>	174	262	427
<b>Nombre moyen de molécule d'eau</b>	6 - 8	12	13

### III.3.2. Propriétés de Complexation des CD et Stœchiométrie

De par leur structure cyclique tridimensionnelle, leur cavité et leur caractère amphiphile, les CD sont les composés de premier choix pour la formation de complexes d'inclusion de type hôte-invité avec un grand nombre de molécules (neutres, chargées, polaires ou apolaires), où aucune liaison covalente n'est créée. Des complexes de stœchiométries diverses peuvent être formés (Figure.III.3).

On parle de complexe 1:1 lorsqu'une molécule invitée interagit avec une molécule de cyclodextrine. Un complexe 1:2 voire 1:3 est formé si la molécule invitée est de grande taille et si plusieurs molécules de cyclodextrines peuvent interagir avec elle. Par contre, un rapport 2:1 est obtenu dans le cas où la cavité de la cyclodextrine est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules. La taille de la cavité et de la molécule invitée jouent donc un rôle important dans le processus de complexation [7].



**Figure.III.3:** Représentations schématiques de complexes d'inclusion  
De stœchiométries différentes

### **III.3.3. Facteurs influençant la Complexation des molécules organiques par les CDs**

#### **a) Facteurs stériques**

Le mécanisme de formation du complexe fait intervenir des paramètres stériques, c'est-à-dire les dimensions et la géométrie des deux molécules qui interagissent. En effet, des molécules trop grosses pour pénétrer même partiellement dans la cavité de cyclodextrine ne pourraient pas former de complexes stables. Il en est de même pour des molécules trop petites, qui pourront pénétrer dans la cavité mais les interactions entre ces dernières et la cavité seront trop faibles pour les maintenir à l'intérieur et par conséquent elles en sortiront très rapidement [8].

#### **b) Polarité et charge**

La charge et la polarité de la molécule invitée sont importantes pour la formation de complexes d'inclusion. En général, ce sont des molécules hydrophobes ou des groupements hydrophobes de molécules qui présentent une affinité pour la cavité interne des cyclodextrines en solution aqueuse. L'hydratation d'un complexe d'inclusion d'un composé hydrophobe est énergiquement favorisée par rapport à l'hydratation de chacun des composants pris séparément. C'est la cohésion des molécules d'eau qui favorise l'interaction hydrophobe, plutôt que l'attraction entre l'hôte et l'invité.

### **III.3.4 Forces stabilisantes les complexes d'inclusions**

Plusieurs contributions énergétiques ont été mises en évidence pour expliquer les interactions en jeu lors de la formation de complexes par des cyclodextrines.

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

#### **- Interactions de Van der Waals :**

Les forces de Van der Waals (VDW), du nom du Hollandais Johannes Diderik Van der Waals, (1837 -1923), prix Nobel de physique 1910, sont des forces électromagnétiques résiduelles faibles, d'origine quantique, s'exerçant entre des molécules et même des atomes neutres.

Elles avaient initialement été introduites sous forme de termes phénoménologiques dans l'équation d'état des gaz de VDW dit réels car ne se comportant plus selon la loi des gaz parfaits. Il a fallu attendre la découverte de l'équation de Schrödinger pour modéliser plus précisément ces forces dont la loi ne varie plus en  $1/R^2$ , comme pour l'électrostatique, mais  $1/R^7$ .

En fait, il s'agit de la combinaison pour l'essentiel de trois types de forces distinctes résultant de différents effets :

- Force de Keesom (effets d'orientation) ;
- Force de Debye (effets d'induction) ;
- Force de London (effets de dispersion).

### - Formation des liaisons hydrogène

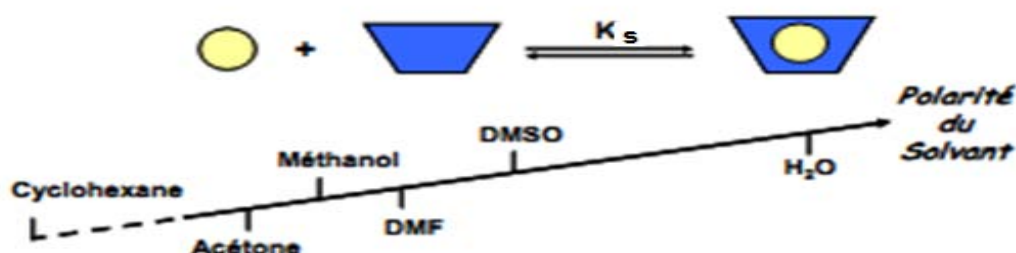
Parmi les molécules polaires, celles qui comportent des atomes d'hydrogène présentent parfois des interactions plus fortes que celles des forces de Van der Waals. L'atome d'hydrogène « fait le pont » entre deux atomes ou plus alors qu'il n'a qu'un électron. Cette liaison hydrogène n'est donc pas une liaison ordinaire. Elle ne se manifeste qu'avec des atomes très électronégatifs.

Une liaison hydrogène peut s'établir entre un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome A très électronégatif (F, O, N) et un atome B très électronégatif porteur d'un doublet non liant.

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

### - Influence du solvant

Les constantes de stabilité des complexes « I/CD » dépendent fortement du solvant. Comme indiqué dans (la Figure III.4), la complexation entre un substrat et une cyclodextrine sera d'autant plus forte que la polarité du solvant sera élevée.



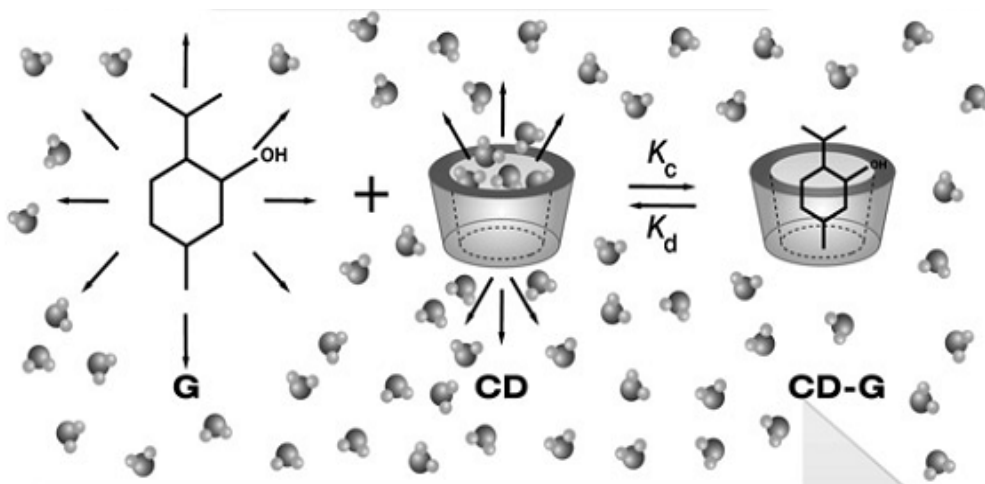
**Figure.III.4.** Stabilité des complexes d'inclusion en fonction de la polarité du solvant [9]



### III.3.5. Mécanisme de Complexation

En solution aqueuse, la cavité des CDs est occupée par des molécules d'eau énergiquement défavorables à cause des interactions polaire-apolaire, ce qui permet une substitution aisée par des molécules invitées de moindre polarité que l'eau. Cette exclusion s'accompagne d'une diminution de l'enthalpie. On peut séparer la formation d'un complexe en plusieurs étapes [9]:

- \* Approche de l'invité vers la cyclodextrine.
- \* Rupture de la structure de l'eau à l'intérieur de la cavité de la CD et expulsion de certaines de ces molécules, car elles sont énergiquement défavorisées ( $\Delta H$  élevé en raison de l'interaction polaire –apolaire).
- \* Rupture de la structure de l'eau autour de la molécule invitée et transport de molécules d'eau vers la solution.
- \* Interaction des groupement non polaires de la molécule invitée avec la cavité hydrophobe de la cyclodextrine (modification entropique et enthalpique).
- \* Eventuellement, création de la liaison hydrogène entre l'invité et la cyclodextrine
- \* Reconstitution de la structure de l'eau autour des parties exposées de l'invité après l'inclusion [10-12] (Figure.III.5).



**Figure.III.5:** Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion.

### III.4. Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion

Les méthodes utilisées pour détecter l'inclusion à l'état solide sont: la diffraction par rayons X, les méthodes thermiques, la chromatographie sur couches minces, la spectroscopie infrarouge, la microscopie électronique à balayage, et le test de

dissolution. En solution, on peut détecter la formation du complexe par les méthodes spectroscopiques (spectroscopie UV/ visible, spectroscopie de fluorescence, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire...etc), et les méthodes électrochimiques et micro-calorimétriques.

### **III.5. Détermination de la stœchiométrie et la constante de stabilité des complexes d'inclusion**

#### **III.5.1. Détermination de la Stœchiométrie**

Les méthodes les plus utilisées pour la détermination de la stœchiométrie des complexes d'inclusion sont la méthode des variations continues (MVC) et la méthode des rapports molaires (MRM) [13, 14].

##### **III.5. 1.1. Méthode des Variations Continues**

Une détermination fiable des stœchiométries des complexes d'inclusion peut être fournie par la méthode des variations continues (méthode de Job) [15-18]. C'est une méthode générale qui peut s'appliquer à de nombreuses techniques analytiques. Cette technique est basée sur l'évolution d'une variable physico-chimique (ex: déplacement chimique, coefficient de diffusion, absorbance...etc) en fonction de la concentration du complexe formé en solution. Cette méthode exige deux conditions :

- les concentrations initiales des solutions mères utilisées sont identiques.
- le volume du mélange des deux solutions doit rester constant.

Le procédé consiste à préparer une série de mélanges en proportions variables de solutions équimolaires des deux corps susceptibles de se complexer et à en mesurer une propriété physique additive. Le procédé est particulièrement rapide et économique.

Il évite l'usage de solutions à concentrations élevées, avantage à la fois théorique et pratique.

##### **III.5. 1.2. Méthode des Rapports Molaires**

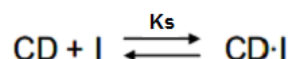
Cette méthode consiste à maintenir la concentration totale de la molécule invitée [I] constante et à faire varier la concentration de la molécule hôte [CD]. Le tracé d'une propriété, propre au complexe, par exemple l'absorbance maximale en fonction du rapport molaires [CD]/[I] est étudié afin de détecter une éventuelle discontinuité ou un changement brutal de pente correspondant au rapport stœchiométrique (n/m) pour le complexe  $CD_nI_m$ .

Si la constante de formation du complexe est suffisante on obtient deux droites de pentes différentes dont le point d'intersection correspond au rapport molaire [CD]/[I].

### III.5.2. Détermination de la Constante de Stabilité

La stabilité d'un complexe d'inclusion est caractérisée par sa constante de stabilité. Cette constante est un paramètre thermodynamique important et largement utilisé.

Pour un complexe de stœchiométrie 1:1, l'équation de la réaction s'écrit:



La stabilité du complexe peut être exprimée par la constante de stabilité  $K_s$  [19, 20];

$$K_s = K_{1/1} = [\text{CD}\cdot\text{I}]/[\text{CD}]\cdot[\text{I}]$$

(CD) représente la molécule hôte soit la cyclodextrine, (I) la molécule invitée et  $K_{1/1}$  est la constante de stabilité du complexe pour un rapport entre la cyclodextrine et la molécule invitée de 1 pour 1.

Un certain nombre d'étude physico-chimique décrite dans la littérature, pour déterminer la constante de stabilité reposent sur des techniques variées [21]: RMN, spectroscopie UV visible, fluorimétrie, solubilité, électrophorèse capillaire, potentiométrie...etc.

Les méthodes graphiques (ou de linéarisation) sont conçues pour générer une relation linéaire entre la propriété observée  $\delta(\text{obs})$  et  $K_s$ , de sorte que les données de la méthode choisie peuvent être traitées graphiquement. La méthode développée par Benesi-Hildebrand [22, 23], est parmi ces méthodes les plus utilisée.

La caractéristique-clé de cette méthode, est que la concentration de la molécule invitée est généralement maintenue constante, alors que celle de la molécule hôte varie dans un intervalle donné de concentrations. Cette approche permet de déterminer graphiquement  $K_s$  à condition que l'espèce non observée soit en large excès (d'au moins un facteur 10) par rapport à l'espèce observée. On établit alors la relation qui correspond à l'équation d'une droite de type :  $y = a x + b$  où  $a$  : représente la pente.

Par extrapolation à l'origine, on peut déterminer la valeur permettant le calcul de  $K_s$ .

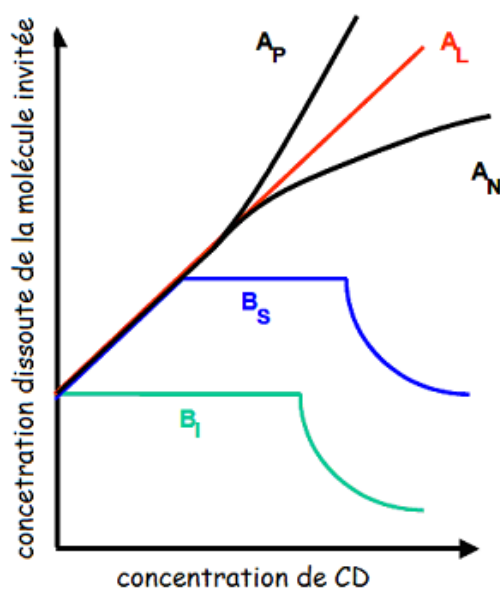
### III.5.3. Profil de solubilité des complexes d'inclusion:

Cette approche, telle que développée par Higuchi et Connors [24], est très couramment utilisée pour l'évaluation de l'utilisation potentielle des CDs, afin d'augmenter la

solubilité de composés hydrophobes en milieu aqueux. Elle permet en effet d'obtenir le profil de la courbe de solubilité de la molécule invitée en fonction de la concentration en CDs et donc de prouver l'augmentation de sa solubilité en présence de cet hôte.

Deux types de diagrammes sont généralement observés (types A et B), caractérisant les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions CD-molécule invitée.

Les courbes de type A sont données à titre indicatif pour la formation de complexes d'inclusion soluble ; en revanche, celles de type B sont évocatrices de la formation de complexes d'inclusion de faible solubilité [25, 26].



**Figure.III.6:** Phases de solubilité et classification des complexes selon Higuchi et Connors.

Avec S la solubilité intrinsèque du substrat en absence de CD [25]

### III.6. Conséquences de la Complexation et Applications

L'inclusion des molécules invitées dans la cavité des CDs constitue une encapsulation moléculaire et ces molécules voient leurs propriétés physicochimiques modifiées. Parmi ces modifications, on peut citer [27]:

- L'amélioration de la dissolution et de la solubilité du soluté et l'augmentation de sa biodisponibilité (dans le cas de principes actifs).
- La modification de ses propriétés spectrales (déplacements chimiques en RMN, longueur d'onde du maximum d'absorption en UV, intensité de la fluorescence, etc.)
- La modification de sa réactivité (en règle générale diminuée). Le soluté bénéficie ainsi d'une protection contre la dégradation thermique ou photochimique, l'oxydation, l'hydrolyse et voit sa stabilité accrue.

➤ La diminution de sa diffusion, de sa volatilité et de sa sublimation.

L'exploitation des capacités d'inclusion et la biocompatibilité des CDs ont entraîné un accroissement du nombre et de la diversité des applications scientifiques et industrielles. (Le tableau III.2) en résume les plus importantes [28].

En outre, comme les CDs sont capables de différencier les énantiomères et, plus généralement, les composés structurellement proches comme les isomères, les homologues...etc, cette propriété est mise à profit dans le domaine de la chimie analytique et plus particulièrement dans celui des méthodes séparatives.

**Tableau.III. 2:** Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications.

<b>Propriétés</b>	<b>Domaines d'application</b>
Amélioration de la solubilité Amélioration de la biodisponibilité Diminution des effets secondaires Stabilisation	pharmaceutique
Stabilité des produits volatils Extraction de composantes indésirables	alimentaire
Masquage d'odeurs désagréables	Agrochimique : herbicides, fongicides
Stabilité des parfums	cosmétologie

## **II.7. Conclusion**

Les Cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques ayant des cavités hydrophobes au centre, permettant ainsi la formation des complexes d'inclusion avec une gamme de composés organiques menant au changement des propriétés des molécules invitées. L'affinité remarquable des CDs pour les molécules apolaires (hydrophobes) peut être mise à profit pour améliorer leurs propriétés physicochimiques et pharmacologiques. Ce qui engendre des applications importantes en particulier dans le domaine pharmaceutique comme l'amélioration de l'hydrosolubilité et la biodisponibilité des principes actifs.

## Références Bibliographiques

- [1] J. Szejtli, Chem. Rev, 1998, 98, 1743-1753
- [2] W. Saenger, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D.MC Nichol, Academic press, London, 1984,.2, 131-259
- [3] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha, Chem. Rev, 1998,. 98(5), 1787-1802
- [4] K. Harata., Chem. Rev, 1998,.98(5), 1803-1828
- [5] J. S. Paginton, Chem. Pharm. Bull, 1987, 35(11), 14609-4615
- [6] J. Szejtli, Academiai Kiado, Budapest, Hungary, 1982, 100-109
- [7] V, Barillaro., Etude de l'inclusion du miconazole dans les cyclodextrines à l'aide du dioxyde de carbone supercritique: aspects galéniques et modélisation moléculaire, Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2006.
- [8] M. M. Meier, M. Luiz, P. Farmer, B. Szpoganicz, J.Incl. Phenom, 2001, .40, 291-295
- [9] E. Deunf, Préparation, Caractérisation et Activation Electrochimique de Nouveaux Complexes Métallo-Cyclodextrines, Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010.
- [10] J. Szejtli, Chem. Rev, 1998, 98, 1743-1753.
- [11] D. Kois, U.H. Brinker, J. Am. Chem. Soc, 1998, 120(45), 4314-4319.
- [12] T. Loftsson, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2002, 44, 63-67.
- [13] G. Lohaus., Chem.Ber, 1997, 100, 2719.
- [14] C. R. Dass., W .Jessup, J. Incl. Phen. & Mol. Rec. Chem, 1996, 24 (3), 193-210
- [15] K. A. Connors., Chem. Rev, 1987, 12, 54-56.
- [16] J. S. Coleman, L. P. Varga., S. H. Mastin, Inorg. Chem, 1970, 9, 1015-1020
- [17] K. C. Ingham, Anal. Biochem; 1975, 68, 660 -663
- [18] P .Job, Annal. Chim, 1927, 113-203.
- [191] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Masson, Int. J. Pharm, 2005, 302, 18–28.
- [20] M.E. Brewster, T. Loftsson, Advanced Drug Delivery Reviews, 2007, 59, 645–666.
- [21] J..E.D Davies, D.D. MacNicol, F Vögtle, J.-M. Lehn, Comprehensive Supramolecular Chemistry, J.L Atwood Eds, 1996, 3, 253-278
- [22] J.Szejtli., Pure Appl. Chem, 2004, 76, 1825-1845

- [23] H.-J.Schneider., F. Hacket., V. Rüdiger, H.Ikeda, Chem. Rev, 1998, 98 (5), 1755-1786.
- [24] T. Higuchi, K.A. Connors, Adv. Anal. Chem. Instrum, 1965, 4, 117-212.
- [25] T. Loftsson, M. Másson, M.E. Brewster, J.Pharm.Sci, 2004, 93, 1091.
- [26] T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, Expert Opinion. Drug. Delivery, 2005, 2, 335.
- [27] C. El fakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A, 1996, 727, 71-82
- [28] G. Crini, M. Morcell, N. Morin, L'actualité chimique, 2001, 247, 18-25.

## *Chapitre IV*

### *La Modélisation Moléculaire*



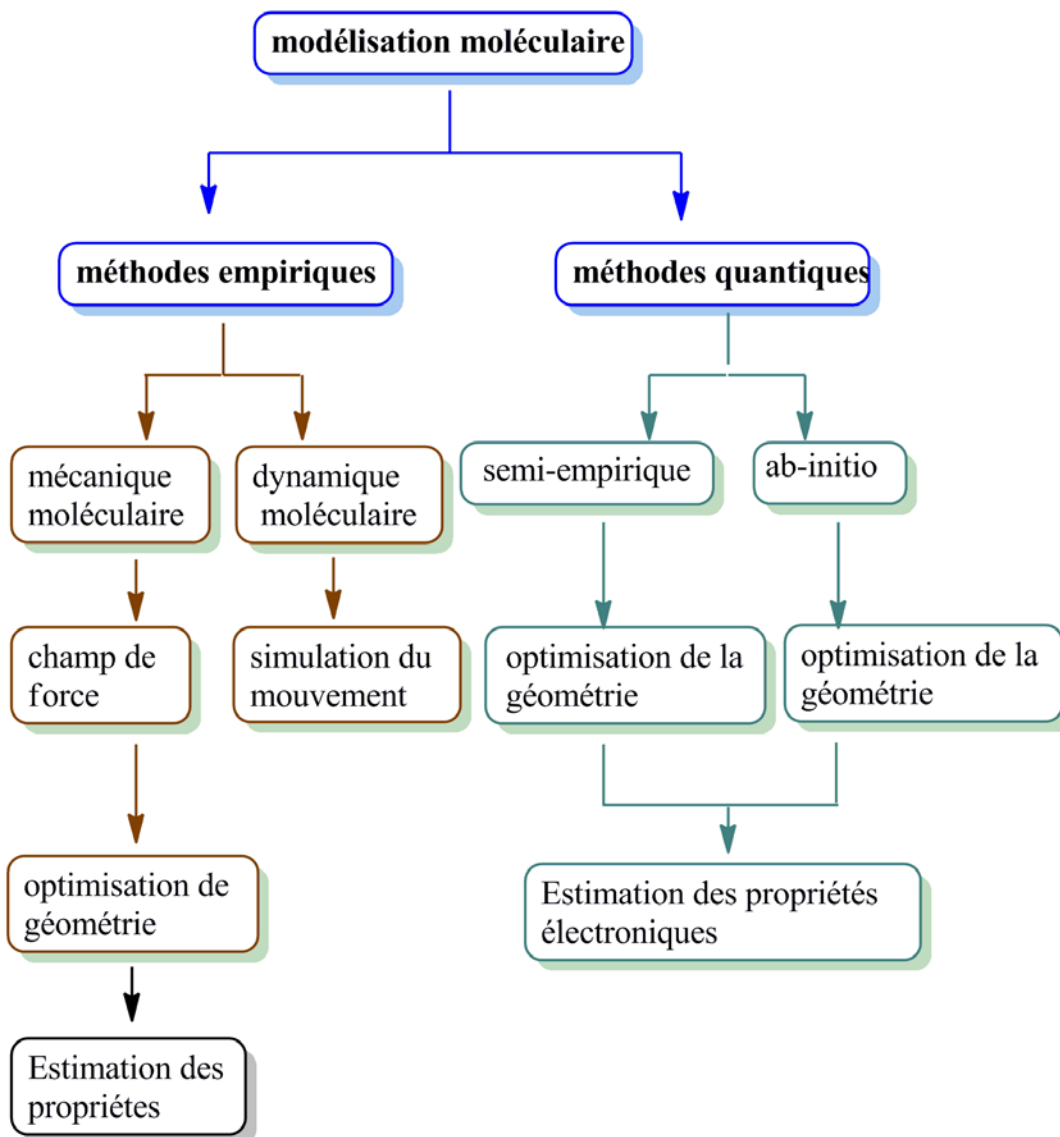
## IV.1. INTRODUCTION

On définit la modélisation moléculaire comme une application des méthodes théorique et des méthodes de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire, elles peuvent être extrêmement complexes et demandent des centaines d'heures de calcul même sur un super-ordinateur. En plus, ces méthodes utilisent souvent des moyens infographiques très sophistiqués qui facilitent grandement la transformation de quantités impressionnantes de données numériques en quelques représentations graphiques facilement interprétables [1].

La chimie par ordinateur est maintenant accueillie comme un outil de plus en plus utile à la fois pour les milieux académiques et industriels.

Aujourd'hui, la modélisation moléculaire nous permet de traiter des systèmes contenant plus d'atomes (molécules de solvant explicite pouvant atteindre des dizaines de milliers d'atomes, grandes surfaces moléculaires et protéines). De ce fait, un phénomène de compétition entre la taille des systèmes moléculaires et la puissance des superordinateurs est apparu [2,3]. La modélisation moléculaire est aujourd'hui mieux reconnue. D'ailleurs, en 1998, le prix Nobel de chimie a été décerné à John. A. Pople et Walter Kohn pour leurs travaux dans les domaines de la chimie informatique et de la modélisation moléculaire (chimie quantique).

La modélisation moléculaire Figure (IV.1) sert pour simuler des systèmes moléculaires, à l'aide des méthodes de calculs théoriques telles que la mécanique quantique (QM: ab-initio, semi- empiriques), la dynamique moléculaire (DM), la mécanique moléculaire (MM) et, depuis quelques années et l'association QM/MM qui paraît très porteuse.



**Figure. IV.1** : Schéma général des différentes méthodes et étapes d'une modélisation moléculaire.

Les trois principales méthodes de calcul sont:

➤ **Mécanique Moléculaire :**

En mécanique moléculaire on considère une structure moléculaire comme étant composée de billes et de ressorts (forces harmoniques) associés à une série de fonctions de potentiel. L'énergie conformationnelle [4] est la sommation de termes d'interactions évaluées à partir de tables précalculées (les champs de force) contenant les constantes d'élongation, de déformation, de torsion, d'attraction et répulsion électrostatique.

L'énergie potentielle totale est donnée par l'expression suivante:

$$E_{\text{tot}} = \underbrace{E_{\text{liaison}} + E_{\text{flexion}} + E_{\text{torsion}}}_{E_{\text{liés}}} + \underbrace{E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{Vander-Waals}} + E_{\text{liaison H}}}_{E_{\text{non-liés}}}$$

$E_{\text{liés}}$  = Energie des interactions entre atomes liés par covalence.

$E_{\text{non liés}}$  = Energie des interactions entre atomes non liés par liaisons covalentes.

C'est la méthode la plus fréquemment retenue car elle produit les temps de calcul les plus courts.

➤ **La Dynamique Moléculaire :**

Elle prend en compte l'effet de la température, de la pression et du temps, calcule les trajectoires des atomes et approche la flexibilité des molécules, leur comportement en solution ou les modes de vibration.

➤ **Mécaniques Quantiques :**

L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique. Les meilleurs programmes comportent des processus d'optimisation de la géométrie. Ainsi les énergies moléculaires sont calculées en utilisant l'équation de Schrödinger avec le formalisme des orbitales moléculaire (MO). L'équation de Schrödinger d'un système moléculaire peut être résolue sans approximation (Ab-initio), ou en introduisant des approximations (semi-empiriques).

**IV.2. La méthode Ab-initio**

Dans une première approximation, les mouvements des noyaux sont séparés de ceux des électrons, c'est l'approximation de Born Oppenheimer tel que :

$$\Psi_T = \psi_E + \psi_N \quad (1)$$

La formule (1) devient :

$$H_{\text{el}}\psi_{\text{el}}(r,R) = E_{\text{eff}}(R) \cdot \psi_{\text{el}}(r, R) \quad (2)$$

Où  $H_{\text{el}}$  : Hamiltonien électronique.

$\psi_{\text{el}}(r,R)$  : La fonction d'onde électronique

$E_{\text{eff}}(\mathbf{R})$  : Energie effective qui est une fonction des coordonnées des noyaux  $\mathbf{R}$ .

Les méthodes les plus utilisées en mécanique quantique sont : La méthode de Hartree-Fock, la méthode de Hartree-Fock périodique et la méthode de la fonctionnelle de la densité DFT.

#### **IV.2.1. La méthode de Hartree-Fock (HF) :**

Cette méthode est utilisée pour l'étude des systèmes ne possédant pas des électrons célibataires [5, 6]. Elle repose sur les deux théories suivantes :

- Théorie de Moller-Plesset (théorie de la perturbation) et la théorie des clusters couplés(CC).

L'utilité de ces deux théories est la correction de l'expression de l'énergie de Hartree-Fock. Pour un système à couches complètes, l'opérateur de Fock aura la forme suivante:

$$f_i(1) = H^{\text{coeur}}(1) + \sum_j (2f_i(1) - k_j(1)) \quad (3)$$

$f_i(1)$  : est l'opérateur de Fock.

$H^{\text{coeur}}(1)$  : opérateur Hamiltonien de cœur.

$k_j(1)$  : Opérateur d'échange

L'opérateur de Fock mono électrique est l'Hamiltonien effectif d'un électron pour un système polyélectronique. Ainsi, les équations de Hartree-Fock peuvent être obtenues sous la forme standard aux valeurs propres en utilisant des gymnastiques mathématiques

$$\text{Tel que : } f_i X_i = \varepsilon_i X_i \quad (4)$$

Une approche itérative nommée méthode de champ auto cohérent (SCF : Self consistent field) est utilisée pour la résolution des équations de Hartree-Fock.

#### **IV.2.2. La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité DFT**

Cette méthode aboutit à des résultats cohérents avec les résultats expérimentaux. Elle permet le calcul de l'énergie à partir de la densité électronique, cette technique malgré son succès mais reste couteuse et demande un temps énorme de calcul.

### IV.2.3. Bases d'orbitales atomiques:

Dans les méthodes Ab-initio et DFT, on utilise un ensemble de fonctions de bases (basis set) à partir duquel on définit l'ensemble des orbitales moléculaires du système chimique étudié

#### IV.2.3.a. Les Orbitales de Type Slater (STO):

Elles ont la forme générale suivante [7]:

$$\chi^{STO} = \chi_{r, n, l, m}(r, \theta, \phi) = NY_{l, m}(\theta, \phi) r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (5)$$

Où: n, l et m: correspondent respectivement au nombre quantique principal, azimutal et magnétique, N est une constante de normalisation, r est la distance de l'électron au noyau atomique,  $\zeta$  est l'exponentielle orbitale (exposant de Slater, déterminant la taille de l'orbitale) et  $Y_{l, m}(\theta, \phi)$  sont les harmoniques sphériques. Elles décroissent de manière exponentielle lorsque la distance au noyau augmente. Elles sont plus précises au niveau du noyau mais nécessitent plus de temps de calcul. Elles ont été approximées comme des combinaisons linéaires d'orbitales gaussiennes ce qui a conduit à de grandes économies en temps de calcul puisque le recouvrement, ainsi que d'autres intégrales par ailleurs, sont alors plus facile à calculer. Comme exemple notons les bases minimales STO-nG où les orbitales de cœur et de valence sont représentées par le même nombre de fonctions primitives gaussiennes. Ainsi, les éléments d'une base STO-3G pour les orbitales de l'atome de carbone 1s, 2s et 2p ( $p_x$ ,  $p_y$ ,  $p_z$ ) sont tous des combinaisons linéaires de trois fonctions gaussiennes primitives.

#### IV.2.3.b. Les Orbitales de Type Gaussienne (GTO):

La forme générale caractéristique des gaussiennes primitives (PGTO) est:

$$\chi^{PGTO} = \chi_{\zeta, n, l, m}(r, \theta, \phi) = NY_{l, m}(\theta, \phi) r^{2n-2-l} e^{-\zeta r^2} \quad (6)$$

Pour décrire les régions proches du noyau avec pertinence, il est nécessaire d'utiliser une combinaison linéaire des gaussiennes primitives appelée "gaussienne contractée" (CGTO) qui s'écrit sous la forme:

$$\chi^{CGTO} = \sum d_k \chi_k^{PGTO} \quad (7)$$

$d_k$  étant le coefficient de contraction de la gaussienne primitive

La représentation de chaque orbitale atomique (OA) peut se faire selon:

- Une base minimale est une description de OA par une seule fonction gaussienne;
- Une base Multiple-Zêta est une description de chaque OA par plusieurs fonctions gaussiennes (Double Zêta "DZ", Triple Zêta "TZ", Quadruple Zêta ".QZ"...). Cette démultiplication du nombre d'OAs permet de mieux décrire la répartition anisotrope des électrons dans l'espace. Par exemple l'atome de C dans une base DZ est décrit par 10 OAs:  $1s, 1s', 2s, 2s', 2p_x, 2p_x', 2p_y, 2p_y', 2p_z, 2p_z'$

➤ **Bases à valences séparées (Split Valence):**

La démultiplication concerne seulement la couche de valence, on la nomme aussi multiple zêta de valence (ou en anglais Split Valence Multiple Zêta "SV-MZ"). Les bases usuelles de bonne qualité sont "DZ" ou "TZ". Par exemple, pour le carbone, une base « Split Valence Double Zêta » utilisera les neuf OAs:  $1s, 2s, 2s', 2p_x, 2p_x', 2p_y, 2p_y', 2p_z, 2p_z'$

Les notations pour les bases «à valence séparée» sont typiquement X-YZWG [8]. X représente le nombre de PGTO utilisées pour décrire les orbitales de cœur pour les atomes lourds (autre que l'hydrogène). G indique que la fonction est de type gaussienne. Le nombre de chiffres après le trait d'union permettent de décrire en combien de fonctions de bases sont décrites les orbitales de valence (deux chiffres "Y et Z" indiquent une base DZ à valence séparée, trois "Y, Z et W" indiquent une base TZ à valence séparée,..) et combien de PGTO interviennent dans celles-ci. Comme exemple, citons quelques bases communes:

- **3-21G:** C'est une base DZ à valence séparée (SV-DZ), ce qui signifie que chaque OA de cœur est représentée par une contraction de 3 PGTO les orbitales de valence sont représentées par une base DZ où l'une des orbitales résulte de la contraction de 2 PGTO et l'autre est une gaussienne simple.
- **6-31G:** SV-DZ également. Les orbitales de cœur sont décrites par 6 PGTO, celles de valence par deux fonctions de base formées respectivement de 3 et 1 PGTO.
- **6-311G:** SV-TZ. Les orbitales de cœur sont décrites par contraction de 6 PGTO, celles de valence sont représentées par trois fonctions de base formées respectivement de 3, 1 et 1 PGTO.

Par ailleurs, la flexibilité de la base peut être augmentée par ajout de fonctions de polarisation et de fonctions diffuses.

➤ **Fonctions de polarisation:**

Elles donnent à la densité électronique un maximum de plasticité en tenant compte de la déformation des orbitales de valence lors de la déformation de la molécule. Elles sont très utiles pour une bonne description des grandeurs telles que l'énergie de dissociation, les moments dipolaires et multipolaires,...etc. Ceci se fait en ajoutant à la couche de valence des fonctions de nombre quantique "l" supérieur: Orbitales p, d, f, g pour les atomes de la deuxième période etc. Les fonctions de polarisations sont symbolisées par des "\*" dans le nom de la base après le G. Exemples:

**6-31G\*:** S'écrit aussi 6-31G(d), elle correspond à SV-DZ 6-31G avec ajout d'une fonction d aux atomes lourds.

**6-31G\*\*:** S'écrit aussi 6-31G (d,p), elle correspond à SV-DZ 6-31G avec ajout d'une fonction d aux atomes lourds et p à ceux H.

➤ **Fonctions diffuses:**

Ce sont des fonctions gaussiennes avec un petit exposant qui augmentent la taille du nuage électronique et permettent de mieux décrire les parties des OMs éloignées des noyaux. Elles sont particulièrement importantes lorsque l'on considère des anions, des molécules avec doublets libres, des interactions à longue distance (les interactions de van der Waals, par exemple) et sont fréquemment utilisées pour le calcul des propriétés telles que les moments dipolaires ou la polarisabilité. Habituellement, les fonctions diffuses sont de type s et p.

Elles sont représentées par un signe "+" ou deux plus "++" placés avant le "G". Le premier indique l'ajout de fonctions diffuses s et p sur les atomes lourds et le deuxième signifie que des fonctions diffuses s sont aussi ajoutées aux atomes légers (hydrogène et hélium). Comme exemple citons les bases: 3-21+G, 6-31+G, 6-31++G.

#### **IV.2.2. Les méthodes semi-empiriques**

Ces méthodes peuvent être divisées selon que l'on nous dicte la théorie, en deux classes :

1- La première classe consiste à l'application de la loi de Huckel étendue [9].

2- La deuxième classe contient un très grand nombre de méthodes connues sous différents acronymes tels que : PM3, AM1 [10], MNDO [11,12], CNDO [13-15], INDO [16], MMDO, PNDO.

Il est à noter que l'application de ce type de méthode de calcul est limitée. On voit généralement son intervention dans le domaine de la chimie organométallique ou bien inorganique. Elle ne concerne pas le domaine de la biochimie ou de la chimie organique (macromolécules et protéines). Dans notre travail, nous avons utilisé comme méthode de base la PM3. Cette méthode est une reparamétrisation des deux méthodes MNDO et AM1 dont nous allons exposer leurs particularités dans ce qui suit.

**A) La méthode PM3 :** Cette méthode est une extension de la méthode MNDO et AM1 (le chiffre 3 signifie la classe de la paramétrisation et ce après MNDO). Les éléments constitutifs de l'Hamiltonien PM3 [17] sont pareils à ceux de la méthode AM1 sauf que la paramétrisation est automatique lorsqu'on applique la méthode PM3. Plusieurs paramètres concernant la méthode AM1 sont issus de la connaissance préalable en chimie appliquée. Des différences peuvent alors exister entre les résultats correspondant aux deux méthodes semi-empiriques. Le degré d'exactitude des prédictions thermodynamiques et structurales est presque identique, néanmoins la méthode PM3 peut présenter quelques divergences surtout lorsqu'il s'agit de la barrière de rotation de la liaison amide étant presque négligeable et inexistante dans certains cas particuliers. L'utilisation du potentiel de torsion empirique s'avère indispensable pour corriger ce genre de problèmes. Le modèle a été récemment étendu pour inclure les métaux de transition (PM3/tm) [18]. D'autres paramétrisations de la méthode PM3 ont donné celle PM6 englobant plus de 70 éléments [19, 20].

**B) La méthode AM1 :** La méthode Austin Model est la seconde théorie semi-empirique présentée par le groupe Dewar (1985). Elle a été conçue dans le but d'éliminer les problèmes liés à la surestimation des interactions des répulsions entre les électrons lors des calculs MNDO. L'utilisation des fonctions gaussiennes pour la répulsion et l'attraction était la base de la modification des termes cœur-cœur.

**C) La méthode MNDO :** Cette méthode a eu un très grand succès quand elle fut introduite mais par la suite quelques limitations sont apparues. Par exemple, les chaleurs de formation des molécules insaturées étaient positives, les angles de liaison étaient



larges. La raison est due à la mauvaise prédiction des ions causée par l'approximation engendrée par la méthode INDO.

#### **D) La méthode PM6:**

C'est la cinquième méthode du groupe James J P Stewart après, MNDO, AM1, PM3 et SAM1 (Les méthodes PM4 et PM5 n'ont pas été publiées). La PM6 a permis de paramétriser plus de 70 éléments, c'est donc une méthode plus complète.

Malgré la difficulté apparente des méthodes semi-empiriques il y a seulement trois sources d'erreurs possibles :

- Les données de référence peuvent être inexactes ou inadéquates
- Le set d'approximation peut inclure des prétentions peu réalistes ou inflexibles.
- Le processus de paramétrisation peut être incomplet.

