

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur
Université de Guelma
Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière
Département des Sciences de la Matière

Mémoire de fin d'étude
Master II



Spécialité : Chimie physique et analytique

Présenté par :

**Ghomeriane Wefa
Zeddouri Rima**

Interaction de la Benzoxazolinone et son dérivé
N-Méthylé avec la β -Cyclodextrine
« Etude théorique et expérimentale »

Sous la Direction de :

Dr. MAAMAR STITI

Juin 2014

Remerciements

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du **Laboratoire de Chimie Appliquée (LCA)**, à l'université 8 Mai 1945 de Guelma. Que le **professeur Mohamed ABDAOUI**, Chef du labo; trouve ici l'expression de notre respectueuse considération et de notre sincère gratitude pour l'intérêt qu'il a accordé à notre travail.

Nous tenons à exprimer notre très sincère reconnaissance à Monsieur le **D^r Maamar STITI** qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail, aussi pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils judicieux et ses orientations précieuses et toute l'attention qu'il nous a accordée le long de la réalisation de ce travail. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ce travail le témoignage de notre profonde gratitude et parfaite considération.

A nos enseignants qui nous ont beaucoup aidés et encouragés durant notre formation.

Nous présentons nos remerciements pour les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.



Dédicace



J'ai l'honneur et la joie de dédier ce modeste travail à :

A mon grand père qui nous quitté en laissant un très grand vide que dieu l'acueil dans sa vaste paradis AHMED

Mon cher père : MOHAMED

En reconnaissance de sa patience et de ses efforts durant toute la durée de ma vie

Ma chère mère : SALIHA

Qui m'a comblé de son amour et de l'éducation qu'elle m'a apportée.

Je dis merci mille fois pour votre compréhension et pour votre soutien

Mes très chers frères : ACHRAF, MERWANE, SALIM et son épouse RADJA.

Mes très chérasses sœurs : ABLA et son mari HAMDI, HASSIBA et son mari SOUFIAN, SIHAM et son mari HAMID.

Et spécialement à TYAD « *Didou* » et OUSSAMA "*Dempion*"

A mes oncles et leurs familles.

A mes tontes et leurs familles.

Mes belles amies : Saida, Imen, Malika, Sarah, Rima, Souhila, Karima, Habiba, Razika, Mira, Zineb, Biba, Asma, fati, Hayet, Wafa et Vanissa.

Mes toutes camarades de la classe 2^{ème} année master chimie physique.



wafa





Dédicace

A dieu le tout miséricordieux

A mon père «Tahar»

Qui s'est dépensé pour moi sans compter, qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

En vous, je vois un père dévoué à sa famille. Ta présence en toute circonstance m'a maintes fois rappelé le sens de la responsabilité.

A ma mère «Fatima»

Qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de nos études.

En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses enfants.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

- *A mes chers frères : Amin, Saïf, Islem.*
- *A mon mari : Walid*
- *A mes belles amis : Imen, Souhila, Wafa*
- *A ma famille : Linda, Nadia, Samia, Na3ima, Fida, Salima.*
- *A mes oncles et leurs famille.*
- *A mes tantes et leurs famille.*

- *Et mon binôme : Wafa*

A toutes celles et tous ceux qui m'aiment

«RIMA»