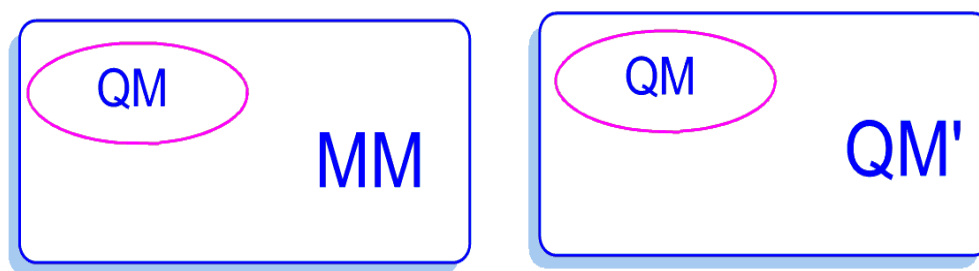
#### **IV.2.3. La méthode Hybride ONIOM**

Malgré les progrès significatifs en matière de méthodologie et de puissance de calcul, le traitement théorique de grosses molécules ou des gros clusters restent souvent difficile à entreprendre. Pour parer à ce problème deux possibilités sont envisageables. Tout d'abord on peut réduire le système au maximum en ne considérant que le centre réactif. On peut également choisir de traiter l'ensemble du système mais avec une méthode de calculs moins coûteuse de type empirique, semi-empirique ou de mécanique moléculaire. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces possibilités dépend des propriétés recherchées aux dépens des autres. En modélisant le système par un tout petit agrégat, on perdra toutes les interactions à plus longues distances aussi bien électroniques que stériques alors qu'en choisissant de traiter l'ensemble du système avec une méthode moins coûteuse on perdra en précision et en qualité.

Dans les années 90, les méthodes de calculs dites « mixtes », couplant la mécanique quantique (QM) et la mécanique moléculaire (MM), ont fait leur apparition sous le nom de méthodes QM / MM. L'intérêt de ces approches et de traiter simultanément, mais selon des méthodes distinctes, les différentes parties d'un système en fonction des propriétés recherchées. A titre d'exemple, si l'on souhaite étudier le site actif d'une protéine ou d'une surface pour la catalyse, on pourra considérer que seuls les atomes les plus proches de ce site auront un effet électronique tandis que le reste du système n'aura qu'un effet stérique et / ou électrostatique.

Ainsi, on pourra séparer le système en deux parties : i) le site actif nécessitant une description fine sera traité par chimie quantique ; ii) le reste du système sera quant à lui traité par mécanique moléculaire pour introduire les effets stériques et électrostatiques. Différents procédés ont été mis au point et la méthode ONIOM (our Own N-layer Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics) développée par Morokuma et al [21,22] plus générale, est implémentée dans le code commercial Gaussian. Cette méthode permet de traiter un système en deux (ONIOM2) ou trois (ONIOM3) niveaux de théories différents.

Dans un système à 2 couches, on parle de l'hybride ONIOM2, qui est aussi notée ONIOM (QM:MM) ou ONIOM (QM:QM') selon les niveaux de théorie combinés (Figure. IV.2).

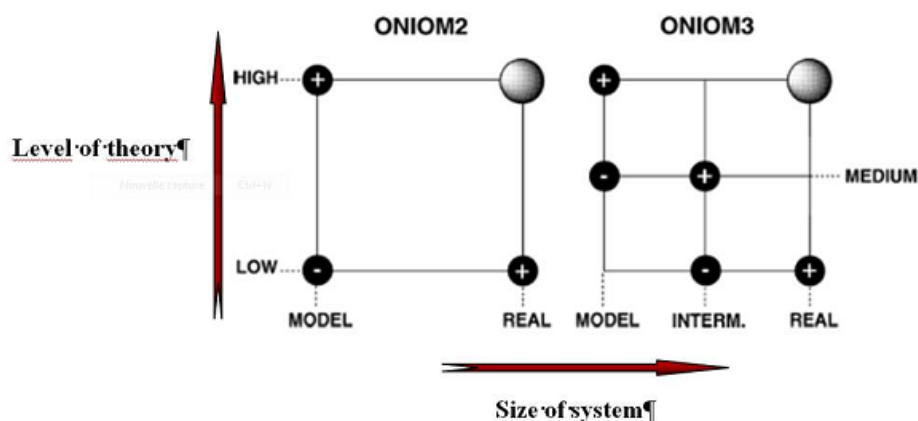


**Figure. IV.2 :** Représentation schématique de la partition du système en deux régions, à niveaux de calcul différents, dans la méthode ONIOM (QM:MM) et ONIOM (QM:QM')

L'extrapolation de l'énergie totale est obtenue à partir de trois calculs indépendants (Figure. IV.3):

$$E_{\text{ONIOM}} = E(\text{high, model}) + (E(\text{low, real}) - E(\text{low, model})) \quad (8)$$

"high" et "low" correspondent respectivement au niveau de théorie supérieur et inférieur, "real" au système réel contenant tous les atomes et calculé au niveau bas et "model" au système modèle représentant la partie active traité au niveau supérieur et qui doit être aussi traité au niveau inférieur. Ainsi, la différence entre les deux derniers termes  $E(\text{low, real}) - E(\text{low, model})$  permet à la fois, la description de la région de bas niveau ainsi que l'interaction entre les deux régions considérées [23].



**Figure. IV.3.** Schéma d'extrapolation pour un système moléculaire, lors d'un calcul ONIOM2 et ONIOM3 [22].

La partie la plus délicate du calcul est le traitement des zones frontières entre la partie haute et la partie basse. Lorsque les calculs sur la partie haute sont effectués, la partie basse est absente et l'on peut donc créer artificiellement des liaisons pendantes. Afin de contourner le problème de ce système chimiquement non réaliste, des atomes d'hydrogène sont ajoutés afin de saturer le modèle.

Tout l'intérêt de cette méthode réside dans le choix du découpage entre partie haute et partie basse et des niveaux de théories. Le but étant que le temps nécessaire pour effectuer les trois calculs ONIOM soit inférieur à celui qu'il faudrait pour calculer le système réel en haut niveau de théorie. L'utilisation de cette méthode permet de travailler sur des systèmes plus importants, limitant ainsi les effets de taille ou de bords, mais tout en contrôlant le temps de calcul.

En général, dans ce type de calcul, le couplage entre les régions (QM:MM) et (QM:QM') doit être capable de traiter les interactions liantes et non-liantes (Van der Waals et électrostatiques).

#### IV.2.4. L'analyse NBO (Natural Bond Orbital)

Dans l'analyse NBO, les interactions donneur-accepteur (liant-antiliant) sont prises en considération en examinant les interactions possibles entre les NBOs occupés (donneurs) type de Lewis et les NBOs inoccupés (accepteurs) non-Lewis et l'estimation de leurs énergies par la théorie de la perturbation de deuxième ordre. Pour chaque NBO (i) donneur et NBO (j) accepteur, l'énergie de stabilisation  $E$  liée à la délocalisation de  $i$  vers  $j$ , est explicitement estimée par l'équation suivante [24]:

$$E(2) = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F(i,j)^2}{\epsilon_j - \epsilon_i} \quad (9)$$

Où  $q_i$  est l'occupation de l'orbitale donneur,  $F(i,j)$  est l'opérateur de Fock et  $\epsilon_i$ ,  $\epsilon_j$  sont les énergies des orbitales NBOs.

### **IV.3. Conclusion:**

La modélisation moléculaire est une application des méthodes théoriques de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. L'ambition d'un chimiste théoricien est d'être capable de prédire, confirmer ou réinterpréter l'expérience à l'aide de la modélisation moléculaire. En effet, la persévérance des chercheurs, et surtout la puissance de leurs moyens informatiques jouent en faveur de la chimie théorique, et son champ d'application.

## Références Bibliographiques

- [1] D. Liotta. *Advances in Molecular Modeling*, Ed., JAI Press, 1. 1988
- [2] H. Dugas, *Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théoriques et pratiques*, quatrième édition, librairie de l'université de Montréal. 1996
- [3] W. Van Gunsteren, H. J Berendsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 1990, 29, 992.
- [4] S. Mekelleche, *Cours de post-graduation; chimie théorique*, 2000-2001
- [5] W.D. Cornell, P. Cieplack, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, *J. Am. Chem. Soc*, 1995, 117, 5179.
- [6] M.L.P Price, D. Ostrovsky, W.L. Jorgensen, *J. Compt. Chem.*, 2001
- [7] C. Slater, *Phys. Rev*, 1930, 36, 57-64.
- [8] J. Pople, "Quantum Chemical Models (Nobel Lecture)", *Angewandte Chemistry International Edition*, 1999, 38, 1894-1902.
- [9] R. Hoffmann, *J. Chem. Phys*, 1963, 39(6), 1397-1412.
- [10] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc*, 1985, 107, 3902-3909.
- [11] M. J.S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc*, 1977, 99, 4899-4907.
- [12] M.J.S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc*, 1977, 99, 4907-4917.
- [13] J.A. Pople, D.P. Santry, G.A. Segal, *J. Chem. Phys*, 1965, 43, 129 -135.
- [14] J.A Pople, G. A. Segal, *J. Chem. Phys*, 1965, 43, 136-149.
- [15] J. A. Pople, G. A. Segal, *J.Chem. Phys*, 1966, 44, 3289
- [16] J.A. Pople, D.L. Beveridge, P.A. Dobosh, *J. Chem. Phys*, 1967, 47 (18), 2026-2033.
- [17] J.J.P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, 1989, 10, 209-220.
- [18] SPARTAN 4.0 (1995), Wave function Inc, 18401 Von Karman Avenue, Irvine.
- [19] J.J.P. Stewart, *J. Mol. Modelling*, 2004, 10, 6-12.
- [20] J. J. P. Stewart, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2004, 33(3), 713-724.
- [21] M. Svensson, S. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Phys. Chem*, 1996, 100, 19357-19363.
- [22] S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma, M. J. Frisch, *J. Mol. Struct*, 1999, 1, 461-462.
- [23] T. Vreven, K. Morokuma, *Annual Reports in Comp. Chem*, 2006, 2, 35-51.
- [24] S. Mirabdullah, B. Sadeghi, K. Zare, *THEOCHEM*, 2007, 817, 27-33.

# ***DEUXIEME PARTIE***

## ***Résultats & Discussion***

# *Chapitre I*

## *Synthèse et Caractérisation des Conjugués Sulfonamides-Acide Lipoïque*

## I.1-INTRODUCTION

Récemment, il a été montré que l' ACIX contribue à l'acidification de l'environnement des tumeurs, en catalysant efficacement l'hydratation de l'anhydride carbonique avec son site actif extracellulaire, menant à l'acquisition des phénotypes métastatique et au chimiorésistance envers les drogues anticancéreuses de nature faiblement basiques.

Outre son rôle dans le contrôle du pH des tumeurs, il est aussi évident que l' ACIX peut influencer d'autres processus dans le microenvironnement des cellules tumorales provoquant ainsi la prolifération, l'invasion, et la métastase de ces cellules.

Les sulfamides et leurs produits de transformation sont connus depuis longtemps par la richesse et la diversité de leurs propriétés pharmacologiques ainsi que par leur large spectre d'activités. Cependant, cette famille de molécules souffre d'un inconvénient majeur qui est sa faible hydrosolubilité et son mauvais index thérapeutique.

De nombreux travaux ont montré qu'une grande famille de sulfonamides s'avèrent présenter une activité inhibitrice accrue vis-à-vis de l'AC. Mais un nombre important d'inhibiteurs appartenant à cette classe chimique disponibles actuellement en thérapeutique, présentent beaucoup d'effets secondaires principalement dus à leur manque de sélectivité surtout par rapport aux isoenzymes I et II de l'anhydrase carbonique omniprésents dans l'organisme [1].

Le développement d'inhibiteurs efficaces et plus sélectifs pour l'ACIX appartenant aux classes chimiques diverses, pour l'utilisation dans le management (diagnostique et traitement) des tumeurs hypoxique, représente actuellement un grand déficit clinique.

Les recherches actuelles s'orientent vers la découverte de nouvelles molécules mais aussi vers l'amélioration de l'efficacité des molécules existantes.

Etant donné l'intérêt attaché aux conjuguées sulfonamides-acide lipoïque candidats potentiels pour le ciblage de l'anhydrase carbonique IX avec les caractéristiques avantageuses de leurs parties lipoyle, susceptibles d'interférer sur les processus biologiques ou pathologiques, un accent particulier a été apporté dans notre laboratoire à la synthèse, la caractérisation et l'étude de ces composés.

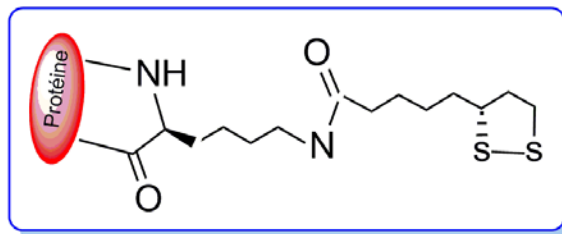


## I.2-Fonction, propriétés physiques et chimiques de l'Acide Lipoïque

L'acide  $\alpha$ -lipoïque (LA) est une substance qui est produite naturellement dans les plantes, les animaux et chez l'homme en petites quantités par le clivage endogène de l'acide Linoléique. (LA) est lié à certaines protéines et agit comme cofacteur de nombreuses et importantes enzymes mitochondriales [2].



**Figure.I. 1** : Conversion du groupement octanoyle en groupement lipoyle par la protéine LipA

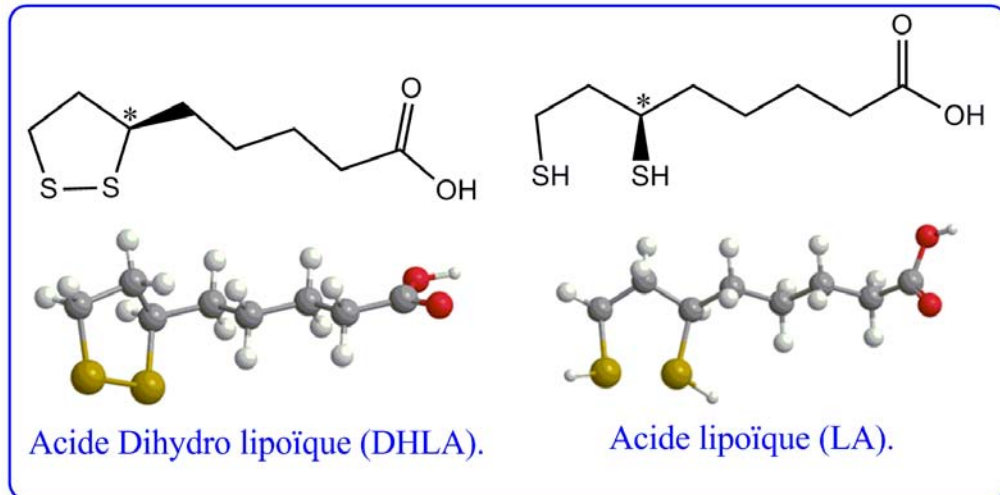


**Figure.I. 2** : Une protéine liée à l'acide lipoïque via un bras espaceur

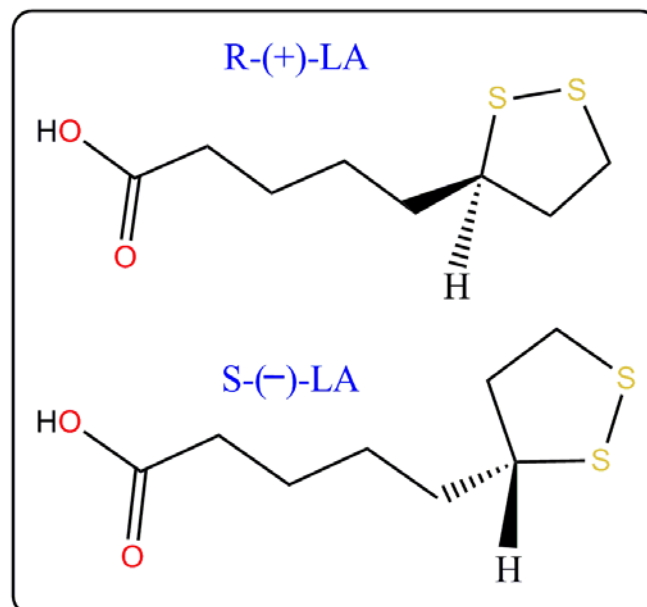
L'acide  $\alpha$ -lipoïque appelé aussi acide thioctique ou, encore acide lipodominique. (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque), est un acide carboxylique ( $pK_a = 5.10$ ) et sa base conjuguée est l'anion lipoate. Sous forme oxydée, il est de couleur jaune, alors que sous forme réduite l'acide dihydrolipoïque (DHLA) (Figure.I.3), est incolore.

L'acide  $\alpha$ -lipoïque est soluble dans le méthanol, l'éthanol, le diéthyléther et le chloroforme et insoluble dans l'eau (127mg/l à 25°C). Sa température de fusion est de 47,5-48°C [3].

Du fait de son atome de carbone chiral, LA a deux énantiomères R et S (Figure.I.4). La forme naturelle est la forme R, la forme S est synthétique et pourrait avoir une activité biologique plus faible que la forme R. La plupart des suppléments commerciaux sont des racémiques.



**Figure.I. 3 :** Structure de LA et du DHLA par différents modes graphiques des logiciels « Chem 2D et 3D »



**Figure.I. 4 :** Les deux énantiomères R et S de l' $\alpha$ -acide lipoïque.

L'acide lipoïque est réduit, en particulier, dans les globules rouges, en acide dihydrolipoïque. Cette réaction est dépendante du NADPH, une forme active de vitamine B<sub>3</sub> [4].

L'acide lipoïque est un composé non toxique possédant la particularité d'agir à la fois dans des environnements hydro et liposolubles de l'organisme. En d'autres termes, l'acide lipoïque est un vecteur naturel qui peut accéder à n'importe quelle partie de la cellule]. Il est un puissant antioxydant endogène et peut piéger les radicaux libres, chélater les métaux et régénérer d'autres antioxydants.

Le choix de l'acide lipoïque comme motif de couplage intéressant, se trouve en effet renforcée par la littérature décrivant ces dérivés comme étant des composés pouvant produire des effets bénéfiques ou favorables dans le traitement de certaines pathologies notamment [5-12]:

- Les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires
- les maladies prolifératives et inflammatoires
- Les maladies auto-immunes et virales.
- Le cancer.
- les maladies neurologiques associées à des intoxications
- toutes les pathologies caractérisées par une production ou un dysfonctionnement de monoxyde d'azote (NO).

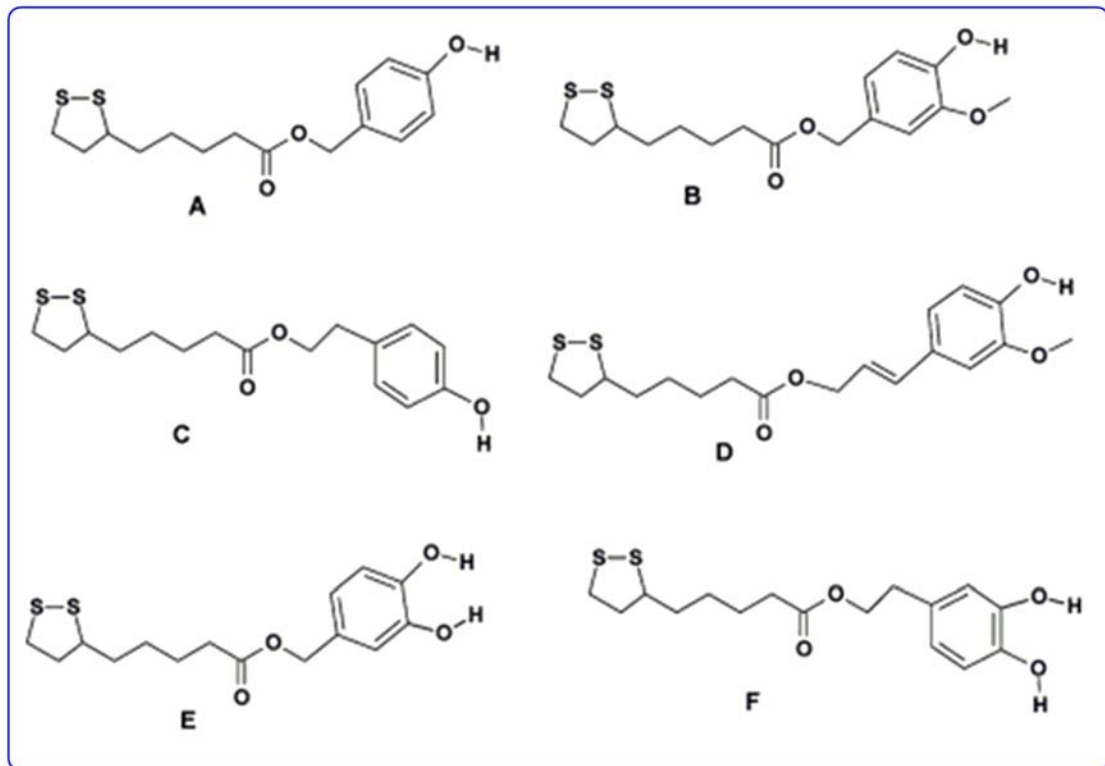
### **I.3. Exemples de composés d'intérêt thérapeutique dérivés de à l'Acide Lipoïque**

L'acide lipoïque présente les caractéristiques chimiques uniques de posséder une fonction disulfure cyclique à une extrémité de la molécule. Ce pont disulfure peut être rompu par une coupure réductrice de la liaison S-S. aboutissant enfin à des dérivés thiolés très actifs. Il présente aussi à l'autre extrémité une fonction acide carboxylique, ce qui rend cette molécules parfaitement compatible avec les différents couplages (peptidiques, d'estérification ....).

Et comme cela a été montré dans plusieurs travaux, la présence de l'entité lipoyle dans le squelette de certaine structure bioactives, qu'elle soit naturelle ou synthétique, lui confère de multiples propriétés biologiques.

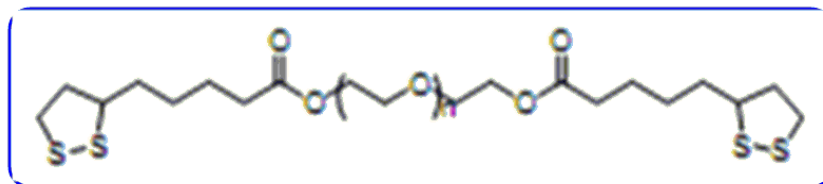
En termes d'amélioration de l'activité anti-oxydante de cette molécule, un ensemble de molécules hybrides ont été synthétisées dans le but d'améliorer son profil pharmacocinétique et son efficacité thérapeutique.

En effet, une série d'esters (figure.I.5) obtenue par couplage de l'acide lipoïque avec des phénols doués d'activité antioxydante a révélé un effet de synergie remarquable [13].



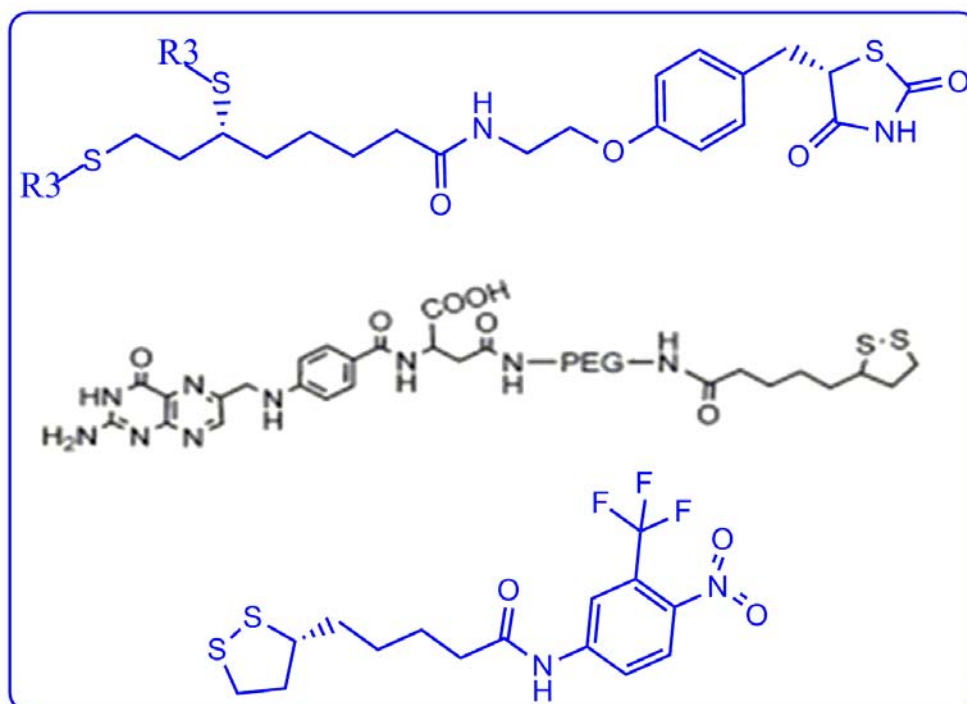
**Figure.I. 5** : Nouvelles structures d'esters obtenues par couplage de l'acide lipoïque avec des phénols.

La pégylation de l'acide lipoïque (Figure.I.6) a pour effet d'augmenter son hydrosolubilité, ce qui améliore d'avantage ses propriétés pharmacologiques [14].



**Figure.I.6 :** Nouveaux esters hydrosolubles obtenus par pégylation de l'acide lipoïque.

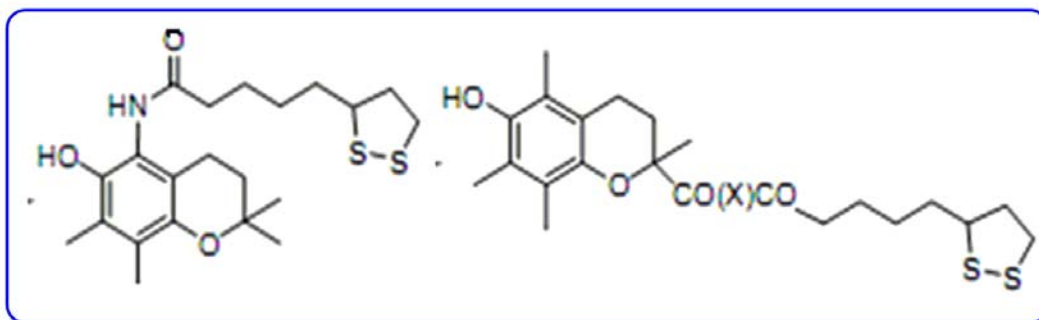
La synthèse et l'évaluation biologique de plusieurs séries de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoïque ont été rapportées dans la littérature [15].trois têtes de séries sont données sur la figure.I.7 suivante:



**Figure.I.7:** Structures de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoïque.

Parmi les nombreuses possibilités de développements offertes par l'acide lipoïque en tant qu'agent thérapeutique, un accent particulier a été apporté pour la synthèse de nouveaux conjugués acide lipoïque-chroman (Figure.I.8).

L'évaluation biologique de ces composés a déjà permis d'obtenir de meilleures activités cardio-protectives et antioxydantes [16].



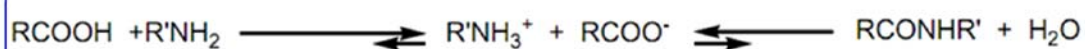
**Figure.I. 8 :** Structures des chromans analogues de l'acide lipoiique douées de propriétés antioxydantes et Antiarrhythmiques

#### I.4. Couplage peptidique d'intérêt thérapeutique

Différentes méthodes de couplage, utilisées pour coupler une molécule biologique d'intérêt à une autre molécule ou à une particule, sont groupées en deux grandes catégories : couplages covalents et couplages d'affinité.

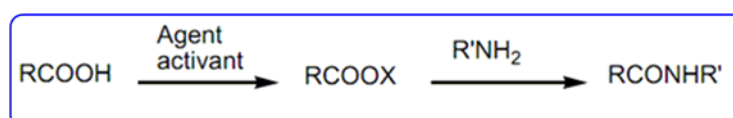
Les méthodes de couplage covalent utilisées en chimie biomoléculaire sont basées sur des réactions entre groupes rencontrés fréquemment au sein des molécules biologiquement actives, comme les amines primaires, les thiols, les carboxylates ....etc[17].

Par exemple, la formation d'une liaison amide (pont peptidique) qui nous concerne dans notre travail se réalise par une condensation entre une fonction acide et fonction amine, il s'agit d'une réaction acido-basique qui favorise la formation d'un sel ( $\text{RCOO}^-$ ,  $\text{R}'\text{NH}_3^+$ ) au lieu de la formation de l'amide ( $\text{RCONHR}'$ ) (**Schéma.I.1**).



**Schéma.I.1:** Formation de la liaison amide.

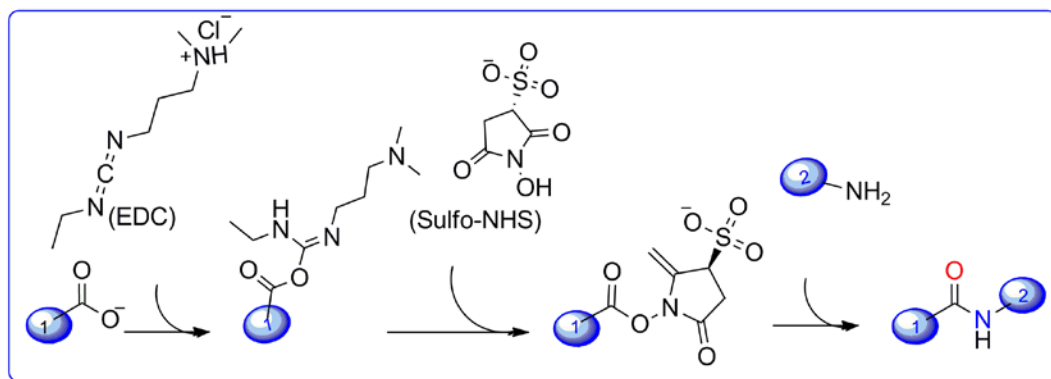
Par conséquent, pour créer une liaison amide, il faut activer la fonction acide carboxylique par un groupe partant fixé sur le carbonyle de l'acide correspondant. Ensuite l'acide activé sera couplé à l'amine:



**Schéma.I. 2:** Activation et aminolyse d'un acide carboxylique

Diverses méthodes permettent l'activation de la fonction acide carboxylique lors du couplage en utilisant un halogène, un azide, un imidazole, un anhydride (symétrique ou

mixte), ou un ester activé. Le schéma général (**Schéma.I.3**) étroitement lié à mes réactions de couplage, illustre la réaction de conjugaison entre un carboxylate activé par **EDC/NHS** (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide Nhydroxysuccinimide) et une amine primaire aboutissant à une liaison amide [18].

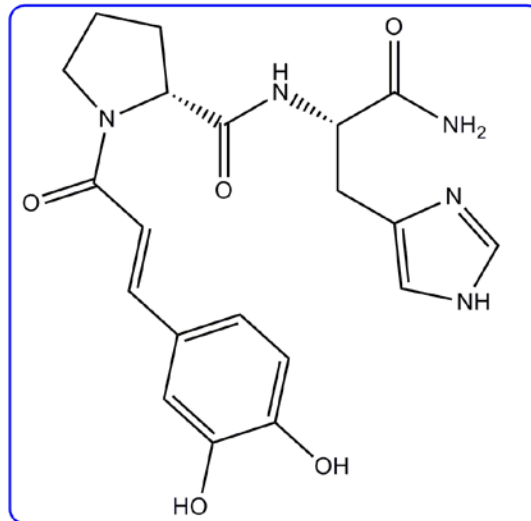


**Schéma.I.3:** Réaction entre un carboxylate et une amine. Le carboxylate est d'abord activé par EDC/NHS pour réagir avec l'amine. Les boules 1 et 2 représentent les molécules d'intérêt

### I.5. Activité biologique des composés peptidiques

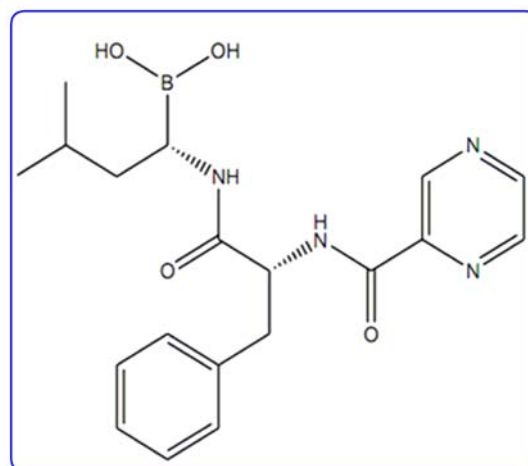
Les composés portant des liens peptidiques trouvent de nombreux débouchés d'application dans le domaine pharmaceutiques. Dans ce contexte, de grosses sociétés pharmaceutiques investissent dans la recherche peptidique pour ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ces molécules sont intensivement utilisées à cause de leurs diverses activités biologiques [19,20]. En effet, dans la chimiothérapie anticancéreuse, l'activation d'une prodrogue (libération du principe actif) peut se faire à l'aide d'enzymes associées à certaines tumeurs, telles que les protéases, la glucuronidase et les carboxylestérases. Le choix de l'espaceur dépend de la nature de la tumeur et donc des enzymes surexprimées à ce niveau. A titre d'exemple, l'espaceur peptidique « Phe-Ala-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Val-Leu-OM<sub>4</sub>P » semble être un bon substrat pour la cathepsine D, qui est surexprimée au niveau extracellulaire des tumeurs [21]. Dans une autre étude brevetée par Trouet et al, les auteurs revendiquent des conjugués d'anticancéreux (ex. la doxorubicine) couplés à des séquences peptidiques: L-Alanyl, L-Leucyl et L-Phenylalanyl.[22] Dans ce cas, l'hydrolyse de la liaison espaceur-PA se fait grâce aux peptidases spécifiques et/ou non spécifiques.

Les peptides vecteurs CPPs (Cell Penetrating Peptides) constituent une autre possibilité d'utilisation thérapeutique. Il a été constaté que le dipeptide (CA-Pro-His-NH<sub>2</sub>) montre une forte activité anti-oxydante [23, 24].



**Figure.I.9:** Le(CPPs) un antioxydant peptidique.

Plusieurs peptides anticancéreux ont été identifiés dans plusieurs sources (micro-organismes, plantes, hydrolyse protéique des produits alimentaires...etc), Par exemple Le Bortezomib ou Velcade® est le premier inhibiteur de protéasome approuvé par la FDA pour le traitement de myélome multiple en 2003 et du lymphome en 2006 [25]. Le point fort du Bortezomib est son action ciblée sur les cellules cancéreuses. L'apoptose provoquée par cette molécule est caractérisée par une augmentation de l'expression de NOXA (protéine pro-apoptotique de la famille BH-3) [26].



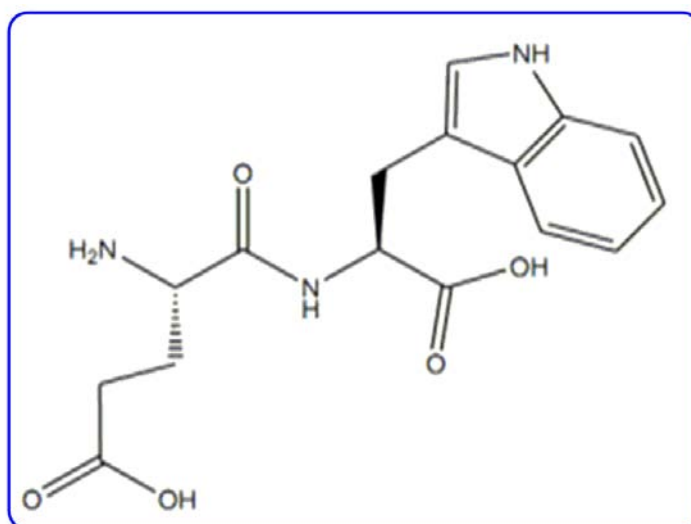
**Figure.I.10 :** la structure de Bortezomib.



## I.6. Peptides Naturels

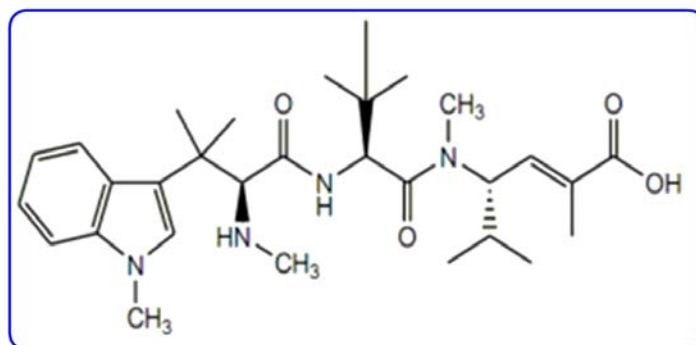
Le milieu naturel a toujours été une source très importante de molécules bioactives. Il est très riche en différentes classes de composés chimiques telle que: les alcaloïdes, les terpènes, les flavonoïdes et les peptides. Ces derniers représentent une source d'inspiration pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Dans la nature, les dipeptides linéaires se trouvent comme des molécules antitumorales, c'est notamment le cas du composé IM862, qui est un dipeptide naturel, formé de : L-Glu-L-Trp, également appelé glufanide. Il a été isolé pour la première fois par le Laboratoire PEPTOS, en Russie, qui s'intéressait aux peptides pharmacologiquement actifs. Initialement isolé du thymus de veau, il a été ensuite obtenu par synthèse [27].



**Figure.I.11:** Dipeptide linéaire le glufanide .

Un autre exemple: le tripeptide de la famille des hemiassterlines, issues d'éponges, provoque l'inhibition de la polymérisation de la tubuline ainsi que la dépolymérisation des microtubules existants, l'inhibition de la mitose et donc de la prolifération cellulaire [28].

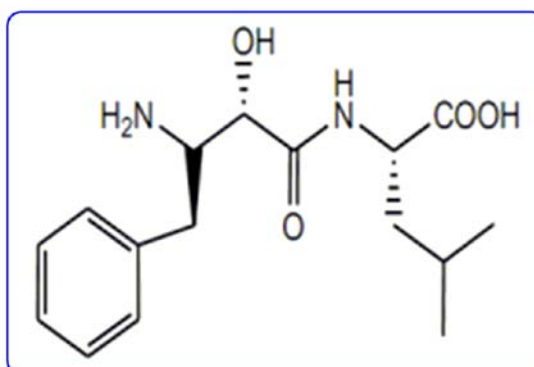


**Figure.I.12:** Structure d'un tripeptide naturel de la famille des hemisterlines

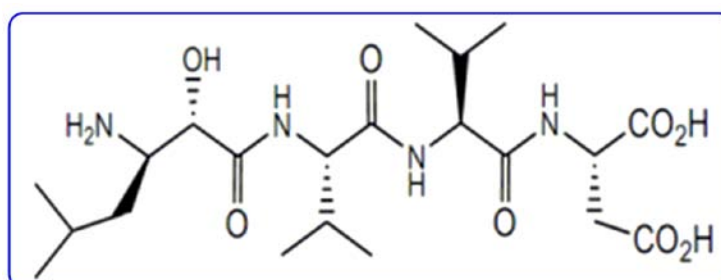
### I.7. Les peptidomimétiques

La première définition d'un peptidomimétique a été donnée par Gant [29] en 1994, il le définit comme une molécule présentant des analogies structurales avec le peptide natif, nécessaire à l'interaction avec le récepteur adéquat.

C'est le cas de la Betastatine et l'Amastatine : substances peptidomimétiques douées d'une très bonne stéréosélectivité.



**Betastatine:** inhibiteur de la leucine aminopeptidase membranaire (APM)



**Amastatine:** inhibitrice de la LAP (leucine aminopeptidase)

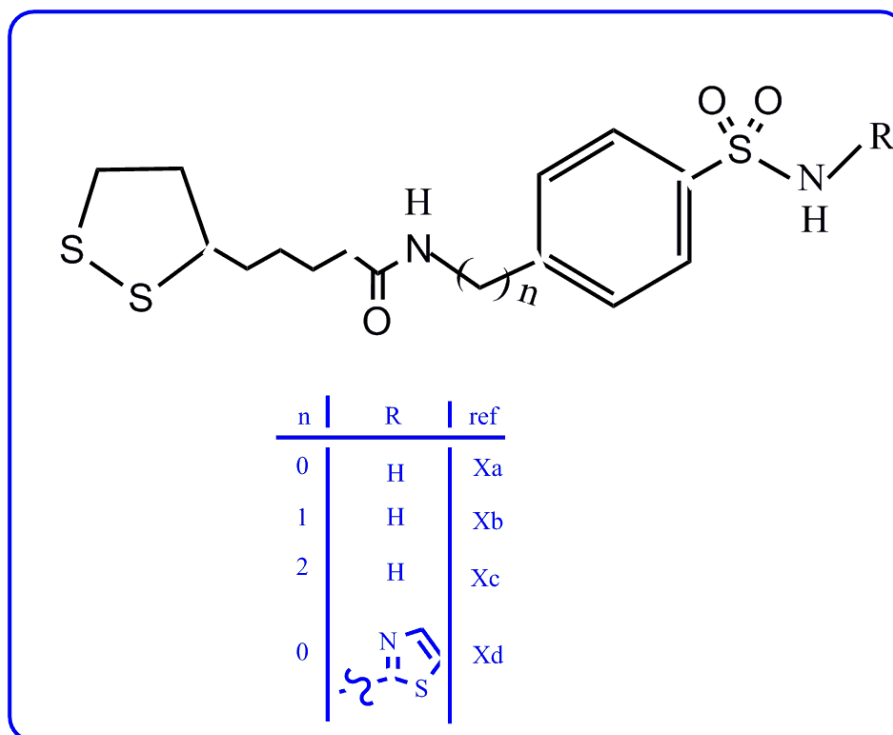
**Figure.I. 13:** exemples de peptidomimétiques

En effet, les peptidomimétiques présentent de nombreux avantages par rapport aux produits naturels [30]. Ces avantages sont notamment :

- ✓ Une stabilité métabolique et une affinité accrue.
- ✓ Une forte absorption au niveau des membranes intestinales.
- ✓ Une faible digestion par les enzymes protéolytiques, ainsi qu'une distribution homogène dans le système immunitaire.
- ✓ De bonnes affinités, spécificités et sélectivités avec les récepteurs biologiques.
- ✓ Peu d'effets secondaires.

### I.8. Synthèse de Conjugués Sulfonamides -Acide Lipoïque.

Compte tenu de l'intérêt pharmacologique présenté par la série de conjugués sulfonamides-acide lipoïque inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (IX) [31], et dont les structures sont données ci-dessous(Figure.I.14), nous réservons cette partie pour leurs synthèse et caractérisations.

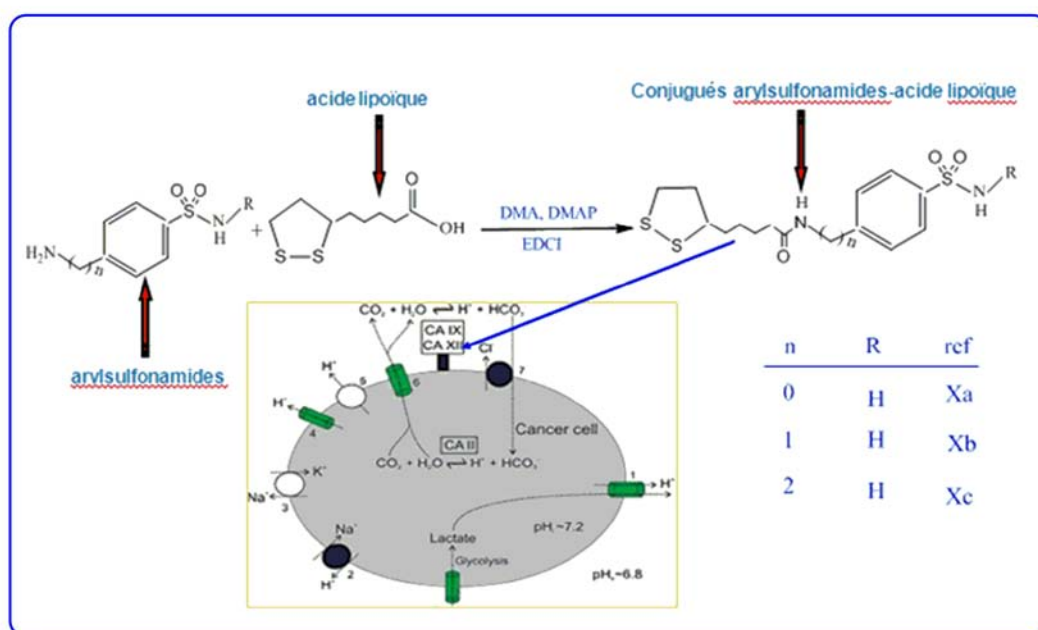


**Figure.I. 14:** Structure générale des conjugués: sulfonamides-acide lipoïque synthétisés.

En effet, ces composés sont obtenus avec un bon rendement par le couplage d'une série de sulfonamides avec l'acide lipoïque dans le DMA (diméthylacétamide) en présence

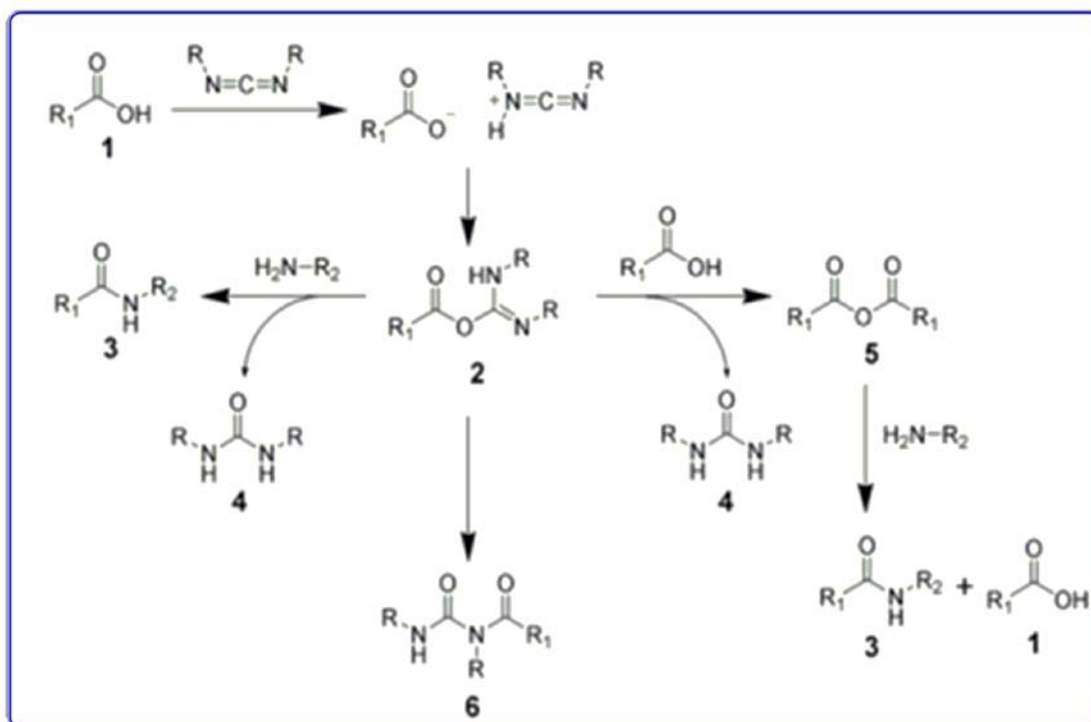
de l'EDCI (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl) carbodiimide ) et du DMAP (4-diméthylamino pyridine) à température ambiante (Schéma .I.4).

L'emploi des carbodiimides tels que le DCC (1,3-dicyclohexylcarbodiimide) ou l'EDCI (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide) pour la formation d'une fonction amide est un moyen éprouvé et très connu en synthèse peptidique[32, 33] ; Cependant ce procédé s'accompagne souvent de réactions secondaires qui peuvent compliquer l'isolement des produits désirés tout en diminuant considérablement leurs rendements.



**Schéma.I.4:** Accès aux conjugués: sulfonamides -acide lipoiique inhibiteurs de l'ACIX

Le mécanisme général faisant intervenir ces réactions est présenté sur le schéma .I.5 suivant:



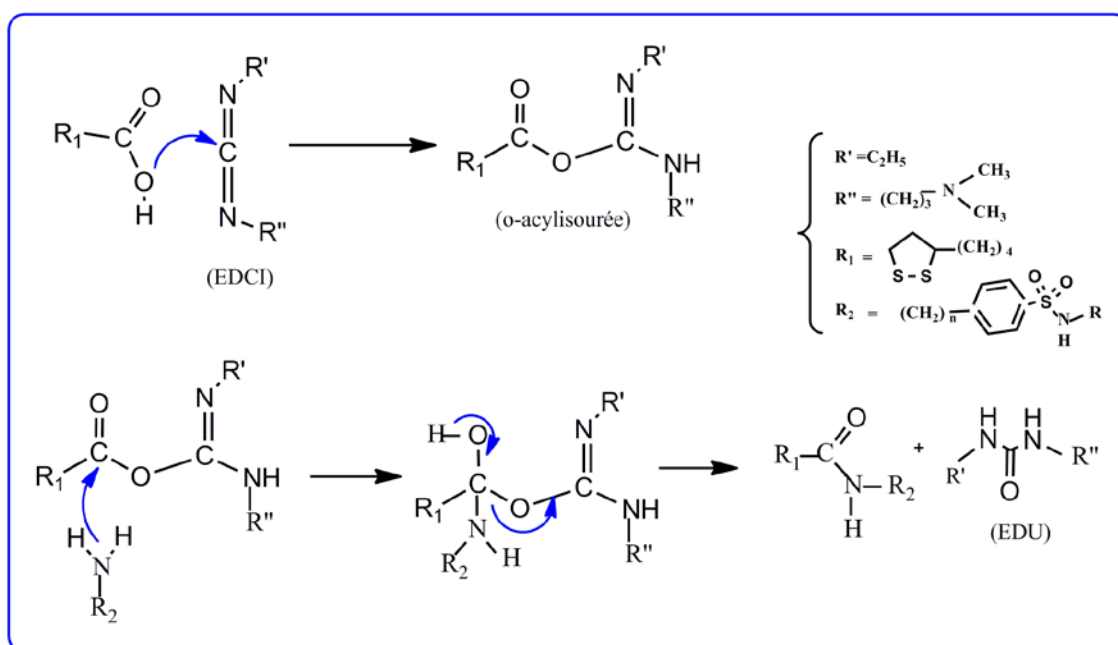
**Schéma.I.5:** Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites.

L'acide **1** réagit avec le carbodiimide pour conduire au produit clé: l'O-acylisourée **2** considéré comme un ester carboxylique possédant un groupement activé facilement partant ; ensuite, l'O-acylisourée obtenu réagit avec les amines pour donner l'amide désiré **3** et l'urée **4**. Cependant, le composé intermédiaire O-acylisourée peut réagir également avec un acide carboxylique additionnel **1** pour produire un anhydride d'acide **5** lequel peu réagir ultérieurement avec une amine pour donner l'amide désiré **3**. La réaction qui implique le réarrangement de l'O-acylisourée **2** au N-acylurée **6** est la réaction indésirable principale.

L'optimisation de cette réaction par la mise au point de nouvelles conditions expérimentales qui consiste à utiliser l'EDCI comme agent déshydratant en présence du DMAP en tant que catalyseur dans le DMA, nous a permis d'accéder aux produits désirés avec des rendements satisfaisants.

Et dans ce cas, le mécanisme réactionnel probable est le suivant : L'attaque nucléophile de l'acide lipoiq ue sur l'EDCI conduit à une O-acylisourée intermédiaire.

L'attaque de l'amine primaire sur le carbonyle activé de ce dernier suivi d'un réarrangement conduit à la formation de la liaison peptidique et à la libération du produit N, N'- thyldim thylaminopropylur e (EDU).



**Schéma.I. 6 :** Mécanisme du couplage des sulfonamides avec l'acide lipoiq ue en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP.

### I.9. Caractérisations des composés obtenus

Les caractéristiques spectroscopiques des composés obtenus sont en accord avec les structures prévues pour ces composés. En effet, la série des quatre composés obtenus a été observée par spectrométrie de masse qui donne des pics moléculaires parfaitement en accord avec les masses des structures proposées (Figures; I.15, I.16).

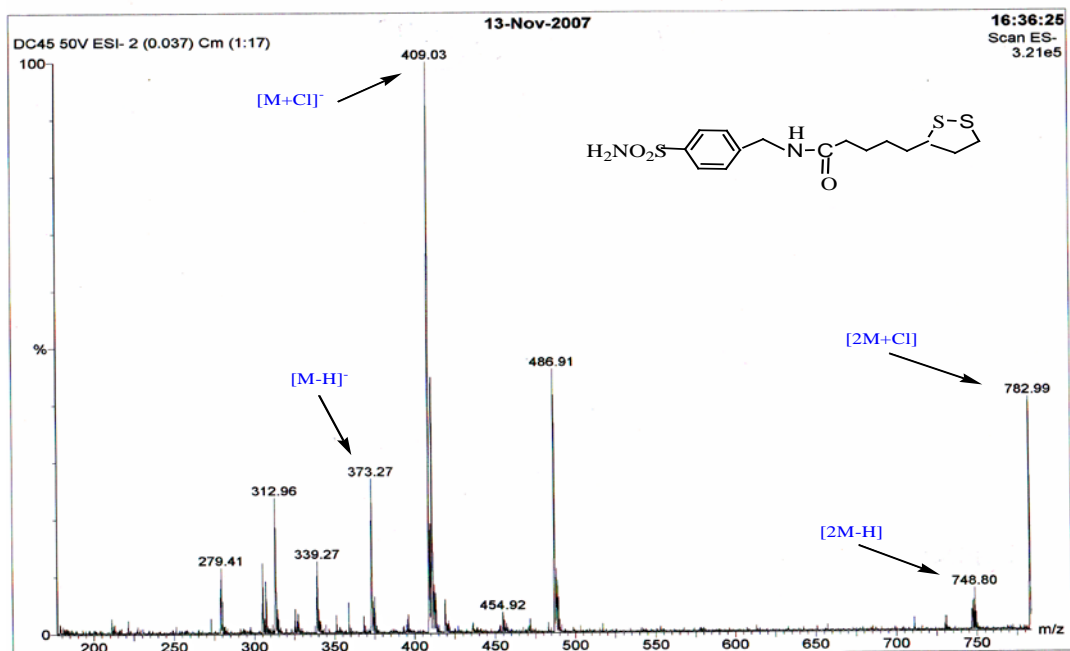
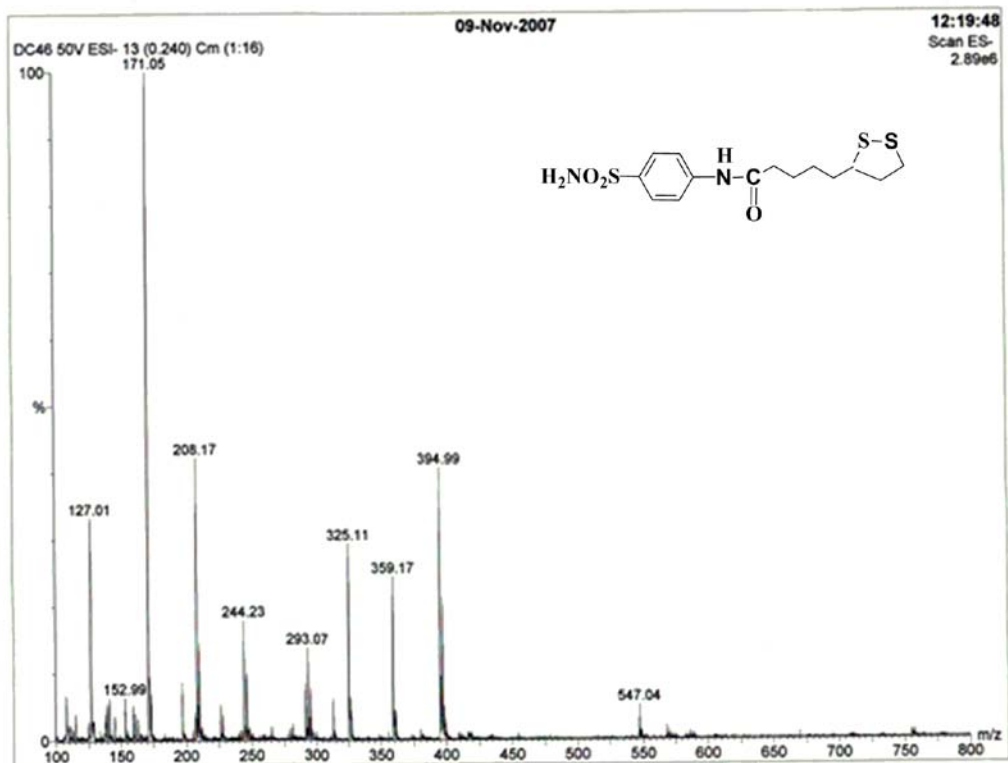
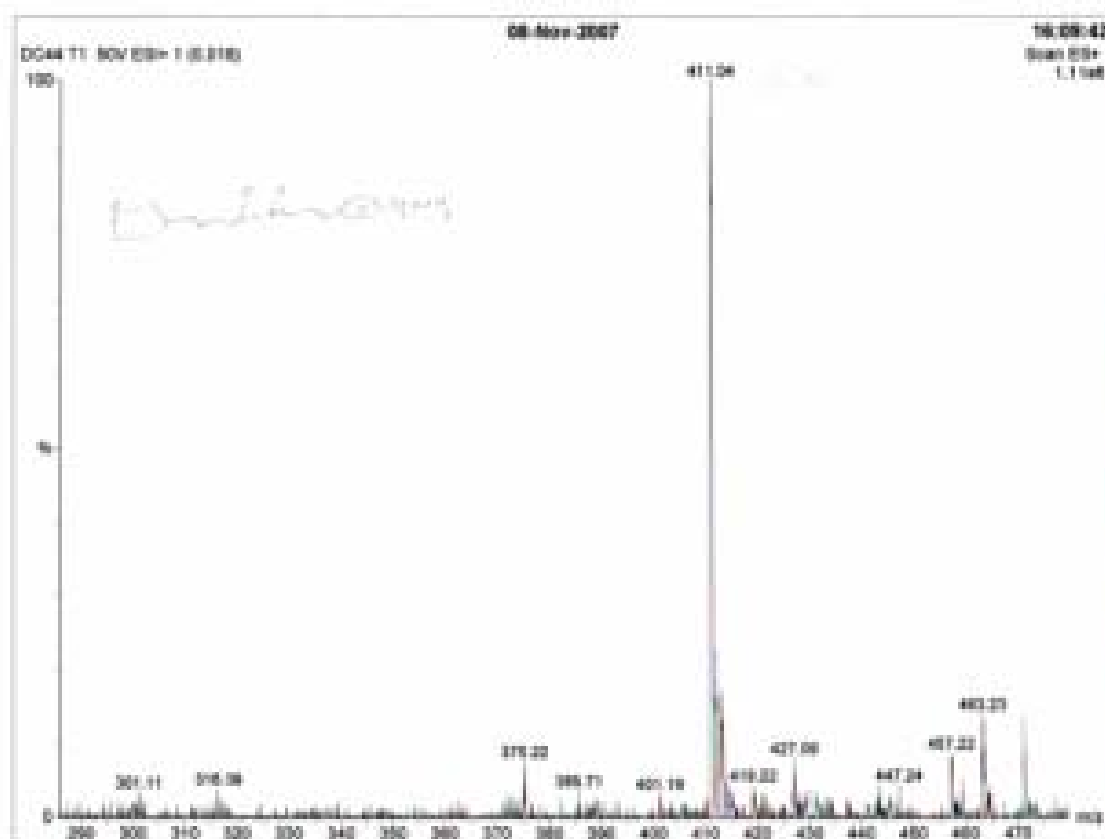


Figure.I.15: Spectres de masse MS-ES<sup>-</sup> des composé (Xa) et (Xb)



**Figure.I.16:** Spectre de masse MS-ES<sup>-</sup> des composé (Xc)

En RMN<sup>1</sup>H obtenu dans le DMSO, les spectres des conjugués (Xa), (Xb) et (Xc) présentent des allures générales assez comparable données sur les Figures.I.17 et I.18. Par exemple, pour les composés (Xa, Xb et Xc), on constate en particulier que le proton N-H de la liaison peptidique est mis en évidence par l'apparition d'un signal sous forme de triplet entre 7.35 et 10.23 ppm, par contre le signal intense allure de singulet apparaissant entre 7.24 et 7.32 ppm est attribué aux protons NH<sub>2</sub> du groupement sulfonamide. Les signaux des protons aromatiques sont observés entre 7.38 et 7.76 ppm.



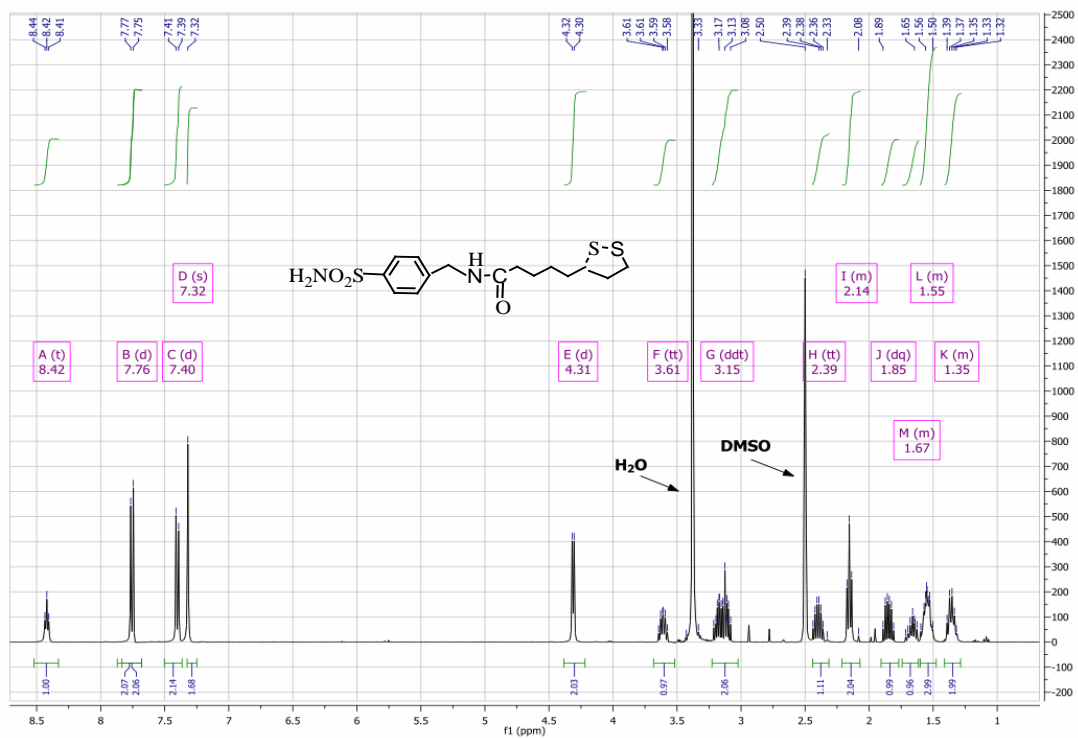
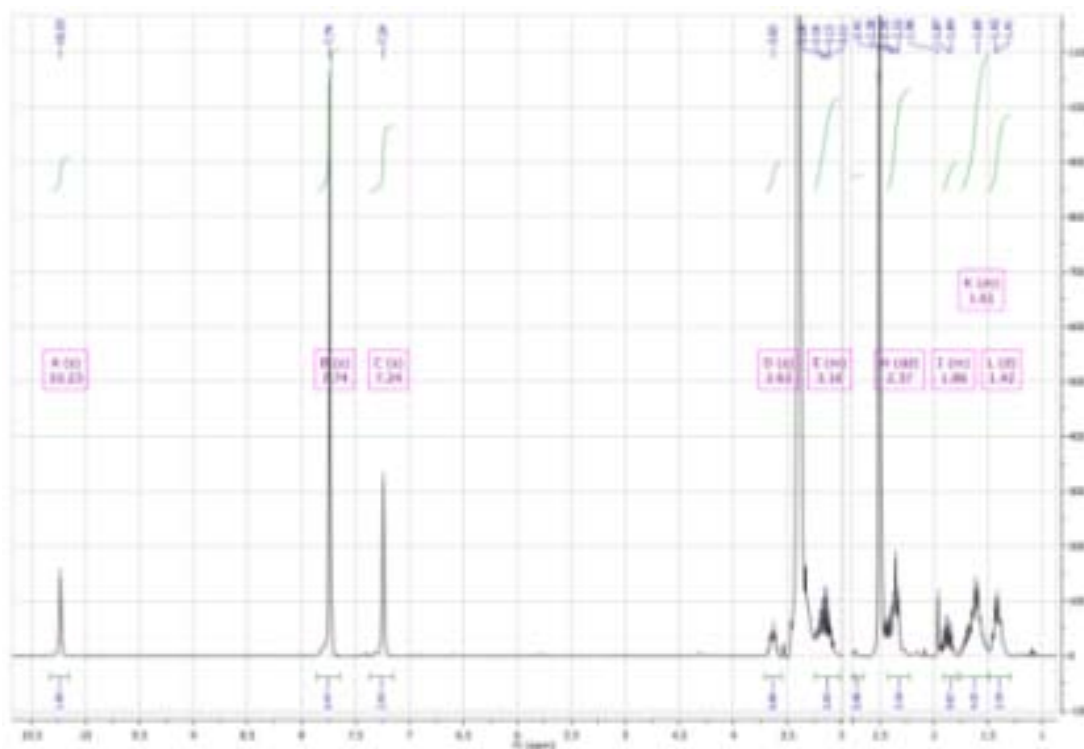
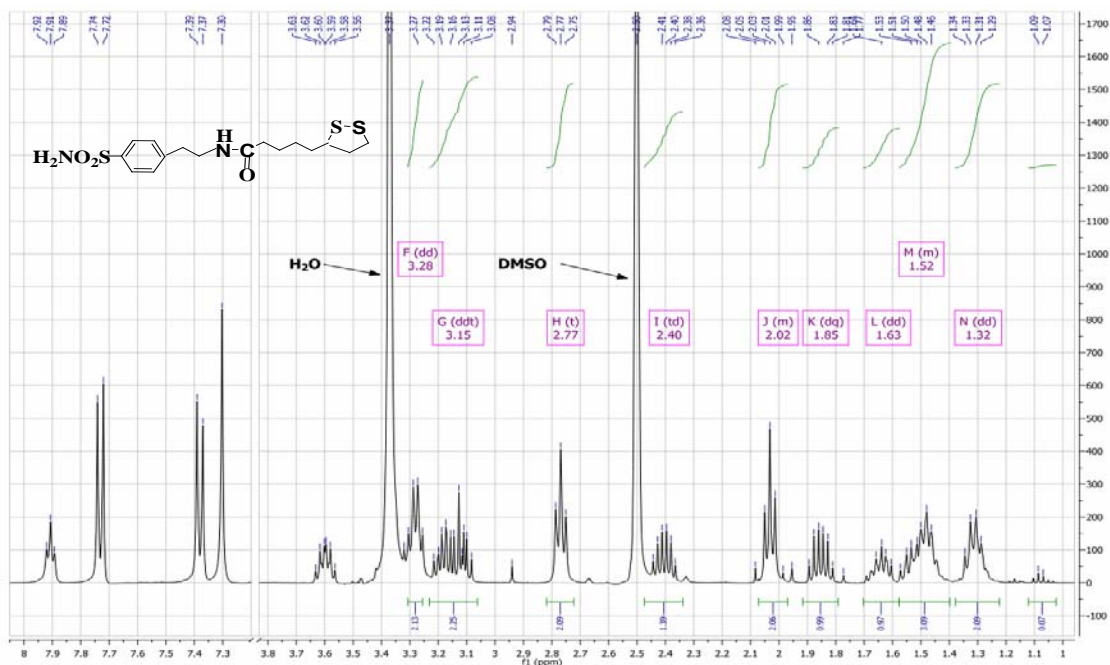
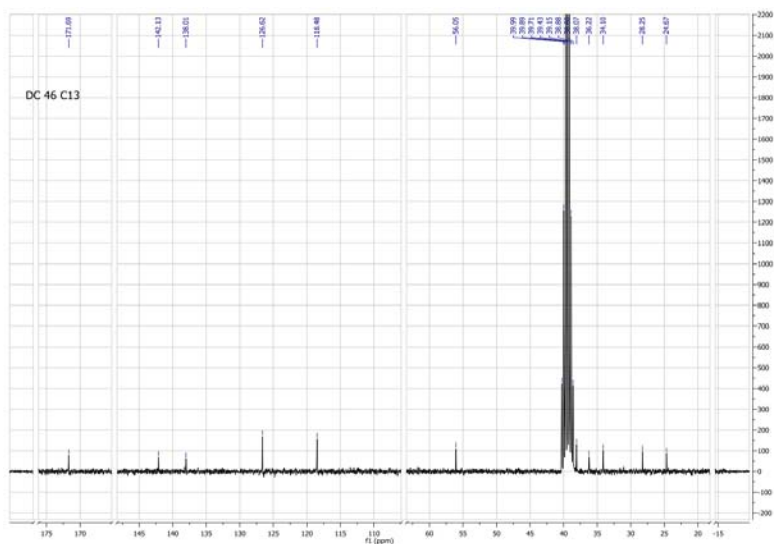


Figure.I.17: Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés (Xa), (Xb) dans le DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure.I.18:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de composé (Xc), dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

Sur les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  dans le DMSO-d<sub>6</sub>, enregistrés à température ambiante, Et pour les mêmes composés (Xa, Xb et Xc), par exemple, on constate l'apparition d'un signal entre 171.69 et 172.25 ppm caractéristique du carbone du groupement C=O de la fonction amide, quatre signaux entre 118.47 et 143.83 ppm correspondants aux carbones aromatiques. Les signaux situés vers la zone des champs plus forts correspondent aux carbones aliphatiques (Figures : I.19, I.20).



**Figure.I.19:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé (Xa)

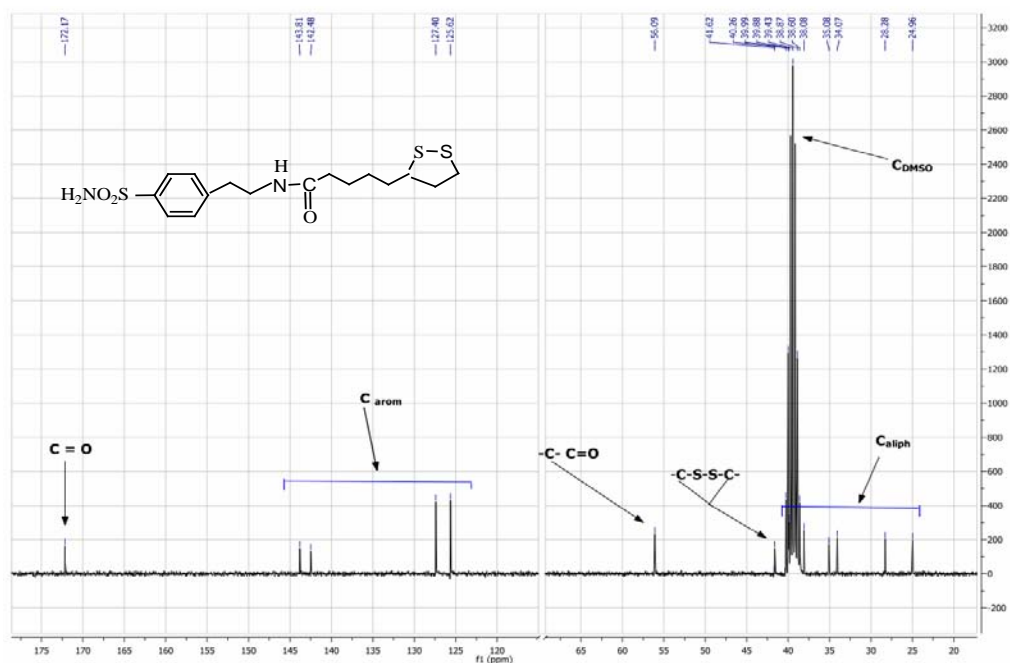
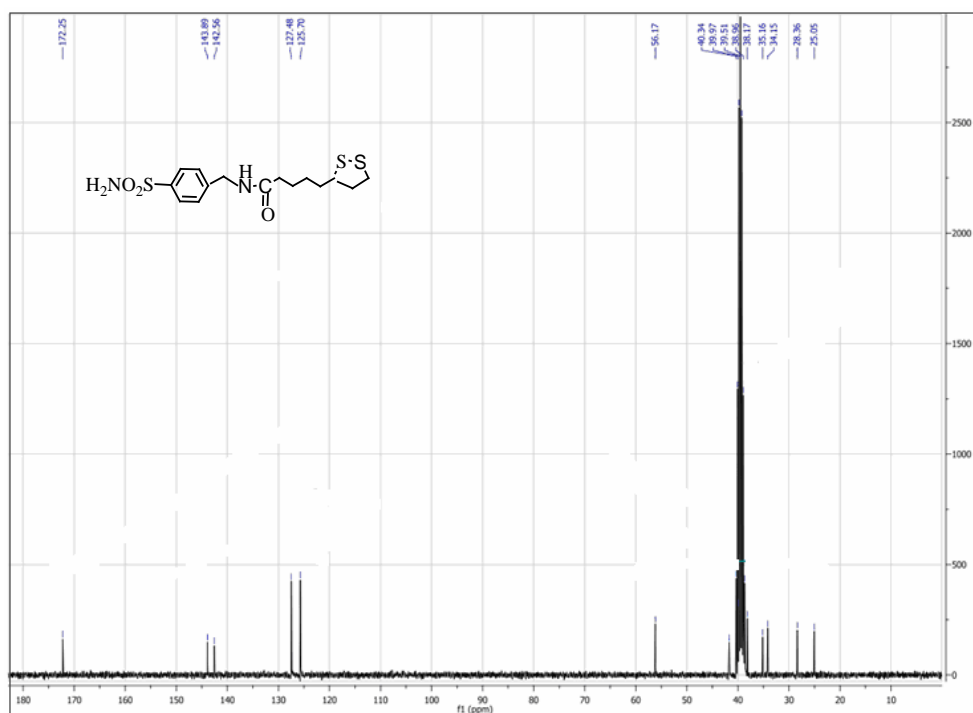


Figure.I.20 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  des composé ( Xb) et (Xc) dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

Le tableau suivant regroupe certaines caractéristiques physico-chimiques des conjugués obtenus.

**Tableau.I.1:** Rendements et caractéristiques physico-chimiques des conjugués sulfonamides acide lipoïque (X) préparés.

	<u>Rdt</u> (%)	<u>Rf</u> DCM/ MeOH	<u>Tf</u> (°C)	<u>MS</u> (ESI <sup>+</sup> /ESI <sup>-</sup> )	<u>RMN<sup>1</sup>H</u> (δ en ppm) DMSO-d6	<u>RMN<sup>13</sup>C</u> (δ en ppm) DMSO-d6
<u>Xa</u>	40	0,42	176	359,17 [M-H] <sup>-</sup> 394,99 [M+Cl] <sup>-</sup>	H <sub>NH</sub> (10.23) H <sub>NH2</sub> (7.24) H <sub>Ph</sub> (7.74) H <sub>aliph</sub> (1.42-3.63)	C=O (171.69) C- Ph (118.47- 142.12) Caliph (24.67- 56.06)
<u>Xb</u>	66	0,55	124	373,27 [M-H] 782.99[2M+Cl] <sup>-</sup>	H <sub>NH</sub> (8.42) H <sub>NH2</sub> (7.32) H <sub>Ph</sub> (7.40 -7.76) H <sub>aliph</sub> (1.35-4.31)	C=O(172.25) C- Ph(125.70- 143.83 ) C <sub>aliph</sub> (25.05-56.17 )
<u>Xc</u>	68	0,88	131 °	411,04 [M+Na] <sup>+</sup> 423,06[M+Cl] <sup>-</sup>	H <sub>NH</sub> (7.91) H <sub>NH2</sub> (7.30) H <sub>Ph</sub> (7.38 -7.73 ) H <sub>aliph</sub> (1.32-3.6)	C=O (172.17) C- Ph(125.62- 143.81)- C <sub>aliph</sub> (24.96-56.09)
<u>Xd</u>	78	0.76	147	466.54, 442.63	7.75 (d, 2H) 7.41 (d, 2H) 7.35 (s, 1H) 6.87 (d, 1H) 6.81 (d, 1H)	X

### I.10. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rapporté les principales propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de l'acide lipoïque ainsi que certains de ses dérivés d'intérêt thérapeutique. Ensuite nous avons décrit le couplage peptidique et ses applications pour accéder à différentes structures bioactives. Par ailleurs, et en vu de leur étude expérimentale au moyen des méthodes spectroscopiques, un accent particulier a été apporté à la synthèse et la caractéristiques d'une série de conjugués sulfonamides- acide lipoïque candidats potentiels pour le ciblage de l'Anhydrase Carbonique (IX).