Liste des tableaux

| N^o | Titre | Page |
|----------------------|---|-------------|
| II.1 | Propriétés physico-chimiques et structurales des principales cyclodextrines. | 16 |
| II.2 | Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications. | 22 |
| III.1 | Caractéristiques physicochimiques et spectroscopiques de la méthyl-3-Benzoxazolinone | 34 |
| III.2 | Comparaison entre les absorptions caractéristiques de la Benzoxazolinone (Benzo) et son dérivé N-méthylé (CH ₃ Benzo) dans l'eau et l'acétonitrile à 10 ⁻⁴ M. | 36 |
| III.3 | Caractéristiques physicochimiques et spectroscopiques du produit obtenu | 38 |
| III.4 | Résultats d'analyse par spectrométrie UV des complexes C ₁ et C ₂ | 42 |
| III.5 | Énergies des complexes (C1) et (C2) prises pour les deux orientations A et B. | 46 |
| III.6 | Chaleurs de formation pour les deux orientations(Ort) A et B dans le vide des complexes C ₁ et C ₂ calculées par (AM1). | 50 |
| III.7 | Chaleurs de formation pour les deux orientations(Ort) A et B dans le vide des complexes C ₁ et C ₂ calculées par (PM3). | 50 |
| III.8 | Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C1 pour les deux orientations A et B dans le vide calculés par PM3 et AM1. | 52 |
| III.9 | Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C2 pour les deux orientations (Ort) A et B .dans le vide calculés par PM3 et AM1 | 53 |
| III.10 | Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C2 pour les deux orientations (Ort) A et B .dans le vide calculés par PM3 et AM1 | 55 |
| III.11 | Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C2 pour les deux orientations (Ort) A et B en présence d'eau et d'acétonitrile calculés par PM3. | 56 |

Liste des figures

| N° | Titre | Page |
|--------------|--|-------------|
| I-1 | Structure générale de la benzoxazolinone | 4 |
| I-2 | Structure générale des acyl-6-Benzoxazolinones | 7 |
| I-3 | Analogie structurale entre la benzoxazolinone et les uréthanes | 9 |
| I-4 | Similitude structurale entre la Benzoxazolinone et la coumarine | 10 |
| I-5 | Analogie structurale entre la méthoxy-6-benzoxazolinone et la mélatonine | 10 |
| I-6 | Exemples d'acyle-6-benzoxazolinone et ses dérivés utilisés en thérapeutique. | 11 |
| II-1 | Structure moléculaire et forme géométrique des cyclodextrines (α , β , γ).les dimensions respectives des CDs obtenues d'après les données cristallographiques. | 14 |
| II-2 | Représentations de la structure chimique des cyclodextrines naturelles. | 15 |
| II-3 | Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion. | 18 |
| II-4 | Représentations schématiques de complexes d'inclusion de stœchiométries différentes | 18 |
| II-5 | Illustration de quelques déformations considérées en MM. | 23 |
| II-6 | Minima locaux et minimum global d'une structure moléculaire | 28 |
| III-1 | Similitude structurale entre la methyl-3-Benzoxazolinone et la coumarine | 34 |
| III-2 | Spectre (IR) de la N-méthylBenzoxazolinone | 35 |
| III-3 | Spectres UV de la Benzo e et son dérivé CH ₃ Benzo dans l'eau et l'acétonitrile à 10 ⁻⁴ M. | 36 |
| III-4 | Spectres(IR) de la β -CD(en vert) de la Benzo (en noir) et leur complexe d'inclusion (C ₁ en rouge). | 39 |
| III-5 | Spectres(IR) de la β -CD(en bleu), de la CH ₃ Benzo(en rouge) et leur complexe d'inclusion (C ₂ en vert). | 40 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| III-6 | Comparaison des absorptions en (IR) des complexes C ₁ et C ₂ par superposition de leurs spectres. | 40 |
| III-7 | Spectres UV du complexe C ₁ et ces précurseurs dans CH ₃ CN et H ₂ O à 10 ⁻⁴ M. | 41 |
| III-8 | Spectres UV du complexe C ₂ et ces précurseurs dans CH ₃ CN et H ₂ O à 10 ⁻⁴ M | 42 |
| III-9 | Structures de la Benzo (à gauche), de la CH ₃ Benzo (à droite) Et de la β-CD (au milieu). | 43 |
| III-10 | Positionnement de la βCD au centre d'un-référentiel xyz. | 44 |
| III-11 | Géométrie de la Benzo et son dérivé N-méthylé. | 45 |
| III-12 | les deux orientations (A et B) de la Benzo pointées vers la face large de la Bcd. | 47 |
| III-13 | les deux orientations (A et B) de la Méthyl Benzo pointées vers la face large de la Bcd. | 47 |
| III-14 | Energies de complexe d'inclusion Benzoxazolinone/ β-CD(C1) en différentes positions Z (A°), pour les deux orientations A et B. | 48 |
| III-15 | Energies de complexe d'inclusion N-methyl Benzoxazolinone/ β-CD (C?) en différentes positions Z (A°), pour les deux orientations A et B. | 48 |
| III-16 | Structures du complexe C1 pour les deux orientations A et B dans le vide correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3 | 54 |
| III-17 | Structures du complexe C2 pour les deux orientations A et B dans le vide correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3. | 54 |
| III-18 | Structures du complexe C1 pour les deux orientations A et B dans l'eau et correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3. | 57 |
| III-19 | Structures du complexe C2 pour les deux orientations A et B dans l'eau et correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3. | 57 |