## Références Bibliographiques

- [1] C.T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 168–181.
- [2] M. Szelag, D. Mikulski, M. Molski, *J Mol Model* 2012, 18:2907–2916
- [3] AL. McLain, PJ.Cormier, M. Kinter, LI. Szweda, *Biol Med* 2013, 61C:161 –169.
- [4] H. Moini, L. Packer, N-E. Saris, *Toxicol Appl Pharmacol* 2002,182:84–90.
- [5] HJ. Tritscheler, SP. Wolff, *Biochem Pharmacol*, 1995, 50:123–126.
- [6]A. Bast, GR. Haenen. *Biofactors*2003,17 (1–4):207–213.
- [7] S. Golbidi, M. Badran, I. Laher; *Front Pharmacol*, 2011, 2:69.
- [8] Y. Koriyama, Y. Nakayama, S. Matsugo, S. Kato, *Brain Res* 2013,1499:145–157.
- [9] R. Pullerits, M. Bokarewa, L. Dahlberg, A. Tarkowski, *Arthritis Res Therapy*, 2005, 7, 817-824.
- [10] M. Wilking, M. Ndiaye, H. Mukhtar, N. Ahmad, 2013, 19:192–208.
- [11] M. Al Abdan, *Scientific World Journal* 2012, 012:509838.
- [12] M. Trentin, T. Carofiglio, R. Fornasier, U. Tonellato, 2002, 23, 4117–4122
- [13]S. Kaki, C. Grey, P. Adlercreutz, *Journal of Biotechnology*, 2012, 157 344–349.
- [14] C.C. Lu, B.M. Kim, K.Y. Chai, *Eur.J.Med. Chem*, 2011, 46, 518 4- 5188.
- [15] S.J. Zhang, Q.F. Ge, D.W. Guo, W.X. Hu, H.Z. Liu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20, 3078–3083.
- [16] M. Koufaki, A. Detsi, E. Theodorou, C. Kiziridi, T. Calogeropoulou, A. Vassilopoulos, A. Kourounakis, E. Rekka, P. N. Kourounakis, C. Gaitanakib and P. Papazafirib, *Bioorganic& Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 4835–4841.
- [17] H.Verma, A. Rajpoot, *Int.J.Pharm Tech Res*, 2012, 4(1) :194.
- [18]Y.WAN, Développement de nanovecteurs polymériques et lipidiques fonctionnalisés par des anticorps pour cibler des cellules cancéreuses, thèse de Doctorat de l'université Bordeaux 1, 2012 ;
- [19]: A. Loffet, *J. Pept. science*, 2002, 8, 1.
- [20]: M. Ayoub, D. Scheidegger, *Chemistry today*, 2006, 24, 46.
- [21] N. Agarwal, D. H. Rich, *Anal. Biochem.* 1983, 130, 158-165.
- [22] A. Trouet, R. Baurain, PCT/BE1995/000076[WO/1996/005863], 29-2-1996.
- [23]: B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 637.
- [24]H. S. Seo, S. Y. Kwak, & Y. S .Lee, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(14), 4266.
- [25] J. Adams, M. Kauffman, *Cancer Investigation*, 2004, 22 (2), 304.

- [26] D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, and Q. P. Dou, *Current Cancer Drug Targets*, 2011, 11 (3), 239.
- [27] A.M.S. Mayer, K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M. McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts & D.E. Shuster, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2010, 31(6), 255.
- [28] G. Kuznetsov, K. Ten Dyke, M.Towle, H. Cheng, J .Liu, J.P .Marsh, S.E.R Schiller, M.R. Spyvee, H. Yang, B.M. Seletsky, C.J. Shaffer, V. Marceau, Y. Yao, E.M. Suh, S. Campagna, F.G. Fang, J.J. Kowalczyk, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, 8(10), 2852.
- [29] J. Gant, *Angew.Chem.Ed.*1994, 33: 1699.
- [30] R. Chadli, Synthèse de dipeptides tête-à-queue de l'acide aminooxy acétique. Thèse de l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2006, 3.
- [31] M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.Y. Winum, C.T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 16130
- [32] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjug Chem*,1995, 6(1), 123-130
- [33] S. Skotnicki, *Tetrahedron Lett*, 1994, 35(2), 197-200.

## *Chapitre II*

*Etude par Spectroscopie UV-Visible et IR  
de la Complexation du Conjugué SULPA  
avec la  $\beta$ -Cyclodextrine*

## II.1. Introduction

L'étude des propriétés physico-chimiques des complexes d'inclusion constitue une large partie de la chimie supramoléculaire moderne. La première étape consiste à déterminer la stœchiométrie du complexe formé. Après avoir déterminé la stœchiométrie du complexe, il faut évaluer la constante d'association du complexe qui reflète les force d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule invitée – molécule cage) formant le complexe d'inclusion et permet de connaître la proportion de la molécule complexée. Un certain nombre de méthode physico-chimiques décrites dans la littérature sont utilisées pour déterminer la constante d'association, elles reposent sur les techniques suivantes : RMN, spectroscopie UV-Visible et IR, électrophorèse capillaire, potentiométrie, fluorimétries, solubilité, ...etc.

Nous avons vu dans la partie bibliographique que les CDs jouent un rôle très important dans la formulation de médicaments faiblement solubles dans l'eau par amélioration de leur solubilité et/ou leur dissolution en formant des complexes d'inclusion.

En effet, l'intérieur de la cavité apporte un micro-environnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules hydrophobes comme le cas de notre molécule SULPA. Lorsque les molécules organiques sont introduites à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -CD en solution aqueuse, les molécules d'eau sont expulsées en solution. Cette forte interaction hydrophobe conduit à la formation des complexes d'inclusion. Des modifications du comportement physico-chimique de l'invité se trouvent modifiées par son inclusion dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD.

La caractérisation par spectroscopie UV-Visible et IR peut être donc utilisée afin de mettre en évidence le phénomène de l'inclusion de la molécule invitée considérée par rapport à ces caractéristiques d'origines [1].

Dans cette partie, nous présentons les résultats de mise en évidence et de caractérisation du complexe d'inclusion de la molécule SULPA avec  $\beta$ -CD en solution et à l'état solide par les techniques spectroscopiques UV-Visible et IR.



## **II.2. Etude en Solution des Complexes d'Inclusion $\beta$ -CD/SULPA**

Cette étude comprend la mise en évidence de la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA et la détermination de sa stœchiométrie ainsi que sa constante de stabilité. La complexation en solution a été suivie par spectroscopie UV-Visible à température ambiante dans l'acétonitrile. A l'aide d'une sonde ultrason (sonificateur) de fréquence bien modulée, des quantités équivalentes de  $\beta$ -CD et de la molécule invités SULPA sont agitées à température ambiante pendant un laps de temps jusqu'à atteindre un équilibre dynamique entre la forme libre et la forme complexée de la molécule invités [2].

### **II.2.1 Mise en Evidance de la formation des complexes d'inclusion - $\beta$ CD/SULPA**

Une analyse complète du phénomène de complexation doit prouver la réalité du processus d'inclusion de la molécule invitée SULPA dans la cavité de la molécule hôte ( $\beta$ -CD), qui permettra par la suite de déterminer la stœchiométrie du complexe et sa constante d'association en solution.

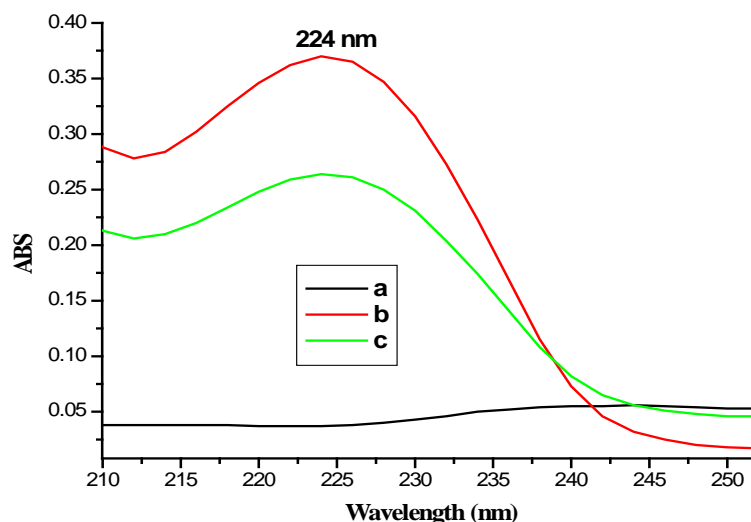
La  $\beta$ -CD est un composé de choix pour l'inclusion de molécules hydrophobes à la condition que la taille de ces molécules invités s'adapte aux dimensions internes de la cavité de la molécule hôte. La  $\beta$ -CD peut ainsi inclure partiellement ou en totalité un composé invité, ce qui donne alors lieu à la formation de complexes d'inclusion.

La technique utilisée pour mettre en évidence la formation du complexe  $\beta$  CD/SULPA, consiste à comparer les spectres d'absorption de la  $\beta$ -CD et du SULPA avec le spectre de leur complexe correspondant dans les mêmes conditions, sachant que la formation du complexe est accompagnée par une perturbation spectrale.

Nous illustrons sur la figure.II.1 les spectres enregistrés par spectroscopie UV-Visible dans l'acétonitrile à température ambiante des solutions équimolaires  $1.00 \times 10^{-5}$  M de la  $\beta$ -CD, du SULPA et de leur complexe attendu.

L'acétonitrile n'entrant pas en compétition avec le soluté pour s'inclure dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD, en raison de sa grande polarité ( $\epsilon = 36.2$ ,  $25^\circ$  C) et son petit gabari.

La présence du phénomène d'inclusion est démontrée sans ambiguïté par la comparaison des spectres d'absorption par spectroscopie UV-Visible de la  $\beta$ -CD et de SULPA seules avec celui de leur mélange. En effet, la molécule hôte et invitée donnent chacune des signaux discernables pour les formes libres et complexées.



**Figure.II.1:** Mise en évidence de la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA dans l'acétonitrile à  $1.00 \times 10^{-5}$  M. **a**-CD libre, **b**- SULPA, **c**- Complexe  $\beta$ -CD-SULPA

Tout d'abord la  $\beta$ -CD présente une bande large située à  $\lambda=264$  nm avec une faible absorption (Abs= 0,041).Le spectre de SULPA absorbe à  $\lambda=226$  nm, Par contre le complexe a un spectre d'absorption avec un maximum à  $\lambda= 224$ nm tout à fait différent de ses précurseurs.

En revanche, on constate que la molécule invitée SULPA libre et son complexe  $\beta$ -CD/SULPA donnent chacune deux bandes d'absorption intenses et discernables dues aux transitions  $\pi$ -  $\pi^*$  et n-  $\pi^*$  et que la nouvelle bande dans le complexe montre une diminution significative de son absorbance et qu'un effet hypochrome est observé indiquant la formation d'une nouvelle espèce.

En conclusion, la formation d'un complexe d'inclusion entre la molécule SULPA et la  $\beta$ -CD est mise en évidence sans ambiguïté par la différence entre les spectres des deux composés de départ et celui du complexe: il y a apparition d'une nouvelle bande d'absorption caractéristique dont le maximum est différent de celui des réactifs. Un déplacement hypochrome est nettement visible dans le spectre du complexe. Ces résultats fournissent une preuve directe de la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD /SULPA dans l'acétonitrile à température ambiante.

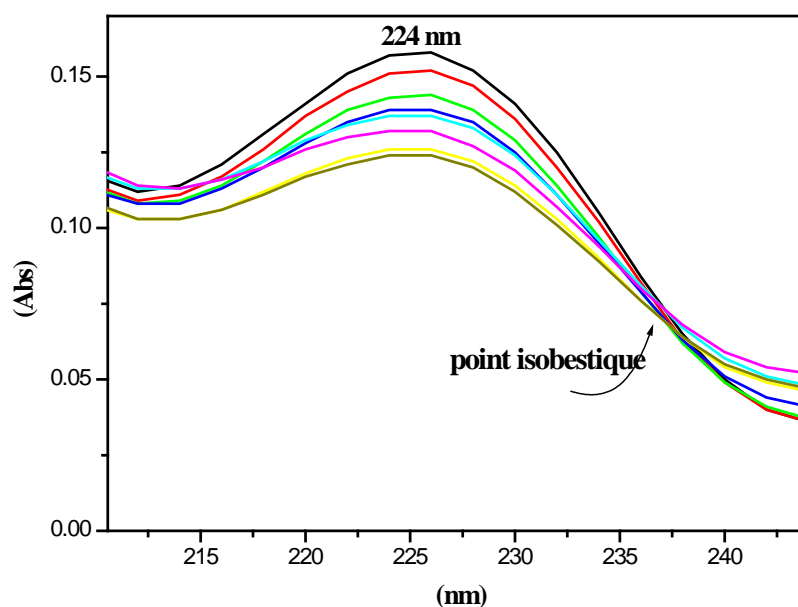
## II.2.2. Détermination de la stœchiométrie

La détermination de la stœchiométrie du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD-SULPA a été effectuée par deux méthodes: la méthode des variations continues et la méthode des rapports molaires, dont la plus performante est la méthode de Job [3].

### II.2.2.1. La Méthode des Variations Continues (ou méthode de Job)

C'est une méthode générale qui ne dépend pas de la technique d'étude des complexes mais impose seulement qu'un paramètre expérimental lié à la complexation doit évoluer avec le temps [4].

Pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA selon la méthode de Job, nous avons fait varier la teneur en  $\beta$ -CD de manière à obtenir une série de solutions, dans lesquelles sa fraction molaire varie entre 0.10 et 0.90 (figure.II.2 ), tout en conservant la somme des concentrations de la molécule SULPA et de la  $\beta$ -CD constante, et nous avons mesuré l'absorbance maximale due à l'interaction entre ces deux composés. Le spectre d'absorption a été enregistré à température ambiante, sur des échantillons en solution de  $1.00 \times 10^{-5}$  M dans l'acétonitrile.

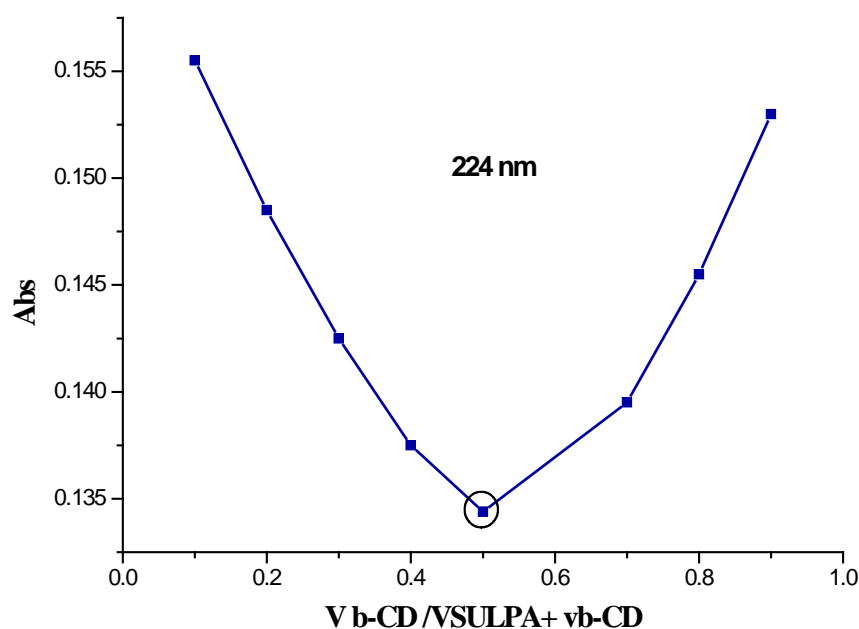


**Figure.II.2 :** Evolution des spectres d'absorption pour le complexe  $\beta$ -CD/SULPA par la méthode des variations continues.

La figure.II.2, montre que l'addition de la  $\beta$ -CD à la solution invitée SULPA produit une augmentation de l'absorbance dans la région UV-Visible. D'autre part, on observe l'apparition d'un point isobestique, ce qui indique qu'il ya une interaction entre le composé SULPA et la  $\beta$ -CD dans les conditions signalées.

Le tracé de la courbe  $Abs = f (V_{\beta\text{-CD}} / V_{\text{SULPA} + V_{\beta\text{-CD}}})$  montre l'apparition d'un point d'inflexion à l'abscisse  $V_{\beta\text{-CD}} / V_{\text{SULPA} + V_{\beta\text{-CD}}} = 0,5$ , c'est à dire que le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA qui s'est formé est de stœchiométrie 1:1. (figure.II.3.). Nous obtenons alors une courbe de forme convexe ayant une absorption  $Abs_{\text{max}}$  qui correspond à la stœchiométrie du complexe obtenue donnée par la valeur de l'abscisse obtenue.

La partie gauche de la courbe correspond à des concentrations en SULPA supérieures à celles de la  $\beta$ -CD, tandis que dans la partie droite nous avons plus de  $\beta$ -CD que de SULPA.  $R = 0.5$  (Figure.II.3), ce qui signifie que le complexe est de stœchiométrie 1:1.



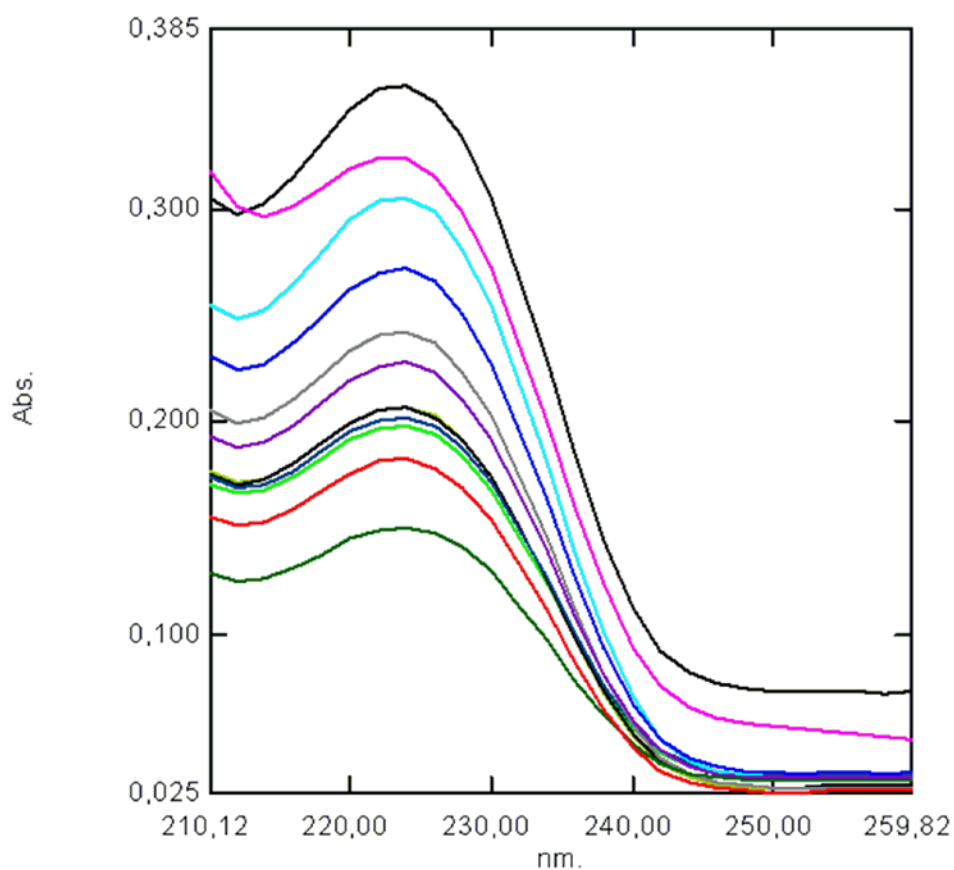
**Figure.II.3:** Détermination de la stœchiométrie du complexe  $\beta$ -CD/SULPA par la méthode des variations continues

### II.2.2.2.Méthode des rapports molaires

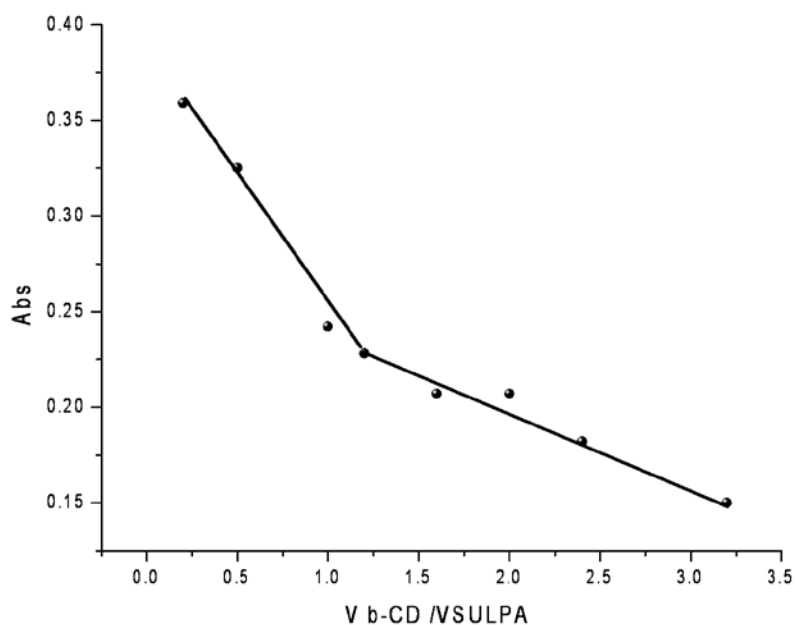
Afin de valider les résultats obtenus par la méthode des variations continues pour la détermination de la stœchiométrie, on a recours à une deuxième méthode, celle des rapports molaires [5, 6].

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe  $\beta$ -CD-SULPA avec cette méthode, nous avons utilisé aussi l'acétonitrile comme solvant où on a exprimé l'absorbance maximale en fonction du rapport des concentrations de la  $\beta$ -CD et celles de la molécule SULPA. Le spectre d'absorption a été enregistré à température ambiante, sur des échantillons en solution de  $1.00 \times 10^{-5}$  M (Figure.II.4)

En traçant les valeurs de l'absorbance en fonction des rapports molaires, on peut déterminer la stœchiométrie du complexe formé à l'aide de l'abscisse du point d'inflexion formé (Figure.II.5).



**Figure.II.4.** Evolution des spectres d'absorption en fonction des rapports molaires pour le complexe  $\beta$ -CD/SULPA

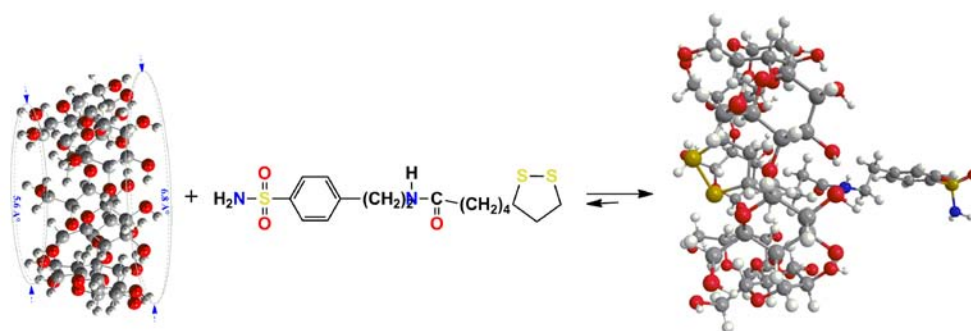


**Figure.II.5 :** Détermination de la stœchiométrie du complexe  $\beta$ -CD/SULPA par la méthode des rapports molaires

Le résultat expérimental obtenu montre, comme indiqué sur la figure. II.5, que la courbe  $Abs = f(V_{\beta\text{-CD}} / V_{\text{SULPA}})$  présente une rupture de pente à l'abscisse  $V_{\beta\text{-CD}} / V_{\text{SULPA}} = 1$ , ce qui signifie que le complexes d'inclusion formé a une stœchiométrie 1:1.

La rupture de pente caractéristique observée à  $V_{\beta\text{-CD}} / V_{\text{SULPA}} = 1$ , montre que la modalité principale d'association pour ce type de complexes est donc de nature équimolaire.

Alors, la méthode des rapports molaires s'accorde bien avec la méthode des variations continues donnant toutes les deux une stœchiométrie de 1:1 pour le complexe formé :  $\beta$ -CD / SULPA.



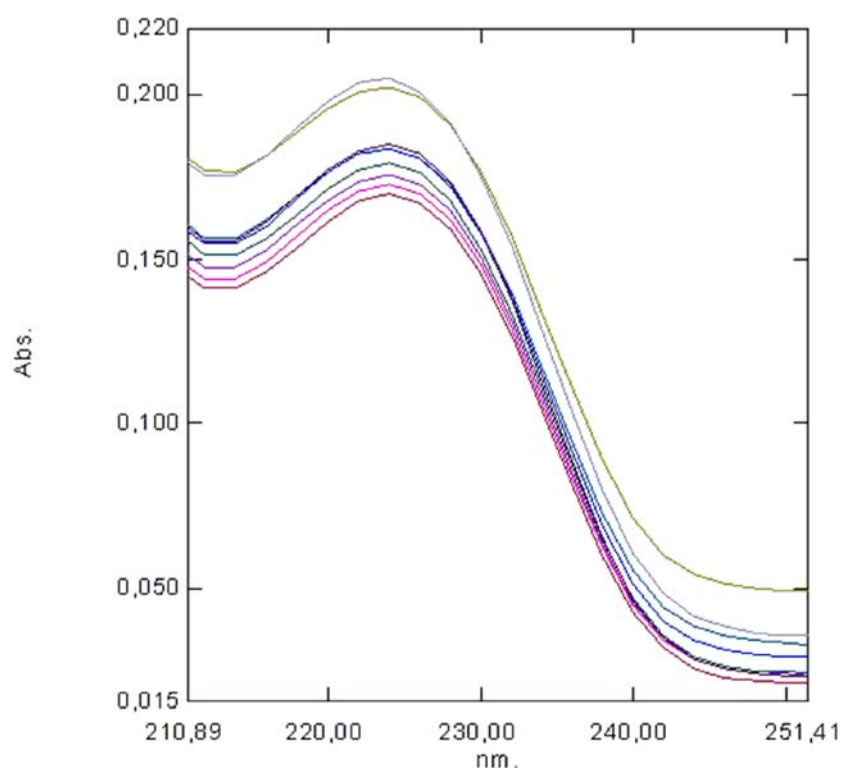
**Figure.II.6:** Représentation de la réaction de complexation entre  $\beta$ -CD et SULPA

#### II.2.4. Effet de l'ajout de la $\beta$ -CD sur l'absorbance des molécules SULPA

Au cours de l'addition progressive d'une solution de la  $\beta$ -CD aux solutions d'une molécule invitée, son spectre UV-Visible manifeste une altération plus ou moins importante (déplacements hyperchromes ou hypochromes, effets hypsochromes ou bathochromes, formation d'un ou plusieurs points isobestiques.....etc).

Dans notre cas, on fait varier la concentration de la  $\beta$ -CD tout en fixant celle de la molécule SULPA. Les différents spectres d'absorptions ont été enregistrés à température ambiante, sur des échantillons de SULPA et de  $\beta$ -CD dissouts dans l'acétonitrile.

La concentration de la molécule SULPA est fixée à  $1.00 \times 10^{-5}$  M par contre, celle de la  $\beta$ -CD varie entre  $2.00 \times 10^{-5}$  M et  $1.00 \times 10^{-4}$  M. Les différentes valeurs des absorbances des complexes formés à chaque ajout de la  $\beta$ -CD sont rassemblées dans le tableau donné dans la partie protocoles expérimentaux.



**Figure.II.7.:**Spectres d'absorption des complexes de SULPA ( $1.00 \times 10^{-5}$  M) contenant différentes concentrations de  $\beta$ -CD ( $2.00 \times 10^{-5}$  et  $1.00 \times 10^{-4}$  M) dans l'acétonitrile à température ambiante.

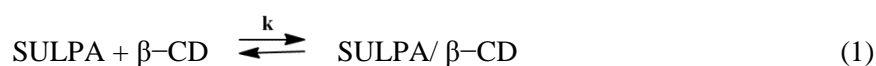
La figure ci-dessus représente le suivi de l'absorbance du SULPA dans l'acétonitrile contenant diverses concentrations de  $\beta$ -CD, elle montre que  $\lambda_{\max}$  de la molécule SULPA dans l'acétonitrile croît sensiblement quand  $\beta$ -CD est ajoutée à la solution avec des concentrations croissantes. Un déplacement hyperchrome de la bande d'absorption témoigne de l'interaction de la molécule SULPA avec la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD. L'augmentation de  $\lambda_{\max}$  des molécules SULPA, suggère une augmentation de leur solubilité, par formation d'un complexe d'inclusion en présence de la  $\beta$ -CD [7, 8]. L'effets hyperchrome constaté avec une augmentation intense de l'absorbance indique que les molécules SULPA forment un complexe suffisamment stable avec la  $\beta$ -CD.

### II.2.5. Détermination de la Constante de Stabilité

Après avoir déterminé la stœchiométrie du complexe, il faut évaluer sa constante de stabilité qui traduit les forces d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule hôte ( $\beta$ -CD) et molécule invitée (SULPA) complexées.

Cette stabilité dépend du caractère polaire de la molécule invitée et de la nature de ses groupements fonctionnels qui entrent en interactions avec la cavité hydrophobe de la molécule hôte. Dans le cas où ces interactions sont fortement attractives, on dit que la molécule invitée possède une grande affinité envers la molécule hôte et forme avec elle un complexe d'inclusion très stable

L'étude de la stabilité du complexe  $\beta$ -CD/ SULPA pour une stœchiométrie 1:1 donnée par l'équation(1) ci dessous, a été réalisée dans l'acétonitrile à la température ambiante.



La constante de stabilité ou d'association (K) de ce complexe a été déterminée en se basant sur la méthode graphique de Benesi- Hildbrand [9], qui consiste à faire varier la concentration de la  $\beta$ -CD tout en fixant celle de la molécule SULPA.

La figure.II.7 ci-dessus qui montre l'évolution des spectres d'absorption, nous a servi aussi lors de la détermination de la constante de stabilité du complexe.

La constante de stabilité, est donnée par l'équation (2) de Benesi-Hildbrand:

$$\frac{[\text{SULPA}]}{\text{Abs}} = \frac{1}{K\varepsilon} \cdot \frac{1}{[\beta\text{-CD}]} + \frac{1}{\varepsilon} \quad (2)$$



Elle donne le rapport de la concentration de la molécule SULPA et l'absorbance maximale en fonction de l'inverse de la concentration de la  $\beta$ -CD.

Après lissage de la courbe de Benesi - Hildbrand:  $[SULPA]/Abs = f(1/[\beta CD])$ , on remarque l'obtention d'une dépendance linéaires sous la forme  $Y = a X + b$

Tel que :

**a** : est la pente de la droite et égale à  $1/K\epsilon$

**b** : est obtenu par extrapolation à l'origine et égale à l'inverse du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$ .

Dans le cas d'une stœchiométrie 2:1, l'équation de Benesi-Hildbrand (3) sous la forme suivante sera applicable:

$$\frac{[SULPA]}{Abs} = \frac{1}{K\epsilon} \times \frac{1}{[\beta-CD]^2} + \frac{1}{\epsilon} \dots\dots\dots (3)$$

Si le tracé de  $[SULPA]/Abs = f(1/[\beta-CD]^2)$  est une dépendance linéaire, la stœchiométrie est de 2:1, en revanche, s'il est une dépendance non linéaire, la stœchiométrie du complexe d'inclusion ne peut être en aucun cas de type 2:1.

Le traitement des données expérimentales concernant les deux types de stœchiométrie 1:1 et 2:1 sont regroupées dans le tableau.II.1 ci-dessous.

**Tableau.II.1:** traitement des données expérimentales entrant dans les équations 2 et 3 de Benesi-Hildebrand pour le complexe  $\beta$ -CD /SULPA à  $\lambda_{max} = 224$  nm.

Solutions	$([SULPA]/Abs) \times 10^{-5}$	$(1/[\beta CD]) \times 10^5$	$(1/[\beta CD])^2 \times 10^8$
1	9,3458	0,3333	11,11
2	9,1743	0,25	6,25
3	9,0992	0,2	4
4	9,0171	0,1666	2,7777
5	8,9847	0,1428	2,0408
6	8,9445	0,125	1,5625
7	8,9286	0,114	1,2345
8	8,8986	0,1	1

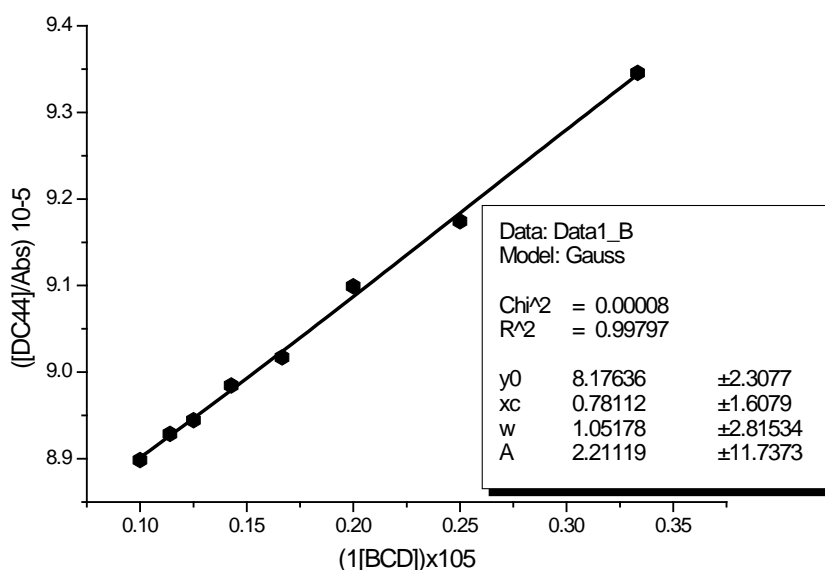
La résolution graphique de la première équation de Benesi-Hildebrand (équation 2) donnée ci-dessus pour une stœchiométrie 1:1 est montrée sur la figure.II.8 ci-après.

Le lissage de la courbe expérimentale obtenu dans ce cas a été effectué sur ordinateur, et a conduit à une droite à partir de laquelle nous avons pu obtenir les résultats suivants:

$\epsilon=725,063$  le coefficient de extinction

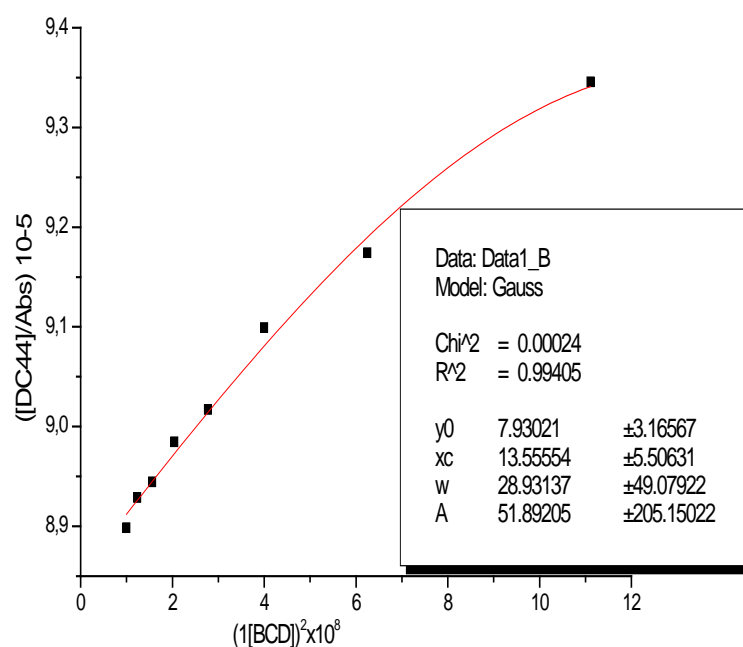
$K = 1.34.10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}$  25°C constante de stabilité

Une valeur assez élevée de la constante  $K$  confirme une stabilité importante du complexe  $\beta$ -CD /SULPA dans l'acétonitrile à la température ambiante.



**Figure.II.8.** Tracé de la droite selon Benesi - Hildebrand donnant la constante de stabilité du complexe  $\beta$ -CD /SULPA pour une stœchiométrie 1:1 à 224 nm.

Et afin de lever toute ambiguïté sur la présence d'une éventuelle stœchiométrie 2:1, nous avons appliqué la deuxième équation de Benesi-Hildebrand donnée ci-dessus (équation 3). En effet, le tracé de  $[\text{SULPA}]/\text{Abs} = f(1/[\beta\text{-CD}]^2)$  présente une dépendance non linéaire (une courbure vers le haut) (Figure.II.9.), par conséquent, la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion de stœchiométrie 2:1 entre SULPA et le  $\beta$ -CD est à écarter.



**Figure.II.9.** La courbe de Benesi - Hildbrand pour une stœchiométrie 2:1 du complexe  $\beta$ -CD/SULPA à 224 nm.

### II.2.5.1. Détermination l'Energie Libre $\Delta G^\circ$

L'énergie libre de Gibbs peut être obtenue à partir de la formule suivante :

$$\Delta G = - RT \ln K_T$$

Où  $K_T$  : Constante de stabilité correspondant à la température T.

**R** : Constante des gaz parfaits égale à (8.314 J/mol.K).

La constante de stabilité K du complexe  $\beta$ -CD/SULPA formé à la température 25°C calculée expérimentalement à partir de loi de benessi-Hildbrand, nous a permis de déterminer la variation de l'énergie libre standard  $\Delta G^\circ$  [10] .

Sous ces conditions expérimentales à la température 25°C, nous avons trouvé :

$$\Delta G^\circ = - 5.630 \text{ Kcal/mol.}$$

Cette valeur négative de  $\Delta G^\circ$  signifie que la formation du complexe d'inclusion entre la molécule SULPA et la  $\beta$ -Cyclodextrine est un processus spontané. Cela confirme les valeurs de  $\Delta G^\circ$  trouvées théoriquement pour les deux orientations A et B.

#### **II.4. Etude à l'Etat Solide du Complexe d'Inclusion $\beta$ -CD/SULPA par Spectroscopie Infra-Rouge(IR)**

Les différentes méthodes disponibles pour la caractérisation des complexes d'inclusion sont généralement basées sur la détection de la variation d'une propriété physique ou chimique de l'invité à la suite de la formation de son complexe d'inclusion.

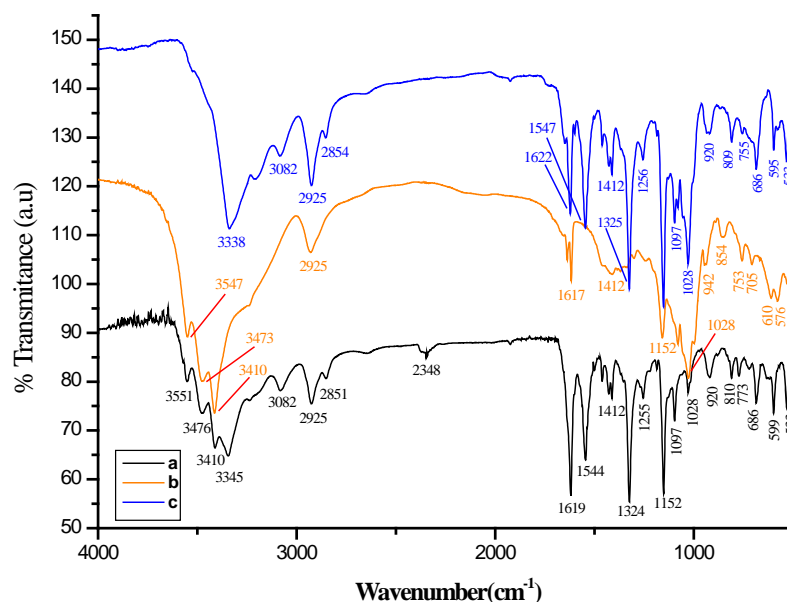
Le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA a été étudié également à l'état solide au moyen de la spectroscopie infrarouge (IR-TF).

La spectroscopie infrarouge qui mesure l'excitation vibrationnelle des atomes autour des liaisons qui les unissent suite à l'exposition à des radiations IR, est un outil très utile pour confirmer la formation des complexes d'inclusion. En effet, les bandes d'absorption résultant de la partie incluse de la molécule invitée sont généralement décalées ou leurs formes et intensités sont souvent modifiées.

Les spectres IR des molécules  $\beta$ -CD, SULPA, ainsi que leur complexe d'inclusion sont présentés sur la figure.II.10.

Le spectre de la  $\beta$ -CD (Fig.II.10-b) montre trois épaulements observés à:  $3410\text{ cm}^{-1}$ ,  $3473\text{ cm}^{-1}$  et  $3547\text{ cm}^{-1}$  dus à des vibrations d'élongation des groupements OH primaires et secondaires de la  $\beta$ -CD liés par des liaisons hydrogène intra- ou intermoléculaires. Les bandes d'absorption centrées à  $2925\text{ cm}^{-1}$ ,  $1412\text{ cm}^{-1}$  et  $1028\text{ cm}^{-1}$  qui sont assez semblables à celles du complexe SULPA /  $\beta$ -CD (figure.II.10.-c), appartiennent successivement aux vibrations de valence des liaisons C-H dans les groupements CH et CH<sub>2</sub>, les vibrations de déformation des liaisons C-H liées aux groupements OH primaires et secondaires et aux vibrations de valence des liaisons C-O dans les groupements éther et hydroxyle de la  $\beta$ -CD [11].

Le spectre infrarouge du complexe  $\beta$ -CD / SULPA (figure.II.10-c) pris dans la région  $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  a été comparée à celui de la molécule invitée SULPA libre (Figure.II.10-a).



**Figure. II.10.** Spectres IR–TF du : (a) SULPA, (b)  $\beta$ -CD et (c)  $\beta$ -CD/SUIPA dans le KBr.

Dans le spectre de la molécule SULPA, des bandes d'absorption importantes observées à  $3551\text{ cm}^{-1}$ ,  $3476\text{ cm}^{-1}$  et à  $3410\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées simultanément à des vibrations asymétriques et symétriques libres et liés par des ponts H souvent observées dans les groupements amines primaires  $\text{NH}_2$ . La bande d'absorption du groupement N-H d'amide est observé vers  $3345\text{ cm}^{-1}$ . Les pics apparaissant à  $3082\text{ cm}^{-1}$ ,  $2851\text{ cm}^{-1}$ ,  $1619\text{ cm}^{-1}$  et  $1545\text{ cm}^{-1}$ , sont attribués respectivement aux élongations C-H du cycle aromatique, aux vibrations d'élongation asymétrique de C-H dans  $\text{S-CH}_2$ , aux vibrations du groupement C=O amide et aux vibrations d'élongation C=C aromatiques.

Les fortes absorptions apparues à  $1324\text{ cm}^{-1}$  et  $1152\text{ cm}^{-1}$  sont dues successivement aux élongations asymétrique et symétrique du groupement  $\text{SO}_2$ . Les bandes positionnées à  $1028\text{ cm}^{-1}$ ,  $1097\text{ cm}^{-1}$ ,  $920\text{ cm}^{-1}$ ,  $810\text{ cm}^{-1}$  et  $599\text{ cm}^{-1}$  sont affectés respectivement aux vibrations d'élongation CN de l'amide, à la déformation CH dans le noyau aromatique, et aux vibrations d'élongations SN, SO et SS dans le cycle 1,2-dithiolane.

Dans le complexe, la bande moins résolue située à  $3338\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux élongations N-H du groupement amide a été perturbée par la présence des vibrations de valence des groupements O-H dans la  $\beta$ -CD, elle a été décalée de  $7\text{ cm}^{-1}$  et son intensité est légèrement diminuée. En outre, la bande de vibrations d'élongation du groupement

amino de la molécule SULPA a été chevauchée par les vibrations d'élongation de nombreux groupements hydroxyles de la  $\beta$ -CD.

En revanche, les bandes observées à  $3082\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  et  $920\text{ cm}^{-1}$  qui sont attribués successivement aux élongations C-H du cycle aromatique, C-H aliphatique et vibrations d'élongation S-N dans le groupement sulfonamide sont restées inchangées.

La bande attribuée au groupement C=O de l'amide positionnée à  $1622\text{ cm}^{-1}$  est devenue plus courte et a été décalée de  $3\text{ cm}^{-1}$  à des fréquences plus élevées.

Un déplacement de  $4\text{ cm}^{-1}$  à une fréquence plus faible ( $595\text{ cm}^{-1}$ ) et la réduction de l'intensité de la bande d'élongation caractéristique du pont disulfure S-S ont été observés. En outre, la bande d'absorption observée à  $2854\text{ cm}^{-1}$  attribuée à la vibration d'élongation C-H dans S-CH<sub>2</sub>, a été légèrement rétrécie et décalée de  $3\text{ cm}^{-1}$  à des fréquences plus élevées.

Selon l'analyse IR présentée ci-dessus, nous pourrions suggérer que ces changements dans les bandes d'absorption caractéristiques de la molécule SULPA libre sont dues à la formation du complexe  $\beta$ -CD / SULPA à l'état solide. Ces résultats indiquent que le fragment arylsulfonamide reste à l'extérieur de la cavité de la  $\beta$ -CD, et que l'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule qui est particulièrement sensible aux attaques chimiques ou physiques [12] a été piégé dans la cavité de la  $\beta$ -CD et donc a été suffisamment protégé

#### II.4. Conclusion

L'étude expérimentale au moyen de la spectroscopie UV-Visible nous a permis de mettre en évidence la formation du complexe d'inclusion BCD /SUPA et de déterminer sa stœchiométrie et sa constante de stabilité dans l'acétonitrile à température ambiante.

Par ailleurs, selon l'analyse par spectroscopie IR, les résultats montrent que le fragment arylsulfonamide reste à l'extérieur de la cavité  $\beta$  de la  $\beta$ -CD. En revanche, l'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule qui est particulièrement sensible aux attaques chimiques ou physiques a été inséré dans la cavité de la  $\beta$ -CD et donc a été bien protégé.

## Références bibliographiques

- [1] M.V.Rekharsky, Y. Inoue, Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, Analytical methods and applications, 2006, 199.
- [2] K.A. Connors, Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability, Wiley, New York, 1987,143.
- [3] T. Looftsson, H. Fridriksdottir, Inter. J. Pharm, 1990, 62, 243–247.
- [4] N. Dhaoui, M. Fatfat, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, Lett. Org. Chem, 2009, 6, 37–40
- [5] M. VALERO, Int. J. Pharm, 2003, 253, 97-110.
- [6] H. Fisli, N. Bensouilah, N. Dhaoui, M. Abdaoui, J. Incl. Phenom. Macrocycl, 2012, 73, 1, 369–376.
- [7] S. Siva, J. Thulasidhasan, N. Rajendiran, Spectrochim. Acta. A, 2013, 115, 559–567
- [8] S. Peroche, H. Parrot-Lopez, Tetrahedron Lett. 2003, 44, 241-245. Chem, 2012, 73, 369–76
- [9] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand J. Am. Chem. Soc, 1949, 71, 2703-2707
- [10] P. Gornas, G. Neunert, K. Baczynski, K. Polewski. Food Chemistry, 2009, 114 190-196.
- [11] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.Kiemle, , Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons 7th. Edit, 2006.
- [12] T. Carofiglio, R. Fornasier, L. Jicsinszky, G. Saielli, U. Tonellato, R. Vetta, Eur. J. Org. Chem, 2002, 119, 121-196

## *Chapitre III*

*Etude par Modélisation Moléculaire de la  
Complexation du Conjugué SULPA avec la  
 $\beta$ -Cyclodextrine*



### **III.1. Introduction**

Actuellement , à cause des limitations des méthodes expérimentales, la modélisation moléculaire a pu envahir toutes les branches de la chimie, pour les informations très utiles qu'elle fournit dans la compréhension des structures ou l'anticipation de divers propriétés et interactions moléculaires de différents systèmes moléculaire et supramoléculaires[1-7].

Les études par modélisation moléculaires offrent un bon aperçu sur les phénomènes de reconnaissance moléculaire et la formation de complexes d'inclusion particulièrement avec les Cyclodextrines.

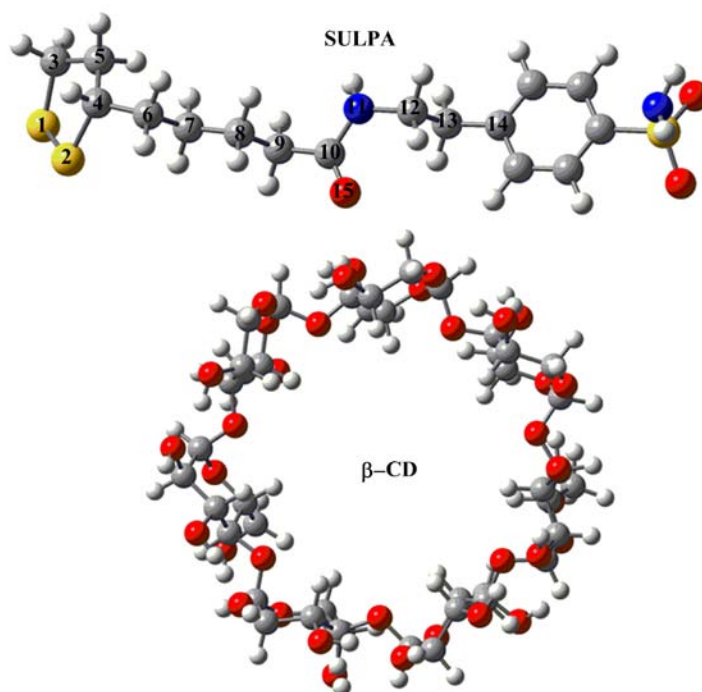
A notre connaissance, l'étude par modélisation moléculaire des complexes d'inclusion de la molécule bioactive SULPA dans la  $\beta$ -CD n'a été jamais décrite dans la littérature. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris pour la première fois une étude par modélisation moléculaire de la formation de son complexe d'inclusion de stoechiométrie 1:1 avec la  $\beta$ -CD.

Nous allons présenter dans ce qui suit, les différentes techniques et méthodes computationnelles (PM3, DFT, ONIOM2 (B3LYP: PM3, NBO, HOMO-LUMO.....etc) permettant d'étudier sa stabilité, déterminer sa structure géométrique optimale, décrire la nature des interactions intermoléculaires entre la molécule hôte et celle invité, déterminer certaines propriétés électroniques et thermodynamiques liés au processus d'inclusion.

### **III.2. Méthodologie de travail et logiciels utilisés**

Les calculs effectués dans ce travail ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Appliquée (LCA) sur des ordinateurs «corps duo » en utilisant les logiciels Gaussian 03 [8] puis Gaussian 09 [9]. Le logiciel Cambridge Chem Bio 3D Ultra (version 12.0) a été utilisé aussi pour la construction des structures de départ. La structure initiale de la  $\beta$ -cyclodextrine est obtenue à partir de la banque de données cristallographiques CSD (Cambridge structure data bank).

Concernant la structure initiale du SULPA, elle a été construite à l'aide de l'interface du logiciel Hyperchem7.51 [10], est optimisée ensuite avec la méthode PM3.



**Figure.III.1:** Les structures moléculaires de la molécule SULPA (La numérotation des atomes sera utilisée dans ce présent travail) et la  $\beta$ -CD optimisées par la méthode semi-empirique PM3.

### III.2.1. Construction du modèle

Cette étape consiste à choisir des modes avec lesquels on fait introduire une molécule invité à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine.

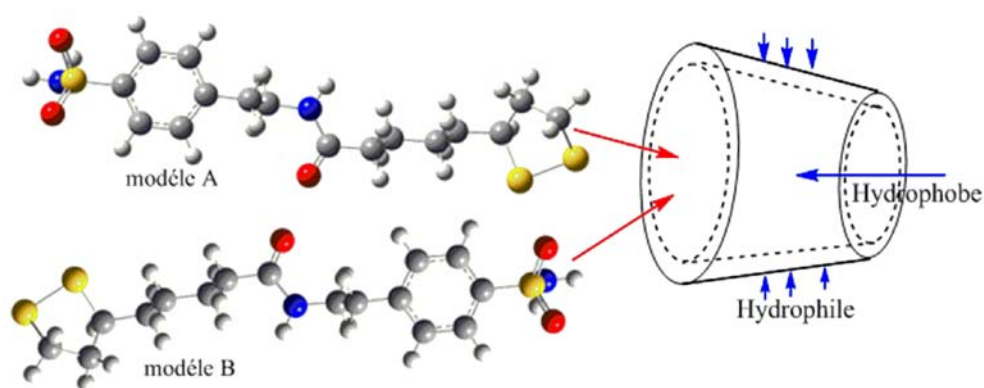
La modélisation a été réalisée par Docking de la structure optimisée de la molécule invité dans la cavité de  $\beta$ -CD. Et compte tenu du grand nombre d'atomes dans le système étudié (195 atomes), un compromis entre la puissance de l'ordinateur et le niveau de calcul désiré a été posé lors de l'optimisation de la géométrie.

Partant de ce raisonnement, nous avons commencé les calculs en utilisant d'abord la méthode semi-empirique PM3. Pour cela, nous avons envisagé deux modèles différents (deux orientations différentes) pour le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA (Figure.III.2).

\* **Dans le modèle A:** L'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule SULPA est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD.

\* **Dans le modèle B :** C'est l'arylsulfonamide de la molécule SULPA qui est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD.

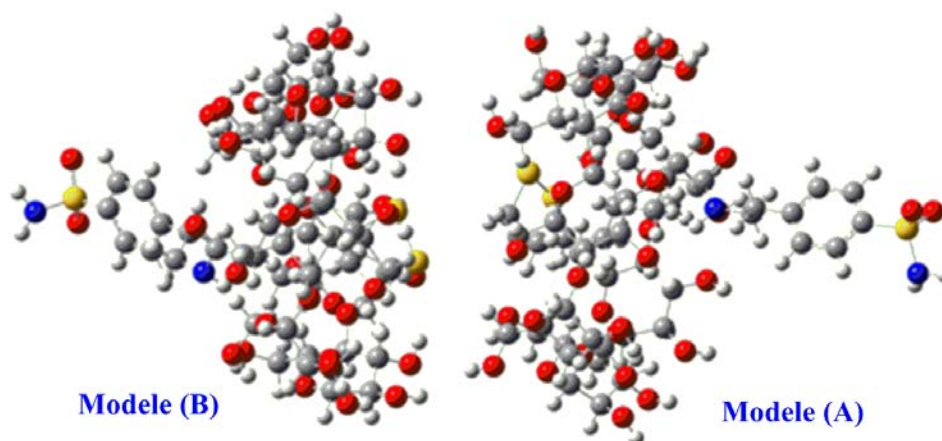
La technique que nous avons suivie pour la formation du complexe est très utilisée dans la littérature [11]. Il s'agit d'une inclusion manuelle de la molécule invitée dans la molécule hôte, connue sous le terme anglais «Docking». L'atome de référence dans notre cas, correspond au Carbone numéroté "R" qui est le plus proche du centre de masse de la molécule invitée et qui servira à fixer sa position lors du processus d'inclusion. Le déplacement selon l'axe OZ se fera par pas de 1 Å de -10 Å à +10Å. Cet intervalle nous permet d'explorer toutes les positions de la molécule invitée par rapport à la  $\beta$ -CD, allant du côté large de sa cavité vers celui étroit en passant à travers sa cavité hydrophobe.



**Figure.III.2 :** Procédure de l'inclusion de la molécule SULPA dans la  $\beta$ -CD selon les deux modèles (A et B).

Et pour explorer plus d'espace conformationnel, on fait subir au minimum local déterminé des rotations autour de l'axe OZ par angle de 20°, de 0° à 360° et le système est optimisé à chaque position sans restriction. C'est ainsi qu'il est possible de localiser le minimum absolu.

Les structures générées à chaque étape ont été successivement optimisées avec la méthode PM3, jusqu'à obtention du complexe le plus stable (Figure III.3).



**Figure.III.3 :** Structures des complexes  $\beta$ -CD / SULPA correspondantes aux deux modèles (A et B) obtenues par un calcul PM3

### III.2.2. Traitement semi-empirique, quantique, hybride ONIOM2 et analyse NBO

Pour prédire les propriétés électroniques moléculaires et décrire avec précision les géométries et les interactions intermoléculaires et aussi, vérifier la fiabilité de telle ou telle approche pour notre cas, et veiller à une meilleure compréhension de la reconnaissance moléculaire, nous avons réalisé notre étude en utilisant un niveau théorique supérieur issu des méthodes de la mécanique quantique: Ce sont les méthodes semi empiriques AM1 et PM3 qui approximent certaines intégrales des méthodes ab-initio et les compensent par introduction de données moléculaires empiriques. La méthode PM3 est similaire à celle AM1 mais utilise dans sa paramétrisation un plus grand nombre et une plus grande variété de paramètres expérimentaux en comparaison avec les propriétés moléculaires calculées.

Nous avons ensuite procédé au calcul des fréquences vibrationnelles au niveau PM3 pour s'assurer que les structures obtenues correspondent à de vrais minimums sur les surfaces d'énergie potentielle [12]. Après cela, on a procédé grâce à ces méthodes semi-empiriques au calcul de quelques propriétés électronique et thermodynamique des complexes formés dans le vide.

Comme les calculs aux niveaux ab-initio et DFT sont prohibitifs dans le traitement de tels larges systèmes surtout avec les moyens de calculs modestes disponibles, on s'est contenté de procéder à des calculs énergétiques "single point" pour la structure optimisée PM3. Nous avons utilisé la méthode Hartree-Fock (HF) et la théorie DFT

avec la fonctionnelle hybride la plus employée actuellement B3LYP qui sont implémentées dans le logiciel Gaussian 09. Nous avons choisi dans ces calculs une base moyenne correspondante aux valences séparées double Zeta G et 6-31G(d).

Enfin, grâce à la nouvelle approche hybride ONIOM [13, 14] qui présente l'avantage de diminuer le temps de calcul, on a pu étudier les complexes  $\beta$ -CD/ SULPA à un niveau de théorie plus élevé. En effet, nous avons utilisée la méthode ONIOM2 qui partage le système macromoléculaire en deux couches affectées à des niveaux de calcul différents. Nous avons soumis la molécule hôte  $\beta$ -CD au niveau quantique le plus bas que nous avons choisi; à savoir la méthode PM3, puis qu'elle fournit seulement un effet d'environnement et contient un nombre d'atomes plus important, alors que la molécule invitée correspondant à la partie active, de taille plus réduite, est traitée au niveau de calcul élevé. Nous avons choisi pour cela une méthode ab-initio avec une base moyenne de type 6-31G(d) avec ajout respectif de fonctions de polarisation et diffuses.

Enfin, nous avons terminé cette étude avec une analyse NBO qui nous a permis de calculer les valeurs des énergies de stabilisation qui confirme l'approche ONIOM2.

Par ailleurs, dans la méthode NBO [15], la quantification de l'énergie de la liaison d'hydrogène intermoléculaire de type YHX se fait par l'évaluation de l'énergie de perturbation de stabilisation  $E^{(2)}$  entre le doublet libre LP(Y) du donneur de protons et l'orbitale anti liante  $\sigma^*(X-H)$  de l'accepteur de protons.

Dans cette thèse ; nous avons utilisé différentes formules permettant de décrire et de caractériser les complexes d'inclusion en cours d'étude. En effet, afin de quantifier l'interaction entre l'hôte et l'invitée dans les géométries optimisées, nous avons évalué les énergies de complexation en utilisant la formule suivante [16]:

$$E_{\text{complexation}} = E_{\text{complexe}} - (E_{\beta\text{-CD}} + E_{\text{molécule invitée libre}}) \quad (1)$$

$E_{\text{complexe}}$  : représente l'énergie d'optimisation du complexe d'inclusion obtenu.

$E_{\beta\text{-CD}}$  : représente l'énergie d'optimisation de la  $\beta$ -CD.

$E_{\text{molécule invitée libre}}$  : représente l'énergie d'optimisation de la molécule invitée libre.

Cette formule permet à la fois de calculer les différentes contributions à l'énergie de complexation, telles que l'énergie de van der Waals, l'énergie électrostatique, l'énergie de liaison H ... etc. On note que l'utilisation des minimums locaux permet à la fois

de tracer les courbes des énergies des complexes en fonction de la distance et celle des énergies de complexation en fonction des angles de torsion ...etc.

Les énergies de déformation et d'interaction sont définies par les formules suivantes:

$$E_{\text{déformation}} [\text{molécule invitée}] = E[\text{molécule invitée}]_{\text{sp}}^{\text{opt}} - E[\text{molécule invitée}]_{\text{opt}} \quad (2)$$

$$E_{\text{déformation}} [\beta\text{-CD}] = E[\beta - \text{CD}]_{\text{sp}}^{\text{opt}} - E[\beta - \text{CD}]_{\text{opt}} \quad (3)$$

Et pour une meilleure compréhension de la reconnaissance moléculaire, les géométries d'équilibres du complexes  $\beta$ -CD/SULPA ont été également complètement optimisées en utilisant la méthode ONIOM2, dont l'énergie totale est donnée par :

$$E_{\text{ONIOM}} = E(\text{high, model}) + (E \text{ low, real}) - E(\text{low, model}) \quad (4)$$

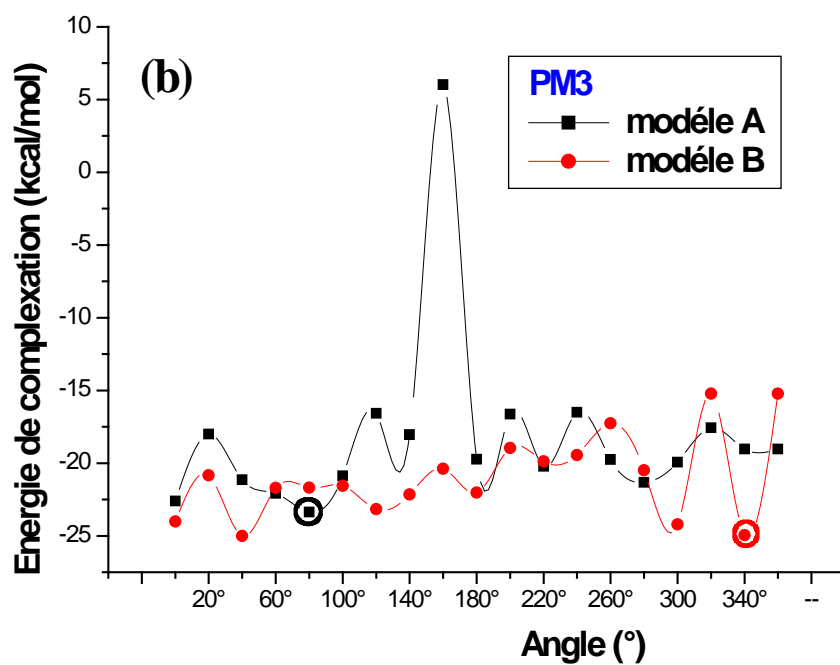
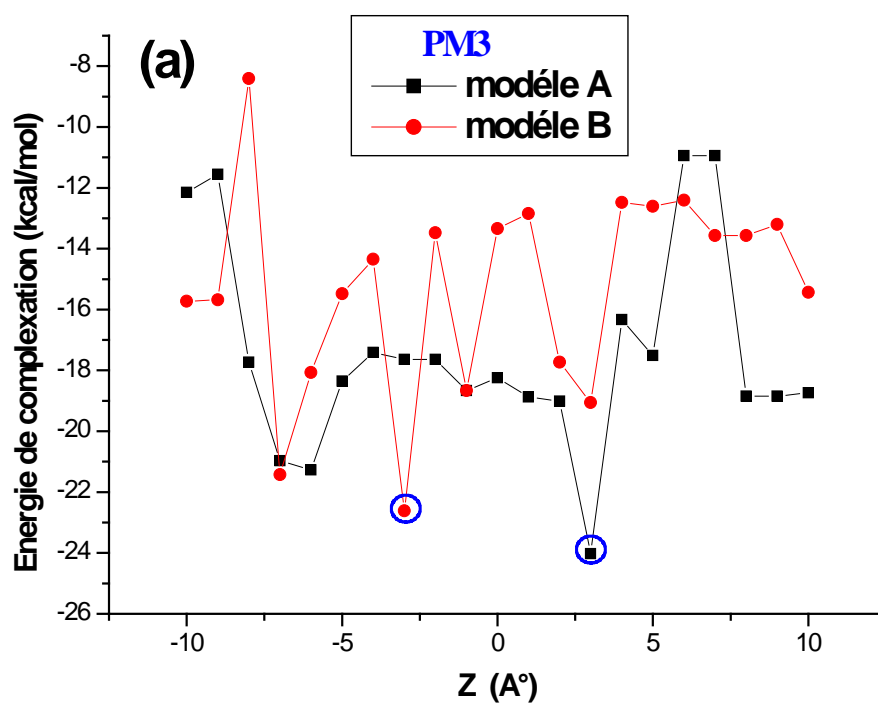
Dans la terminologie de Morokuma et ses collègues [17], le système complet est appelé 'real', il est traité à un niveau inférieur de la théorie. La couche interne se nomme "model", elle est traitée à la fois au niveau de théorie supérieure et inférieure. Où E (High ; model) est l'énergie de la couche interne (SULPA) au niveau de théorie élevé, E(low, real) est l'énergie du système réel au bas niveau de théorie (le complexe) et E(low, model) est l'énergie du système "modèle" (SULPA) au bas niveau de théorie, la  $\beta$ -CD représente la couche externe.

### III.3. Discussion des Résultats

Le traitement des données du processus de complexation permet de localiser le minimum énergétique sur les axes pour les deux modèles décrits ci-dessus.

#### III.3.1. Calculs semi-empiriques et de mécanique quantique

Nous avons adapté la méthode PM3 pour rechercher des structures de plus basse énergie. Différents minimas ont été localisés pour l'ensemble du système. La représentation graphique des changements énergétiques impliqués au cours du processus d'inclusion aux différentes positions Z pour les deux orientations A et B est illustrée dans la figure.III.4.suivante :



**Figure.III.4 :** Variation de l'énergie de complexation au cours du processus d'inclusion De la molécule SULPA dans la  $\beta$ -CD calculées par la méthode PM3:  
 (a) pour différentes positions le long de l'axe Z  
 (b) pour différentes rotations le long de l'angle (°).

D'après ces courbes, on peut remarquer que les valeurs des énergies sont toutes négatives, ce qui prouve que le processus d'inclusion de la SULPA dans la  $\beta$ -CD est thermodynamiquement favorable. Par ailleurs, on remarque que pour l'orientation A, un minimum énergétique a été localisé au début du processus à 3 Å correspondant à une énergie de complexation équivalente à -24,02 Kcal / mol et un angle égal à 80°, loin de la cavité de la  $\beta$ -CD. Cependant, pour l'orientation B, le minimum énergétique est obtenu à -3Å avec une énergie de liaison de -22,61 kcal /mol et un angle égal à 340°.

D'après les valeurs des énergies de complexation  $E_{\text{complexation}}$  obtenues, nous concluons que le modèle A est le plus favorisé, et par conséquent la molécule SULPA peut pénétrer dans la cavité de la  $\beta$ -CD avec son hétérocycle 1-2-Dithiolane et forme avec elle un complexe plus stable.

### III.3.2. L'Effet de Solvants

Dans notre étude, nous avons aussi pris en considération la solvation des complexes SULPA/ $\beta$ -CD, afin de tirer des conclusions concernant l'effet de solvant sur le phénomène de complexation.

Le rôle du solvant, en particulier l'eau, dans les systèmes biologiques a une importance capitale dans le comportement des molécules étudiées.

Dans notre travail, on a procédé à une solvation implicite PCM. Vu le nombre assez important des atomes de notre système moléculaire (195 atomes), nous nous sommes limités, donc, à des calculs « single point » dans le milieu aqueux et cela nous a permis d'avoir une idée quantitative mais généralement satisfaisante de l'effet de solvation. Dans ce contexte, nous avons calculé les énergies « single point » de solvation en utilisant les fonctionnelles B3LYP/6-31G(d) et HF 6-31G(d) sur le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD /SULPA pour les deux orientations A et B.

Les résultats de l'effet de solvant indiqués dans le tableau.III.1, montre que le modèle A est plus favorable et cela confirme les résultats obtenus dans le vide. Et dans tous les cas, on constate que la différence d'énergie entre les deux modèles utilisant H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN et DMSO comme solvants est presque la même (environ 1,9 kcal / mol) en faveur du modèle A.



### III.3.3. Moment Dipolaire

Les moments dipolaires calculés pour les deux modèles du complexes  $\beta$ -CD /SULPA sont significativement plus grands que la molécule SULPA isolée (tableau.III.1). Et par comparaison à la  $\beta$ -CD, ces valeurs ont été plus élevées ou plus basses. Cela indique que la polarité de la cavité  $\beta$ -CD a changé après que la molécule SULPA est entrée dans sa cavité. En outre, on peut remarquer que c'est le complexe A qui possède les moments dipolaires les plus élevées dans la solution et sa polarité a été considérablement augmentée lors du passage du vide (4,70 D) à la solution. On peut conclure donc, que la polarité de ces complexes a une relation étroite avec la manière dont la molécule SULPA est incluse dans la molécule  $\beta$ -CD et avec le milieu dans lequel la complexation a été réalisée.

### III.3.4. Détermination des paramètres géométriques et de l'énergie de déformation

Dans le tableau.III.2, nous présentons les longueurs de liaison, angles et les angles dièdres les plus caractéristiques entre les deux modèles de la molécule avant et après la complexation obtenus par la méthode semi-empirique PM3. Ces résultats indiquent que la molécule invitée dans les deux complexes A et B change complètement sa géométrie initiale. Ce changement est justifié clairement par la différence entre les valeurs des angles dièdres de la molécule SULPA avant et après la complexation. La modification a été plus significative dans les angles dièdres, en particulier, dans la chaîne aliphatique du fragment lipoyle et dans l'hétérocyclee dithiolane, qui indique que la molécule SULPA adapte une meilleure conformation dans la cavité hôte pour former un complexe d'inclusion plus stable.

Des calculs de l'énergie de déformation dans le vide figurant dans le tableau.III.1 montrent qu'aussi bien la  $\beta$ -CD que la molécule SULPA dans le complexe A nécessitent plus d'énergie que celui du complexe B dans le but d'adapter leurs structures pour la formation de leurs complexes; les valeurs des énergies correspondantes sont respectivement: 1,02 et -3,83 kcal / mol pour la  $\beta$ -CD et 1,15 et 0,91 kcal/mol pour la molécule SULPA.

**Tableau.III.1:** Energies (kcal / mol) et des moments dipolaires (Debye) avec des calculs PM3 et single points évaluées à des niveaux B3LYP/6-31G (d) et HF/6-31G (d) pour les complexes d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA.

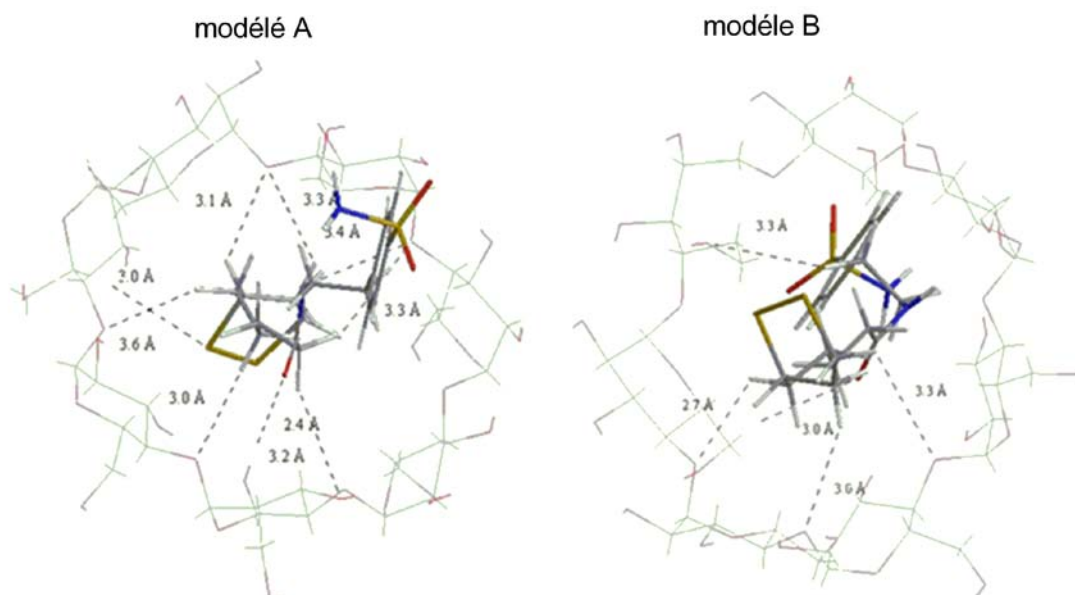
termes énergétiques	SULPA	$\beta$ -CD	modèle A	modèle B	$\Delta E$
<b>PM3(dans le vide)</b>					
<b>E</b>	-93.65	-1449.12	-1566.79	-1565.38	
<b>E<sub>complexation</sub></b>			-24.02	-22.61	
<b>E<sub>deformation</sub>(SULPA)</b>			1.15	0.91	
<b>E<sub>deformation</sub>(<math>\beta</math>-CD)</b>			1.02	-3.83	
<b><math>\mu^d</math>(D)</b>	7.28	4.10	4.70	6.67	
<b>B3LYP/6-31G(d)</b>					
<b>E</b>			-4034121.97	-4034118.50	3.47
<b>HF/6-31G(d)</b>					
<b>E</b>			-4013992.45	-4013989.17	3.28
<b>PM3( dans le solvants)</b>					
<b>E(CH<sub>3</sub>CN)</b>	-114.96	-1483.04	-1609.87	-1607.93	
<b>E<sub>complexation</sub></b>			-11.87	-9.92	
<b>E<sub>deformation</sub>(SULPA)</b>			0.77	1.38	
<b>E<sub>deformation</sub>(<math>\beta</math>-CD)</b>			2.16	4.92	
<b><math>\mu^d</math>(D)</b>	10.08	7.60	14.69	13.56	
<b>E(H<sub>2</sub>O)</b>	-115.41	-1474.73	-1611.32	-1609.34	
<b>E<sub>complexation</sub></b>			-21.46	-19.48	
<b>E<sub>deformation</sub>(SULPA)</b>			0.29	0.66	
<b>E<sub>deformation</sub>(<math>\beta</math>-CD)</b>			-6.97	-4.15	
<b><math>\mu^d</math>(D)</b>	8.21	3.18	14.83	13.65	
<b>E(DMSO)</b>	-114.75	-1474.18	-1610.52	-1608.54	
<b>E<sub>complexation</sub></b>			-21.58	-19.60	
<b>E<sub>deformation</sub>(SULPA)</b>			0.28	0.92	
<b>E<sub>deformation</sub>(<math>\beta</math>-CD)</b>			-7,06	-4.27	
<b><math>\mu^d</math>(D)</b>	8.14	3.09	14.77	13.59	
<b>B3LYP/6-31G(d)</b>					
<b>E (CH<sub>3</sub>CN)</b>			-4034199.68	-4034199.22	0.47
<b>HF/6-31G(d)</b>					
<b>E (CH<sub>3</sub>CN)</b>			-4014094.42	-4014093;56	0.86

Toutes les valeurs énergétiques sont en Kcal/mole.

$\Delta E = E_{\text{complexation (B)}} - E_{\text{complexation (A)}}$ .

### III.3.5. Liaisons Hydrogène dans le Complexe

D'après les discussions précédentes concernant les structures des complexes optimisées par la méthode PM3, nous pouvons confirmer que dans les deux modèles envisagés, la molécule SULPA est insérée dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD, et que des liaisons H intermoléculaires représentées en pointillés sur la Figure III.4; jouent un rôle crucial dans la stabilisation de ces complexes, en particulier celles ayant des longueurs de liaison allant de 2.4Å à 3.1Å, appartenant juste à l'intervalle des valeurs rapportées dans la littérature [18]. Ce sont les cas des liaisons H établis entre les atomes d'oxygène O (162) des groupements amide HNC=O dans la molécule SULPA et les atomes d'hydrogène H (141) et H (136) des groupements hydroxyle primaires et secondaires de la  $\beta$ -CD dans les complexes A et B respectivement, et les atomes d'hydrogène H (185) des groupements amide HNC=O de la molécule SULPA avec l'atome d'oxygène O (78) des groupements hydroxyles primaires de la  $\beta$ -CD. L'insertion de la molécule SULPA dans la cavité hydrophobe de  $\beta$ -CD crée des ponts hydrogène conduisant à une diminution de sa souplesse et flexibilité et augmentation de sa stabilité.



**Figure.III.4 :** Structures géométriques des complexes  $\beta$ -CD/SULPA (modèles A et B) optimisées par la méthode PM3 dans L'acétonitrile. Les liaisons hydrogène intermoléculaires possibles sont indiquées par des lignes en pointillés.

**Tableau .III.2 :** Paramètres géométriques de la molécule SULPA avant et après inclusion dans la  $\beta$ -CD pour les complexes les plus stables A et B calculés par la méthode PM3.

	<b>SULPA Libre</b>	<b>SULPA dans le Complexe A</b>	<b>SULPA dans le Complexe B</b>
<b>Longueur de liaison (Å)</b>			
C <sub>12</sub> -C <sub>13</sub>	1.53	1.53	1.53
N <sub>11</sub> -C <sub>12</sub>	1.48	1.48	1.48
C <sub>10</sub> -O <sub>15</sub>	1.23	1.21	1.22
C <sub>10</sub> -N <sub>11</sub>	1.42	1.41	1.43
C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	1.52	1.52	1.51
C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub>	1.52	1.52	1.52
C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub>	1.52	1.52	1.52
C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub>	1.52	1.52	1.52
C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub>	1.52	1.52	1.52
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	1.53	1.53	1.53
C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub>	1.52	1.52	1.52
S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub>	1.87	1.86	1.86
S <sub>1</sub> -C <sub>3</sub>	1.87	1.83	1.83
S <sub>1</sub> -S <sub>2</sub>	2.08	2.07	2.07
<b>Angles (°)</b>			
C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub> -N <sub>11</sub>	113.87	113.41	113.04
C <sub>12</sub> -N <sub>11</sub> -C <sub>10</sub>	121.39	121.74	120.54
O <sub>15</sub> -C <sub>10</sub> -N <sub>11</sub>	119.41	119.55	118.73
O <sub>15</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub>	122.89	122.63	124.74
N <sub>11</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub>	117.53	117.70	116.40
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub>	110.08	111.64	113.48
C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub>	111.23	110.78	110.78
C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub>	110.45	111.17	110.24
C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	114.69	114.59	114.76
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>3</sub>	111.91	112.57	112.97
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	112.83	112.58	112.31
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> -S <sub>2</sub>	111.72	112.25	112.00
C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -S <sub>2</sub>	109.21	109.43	110.36
C <sub>5</sub> -C <sub>3</sub> -S <sub>1</sub>	110.96	111.55	110.98
C <sub>4</sub> -S <sub>2</sub> -S <sub>1</sub>	96.75	96.82	97.61
C <sub>3</sub> -S <sub>1</sub> -S <sub>2</sub>	97.08	97.33	96.53
<b>Dihedral angles (°)</b>			
C <sub>10</sub> -N <sub>11</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>13</sub>	80.15	83.45	87.66
C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub> -N <sub>11</sub> -C <sub>12</sub>	-169.95	-164.82	-154.86
C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	-177.17	-176.86	179.34
C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub>	174.54	-153.68	174.61
C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub>	171.43	172.19	175.36
S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub>	67.97	69.85	69.08
C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub>	-55.54	-54.16	-55.764
S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>3</sub>	40.10	38.20	31.34
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>3</sub>	165.00	163.76	157.09
S <sub>1</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub>	-39.03	-35.60	-38.41
S <sub>1</sub> -S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	-22.63	-22.85	-11.39
S <sub>1</sub> -S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub>	-148.17	-148.60	-137.31
S <sub>2</sub> -S <sub>1</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub>	19.45	16.35	25.76
C <sub>3</sub> -S <sub>1</sub> -S <sub>2</sub> -C <sub>4</sub>	1.89	3.67	-7.52

### III.3.6. DFT Single Point et les calculs Hartree-Fock

Finalement, et à partir des énergies calculées par l'approche « points singuliers » HF/6-31G(d), et B3LYP/6-31G(d) résumées dans le tableau (III.3.), nous pouvons constater que toutes les énergies du complexe A sont inférieures à celles du complexe B. Ceci suggère constamment que le complexe A est plus stable que le complexe B. Et que l'hétérocycle dithiolane est le plus favorable à être piégé dans la cavité de la  $\beta$ -CD plutôt que le fragment arylsulfonamide. Et il est important de noter que dans tous les cas, les résultats des deux méthodes DFT et HF convergent et sont en accord avec ceux obtenus par la méthode semi-empirique PM3 en solutions. Jusqu'à maintenant, et après tous ces résultats, nous pouvons dire que le choix de la méthode paramétrisée PM3 était judicieux et nous sommes complètement du même avis que les auteurs qui qualifient cette méthode comme étant une technique très puissante que l'on peut appliquer dans des systèmes biochimiques divers [19].

### III.3.6. Les calculs via la méthode ONIOM2

Afin de mieux comprendre la reconnaissance moléculaire entre l'invitée et l'hôte, et dans le but d'obtenir plus de précision et exactitude des deux structures obtenues par PM3, nous avons procédé à l'application des méthodes hybrides ONIOM2 pour optimiser le complexe  $\beta$ -CD/SULPA à des niveaux supérieurs de calcul. Des bases moyennes B3LYP/6-31G(d) et HF/6-31G(d) ont été imposées à la molécule invitée représentant le haut niveau de la méthode hybride et des calculs quantiques PM3 représentant le bas niveau de la méthode sont effectués sur la  $\beta$ -Cyclodextrine.

Tous les calculs sont performés suivant la procédure décrite en littérature [20]. Comme c'est montré dans le tableau.III.1, les calculs effectués par la méthode ONIOM2 tendent vers les mêmes résultats que ceux obtenus par la méthode PM3. En conséquence, l'énergie de complexation de l'orientation A est plus négative comparée à celle de l'orientation B. En effet, cette méthode hybride confirme aussi que l'orientation A est plus favorable. Selon les résultats obtenus dans les tableaux(III.1) et (III.3), nous pouvons voir que toutes les méthodes utilisées dans cette étude, montrent que l'orientation A est plus favorable que l'orientation B, et les calculs ONIOM2 confirment les résultats PM3.

**Tableau.III.3:** Caractéristiques énergétiques, thermodynamiques et résultats des calculs HOMO-LUMO selon la méthode PM3 et Energies "Single point" calculée par ONIOM2 pour les complexes d'inclusion  $\beta$ -CD/ SULPA.

paramètre	SULPA	$\beta$ -CD	A modèle	Bmodel	$\Delta E$
sous vide,					
<u>EPM3</u>			-1566.79	-1565.38	1.406
$E_{HOMO}$ (eV)	-8.54	-10.79	-8.43	-9.02	
$E_{LUMO}$ (eV)	-1.92	1.644	-1.82	-2.36	
$E_{HOMO}-E_{LUMO}$ gap (eV)	-6.62	-12.43	-6.61	-6.66	
$H_f$	163.17	-660.66	-518.62	-518.12	
$\Delta H$			-21.12	-20.62	
$G_f$	104.45	-783.12	-678.92	-678.73	
$\Delta G$			-0.24	-0.06	
$S$ (cal/mol.K)	196.83	412.57	537.67	538.72	
$\Delta S$ (cal/mol.K)			-71.73	-70.67	
E Oniom B3LYP/6-31G(d): PM3			-1353027.35	-1353027.22	0,13
E Oniom HF/6- 31G(d):PM3			-1347994.52	-1347994.26	0.26
dans de l'acétonitrile					
<u>EPM3</u>			-1609.87	-1607.93	1.94
$E_{HOMO}$ (eV)	-9.04	-10.87	-9.08	-8.99	
$E_{LUMO}$ (eV)	-2.20	1.60	-2.22	-2.18	
$E_{HOMO}-E_{LUMO}$ gap (eV)	-6.84	-12.48	-6.86	-6.81	
E Oniom B3LYP/6-31G(d): PM3			-1353051.058	-	1,42
E Oniom HF/6- 31G(d):PM3			-1348011.24	-1348009.49	1.75

Toutes les valeurs énergétiques ne présentant aucun indice sont en (Kcal/mol).

<sup>a</sup> $E$  est l'énergie de HF.

<sup>b</sup> Energie de l'orbitale moléculaire la plus haut occupé.

<sup>c</sup> Energie de l'orbital moléculaire la plus bas occupée.

<sup>d</sup> moment dipolaire en Debye.

<sup>e</sup> $\Delta A^\circ = A_{\text{complex}} - (A_{\beta\text{-CD}} + A_{\text{CENS-Dibenz}})$ ,  $A=H,G$  ou  $S$  à  $P=1$  atm et  $T=298.15$  K.

### III.3.7. les paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusion

Les variations d'enthalpie ( $\Delta H^\circ$ ), d'entropie ( $\Delta S^\circ$ ) et de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), pour les complexes  $\beta$ -CD/SULPA ont été effectués à pression atmosphérique et à 298,15 K, par la méthode semi-empirique PM3. Les résultats sont illustrés dans le Tableau.III.3. On remarque que les changements d'enthalpie pour les l'orientation A et B sont tous négatifs indiquant que le processus est exothermiques. En outre, les valeurs de  $\Delta S^\circ$  pour le complexe  $\beta$ -CD /SULPA sont négatives, ce qui indique une diminution

du degré de liberté de la molécule SULPA complexée. La valeur négative de  $\Delta G^\circ$  indique que la réaction de complexation est spontanée.

### 111.3.8. Étude par les Orbitales Moléculaire Frontières (FMO)

L'interaction de transfert de charge se produisant dans le phénomène de reconnaissance moléculaire dans les CDs, joue un rôle crucial dans la stabilité chimique du système d'auto-assemblage supramoléculaire. Les termes les plus importants dans ce genre d'interaction sont apportés par le transfert de charge entre l'orbitale moléculaire (HOMO) et l'orbitale moléculaire (LUMO), appelée orbitales frontières moléculaires (FMO), qui sont les orbitales les plus importantes dans une molécule.

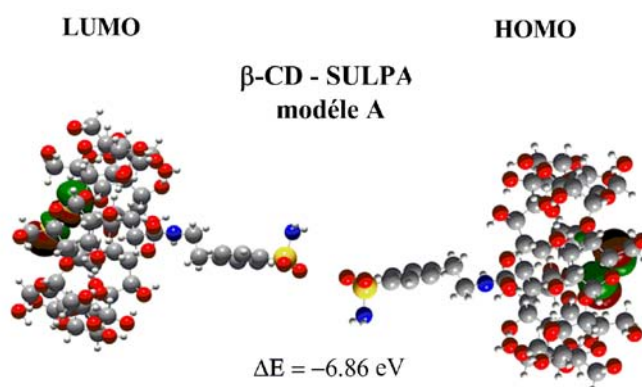
L'écart d'énergie ( $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ ) entre HOMO et LUMO reflète l'éventuelle interaction de transfert de charge au sein de la molécule, ce qui explique sa réactivité chimique et sa stabilité et aussi l'influence sur son activité biologique.

Ainsi, une molécule avec un grand écart d'orbitale frontière est moins polarisable et est généralement associée à une réactivité chimique faible et une grande stabilité [20].

Dans notre étude, l'analyse HOMO-LUMO a été menée pour élucider des informations concernant la complexation entre le  $\beta$ -CD et la molécule SULPA. Le calcul a été effectué dans le vide et dans l'acétonitrile en utilisant la méthode PM3.

Selon les résultats présentés dans le tableau III.3, les gaps énergétiques entre HOMO et LUMO :  $\Delta$  (HOMO-LUMO) des deux complexes A et B ont les valeurs suivantes:

-6,61 eV et -6.66 eV sous vide et -6,86 eV et -6,81 eV dans de l'acétonitrile, respectivement. Par conséquent, nous pouvons conclure que les deux complexes sont très stables [21] et ce résultat est en bon accord avec nos autres calculs théoriques.

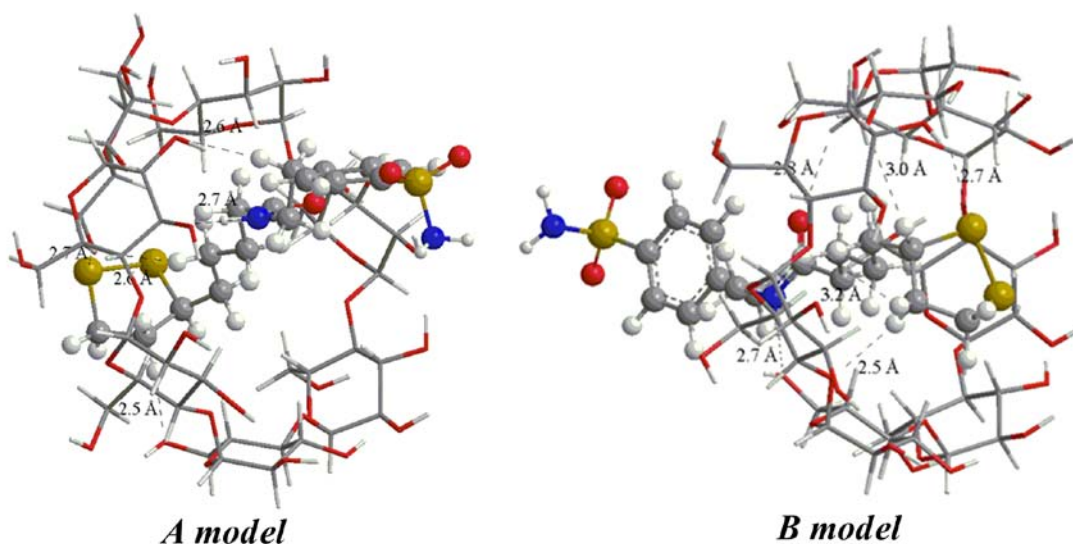


**Figure.III.5:** Représentation des orbitales frontières HOMO et LUMO du complexe  $\beta$ -CD/SULPA (modèle A) dans l'acétonitrile.

### III.3.9. Analyse NBO

L'analyse NBO fournit une méthode efficace pour étudier les liaisons intra et intermoléculaires [22], et fournit également une base pratique pour étudier le transfert de charge ou l'interaction dans les systèmes moléculaires. L'évaluation de l'énergie de perturbation de stabilisation  $E^{(2)}$  entre les orbitales donneuses de protons (liantes) et l'orbitale  $a^*(X-H)$  acceptrice de protons (antiliante) est mentionnée dans le tableau.III.4.

À partir du tableau.III.4, on peut voir un grand nombre d'interactions entre des orbitales donneuses CV C-H ou N-H et des orbitales acceptrices  $G^*$  C-H. Ces interactions se produisent entre la cavité de la  $\beta$ -CD et la molécule invitée SULPA lors du phénomène de complexation. Les énergies d'interactions possibles pour ces auto-assemblages sont situées dans la gamme de 0.39 à 4,19 kcal / mol.



**Figure.III.6.** : Structures géométriques optimisées au B3LYP/6-31G (d) pour les complexes ( $\beta$ -CD/ SULPA).



**Tableau.III.4 :** Les orbitales donneuses et acceptrices d'électrons, énergies correspondantes  $E^{(2)}$ , pour les orientations A et B des complexes  $\beta$ -CD/SULPA optimisés par ONIOM2.

Doneuses	Acceptrices	$E^{(2)}$ (kcal/mol)
<b>Orientation A</b>		
<b>Doneuse (<math>\beta</math>-CD) et acceptrice( S ULPA)</b>		
BD (1) C15-H93	BD*(1) N158-H185	2.74
BD (1) C23-H102	BD*(1) C156-H184	1.87
BD (1) C27-H107	BD*(1) C156-H183	2.91
BD (1) C29-H109	BD*(1) C154-H179	2.90
BD (1) C33-H114	BD*(1) C155-H182	2.76
BD (1) C35-H116	BD*(1) C153-H178	3.01
BD (1) C 41-H123	BD*(1) C153-H177	1.78
BD (1) O 54-H132	BD*(1) C160-H189	1.97
LP (1) O47	BD*(1) C152-H176	1.39
LP (2) O63	BD*(1) C154-H180	1.15
<b>Doneuses (SULPA) et acceptrice( <math>\beta</math>-CD)</b>		
BD (1) C 153-H177	BD*(1) C41-H123	2.85
BD (1) C 153-H178	BD*(1) C35-H116	3.36
BD (1) C 154-H179	BD*(1) C29-H109	3.40
BD (1) C 155-H182	BD*(1) C33-H114	2.98
BD (1) C 156-H183	BD*(1) C27-H107	2.49
BD (1) C 156-H184	BD*(1) C23-H102	3.18
BD (1) N 158-H185	BD*(1) C15-H93	1.72
BD (1) C 160-H189	BD*(1) O54-H132	2.55
LP (1) S148	BD*(1) O63-H137	1.12
LP (2) S148	BD*(1) O63-H137	3.95
<b>Orientation B</b>		
<b>Doneuse (<math>\beta</math>-CD) et acceptrice( S ULPA)</b>		
BD (1) C3-H81	BD*(1) C150-H173	1.60
BD (1) C5-H83	BD*(1) C154-H180	1.64
BD (1) C9-H88	BD*(1) C152-H176	2.66
BD (1) C11-H90	BD*(1) C153-H177	1.95
BD (1) C15-H93	BD*(1) C151-H174	3.15
BD (1) C23-H102	BD*(1) C153-H178	2.31
BD (1) C35-H116	BD*(1) C156-H183	2.09
BD (1) C36-H118	BD*(1) C160-H188	2.71
LP (1) O50	BD*(1) C152-H175	0.84
<b>Doneuse (SULPA) et acceptrice <math>\beta</math>-CD)</b>		
BD (1) C150-H173	BD*(1) C3-H81	1.96
BD (1) C151-H174	BD*(1) C15-H93	2.73
BD (1) C153-H17	BD*(1) C9-H88	2.61
BD (1) C152-H176	BD*(1) C11-H90	2.93
BD (1) C153-H178	BD*(1) C23-H102	2.31
BD (1) C154-H180	BD*(1) C5-H83	2.18
BD (1) C156-H183	BD*(1) C35-H116	2.98
BD (1) C160-H188	BD*(1) C36-H118	2.57
LP (1) S149	BD*(1) C21-H100	1.60

BD (1) signifie une liaison  $\sigma$  orbitale; BD (1) \* signifie  $\sigma^*$  anti-liante orbitale; LP (1) et LP (2) signifie 1ère et 2ème paire électron solitaire, respectivement.  $E^{(2)}$  signifie que l'énergie de stabilisation.

### III.4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons entrepris une investigation théorique par modélisation moléculaire sur l'interaction entre le  $\beta$ -CD et la molécule SULPA biologiquement active. Les méthodes PM3, HF, DFT, ONIOM2 et l'analyse NBO, nous ont permis de définir et d'analyser deux orientations possibles de la molécule SULPA dans la cavité de la  $\beta$ -CD. Les calculs thermodynamiques ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) et la méthode FMO suggèrent que le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA est assez stable et les résultats de l'analyse théorique indiquent que le complexe A est plus favorisé par rapport au complexe B dans le vide et en solution. En particulier, il est important de noter qu'aussi bien dans le vide qu'en solution, l'hétérocycle 1,2-dithiolane de la molécule SULPA qui est la partie la plus fragile se trouve encapsulée dans la cavité de la  $\beta$ -CD et par conséquent elle est bien protégée.

## Références bibliographiques

- [1] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, *Chem. Rev*, 1998, 98, 1755-1785.
- [2] K. Harata, *Chem. Rev*, 1998, 98, 1803-1828.
- [3] L. Liu, X.S. Li, K.S. Song, Q.X. Guo, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 2000, 531, 127-134.
- [4] L. Liu, Q.X. Guo, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*, 2004, 50, 95-103.
- [5] L. Liu, X.S. Li, Q.X. Guo, Y.C. Liu, *Chin. Chem. Lett*, 1999, 10, 1053-1056.
- [6] E.C. Yang, X.J. Zhao, F. Hua, J.K. Hao, *J. Mol. Struct*, 2004, 712, 75-79.
- [7] C.L. Yan, Z.L. Xiu, X.H. Li, C. Hao, *J. Mol. Graph. Model*, 2007, 26, 420-428.
- [8] Gaussian 03, Revision B.01, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian, Inc, Pittsburgh.
- [9] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vre-ven, J.A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, , Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, : Gaussian, Inc., Wallingford, 2009.

- [10] Hyperchem TM Professional 7.51, Hypercube, Inc, 2002.
- [11] K.A. Al-Sou'od, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2006, 54, 123- 127.
- [12] S. Morpurgo, M. Bossa, J. Moepurgo, J. Mol. Struct. (THEOCHEM), 1998, 429, 71–80
- [13] C.L. Yan, X.H. Li, Z.L. Xiu, C. Hao, J. Mol. Struct. (Theochem), 2006, 764, 95–100.
- [14] M. Kuno, S. Hannongbua, K. Morokuma, Chem. Phys. Lett, 2003, 380, 456–463.
- [15] A.E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold, Chem. Rev, 1988, 88, 899–926.
- [16] N. Bensouilah, M. Abdaoui, C. R. Chim, 2012, 15, 22–36
- [17]. S. Dapprich, I. Koma'romi, K.S. Byun, K. Morokuma, M.J. Frisch, J. Mol. Struct. (Theochem), 1999, 1–21, 461–462
- [18] L. Seridi, A. Boufelfel, J. Mol. Liq, 2011, 158, 151-158
- [19] V. Mukherjee, N.P. Singh, R.A. Yadav, J. Mol. Struct, 2011, 988, 24–34.
- [20] R. Castro, M.J. Berardi, E. Cordova, M.O. de Olza, A.E. Kaifer, J.D. Evanseck, J. Am. Chem. Soc, 1996,118, 10257–10268
- [21] G.S. Tschumper, K. Morokuma, J. Mol. Struct. TheoChem, 2002, 592, 137–147
- [22] N. Rajendiran, T. Mohandoss, G. Venkatesh, Spectrochim. Acta, A, 2014,124, 441–450.

## ***CONCLUSION GENERALE***

## Conclusion générale

Les Anhydrases Carbonique (ACs) sont des métalloenzymes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

Alors que l'isoforme II de l'AC est principalement responsable des rôles physiologiques « normaux », d'autres isoformes sont impliquées dans des phénomènes pathologiques tels que le cancer.

L'ACIX qui est une protéine extramembranaire, est largement exprimée dans de nombreuses tumeurs, elle constitue de ce fait une nouvelle cible thérapeutique dont la sélectivité cellulaire est une caractéristique de premier plan.

La première problématique réside dans le fait que la majorité des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique actuellement disponibles en thérapeutique en particulier les sulfonamides, s'avèrent présenter beaucoup d'effets secondaires principalement dus à leur faible hydrosolubilité et leur manque de sélectivité. Donc le premier volet de notre travail, a consisté tout d'abord à la reprise de la synthèse et la caractérisation d'une série de quatre conjugués sulfonamides-acide lipoyique via le couplage peptidique d'une série de sulfonamides inhibiteurs potentiels de l'anhydrase carbonique avec l'acide lipoyique dans le but d'augmenter leur sélectivité envers L'ACIX. L'optimisation de cette réaction par la mise au point de nouvelles conditions expérimentales qui consiste à utiliser l'EDCI comme agent déshydratant en présence du DMAP en tant que catalyseur dans le DMA, nous a permis d'accéder aux produits désirés avec des rendements satisfaisants.

La présence du fragment lipoyole dans ces molécules leur confère une activité inhibitrice beaucoup plus élevée et plus sélective que leurs précurseurs correspondants. Cependant, ces composés se sont montrés plus lipophiles que leurs précurseurs et leur solubilité dans l'eau s'est considérablement diminuée.

La deuxième problématique porte donc sur la faible solubilité aqueuse de ces conjugués ainsi que leur instabilité vis-à-vis de la lumière, la chaleur et les conditions alcalines.

Dans ce contexte, et afin d'améliorer la solubilité, la stabilité, la biodisponibilité de ces composés, une étude théorique et expérimentale de la complexation avec la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) du composé le plus actif en l'occurrence le N-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide (SULPA) a été réalisée. Ainsi, le complexe d'inclusion de la  $\beta$ -CD avec la molécule SULPA a été préparé avec

succès par le procédé de co-précipitation et sa formation a été mise en évidence à la fois dans la phase liquide, et également à l'état solide à l'aide de la spectrophotométrie UV-Visible et IR. Ensuite et à l'aide de la méthode de Job et l'équation Benesi-Hildebrand respectivement, la stoechiométrie du complexe a été trouvée égale 1:1 et sa constante de stabilité a été évaluée comme  $1.3415 \cdot 10^4 \text{ (mol / L)}^{-1}$  à la température ambiante.

Etant donné l'intérêt récent attaché à la modélisation moléculaire des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines, nous avons mené une investigation théorique au moyen de la modélisation moléculaire sur le complexe d'inclusion de stoechiométrie 1:1, entre la molécule SULPA faiblement soluble dans l'eau et la  $\beta$ -CD.

En effet, l'utilisation des méthodes théoriques telle que la méthode semi-empirique PM3, les méthodes quantiques ("single point" HF et (B3LYP/6-31G (d) de la théorie de la densité fonctionnelle DFT) et la méthode hybride ONIOM2, nous ont permis d'analyser deux orientations possibles de la molécule invitée SULPA dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD

Toutes ces méthodes de calculs faisant apparaître des paramètres thermodynamiques et structuraux du complexe étudié dans le vide et en solution, indiquent que le processus de l'inclusion est thermodynamiquement favorable et que le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD/SULPA est assez stable. Ces résultats théoriques sont en bon accord avec ceux que nous avons trouvés expérimentalement par spectrophotométrie UV-Visible.

D'autre part, le complexe A dans lequel l'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule SULPA est inséré dans le côté large de la  $\beta$ -CD s'est montré plus favorisée par rapport au complexe B. Par ailleurs, les investigations théoriques par les orbitales frontières HOMO, LUMO dans le vide et en solution et les résultats structuraux de l'analyse fonctionnelle par spectroscopie IR, montrent que l'hétérocycle 1-2-Dithiolane très sensible aux agressions chimiques ou physiques est piégé dans la cavité de la  $\beta$ -CD, ce qui le rend suffisamment protégé.

Enfin, par l'analyse NBO, nous avons pu déterminer les valeurs de l'énergie de stabilisation E2 et mettre en évidence les principales forces motrices de complexation mises en jeu dans le processus de complexation entre la molécule invitée SULPA et la  $\beta$ -CD.

## ***TROISIEME PARTIE***

***Appareillages, Protocoles Expérimentaux et  
Programmes Utilisés***



## I. Conditions générales et Méthodes de caractérisation

*Les rendements expérimentaux* sont exprimés en pourcentage des produits purs isolés par rapport à la quantité de matières premières mise en œuvre.

*Solvants* : Le principal solvant utilisé dans ce travail est l'acétonitrile. Il a l'avantage d'être polaire, aprotique et est approprié pour toutes nos mesures

*Les points de fusion* ont été déterminés à l'aide d'un appareil à point de fusion sur capillaire (appareil electrothermal (IA9000)).

*CCM*: Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur plaque de silice en aluminium Merck 60 F354 (art.5554). Selon leur nature, les produits ont été révélés par différentes méthodes: à la lumière UV (254nm) pour les composés possédant un chromophore, à l'aide d'un révélateur chimique approprié; pour les aminés dans une solution de ninhydrine dans l'éthanol (0,1%) ou pour les cyclodextrines dans une solution d'acide sulfurique dans l'eau (20%), ou dans le système (dioxane / ammoniacque concentré) suivi d'un chauffage jusqu'au développement optique des taches.

*Les spectres d'infrarouge* ont été enregistrés au Laboratoire du génie des matériaux au centre de recherche de l'université de Guelma, à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Spectrum one FT-IR Spectrometer, en pastilles de bromure de potassium. Les différentes absorptions ( $\nu$ ) sont indiquées en  $\text{cm}^{-1}$ .

*Pastillage dans le KBr*: Il consiste à incorporer le produit solide à étudier à du KBr anhydre. Tout d'abord, il faut procéder à son séchage pendant 24H ainsi qu'au nettoyage au chloroforme et au séchage de tout le matériel à utiliser. Puis on pulvérise finement par broyage dans un mortier d'agate le mélange de substance à analyser avec le KBr anhydre avec le rapport substance/KBr variant entre 3 et 10%. La poudre est ensuite placée dans une matrice d'acier inoxydable et soumise à une très forte pression (10 tonnes) à l'aide d'une presse hydraulique. Avant et pendant l'application de la pression, on évacue l'air en reliant la matrice à une pompe à vide.

*Les spectres UV-Visible* ont été enregistrés au Laboratoire (LCA) à l'aide d'un spectromètre UV-visible Shimadzu model (RF-5301 PC) relié à un ordinateur sous Windows XP doté du logiciel Personal Software version 2.43, Shimadzu scientific Instruments, équipé d'une lampe Xénon, à cellule en quarts de 1.00 cm de diamètre, à température ambiante. Les longueurs d'onde ( $\lambda$ ) sont indiquées en nm.

*Les réactifs utilisés* sont fournis par Sigma-Aldrich et Flucka et sont utilisés sans purifications.

*Les spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C* ont été enregistrés à température ambiante sur Bruker DRX 400 (à une fréquence de 400MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, utilisant DMSO-*d*<sub>6</sub> et le D<sub>2</sub>O comme solvants et le tetramethylsilane (TMS) comme référence interne.

La multiplicité des signaux est indiquée par une (ou plusieurs) lettre(s) minuscule(s): singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet.

*Les spectres de masse* sont obtenus par technique electrospray sur un appareil Water Micro-Mass ZQ, en mode positif et négatif.

## **II-Protocoles Expérimentaux**

### **II.1. Synthèse des conjugués sulfonamides-acide lipoïque**

#### **II.1.1. Synthèse de: *N*-(4-Sulfonamidophenyl) -5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide.**

Dans un ballon de 100 ml, à 0,2g (1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5ml de DMA, sont ajoutés 0,167g (1éq) de sulfonilamide et 0,15g (1éq) de DMAP. La solution obtenue est traitée avec 0,186g (1 éq) de l'EDCI. Après 6h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice (DCM /MeOH (85 /15)).

**MW**=360,52 g/mol [**C**<sub>14</sub> **H**<sub>20</sub> **O**<sub>3</sub>**N**<sub>2</sub>**S**<sub>3</sub>]

**Rdt** = 40 %

**Rf** = 0,42 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9,5/0,5).

**Tf** = 176°C.

**SM (ESI/MeOH / CH<sub>3</sub>CN)**: m/z (exp.) 359,17 [M-H]<sup>-</sup> ;394,99 [M+Cl]<sup>-</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm ): 10.23 (s, 1H), 7.74 (s, 4H), 7.24 (s, 2H), 3.63 (s, 1H), 3.16 (m, 3H), 2.37(m,3H), 1.86(m, 1H), 1.61(m,3H), 1.42(d,2H,J=7.21Hz).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO*d*<sub>6</sub>, 400 MHz , δ en ppm ) : 171.69,142.12,126.61, 118.47 , 56.06 , 39.71 , 39.43 , 38.07 , 36.21 , 34.10 , 28.25 , 24.67.

**II.1.2. Synthèse de: *N*-[(4-Sulfonamidophenyl)-methyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide**

A 0,2 g (1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5ml de DMA sont ajoutés 0,216 g (1éq) de 4-aminomethylbenzensulfonamide hydrochloride et 0,15 g (1éq) de DMAP. La solution obtenue est traitée avec 0,14ml (1éq) de TEA et 0,186g (1 éq) de l'EDCI. Après 6h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice (DCM /MeOH (85/15)).

**MW**=374,54g/mol [**C**<sub>15</sub> **H**<sub>22</sub> **O**<sub>3</sub>**N**<sub>2</sub>**S**<sub>3</sub>]

**Rdt**= 66%

**Rf** = 0,55 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 7,5/1,5).

**Tf** = 124°C.

**SM (ESI<sup>-</sup>, MeOH / CH<sub>3</sub>CN)** : m/z (exp.) 373,27 [M-H]<sup>-</sup> ; 409,03 [M+Cl]<sup>-</sup> ; 748.80[2M - H]<sup>-</sup> , 782.99[2M+Cl]<sup>-</sup> .

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm), : 8.42 (t, 1H, J=5.95Hz), 7.76 (d, 2H, J=8.32Hz), 7.40 (d, 2H, J = 8.32 Hz), 7.32 (s, 2H), 4.31 (d, 2H, J=5.95Hz); 3.61(m,1H), 3.15(m,2H), 2.39(m,1H), 2.14(m,2H), 1.85(m,1H), 1.67 (m, 1H), 1.55 (m, 3H),1.35(m,2H)

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm,) : 172.25 ; 143.83 ; 142.56 ; 127.48 ; 125.70 ; 56.17 ; 40.34 ; 39.97 ; 38.17 ; 35.16 ; 34.15 ; 28.36 ; 25.05.

**II.1.3. Synthèse de: *N*-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide.**

A 0,2 g (1éq) de l'acide lipoïque dans 2,5 ml de DMA sont ajoutés 0,1194 g (1éq) de 4-aminoethylbenzensulfonamide et 0,15 g (1éq) de DMAP. La solution obtenue est traitée avec 0,186 g (1 éq) de l'EDCI. Après 3h d'agitation à température ambiante, la phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle, ensuite séchée et concentrée sous pression réduite ; le produit ainsi obtenu est purifié sur colonne à gel de silice ( DCM /MeOH (85 /15)).

**MW**=388,57g/mol [**C**<sub>16</sub> **H**<sub>24</sub> **O**<sub>3</sub>**N**<sub>2</sub>**S**<sub>3</sub>]

**Rdt** = 68%,

**Rf** = 0,88 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 7,5/1,5).

**Tf** = 131°C.

**SM** (ESI<sup>+</sup>; ESI<sup>-</sup> /MeOH / CH<sub>3</sub>CN): : m/z (exp.) 411,04 [M+Na]<sup>+</sup>;387,18 [M-H]<sup>-</sup>; 423,06[M+Cl]<sup>-</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm), : 7.91 (t, 1H, J=4Hz), 7.73 (d, 2H, J=4Hz),7.38 (d, 2H, J=4Hz), 7.30 (s,2H), 3.6 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.77 (t, 2H, J=8Hz), 2.4 (m, 1H), 2.02 (t, 2H, J=8Hz),1.85 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.52 (m, 3H), 1.32 (m, 2H).

**RMN** <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm ) : 172.17 ; 143.81 , 142.48 , 127.40 ; 125.62 ; 56.09 ; 41.62 ; 40.26 ; 38.08 ; 35.08 ; 34.07 ; 28.28 ; 24.96.

#### **II.1.4. Synthèse de: N-[(4-(Thiazol-2-yl)-sulfonamidophenyl)]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide.**

Préparé suivant le même mode opératoire précédent par le couplage entre le sulfathiasole(1éq) et l'acide lipoiique(1éq) en présence de l'EDCI(1 éq).

**MW**=443,63g/mol [**C**<sub>17</sub> **H**<sub>21</sub> **O**<sub>3</sub>**N**<sub>3</sub>**S**<sub>4</sub>]

**Rdt** = 78%.

**Rf**: = 0,35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 7,5/1,5).

**Tf** = 147°C.

**MS ESI**+ m/z 466.54 [M+Na]<sup>+</sup>, ESI- m/z 442.63 [M-H]<sup>-</sup>.

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm ), 7.75 (d, 2H, J=4Hz), 7.41 (d, 2H, J=4Hz), 7.35 (s, 1H), 6.87 (d, 1H), 6.81 (d, 1H),3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.4 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.5 (m, 3H), 1.31(m, 2H).

## **II.2. Préparation du complexe d'inclusion SULPA/β-CD à l'état solide :**

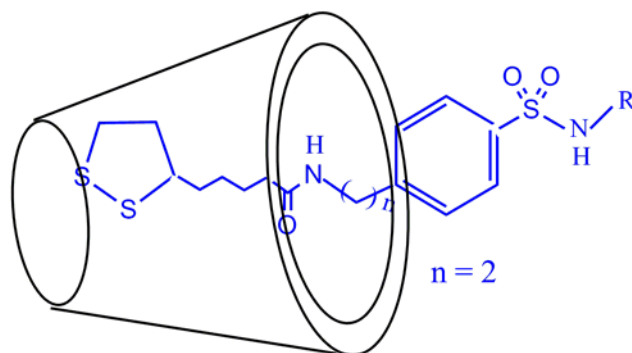
La préparation des complexes d'inclusion, consiste à utiliser deux solvants miscibles, parmi, ceux-ci on a choisi l'eau et le méthanol. Laβ -cyclodextrine est soluble dans l'eau, et la SUPA soluble dans le méthanol. Les deux solvants étant miscibles.

Une solution aqueuse à 2 % de  $\beta$ -CD (1 éq.), et une solution de SULPA (1 éq.) dans peu de méthanol ont été préparées. La synthèse du complexe se fait en mélangeant, goutte à goutte, la solution de SULPA dans le méthanol, à la solution aqueuse de la  $\beta$ -CD, sous agitation magnétique et à température ambiante à l'aire libre pendant 24 heures. Le précipité formé est décanté puis séché à 37°C, un solide blanc est recueilli.

Le solide obtenu contient le complexe, ainsi que la cyclodextrine n'ayant pas réagi.

Nous avons procédé à une tentative de purification du complexe en nous basant sur la différence de solubilité entre le complexe et la cyclodextrine, celle-ci étant la plus soluble dans l'eau. Pratiquement, on solubilise le solide obtenu dans un volume minimal d'eau chaude, de sorte que la concentration en complexe soit juste en dessous de la limite de sa solubilité. Après refroidissement de la solution à température ambiante, la limite de solubilité du complexe étant dépassée, celui-ci précipite, les cyclodextrines restant solubles. Après sédimentation de la solution, le retrait de la solution de surnageant contenant les cyclodextrines permet une purification acceptable.

Nous donnons, ci-après, les caractéristiques spectroscopiques du complexe d'inclusion avec la molécule SULPA :



**MW**=1523,57g/mol

**Rdt** = 63.6 %,

**Rf** = 0,68(isopropanol / ammoniaque (v/v: 80 /20)

**Tf** = 231°C.

**IR** (KBr,  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ): 3368.07 (OH) , 3260.07 ( NH ) , 1751 (C=O), 1175 (C-O),, 1150(SO<sub>2</sub>)

**U.V -Visible** ( $\lambda_{\text{max}}$  nm): 224 nm.

## **II.3. Etude en solution du complexe d'inclusion $\beta$ -CD/SULPA**

### **II.3.1. Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion - $\beta$ CD-SULPA**

#### **\*Préparation des solutions au moyen des ultrasons**

La complexation en solution a été suivie par spectroscopie UV-Visible à température ambiante dans l'acétonitrile.

A l'aide d'une sonde ultrason (sonificateur) de fréquence bien modulée, des quantités équivalentes de  $\beta$ -CD et de la molécule invitée SULPA sont agitées à température ambiante pendant un laps de temps jusqu'à atteindre un équilibre dynamique entre la forme libre et la forme complexée de la molécule invitée.

Cette méthode s'est avérée économique et très rapide.

### **II.3.2. Détermination de la stoechiométrie du complexe d'inclusion $\beta$ -CD-SULPA**

La stoechiométrie du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD-SULPA a été déterminée avec deux méthodes distinctes: La méthode des variations continues et la méthode des rapports molaires:

#### **II.3.2.a. Méthode des variations continues (méthode de Job)**

Pour déterminer la stoechiométrie du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD-SULPA selon la méthode de Job, nous avons fait varier la teneur en  $\beta$ -CD de manière à obtenir une série de solutions, dans lesquelles sa fraction molaire variait entre 0.10 et 0.90, tout en conservant la somme des concentrations des SULPA et de la  $\beta$ -CD constantes, et nous avons mesuré l'absorbance maximale.

Les solutions des SULPA et de la  $\beta$ -CD ont été préparées dans le même solvant (acétonitrile) et à la même concentration ( $1.00 \times 10^{-5}$  M). Les résultats de cette méthode sont présentés dans le Tableau.1 donné ci-après:

#### **II.3.2. b Méthode des rapports molaires**

Le protocole utilisé ici pour la détermination de la stoechiométrie du complexe  $\beta$ -CD-SULPA a été procédé dans l'acétonitrile en utilisant la méthode des rapports molaires. Les solutions de 1 jusqu'à 9 de SULPA et de la  $\beta$ -CD, sont préparées de la même façon que dans la méthode des variations continues à partir de solutions mères de SULPA et de  $\beta$ -CD, aux mêmes concentrations de  $1.00 \times 10^{-5}$  M.

Dans ce cas, en fixant le volume de la solution de SULPA à 3 ml et on fait varier celui de la  $\beta$ -CD en solution, de 0.6 à 5.4 ml. Les résultats de cette méthode sont présentés dans le Tableau.2 donné ci-après:

**Tableau.1** : Préparation des différents volumes molaires utilisées dans la méthode des variations continues.

Solutions	V $\beta$ -CD (ml)	V <sub>SULPA</sub> (ml)	FM $\beta$ -CD	Abs à 224 nm
1	0.5	4.5	0.1	0,1555
2	1	4	0.2	0,1485
3	1.5	3.5	0.3	0,1425
4	2	3	0.4	0,1375
5	2.5	2.5	0.5	0,1355
6	3	2	0.6	0,1381
7	3.5	1.5	0.7	0,1395
8	4	1	0.8	0,1455
9	4.5	0.5	0.9	0,1530

**Tableau.2** : Préparation des différents volumes molaires utilisées dans la Méthode des rapports molaires.

Solutions	V $\beta$ -CD (ml)	V <sub>SULPA</sub> (ml)	V $\beta$ -CD / V <sub>SULPA</sub>	Abs à 224 nm
1	0.6	3	0.2	0.359
2	1.2	3	0.4	0.348
3	1.8	3	0.6	0.325
4	2.4	3	0.8	0.242
5	3	3	1	0.228
6	3.6	3	1.2	0.207
7	4.2	3	1.4	0.207
8	4.8	3	1.6	0.182
9	5.4	3	1.8	0,150

### II.3.3. Détermination de la constante de stabilité du complexe

La constante de stabilité a été déterminée dans l'acétonitrile, en utilisant la méthode de Benesi-Hildbrand.

Cette étude consiste à faire varier la concentration de la  $\beta$ -CD tout en fixant celle du SULPA. La concentration de la molécule SULPA est fixée à  $1.00 \times 10^{-5}$  M et on fait varier celle de la  $\beta$ -CD (entre  $2.00 \times 10^{-5}$  et  $1.00 \times 10^{-4}$  M).

Pour préparer les solutions numérotées de 1 jusqu'à 9, on mélange deux volumes égaux des solutions de SULPA et de  $\beta$ -CD.

Les différentes valeurs des absorbances du complexe sont rassemblées dans le tableau.3 suivant :

**Tableau.3** : Variation des absorbances en fonction de l'ajout de la  $\beta$ -CD

Solutions	[SULPA] (M)	[ $\beta$ -CD] (M)	Abs à 224 nm
1	$10^{-5}$	$2.00 \times 10^{-5}$	0,1075
2	$10^{-5}$	$3.00 \times 10^{-5}$	0,1090
3	$10^{-5}$	$4.00 \times 10^{-5}$	0,1099
4	$10^{-5}$	$5.00 \times 10^{-5}$	0,1109
5	$10^{-5}$	$6.00 \times 10^{-5}$	0,1113
6	$10^{-5}$	$7.00 \times 10^{-5}$	0,1118
7	$10^{-5}$	$8.00 \times 10^{-5}$	0,1120
8	$10^{-5}$	$9.00 \times 10^{-5}$	0,1124
9	$10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-4}$	0,1128



### **III. Protocoles Théoriques**

#### **III.1. Programmes utilisés:**

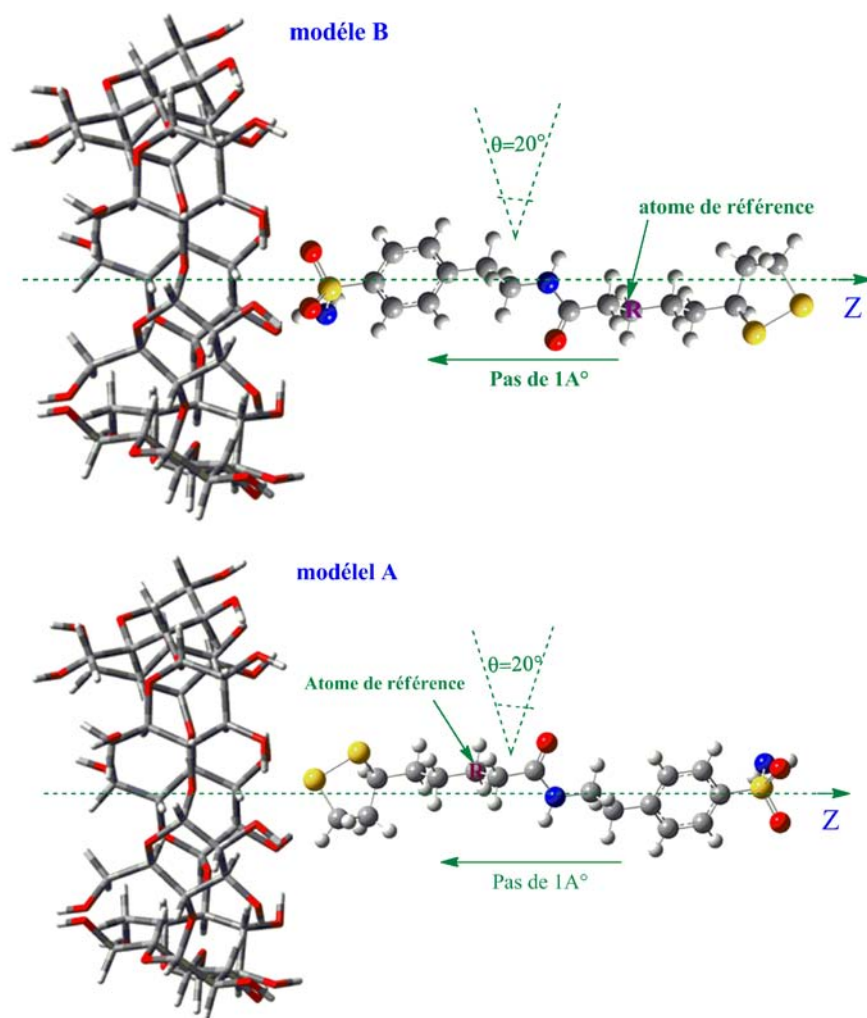
Les données ont été traitées à l'aide des programmes suivants:

- ORIGIN, version 8.0, de Microcal, Inc.
- ChemDraw Ultra 12.0 3D
- HYPERCHEM 7.51
- GAUSSIAN09
- Excel

#### **III.2. Recherche du minimum**

La détermination du minimum est une opération très difficile, car il existe une infinité de points à l'intérieur de la cavité de CD qu'il faut explorer. Donc, nous pouvons seulement l'approcher. Nous avons contribué au développement d'une procédure de recherche systématique du minimum propre à notre complexe d'inclusion SULPA/ $\beta$ -CD. La modélisation a été réalisée par docking de la structure optimisée du PIC dans la cavité de la  $\beta$ -CD. Ainsi, le processus d'inclusion consiste à placer en premier, les atomes d'oxygène glucosidiques de la  $\beta$ -CD sur le plan XY, puis le SULPA a été placé sur l'axe Z. Durant Le processus de complexation, les coordonnées de la  $\beta$ -CD sont maintenus fixes et la molécule SULPA est déplacée par translation. Par conséquent, l'atome de référence est placé au préalable à la position 10 Å, est déplacé pas par pas de 1 Å, selon l'axe axial OZ, vers le point symétrique -10 Å en traversant bien évidemment le cœur de la  $\beta$ -CD. A chaque déplacement, la molécule est mise en mouvement rotationnel autour de l'atome de référence avec un incrément angulaire de 20 ° jusqu'à atteindre 360°. Cette étape est effectuée afin d'explorer le maximum possible de la géométrie tridimensionnelle la plus stable. Il est intéressant de mentionner qu'à chaque mouvement, que ce soit déplacement ou rotation autour de la l'atome de référence, le système est optimisée sans aucune contrainte en utilisant la méthode semi-empirique PM3 choisie. Une fois que tous les minimums locaux sont déterminés il sera donc possible de localiser le minimum absolu.

Lors de la complexation, deux modèles d'inclusion (2 orientations) ont été pris en compte et la molécule SULPA invité a été insérée graduellement dans la cavité de la  $\beta$ -CD (Figure.1).



**Figure.1** : Procédure de l'inclusion de la molécule SULPA dans la  $\beta$ -CD selon les deux modèles (A) et (B).

**Dans le modèle A:**

L'hétérocycle 1-2-Dithiolane de la molécule SULPA est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD.

**Dans le modèle B:**

L'arylsulfonamide de la molécule SULPA est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD.

On note que l'utilisation de ces minimums locaux permet de tracer les courbes des énergies du complexe en fonction de la distance parcourue par la molécule invitée le

long du processus de l'inclusion. Les résultats du processus théorique de l'inclusion de SULPA dans la  $\beta$ -CD sont présentés dans le tableau.4 donnés ci- après:

**Tableau.4:** Énergies du la complexation pour les deux orientations A et B.

<b><math>\beta</math>-CD-SULPA</b>		
<b>Z (A°)</b>	<b>Energie (Kcal/mol) orientation A</b>	<b>Energie (Kcal/mol) orientation B</b>
10	-18.734	-15.431
9	-18.85	-13.199
8	-18.85	-13.564
7	-10.939	-13.564
6	-10.939	-12.405
5	-17.513	-12.611
4	-16.328	-12.479
<b>3</b>	<b>-24.02</b>	-19.057
2	-19.012	-17.734
1	-18.877	-12.843
0	-18.242	-13.341
-1	-18.664	-18.664
-2	-17.639	-13.479
<b>-3</b>	-17.639	<b>-22.614</b>
-4	-17.412	-14.346
-5	-18.353	-15.483
-6	-21.275	-18.066
-7	-20.973	-21.425
-8	-17.727	-8.412
-9	-11.554	-15.684
-10	-12.154	-15.73

# ***ANNEXE***

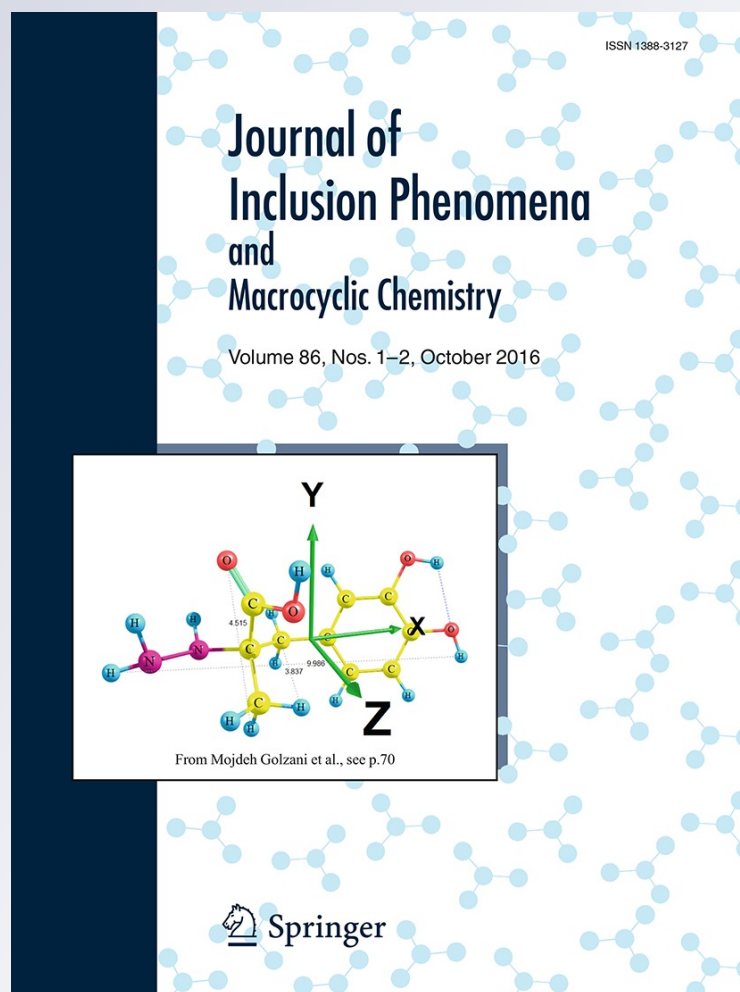
*Spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of  $\beta$ -cyclodextrin with N-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide*

**Habiba Bouzit, Maamar Stiti & Mohamed Abdaoui**

**Journal of Inclusion Phenomena and Macrocylic Chemistry**  
and Macrocylic Chemistry

ISSN 1388-3127  
Volume 86  
Combined 1-2

J Incl Phenom Macrocycl Chem (2016)  
86:121-134  
DOI 10.1007/s10847-016-0647-7



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of $\beta$ -cyclodextrin with *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide

Habiba Bouzit<sup>1,2</sup> · Maamar Stiti<sup>1</sup> · Mohamed Abdaoui<sup>1</sup>Received: 4 January 2016 / Accepted: 28 July 2016 / Published online: 6 August 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** Spectroscopic investigation supported by molecular modeling methods has been used to describe the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) with *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide in solution and in solid state. By using UV–Vis absorption, the stoichiometric ratio of the complex was found to be 1:1 and the stability constant was evaluated as  $1.3415 \cdot 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}$ . Solid state characterization by FT-IR spectroscopy provided remarkable evidences of the formation of inclusion system. Moreover, semi-empirical calculations using PM3 level of theory and hybrid method ONIOM2 clearly indicate that the formed complexes are energetically favored in vacuum and in solution. From NBO analysis, the mutual interactions between  $\beta$ -CD and SULPA were analyzed and discussed.

**Keywords** *N*-(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide · Lipoic acid · hCA IX inhibitors ·  $\beta$ -Cyclodextrin · Inclusion complex · Molecular modeling

## Introduction

Sulfonamides are a very useful structure, leading to a large family of compounds exhibiting a wide variety of pharmacological activities such as antibacterial, hypoglycemic, diuretic, anticonvulsant, anti-carbonic anhydrase, antithyroid, antitumor, HIV protease inhibitor activities and anti-inflammatory [1, 2]. Among this broad spectrum of activities showed by sulfonamides, their role as inhibitors of the zinc containing metalloenzyme carbonic anhydrase (CA) has been discovered and clinically exploited. However, most of the clinically used sulfonamides present unfavorable physicochemical properties such as low water solubility and bad therapeutic index, owing to several undesired side effects [3, 4].

Modern drug design not only focuses on the pharmacological activity of a drug such as a compound but also considers its ability to be absorbed and to reach its site of action. Low water solubility continues to influence the development of many potential drug candidates [5, 6]. This is the reason why different strategies using prodrug, solid dispersions, salt compounds and complexes have been developed to exceed the problem of poor solubility of drugs [7, 8]. Among all the solubility enhancement techniques, inclusion complex formation technique has been employed more precisely to improve the aqueous solubility, dissolution rate, and bioavailability of poorly water soluble drugs. Inclusion complexes are formed by the insertion of the hydrophobic molecule (known as guest) into the cavity of another molecule or group of molecules (known as host). The most commonly used host molecules are cyclodextrins [9].

Cyclodextrins (CDs) are seductive cyclic oligosaccharides composed of glucopyranose units. The most used CDs are  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs, which are built up from six,

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10847-016-0647-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mohamed Abdaoui  
abdaoui.mohamed@univ-guelma.dz

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Appliquée, Université 8 Mai 1945, BP 401, 24000 Guelma, Algeria

<sup>2</sup> Research Centre in Analytical Chemistry and Physics (CRAPC), BP 248, Algiers RP, 16004 Algiers, Algeria

seven and eight glucopyranoses, respectively. Due to their unique structure, characterized by a chiral and hydrophobic cavity, CDs have been successfully used as chiral selectors and drug delivery systems, due to its exterior hydrophilic surface and interior hydrophobic cavity.

Complexation of a large variety of guest compounds with CDs or modified cyclodextrins can enhance the apparent water solubility of the guest, increase stability against the effects of light, heat, and oxidation, mask undesirable physiological effects, in addition to other important properties [10, 11].

Recently, there has been considerable interest in the synthesis and pharmacological property of human carbonic anhydrase (hCA) inhibitors [12–15]. Interestingly, the inhibition of transmembrane, tumor-associated isozyme hCA IX with a library of aromatic and heteroaromatic sulfonamides has been investigated. Unfortunately, most of these compounds have very limited water solubility and exhibit some serious side effects due particularly to their low selectivity by inhibiting the other CA isozymes of major physiological functions [16–18].

Previously, we have synthesized and studied a new class of carbonic anhydrase inhibitors, mainly the *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide (Fig. 1), a specific CAIX inhibitor exhibiting an effective antitumor activity [19].

This poorly water soluble compound that we have denoted by SULPA bears a chiral carbon atom and therefore occurs as *R*- and *S*-enantiomers.

Furthermore, according to a Nano approach, which consisted in grafting this compound onto gold nanoparticles (AuNPs), we found that the activity and selectivity of this lipoic acid tailed sulfonamide were dramatically enhanced. However, knowing that the 1,2-dithiolane ring in SULPA compound is the source of the fascinating

biological properties of lipoic acid, but also of its low solubility in water, instability to light, heat and alkaline conditions [20, 21]. For these reasons, we extend our investigation in this present paper to a Sugar approach in which we report an experimental and theoretical study of the inclusion complexation of  $\beta$ -CD with SULPA in the aim of improving its stability, aqueous solubility and inhibitor activity.

## Experimental

### Materials

The investigated compound namely: *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide was synthesized, purified and characterized according to the procedure described in a previous work in the literature [19] and studied as a racemic mixture.

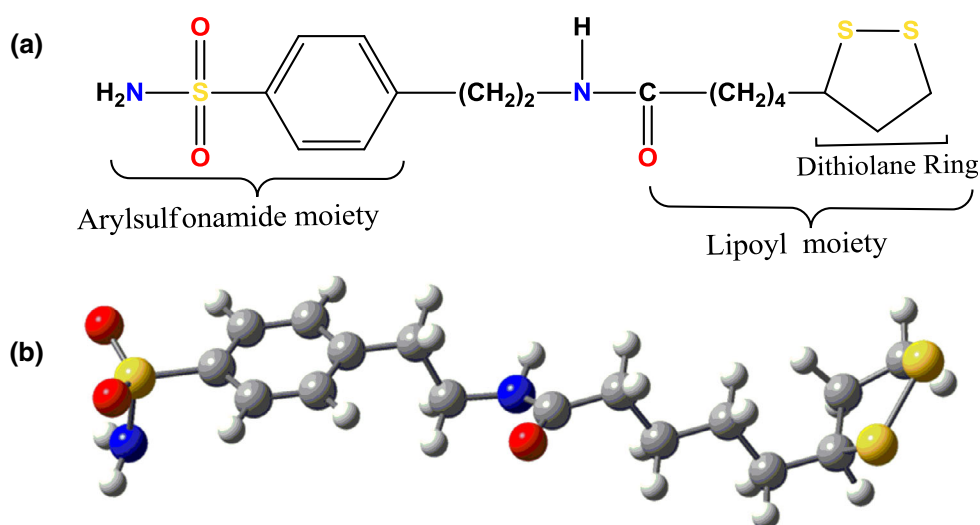
$\beta$ -CD was purchased from Sigma. All used chemicals were of high purity (analytical grade). Double-distilled water was used throughout.  $\beta$ -CD hydrate ( $\beta$ -CD $\cdot$ 12H<sub>2</sub>O) has a water content of 14 % which was taken into account when preparing its solutions.

Fresh solutions were prepared just before taking measurements. The concentration of  $\beta$ -CD was varied from  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  M. The concentration of the SULPA (C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) solutions was equal to  $10^{-5}$  M. The experiments were carried out at room temperature.

### Preparation of inclusion complex in solution

The concentration of stock solution of the SULPA was  $10^{-2}$  M. The stock solution (0.1 ml) was transferred into 100 ml volumetric flasks. The final concentration of

**Fig. 1** **a** Molecular structure of *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide. **b** SULPA structure optimized with PM3 method





SULPA in all the flasks was  $10^{-5}$  M. The experiments were carried out at room temperature (25 °C). Varying concentrations of  $\beta$ -CD solution (ranging from  $2.0 \cdot 10^{-5}$  to  $1.0 \cdot 10^{-4}$  M) was added. The mixed solution was shaken thoroughly and analyzed.

### Preparation of inclusion complex in solid state

The inclusion complexes were prepared by using co-precipitation method as follows: To a stirred saturated solution of  $\beta$ -CD in water (2 %) was added slowly a solution of SULPA (1 equiv.) in methanol: water system (10:90, v/v). The mixture was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The solution became turbid and the precipitated complex was recovered by filtration and washed with small amount of methanol and water to remove uncomplexed compound and  $\beta$ -CD, respectively. The precipitate was then dried in vacuum at room temperature for two days and stored in an airtight bottle.

### Instruments

The electronic absorption spectral measurements were obtained by means of a Shimadzu spectrophotometer (Model U-1800 PC UV-Vis spectrophotometer) equipped with a xenon arc lamp. The wavelengths ( $\lambda$ ) are recorded in the range of 400–220 nm and the measurements were carried out in acetonitrile.

FT-IR spectra of the samples ( $\beta$ -CD, SULPA and their inclusion complex powder) were obtained on a Spectrum one Perkin Elmer FT-IR. The samples were first ground and mixed thoroughly with KBr: an infrared transparent matrix. The KBr disks were prepared by compressing the powder. The scans were obtained from 500 to  $4000 \text{ cm}^{-1}$  at resolution of  $1 \text{ cm}^{-1}$ .

### Molecular modeling

Molecular modeling of CD complexes is among computational techniques and theoretical methods that are used to predict their molecular behaviors, specifically, information about their geometry and the nature of interactions between the host and the guest molecules.

In our study, the initial geometry of SULPA structure was constructed with the use of Hyperchem software 7.5 molecular modeling package [22]. The starting structure of  $\beta$ -CD was constructed with CS Chem3D Ultra (Version 10, Cambridge software) from the crystal structure. Molecular modeling of the inclusion complex for 1:1 stoichiometry and all calculations were performed using Gaussian 09 program [23].

The inclusion process was emulated manually by translating the guest molecule into the  $\beta$ -CD cavity along the Z axis from  $-10 \text{ \AA}$  to  $+10 \text{ \AA}$  with  $1 \text{ \AA}$  step. By using semi-empirical quantum mechanical calculations at PM3 level of theory, the geometry optimization and the energy minimization were carried out as described in the literature [24] (details were also provided in Supporting Information).

It is generally accepted that the approach of the guest molecules to the CD cavity is more favorable towards the wider rim side of the cavity, therefore, as showed below in Fig. 2, we optimized both the two possible orientations labeled A and B:

- (i) Dithiolane ring of SULPA inserted into the wide rim of  $\beta$ -CD, namely A model.
- (ii) Arylsulfonamide ring of the guest inserted into the wide rim of  $\beta$ -CD, namely B model.

The coordinate systems and inclusion process of SULPA into  $\beta$ -CD according to both orientations A and B are shown in Fig. 2.

The solvent effects on the conformational equilibrium have been investigated using the PCM model for water ( $H_2O$ ) ( $\epsilon = 78.39$ ), dimethylsulfoxide (DMSO) ( $\epsilon = 46.7$ ) and acetonitrile ( $CH_3CN$ ) ( $\epsilon = 36.2$ ) as solvents with PM3 method.

The complexation energy ( $E_{\text{complex}}$ ) upon complexation between  $\beta$ -CD and SULPA is calculated for the minimum energy structures according to the following equation [25, 26].

$$E_{\text{complexation}} = E_{\text{complex}} - (E_{\beta\text{-CD}} + E_{\text{SULPA}}) \quad (1)$$

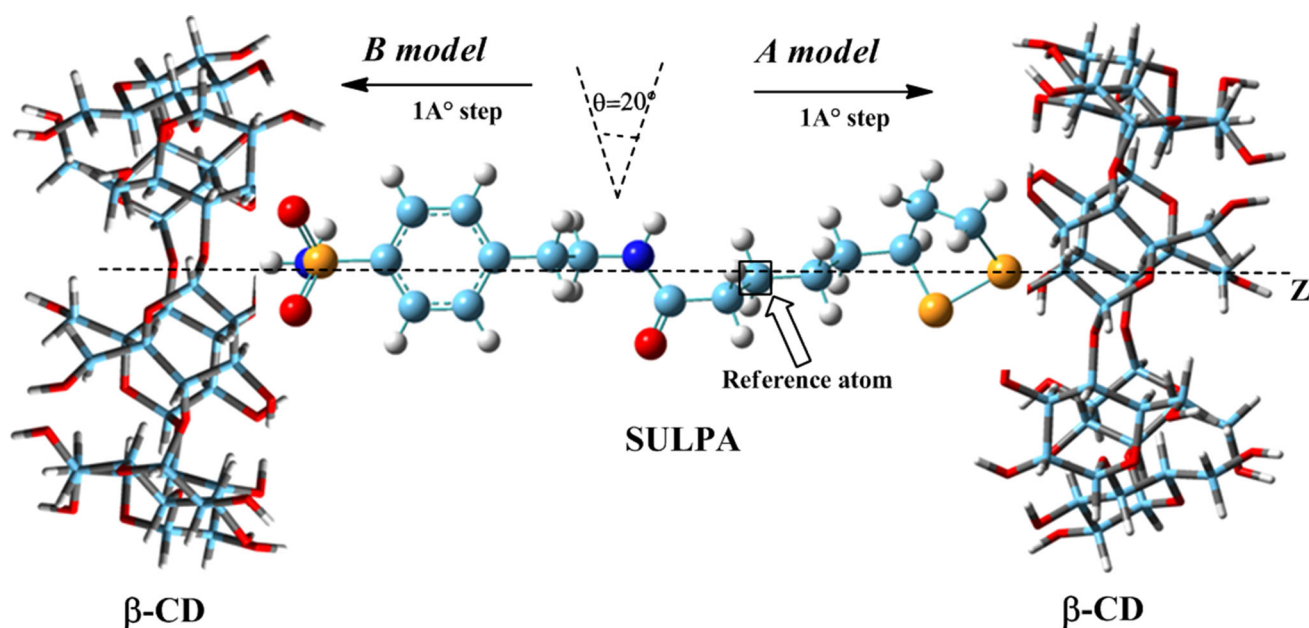
Where  $E(\text{complex})$ ,  $E(\beta\text{-CD})$  and  $E(\text{SULPA})$  are the total energy of the optimized most stable complex, the free optimized  $\beta$ -CD and the free optimized guest SULPA molecule, respectively.

The density functional theory (DFT) single-point calculation is applied to calculate also the deformation energy ( $E_{\text{DEF}}$ ) of each component (host or guest), based on the following equation:

$$E_{\text{DEF}}[\text{component}] = E[\text{component}]_{\text{sp}}^{\text{opt}} - E[\text{component}]_{\text{opt}} \quad (2)$$

Where  $E[\text{component}]_{\text{sp}}^{\text{opt}}$  stands for the single point energy of the component on the configuration taken from the optimized complex geometry and  $E[\text{component}]_{\text{opt}}$  its energy when it is optimized in free form. The energy values were obtained from Eq. (2) by decomposing the optimized complex and performing a single point energy calculation on each resulting species.

For a deeper understanding of the encapsulation process and to improve the precision of the theoretical results, an



**Fig. 2** Procedure of inclusion of SULPA into  $\beta$ -CD according to both orientations A and B. The *horizontal arrows* indicate the direction of displacement of the guest molecule during the complexation process

ONIOM method of calculation was used. This method allows different levels of theory to be applied to different parts of a molecular system [27]. In the two-layered ONIOM method (ONIOM2), the molecular system being studied is split into two layers: an inner and an outer layer. The inner layer consists of the most critical elements of the system, and the remainder of the system includes outer layer. In the terminology used by Morokuma et al. [28], the ONIOM energy is described as:

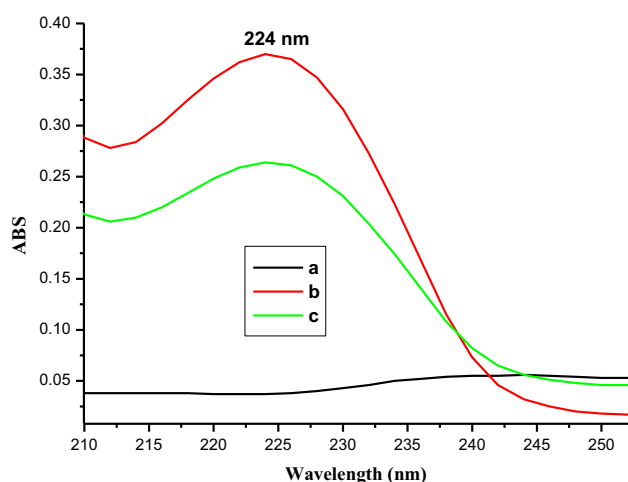
$$E_{\text{ONIOM}} = E(\text{high, model}) + (E(\text{low, real}) - E(\text{low, model})) \quad (3)$$

where  $E(\text{high, model})$ ,  $E(\text{low, real})$  and  $E(\text{low, model})$  represent the energy of the inner layer (SULPA) treated with the high level of theory, the energy of the entire system (the complex ( $\beta$ -CD/SULPA)) treated with the low level of theory and the energy of the model system ( $\beta$ -CD) also treated with the low level of theory, respectively.

## Results and discussion

### Absorption spectral characteristics of SULPA in $\beta$ -CD

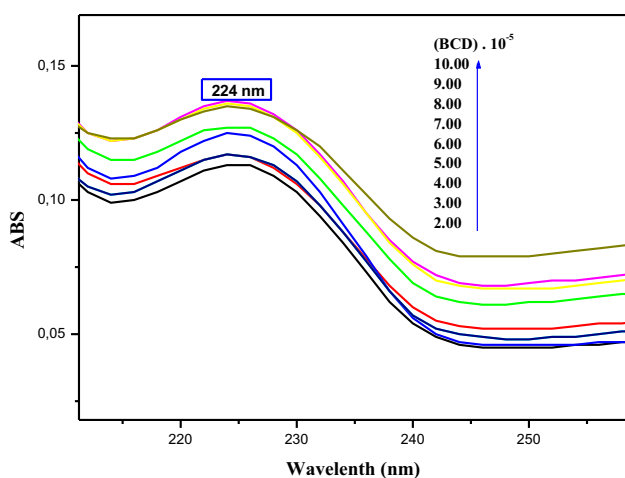
The inclusion phenomena in acetonitrile solution of the SULPA within the hydrophobic cavity of the  $\beta$ -CD was investigated through UV/Vis spectroscopy (Fig. 3). The absorption spectrum of the SULPA ( $1.00 \cdot 10^{-5}$  M) itself without  $\beta$ -CD exhibits a single absorption maximum at 224 nm, in addition, there was no noticed spectral shift in



**Fig. 3** UV spectra of: **a** free  $\beta$ -CD, **b** SULPA, **c** their inclusion Complex  $\beta$ -CD/SULPA in acetonitrile

the presence of  $\beta$ -CD ( $1.00 \cdot 10^{-5}$  M) except an increase in the intensity.

Figure 4 shows absorption spectra of SULPA solution ( $1.00 \cdot 10^{-5}$  M) containing various concentrations of  $\beta$ -CD (between  $2.00 \cdot 10^{-5}$  and  $1.00 \cdot 10^{-4}$  M). Upon the stepwise addition of  $\beta$ -CD, the absorption peak at 224 nm gradually increases in intensity, but don't shows any shift in the wave peak (bathochromic or hypsochromic shift) this behavior might suggest strong interactions between  $\beta$ -CD and SULPA and formation of inclusion complex. Further, the increase of absorbance when adding  $\beta$ -CD solutions has been attributed to the enhanced dissolution of SULPA



**Fig. 4** Absorption spectra of SULPA ( $1.00 \cdot 10^{-5}$  M) upon adding various concentrations of  $\beta$ -CD in acetonitrile

through the hydrophobic interaction of  $\beta$ -CD cavity [29, 30].

#### Determination of the stoichiometry of the complex

The stoichiometry of the complex  $\beta$ -CD/SULPA was studied using the Job method, also known as the continuous variation method [31, 32]. Briefly, the experiments use stock solutions with different volumes of equal molar concentrations of Host and Guest components which were mixed in such a way that their total volume remains constant and absorbance was plotted versus molar ratio (the molar of  $\beta$ -CD divided by the total molar of  $\beta$ -CD and SULPA).

$$\text{Molar ratio} = \frac{V_{\beta\text{-CD}}}{V_{\beta\text{-CD}} + V_{\text{SULPA}}} \quad (4)$$

Where  $V_{\beta\text{-CD}}$  and  $V_{\text{SULPA}}$  are the volumes of  $\beta$ -CD and SULPA solutions, respectively.

The Job's plot is shown in Fig. 5a where we noticed that the UV absorbance changes between free and complexed SULPA. The Job's plot maximum peak was obtained at molar ratio = 0.5, which indicates that a complex with a 1:1 stoichiometry between  $\beta$ -CD and SULPA is predominant in the solution. Besides that, the presence of isosbestic point in the absorption spectra Fig. 5b is a strong indicative of the 1:1 inclusion complex formation [33].

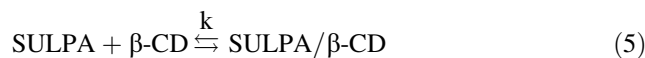
#### Determination of the stability constant of the complex

The stability constant value of host–guest complexes is a useful index of their binding strength. In our study, the stability constant ( $K$ ) of  $\beta$ -CD/SULPA complex has been determined in acetonitrile, with Benesi–Hildebrand method

[34–36], which comprises varying the concentration of  $\beta$ -CD while fixing that of SULPA one. In this approach, we expressed the ratio of the concentration of SULPA and maximum absorbance versus the inverse of the concentration of  $\beta$ -CD.

Assuming that the  $\beta$ -CD forms an inclusion complex of 1:1 stoichiometry with the SULPA.

In such case, the inclusion complex is present in solution in dynamic equilibrium with its constituents as shown below in Eq. (5), on which the Benesi–Hildebrand Eq. (6) can be applied.



$$\frac{[\text{SULPA}]}{\text{Abs}} = \frac{1}{K\epsilon} \times \frac{1}{[\beta\text{-CD}]} + \frac{1}{\epsilon} \quad (6)$$

Thus, the plot of  $[\text{SULPA}]/\text{Abs}$  versus  $(1/[\beta\text{-CD}])$ , displayed in Fig. 6, shows a good linearity with a correlation factor of  $R^2 = 0.998$ . This confirms the formation of the inclusion complex between  $\beta$ -CD and SULPA with a stoichiometry of 1:1.

From the intercept ( $1/\epsilon$ ) and the slope ( $1/K\epsilon$ ) values of this plot shown in (Fig. 6), the constant stability ( $k$ ) for the host–guest inclusion complex was calculated and proved to be equal to  $1.34 \cdot 10^4$  (mol/L) $^{-1}$  at 25 °C in acetonitrile solution. The higher value of the formation constant of  $\beta$ -CD/SULPA inclusion complex suggests that  $\beta$ -CD forms stable inclusion complex with SULPA molecule and reveals the presence of strong interactions between the host and the guest [37].

Now, suppose the case where a 2:1 stoichiometry is predominant, since then, the applicable equation becomes:

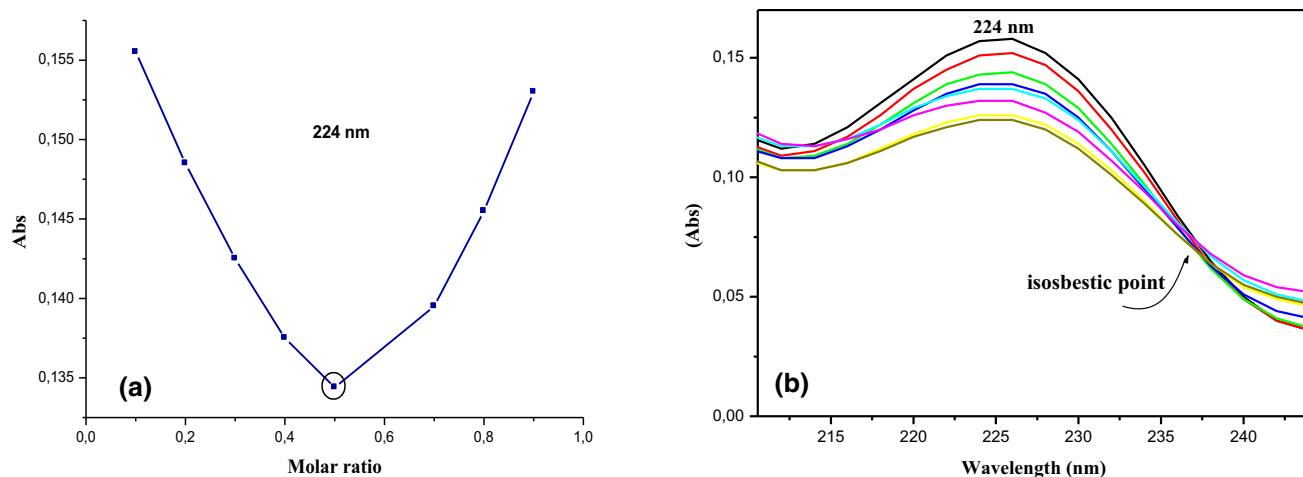
$$\frac{[\text{SULPA}]}{\text{Abs}} = \frac{1}{K\epsilon} \times \frac{1}{[\beta\text{-CD}]^2} + \frac{1}{\epsilon} \quad (7)$$

According to this equation, when the trace of  $[\text{SULPA}]/\text{Abs}$  versus  $1/[\beta\text{-CD}]^2$  is performed with the same data above, we do not get a straight line. This observation suggests that the composition of the complex is not 2:1 and therefore the possibility of forming an inclusion complex with stoichiometry 2:1 between  $\beta$ -CD and SULPA is discarded [38].

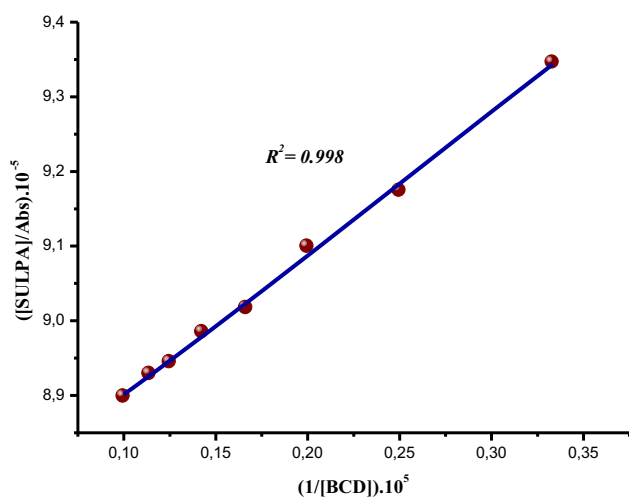
#### Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) study

FT-IR is a very useful tool to confirm the formation of the inclusion complexes. Indeed, the bands resulting from the included part of the guest molecule are generally shifted or their shapes and intensities altered [39].

The FT-IR spectra of  $\beta$ -CD, SULPA, and their inclusion complex are presented in (Fig. 7). The  $\beta$ -CD (Fig. 7b) showed its signature peaks observed at frequencies: 3413,



**Fig. 5** **a** Job's plot of absorbance versus molar ratio of  $\beta$ -CD and SULPA. **b** Evolution of UV/Vis spectra of  $\beta$ -CD/SULPA complex within the same method



**Fig. 6** Benesi-Hildebrand plot of  $([SULPA]/Abs)$  versus  $(1/[\beta\text{-CD}])$  at 25 °C and  $\lambda = 224$  nm

2926 and 1027  $\text{cm}^{-1}$  which are corresponding respectively to the symmetric and asymmetric stretching of OH,  $\text{CH}_2$  stretching, and bending vibration of C–O–H groups in  $\beta$ -CD structure. The infrared spectra of the complex SULPA/ $\beta$ -CD (Fig. 7c) taken in the region of 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  was compared with that of the free guest SULPA (Fig. 7a).

The spectral region from 4000 to 3000  $\text{cm}^{-1}$  is difficult to analyze for  $\beta$ -CD and its complexes due to the co-presence of primary and secondary OH groups of  $\beta$ -CD and water molecules of crystallization in this region. In the SULPA spectrum, the peaks between 3500 and 3400  $\text{cm}^{-1}$  are due to asymmetric and symmetric vibrations of the amino group ( $\text{NH}_2$ ). The band for (N–H) of the amidic group is observed around 3345  $\text{cm}^{-1}$ . The peaks appearing at 3078, 1619 and 1545  $\text{cm}^{-1}$  respectively, are attributed to C–H stretching of aromatic ring, to the amidic (C=O)

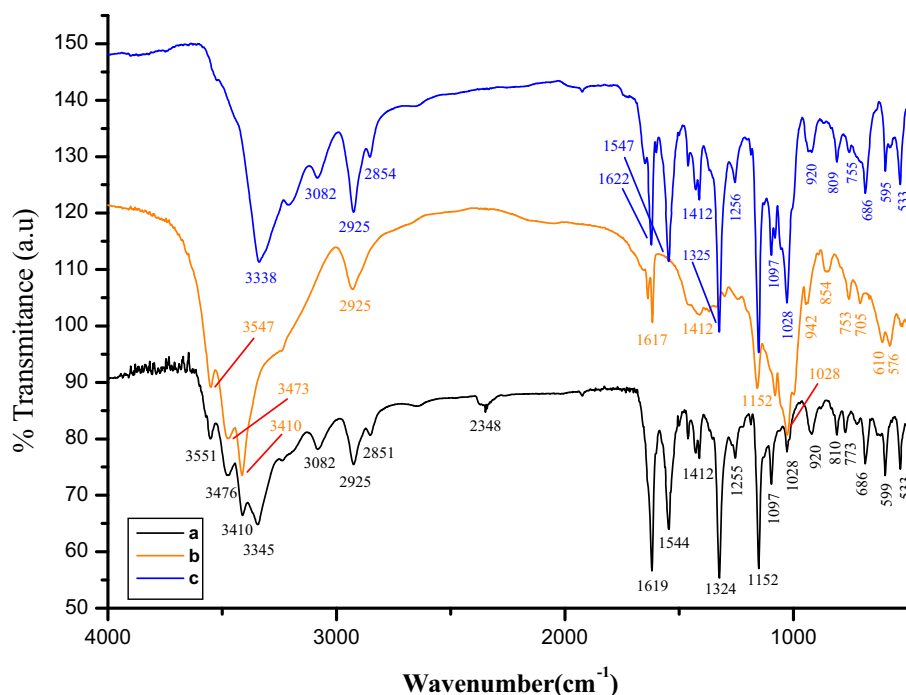
stretching and to NH deformation. The strong absorptions observed at 1324 and 1152  $\text{cm}^{-1}$  are assigned successively to  $\text{SO}_2$  asymmetric and symmetric stretching. The bands positioned at 1097, 920, 810, and 576  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to C–H deformation in phenyl ring, S–N stretching, S–O stretching and S–S stretching in 1,2-dithiolan ring, respectively.

In the complex, the less resolved band at 3338  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the (N–H) stretching of amidic group was shifted by 7  $\text{cm}^{-1}$  and its intensity was slightly diminished. In contrast, the bands observed at 3078 and 920  $\text{cm}^{-1}$  which are attributed successively to C–H stretching of aromatic ring and S–N stretching in sulfonamide group remained unchanged. The band assigned to (C=O) of the amidic group positioned at 1622  $\text{cm}^{-1}$  became shorter and shifted by 3  $\text{cm}^{-1}$  to higher frequencies. An appreciable shift of 43  $\text{cm}^{-1}$  to a lower frequency (533  $\text{cm}^{-1}$ ) and reduction in intensity of the characteristic disulfide bridge S–S stretching band was observed.

According to the above FT-IR analysis, we might suggest that these changes in the characteristic bands of free SULPA can be due to the formation of  $\beta$ -CD/SULPA inclusion complexes in solid state. Thus, only one ring of the guest molecule namely the dithiolan ring seems to be predominantly embedded into the hydrophobic cavity of  $\beta$ -CD. By contrast, these results indicate that the Arylsulfonamide moiety remains outside of the CD cavity.

The dithiolan ring is the most fragile part of SULPA, as it is common for this group to be reduced enzymatically or chemically to thiols or be cleaved when SULPA is under degradation conditions [40]. Therefore, the inclusion of the dithiolan ring into CD cavity and the consequent protective effects on this moiety is the determinative factor for SULPA stability.

**Fig. 7** FT-IR spectra of (a) SULPA, (b)  $\beta$ -CD and (c)  $\beta$ -CD/SULPA complex in KBr



## Molecular modeling studies

### Molecular modeling investigations using semi-empirical PM3 method

Host–guest systems using the complexation of biomolecules with cyclodextrins (CDs) is an ideal model for mimicking enzyme–substrate interactions [41]. Currently, computational methods used in molecular modeling have become an important tool to study such supramolecular systems. Among the most widely used of these methods, we can mention: molecular mechanics (MM), molecular dynamics (MD), semiempirical methods such as Austin Model 1 (AM1), Parametrization Model 3 (PM3), Parametrization Model 6 (PM6), Own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics (ONIOM) method, Natural Bond Orbital (NBO) analysis, Hartree–Fock (HF) and Density Functional Theory (DFT) [42].

To validate our experimental results described above, PM3 method was particularly adopted to investigate the encapsulation process of SULPA in  $\beta$ -CD cavity, since this method has been shown to be a powerful tool in the conformational study involving CD inclusion complexes [43]. The molecular modeling analysis was performed on the optimized geometry of the inclusion complexes of the 1:1 stoichiometry with the lowest energy which were obtained during the simulation of the inclusion process in each one of the orientations considered, as detailed in “Molecular modeling” section.

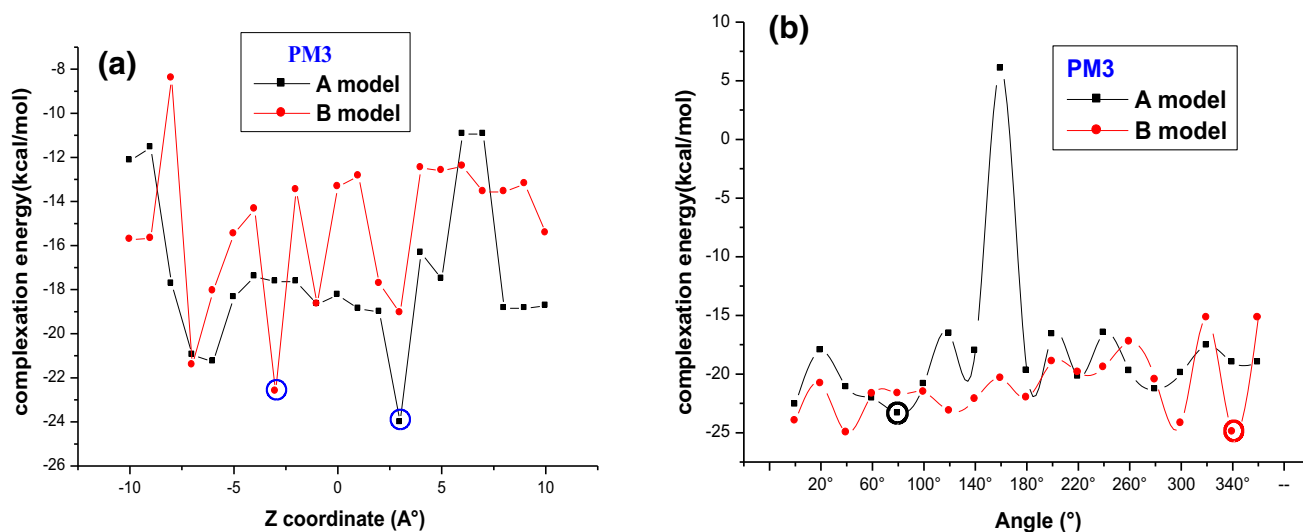
*In vacuum study* In the first approach of this study, calculations were carried out in vacuum.

Figure 8 depicts the graphical representation of the complexing energy (kcal/mol) changes involved during the inclusion passing and circling processes of  $\beta$ -CD with SULPA versus the displacement along the Z axis and the rotational angle, respectively for the two possible models A and B.

*Passing process* Interestingly, in the passing process, complexation energy is the lowest  $-24.02$  kcal/mol, when SULPA is precisely located at the optimum coordinate Z equal to  $3 \text{ \AA}$  for the A complex. However, for the B complex the optimum coordinate Z was located at  $-3 \text{ \AA}$  with complexation energy of  $-22.61$  kcal/mol (Fig. 8a). Consequently, we conclude that the A model, in which the SUPRA molecules penetrate into the CD cavity with dithiolane ring, is the most favorable.

*Circling process* In the circling process the complexing energy is the lowest ( $-23.36$  kcal/mol) when  $\theta$  is equal to  $80^\circ$  for the A complex, but for the B complex, the optimum angle was found to be equal to  $340^\circ$  with complexing energy of  $-24.95$  kcal/mol (Fig. 8-b).

One can notice that in both passing and circling processes, the curves show several local minima, where all complexing energies for the two orientations are negative, indicating that the inclusion process of the SULPA in the  $\beta$ -CD is thermodynamically favorable.



**Fig. 8** Complexation energy changes involved during the passing (a) and circling (b) processes of SULPA in  $\beta$ -CD versus the rotational angle and the displacement along the Z axis in vacuum for both possible models A and B

**Effect of solvents** In the second approach, we undertook PM3 calculations in solutions in order to examine the influence of the solvation effect on the complexation energy, deformation energy and dipole moments of the inclusion complexes. Since in solution, results describe really the binding behavior of  $\beta$ -CD and SULPA than in vacuum; the key features in the complexation of  $\beta$ -CD with SULPA in presence and in absence of solvents are summarized in Table 1.

Like the results obtained in the vacuum, the values of complexation energy in solution listed in Table 1 indicate that the A model is the most favorable for complexation. In all cases, we notice that the energy difference between the two models using  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$  and DMSO as solvents is almost the same (around 1.9 kcal/mol) in favor of A model.

**Dipole changes** As depicted in Table 1, we noticed that both A complex and B complex showed dipole moments in acetonitrile, water and DMSO higher than the corresponding isolated SULPA molecule in the same medium which is an indication of the augmentation of the polarity and the intermolecular interactions in the solution [44].

In addition, the dipole moment of B complex is 1.97 D higher than that of A complex in vacuum. And it is the A complex which possesses the higher dipole moments values in solution and its polarity was dramatically increased when passing from vacuum (4.70 D) to solution as shown in Table 1. From these results, it can be concluded that the polarity of these inclusion complexes have a closed relation with the way in which the SULPA molecule is included in the  $\beta$ -CD molecule and with the medium in which the complexation was carried out.

**Geometrical parameters and deformation energy during inclusion process** According to Pathigoolla et al. [45], the flexibility of guests and  $\beta$ -CD can favor interactions because they can modify their conformations to ensure a better inclusion and enhance the complexation entropy. The deformation energy for each component, the host or the guest molecules, throughout the formation of the complex, was defined as the difference between the single point energy of the component in the optimized complex and its energy when it is optimized in free form.

Calculations on the deformation energy in vacuum reported in Table 1 demonstrate that both  $\beta$ -CD and the SULPA molecule in the A model require more energy than that of the B model in order to adapt their structures for the formation of their complexes; the corresponding values are, respectively, 1.02 and  $-3.83$  kcal/mol for  $\beta$ -CD and 1.15 and 0.91 kcal/mol for SULPA molecule respectively. These results are also confirmed with calculation carried out in solution with  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and DMSO solvents. The Conformational flexibility of the guest and host structures are one of the important structural requirements for complexation process. This can be more supported by the geometric parameters (bond distances, bond angles and dihedral angles) of SULPA before and after inclusion in  $\beta$ -CD (Results are provided in the supplementary data).

It is clear that inside  $\beta$ -CD (in both models A and B), the SULPA molecule has completely changed its initial topology. The alteration was more significant in dihedral angles, particularly, in aliphatic chain of lipoyl moiety and in the dithiolane ring, which indicate that SULPA adapt a better conformation inside the host cavity to form a more stable inclusion complex.

**Table 1** Energies (kcal/mol) and dipole moments (Debye) at PM3 calculations and single point energies evaluated at B3LYP/6-31G(d) and HF/6-31G(d) for  $\beta$ -CD/SULPA inclusion complexes

Energetic terms	SULPA	$\beta$ -CD	A model	B model	$\Delta E$
PM3(in vacuum)					
E	-93.65	-1449.12	-1566.79	-1565.38	
$E_{\text{complexation}}$			-24.02	-22.61	
$E_{\text{deformation}}$ (SULPA)			1.15	0.91	
$E_{\text{deformation}}$ ( $\beta$ -CD)			1.02	-3.83	
$\mu^{\text{d}}$ (D)	7.28	4.10	4.70	6.67	
B3LYP/6-31G(d)					
E			-4034121.97	-4034118.50	3.47
HF/6-31G(d)					
E			-4013992.45	-4013989.17	3.28
PM3 (in solvents)					
E (CH <sub>3</sub> CN)	-114.96	-1483.04	-1609.87	-1607.93	
$E_{\text{complexation}}$			-11.87	-9.92	
$E_{\text{deformation}}$ (SULPA)			0.77	1.38	
$E_{\text{deformation}}$ ( $\beta$ -CD)			2.16	4.92	
$\mu^{\text{d}}$ (D)	10.08	7.60	14.69	13.56	
E (H <sub>2</sub> O)	-115.41	-1474.73	-1611.32	-1609.34	
$E_{\text{complexation}}$			-21.46	-19.48	
$E_{\text{deformation}}$ (SULPA)			0.29	0.66	
$E_{\text{deformation}}$ ( $\beta$ -CD)			-6.97	-4.15	
$\mu^{\text{d}}$ (D)	8.21	3.18	14.83	13.65	
E (DMSO)	-114.75	-1474.18	-1610.52	-1608.54	
$E_{\text{complexation}}$			-21.58	-19.60	
$E_{\text{deformation}}$ (SULPA)			0.28	0.92	
$E_{\text{deformation}}$ ( $\beta$ -CD)			-7.06	-4.27	
$\mu^{\text{d}}$ (D)	8.14	3.09	14.77	13.59	
B3LYP/6-31G(d)					
E (CH <sub>3</sub> CN)			-4034199.68	-4034199.22	0.47
HF/6-31G(d)					
E (CH <sub>3</sub> CN)			-4014094.42	-4014093.56	0.86

$\Delta E$  is relative energy difference,  $\Delta E = E$  (B model) –  $E$  (A model)

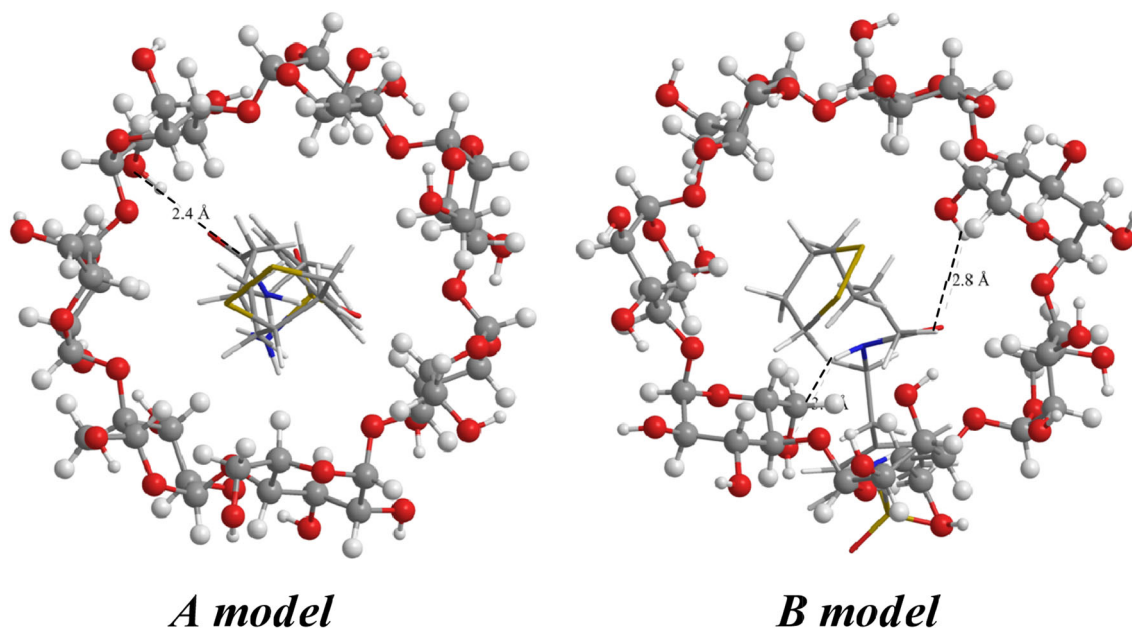
All energies in kcal/mol,  $\mu$  dmoment in Debye (D)

**Hydrogen bonding in the complex** From the above discussions on the PM3 optimized structures, we can confirm that in both models, the SULPA molecule is inserted in the hydrophobic cavity of  $\beta$ -CD. Further insight, reveals that there are intermolecular H-bonds in these structures (shown as black dashed line in Fig. 9); which have a crucial role in stabilization of complexes, in particular those having bond lengths ranging from 2.4 to 3.1 Å, just falling in the reported data [46], such as H bonds established between the oxygen atoms O(162) of amide groups H–N–C=O in SULPA molecule and hydrogen atoms H(141) and H(136) of secondary and primary hydroxyl groups of  $\beta$ -CD in A and B complexes respectively and hydrogen atoms H(185) of amide groups H–N–C=O in SULPA molecule with the oxygen atom O(78) of primary hydroxyl groups of  $\beta$ -CD. The insertion of SULPA into the hydrophobic cavity of  $\beta$ -

CD changes the preference of hydrogen bridges and leads to the decrease of flexibility of the guest and increase of its stability.

#### DFT single point and Hartree–Fock calculations

The evidence for the formation of inclusion complex preferably in A model was proved by using a more accurate method. Thus, by proceeding with DFT single point calculations at the B3LYP/6-31 G(d) levels and Hartree–Fock HF/6-31G(d) to the PM3 optimized geometries, we can observe from calculation results summarized in Table 1, that in vacuum as in acetonitrile solution, the single point energy calculated by DFT and HF is lower in the A complex than that in the B complex. This provides important support to our above result and thus, predicts that the

*A model**B model*

**Fig. 9** Geometrics structures of  $\beta$ -CD/SULPA complexes optimized by PM3 method in Acetonitrile, the possible intermolecular hydrogen bonds are indicated by *dotted lines*

dithiolane ring has a preference to be embedded in cavity of the  $\beta$ -CD rather than the Arylsulfonamide moiety. Finally it is important to notice that in all cases, the results of both methods DFT and HF are converging and are in agreement with those obtained by the PM3 semi-empirical method in solutions.

#### *ONIOM2 calculations*

In order to further understand molecular recognition between  $\beta$ -CD and SULPA, we rationalized our study by adopting the ONIOM2 method. Since this hybrid method allows a high level calculation on just a small part of the critical molecular system and incorporate the effects of the remaining items at a lower level of theory, to give an expression of energy compatible with similar accuracy to a high calculation level on the complete system [47]. Within this approach, we submitted the host molecule  $\beta$ -CD to the low level of quantum calculations PM3 method, while the guest molecule SULPA was treated by the [(B3LYP/6-31G(d):PM3) high level of DFT theory and (RHF/6-31G(d):PM3). As can be seen in Table 2, we reported and compared the energetic values ( $E_{\text{ONIOM2}}$ ) in vacuum and in acetonitrile for the two models A and B computed with ONIOM2 method, to those obtained from PM3 calculations. We found that ONIOM2 calculations confirm PM3 results. Indeed, both ONIOM2 (B3LYP/6-31G (d):PM3) and ONIOM2 (RHF/6-31G (d):PM3) allowed A model to be more favorable than B model by respectively 0.13, 0.26 kcal/mol in vacuum and 1.42, 1.75 kcal/mol in

acetonitrile. We notice that the relative energy difference of the optimized complexes computed by the ONIOM2 method has almost the same order of magnitude than that obtained by PM3 method. Consequently, this is another proof of the tailoring and the effectiveness of the PM3 semi-empirical calculations in inclusion complexes.

#### *Thermodynamic parameters of inclusion complexes*

The statistical thermodynamic calculations carried out at 1 atm and 298.15 K by PM3, were also performed to confirm the completeness of our optimization. The thermodynamic parameters (enthalpy, entropy, free energy) of the guest, host and inclusion complexes are summarized also in Table 2. The obtained results demonstrate that 1:1  $\beta$ -CD/SULPA complex is favored by a negative enthalpy change, suggesting that the complexation is exothermic and is an enthalpy-driven process in vacuum. Furthermore, the enthalpy change of complexes is more negative for A complex indicating a stronger interaction between  $\beta$ -CD and SULPA and showing that the A model is the most thermodynamically favorable. The thermal Gibbs free energy change  $\Delta G$  is also more negative for A complex which implies that the inclusion process proceeded spontaneously at 298.15 K and the A complex is the most thermodynamically stable. Both enthalpy change  $\Delta H$  and entropy change  $\Delta S$  are negative, which indicate that the inclusion process is an exothermic and enthalpy controlled process [48]. The corresponding negative entropy change is assigned to a diminution of the degrees of freedom of the



**Table 2** Thermodynamic parameters and HOMO–LUMO energy calculations using the PM3 method and relative energy for the optimized structures of complexes  $\beta$ -CD/SULPA in both models as calculated by ONIOM2 method

Parameter	SULPA	$\beta$ -CD	Amodel	Bmodel	$\Delta E$
In vacuuo					
EPM3			–1566.79	–1565.38	1.406
$E_{HOMO}$ (eV)	–8.54	–10.79	–8.43	–9.02	
$E_{LUMO}$ (eV)	–1.92	1.644	–1.82	–2.36	
$E_{HOMO}-E_{LUMO}$ gap (eV)	–6.62	–12.43	–6.61	–6.66	
$H_f$	163.17	–660.66	–518.62	–518.12	
$\Delta H$			–21.12	–20.62	
$G_f$	104.45	–783.12	–678.92	–678.73	
$\Delta G$			–0.24	–0.06	
$S$ (cal/mol.K)	196.83	412.57	537.67	538.72	
$\Delta S$ (cal/mol.K)			–71.73	–70.67	
E Oniom B3LYP/6-31G(d): PM3			–1353027.35	–1353027.22	0.13
E Oniom HF/6-31G(d):PM3			–1347994.52	–1347994.26	0.26
In acetonitrile					
EPM3			–1609.87	–1607.93	1.94
$E_{HOMO}$ (eV)	–9.04	–10.87	–9.08	–8.99	
$E_{LUMO}$ (eV)	–2.20	1.60	–2.22	–2.18	
$E_{HOMO}-E_{LUMO}$ gap (eV)	–6.84	–12.48	–6.86	–6.81	
E Oniom B3LYP/6-31G(d): PM3			–1353051.058	–1353049.642	1.42
E Oniom HF/6-31G(d):PM3			–1348011.24	–1348009.49	1.75

All energies in kcal/mol

$E_{HOMO}$  energy of the highest occupied molecular orbital

$E_{LUMO}$  energy of the lowest unoccupied molecular orbital

$\Delta A = A_{\text{complex}} - (A_{\beta\text{-CD}} + A_{\text{SULPA}})$ , A = H, G or S at P = 1 atm and T = 298.15 K

$\Delta E$  is relative energy difference,  $\Delta E = E$  (B model) – E (A model)

guest while the negative enthalpy change ( $\Delta H$ ) arose from the Van-der-Waal's interactions and H-bonding between the host and the guest which play an important role in the inclusion complexes.

#### Frontier molecular orbital (FMO) study

The charge transfer interaction occurs in CD molecular recognition phenomenon plays a crucial part in the chemical stability of the supramolecular self assembling system. The most important terms in this kind of interaction are contributed from the charge transfer between the highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), called frontier molecular orbitals (FMO), which are the most important orbitals in a molecule.

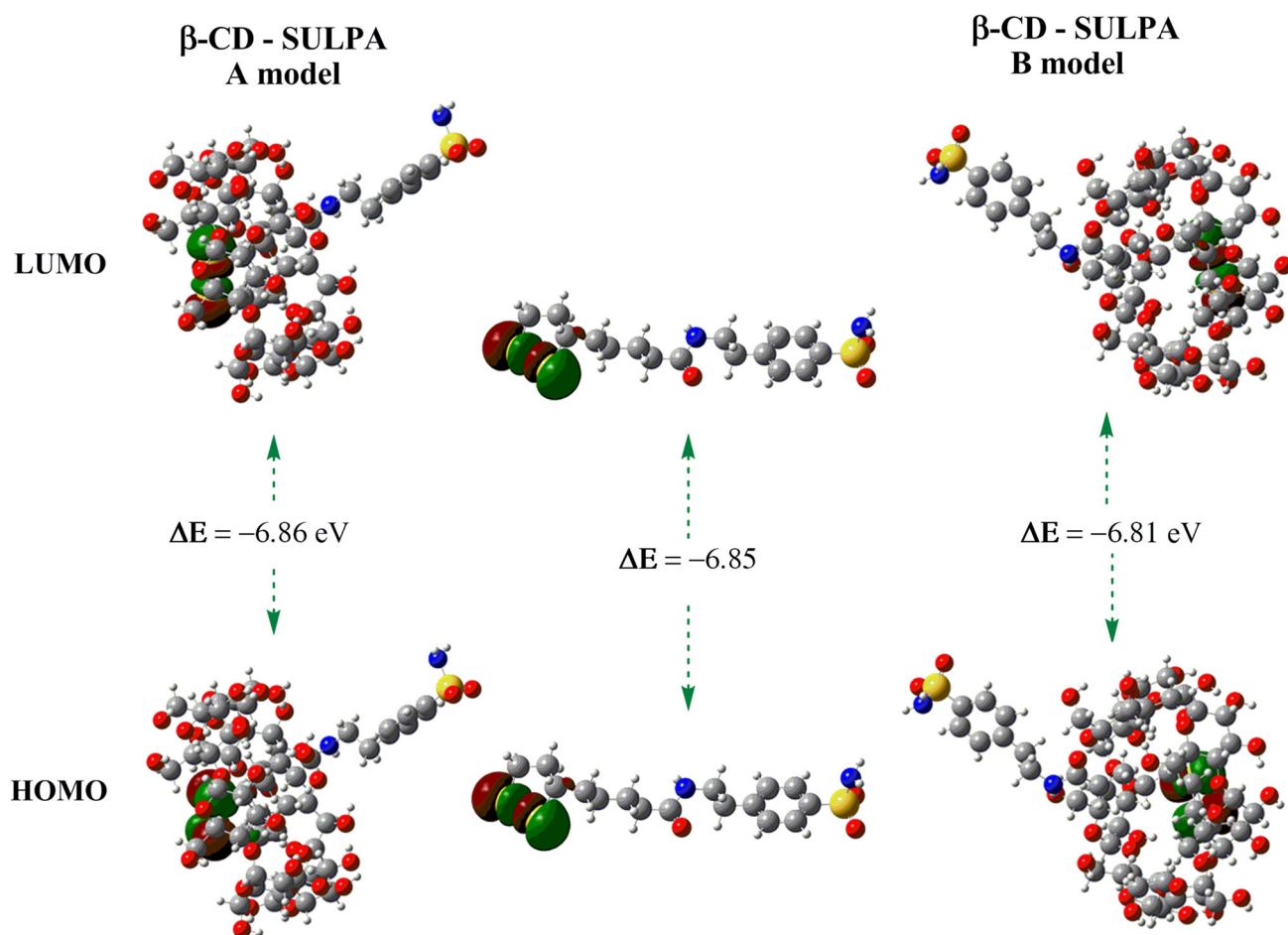
In simple molecule orbital theory approaches, the HOMO energy ( $E_{HOMO}$ ) is in relationship with the ionization potential (I) and LUMO energy ( $E_{LUMO}$ ) has been used to estimate the electron affinity (A) [49]. The energy gap ( $E_{HOMO}-E_{LUMO}$ ) between HOMO and LUMO reflects the eventual charge transfer interaction within the molecule, which explains the chemical reactivity and stability of this molecule and also influence its biological activity.

So, a molecule with a large frontier orbital gap is less polarizable and is generally associated with a low chemical reactivity and high stability [50].

In our study, the HOMO–LUMO analysis (Fig. 10) has been carried out to elucidate information regarding the inclusion complexation between  $\beta$ -CD and SULPA. The calculation was conducted in vacuum and in acetonitrile using the PM3 method. According to the results reported in Table 2, the HOMO–LUMO energy gaps  $\Delta$ (HOMO–LUMO) of the two complexes (A model and B model) are expected to be –6.61 and –6.66 eV in vacuum and –6.86 and –6.81 eV in acetonitrile, respectively. Consequently, we can conclude that the two complexes are highly stable [51] and this result is in good agreement with our other theoretical calculations.

#### Conclusions

In this study, the inclusion complex of  $\beta$ -CD with *N*-[(4-sulfonamidophenyl)ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide was successfully prepared by co-precipitation method and characterized in both the liquid phase and the solid state using (UV–Vis) and (FT-IR) spectroscopy. By



**Fig. 10** Typical contour plots of HOMO and LUMO of the SULPA and the  $\beta$ -CD/SULPA Complexes (*A model* and *B model*) with their energy gaps  $\Delta(\text{HOMO-LUMO})$  in acetonitrile

Job method, and Benesi–Hildebrand equation, respectively, the complex was found to present a 1:1 stoichiometry and its formation constant ( $K$ ) in solution was evaluated. Additionally, a molecular modeling investigation of the interaction between  $\beta$ -CD and SULPA was carried out using PM3, HF, DFT, ONIOM methods and NBO analysis, which allow us to define and analyze two possible orientations of the guest molecule inside the host cavity. The statistical thermodynamic calculations ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) and HOMO, LUMO orbital investigations suggest that the inclusion complex  $\beta$ -CD/SULPA is enough stable and the simulation results indicate that the A complex is more favored than B complex in presence and in absence of solvent. In particular, it is important to note that in both vacuum and solution, the 1, 2-dithiolane ring in the molecule that is most sensitive to chemical or physical attacks was entrapped into the  $\beta$ -CD cavity and therefore was sufficiently well protected.

**Acknowledgments** This paper was supported in part by PNR (08/U24/2011). We acknowledge the Algerian Ministry of Higher

Education and Scientific Research and General Direction of Scientific and Technologic research for financial support.

## References

- Maren, T.H.: Relations between structure and biological activity of sulfonamides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**, 309–327 (1976)
- Weidle, U.H., Tiefenthaler, G., Georges, G.: Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy. *Cancer Genomics Proteomics* **11**, 67–79 (2014)
- Supuran, C.T., Scozzafava, A.: Carbonic anhydrase inhibitors. *Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents* **1**(37), 61–97 (2011)
- Frost, S.C., McKenna, R. (eds.): *Carbonic Anhydrase, Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. Springer, Dordrecht (2014)
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001)
- Dahan, A., Hoffman, A.: Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis

- model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J. Control. Release.* **129**, 1–10 (2008)
7. Savla, S., Surjusee, A., Rokade, V., Sawant, S., Kadu, P.: Approaches to improve solubility of poorly water soluble drugs. *W J P P S* **4**, 610–626 (2015)
  8. Torchilin, V.P.: Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release.* **73**, 137–172 (2001)
  9. Saraf, S.A., Tripathi, G.K., Pandey, M., Yadav, P., Saraf, S.K.: Development of meloxicam formulation utilizing ternary complexation for solubility enhancement. *Pak. J. Pharm. Sci.* **24**(4), 533–538 (2011)
  10. Szejtli, J.: Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1753 (1998)
  11. Loftsson, T., Brewster, M.E.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1017–1025 (1996)
  12. Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C.T.: Carbonic anhydrases, current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **19**, 199–229 (2004)
  13. Supuran, C.T.: Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **27**, 759–772 (2012)
  14. Aggarwal, M., Boone, C.D., Kondeti, B., McKenna, R.: Structural annotation of human carbonic anhydrases. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **28**, 267–277 (2013)
  15. Hassan, I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W.S.: Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 1570–1582 (2013)
  16. Lock, F.E., McDonald, P.C., Lou, Y., Serrano, I., Chafe, S.C., Ostlund, C., Aparicio, S., Winum, J.Y., Supuran, C.T., Dedhar, S.: Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene* **32**, 5210–5219 (2013)
  17. Durgun, M., Turkmen, H., Ceruso, M., Supuran, C.T.: Synthesis of Schiff base derivatives of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonamide with inhibitory activity against carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2377–2381 (2015)
  18. Krall, N., Pretto, F., Neri, D.: A bivalent small molecule-drug conjugate directed against carbonic anhydrase IX can elicit complete tumour regression in mice. *Chem. Sci.* **5**, 3640–3644 (2014)
  19. Stiti, M., Cecchi, A., Rami, M., Abdaoui, M., Barragan-Montero, V., Scozzafava, A., Guari, Y., Winum, J.Y., Supuran, C.T.: Carbonic anhydrase inhibitor coated gold nanoparticles selectively inhibit the tumor-associated isoform IX over the cytosolic isozymes I and II. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16130 (2008)
  20. Maeda, H., Onodera, T., Nakayama, H.: Inclusion complex of  $\alpha$  lipoic acid and modified cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **689**(1–2), 201–206 (2010)
  21. Zhang, S.J., Ge, Q.F., Guo, D.W., Hu, W.X., Liu, H.Z.: Synthesis and anticancer evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 3078–3083 (2010)
  22. Hyperchem. Release 7.51 for windows. Hypercube Inc. (2002)
  23. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Jr. Montgomery, J.A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J. C.T. Wallingford, Gaussian, Inc, (2009)
  24. Yan, C.L., Li, X.H., Xiu, Z.L., Hao, C.: A quantum-mechanical study on the complexation of  $\beta$ -cyclodextrin with quercetin. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **764**, 95–100 (2006)
  25. Tafazzoli, M.: M. hiasi, Structure and conformation of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrin in solution, Theoretical approaches and experimental validation. *Carbohydr. Polym.* **78**, 10–15 (2009)
  26. Yan, C.L., Xiu, Z.L., Li, X.H., Hao, C.: Molecular modeling study of  $\beta$ -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (–)-epicatechin. *J. Mol. Graph. Model.* **26**, 420–428 (2007)
  27. Dapprich, S.: I. Komáromi, K.S. Byun, K. Morokuma, M.J. Frisch, A new ONIOM implementation in Gaussian 98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1**, 461–462 (1999)
  28. Kuno, M., Hannongbua, S., Morokuma, K.: Theoretical investigation on nevirapine and HIV-1 reverse transcriptase binding site interaction, based on ONIOM method. *Chem. Phys. Lett.* **380**, 456–463 (2003)
  29. Siva, S., Thulasidhasan, J., Rajendiran, N.: Host-guest inclusion complex of propafenone hydrochloride with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins: spectral and molecular modeling studies. *Spectrochim. Acta. A* **115**, 559–567 (2013)
  30. Fisli, H., Bensouilah, N., Dhaoui, N., Abdaoui, M.: Effects of solvent, pH and  $\beta$ -cyclodextrin on the fluorescent behaviour of lomustine. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **73**, 369–376 (2012)
  31. Mura, P.: Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution, a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101**, 238–250 (2014)
  32. Kadri, M., Dhaoui, N., Abdaoui, M., Winum, J.Y., Montero, J.L.: Inclusion complexes of 2-chloroethylnitrososulfamides (CENS) with  $\beta$ -cyclodextrin. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 79–84 (2004)
  33. Connors, K.A.: Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability, p. 143. Wiley, New York (1987)
  34. Benesi, H.A., Hildebrand, J.H.: A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2703–2707 (1949)
  35. Szejtli, J.: Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)
  36. Dhaoui, N., Fatfat, M., Abdaoui, M., Barragan-Montero, V.: Inclusion complexes of 2-chloroethyl nitrososulfamides (CENS) in natural and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *Lett. Org. Chem.* **6**, 37–40 (2009)
  37. Fisli, H., Bensouilah, N., Abdaoui, M.: Spectrofluorimetric determination of the antineoplastic agent lomustine based on the sensitizing effect of  $\beta$ -cyclodextrin. *Luminescence* **31**, 871–880 (2016)
  38. Bensouilah, N., Fisli, H., Dhaoui, N., Benali-Cherif, N., Abdaoui, M.: Solvent effects of N-nitroso, N-(2-chloroethyl)N', N'-dibenzylsulfamid and its copper(II) and cobalt(II) complexes: fluorescence studies. *Luminescence* **28**, 30–37 (2013)
  39. Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.: Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th edn. Wiley, New York (2006)
  40. Carofiglio, T., Fornasier, R., Jicsinszky, L., Saielli, G., Tonellato, U., Vetta, R.: Capillary electrophoresis, ROESY NMR and molecular modelling study of the inclusion complex  $\beta$ -cyclodextrin/lipoic acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1191–1196 (2002)
  41. Breslow, R., Dong, S.D.: Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. *Chem. Rev.* **98**, 1997–2011 (1998)

42. Seridi, L., Boufelfel, A.: Molecular modeling study of Lamotrigine/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *J. Mol. Liq.* **158**, 151–158 (2011)
43. Rajendiran, N., Mohandoss, T., Venkatesh, G.: Investigation of inclusion complexes of sulfamerazine with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins, An experimental and theoretical study. *Spectrochim. Acta A* **124**, 441–450 (2014)
44. Castro, R., Berardi, M.J., Cordova, E., de Olza, M.O., Kaifer, A.E., Evanseck, J.D.: Unexpected roles of guest polarizability and maximum hardness, and of host solvation in supramolecular inclusion complexes: a dual theoretical and experimental study. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10257–10268 (1996)
45. Pathigoolla, A., Sureshan, K.M.: Reverse-CD mimics with flexible linkages offer adaptable cavity sizes for guest encapsulation. *Chem. Commun.* **50**, 317–319 (2014)
46. Rajendiran, N., Venkatesh, G., Mohandass, T.: Fabrication of 2D nanosheet through self assembly behavior of sulfamethoxypyridazine inclusion complexes with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins. *Spectrochim. Acta A* **123**, 158–166 (2014)
47. Tschumper, G.S., Morokuma, K.: Gauging the applicability of ONIOM (MO/MO) methods to weak chemical interactions in large systems: hydrogen bonding in alcohol dimers. *J. Mol. Struct. TheoChem.* **592**, 137–147 (2002)
48. Bensouilah, N., Abdaoui, M.: Inclusion complex of N-nitroso, N-(2-chloroethyl) N', N'-dibenzyl sulfamid with  $\beta$ -cyclodextrin, fluorescence and molecular modeling. *C. R. Chim.* **15**, 1022–1036 (2012)
49. Pal, K., Chandra, F., Mallick, S., Koner, A.L.: Effect of solvents and cyclodextrin complexation on acid–base and photophysical properties of dapoxyldye. *J. Photochem. Photobiol. A* **306**, 47–54 (2015)
50. Bani-Yaseen, A.D., Mo'ala, A.: Spectral, thermal, and molecular modeling studies on the encapsulation of selected sulfonamide drugs in  $\beta$ -cyclodextrin nano-cavity. *Spectrochim. Acta A* **131**, 424–431 (2014)
51. Sayede, A.D., Ponchel, A., Filardo, G., Galia, A., Monflier, E.: *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **777**, 99–106 (2006)