Liste des schémas

| N^o | Titre | Page |
|----------------------|--|-------------|
| I-1 | Biosynthèse de la Benzoxazolinone | 4 |
| I-2 | Préparation de la benzoxazolinone par fusion de l'urée avec de l'ortho-amino-phénol. | 5 |
| I-3 | Préparation de la la benzoxazolinone par action du phosgène sur l'ortho-amino-phénol. | 5 |
| I-4 | Réaction de substitution sur l'azote de la benzoxazolinone | 6 |
| I-5 | Réaction de formation des bases de Mannich avec la Benzoxazolinone | 6 |
| I-6 | Hydrolyse alcaline de la Benzoxazolinone | 6 |
| I-7 | Réaction d'acylation de la Benzoxazolinone | 8 |
| III-1 | synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone | 33 |
| III-2 | Mécanisme proposé pour la synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone | 33 |
| III-3 | Représentation schématique de la formation d'une inclusion de la Benzoxazolinone ou son dérivé méthylé dans la β cyclodextrine | 34 |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| P.P.A | Acide phosphorique. |
| R-X | Un halogénure d'alkyle . |
| PPP | Acide phosphorique . |
| ALCL₃ | Le chlorure d'aluminium . |
| DMF | Diméthyle formamide . |
| QSAR | Quantitative Structure –Activity Relationships . |
| Benzo | <u>Benzoaxolinone</u> |
| L'AZT | Un médicament anti-VIH . |
| CDs | Cyclodextrines |
| α- CD | Alfa-cyclodextrine . |
| β- CD | Béta-cyclodextrine . |
| γ- CD | Gama-cyclodextrine . |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire . |
| MM | Mécanique Moléculaire . |
| PM3 | Parametric Method 3. |
| MNDO | Modified Neglect of Diatomic Overlap . |
| AM1 | Austrin Model 1. |
| VDW | Van-der-Waals. |
| IR | Infra-rouge. |
| CG TAZE | Cyclodextrine glycosyl transférase |
| E_{lies} | Énergie des interactions entre atomes liée par liaisons covalence |
| E_{non lies} | Énergie des interactions entre atomes non liée par liaisons covalence |
| MO | Orbitales moléculaires |
| LCAO | Combinaison d'orbitales atomique |
| FTIR | Transformée de fourier |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| FR | Rapport frontaux |
| E_{β-CD} | L'énergie de le béta-cyclodextrine |
| E_{invitée} | L'énergie de la molécule invitée |

Sommaire

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale | 1 |
| Chapitre (I) : Benzoxazolinone & produits de transformation | |
| I-1) Description de la Benzoxazolinone..... | 4 |
| I-2-) Préparation de la Benzoxazolinone..... | 4 |
| I-2-a) Voie biochimique..... | 4 |
| I-2-b) Voie chimique..... | 5 |
| Préparation à partir de l'ortho-amino-phénol..... | 5 |
| I-3) Propriétés chimiques de la Benzoxazolinone..... | 5 |
| I-3-1) Substitution à l'azote..... | 5 |
| I-3-2) Ouverture du cycle oxazolinonique (Hydrolyse alcaline et hydrolyse acide)..... | 6 |
| I-3-3) Substitution sur le noyau benzénique de la Benzoxazolinone..... | 7 |
| Acylation de la Benzoxazolinone..... | 7 |
| I-4) Relation entre la structure chimique et les propriétés pharmacodynamiques..... | 8 |
| I-5) Conclusion..... | 12 |
| Chapitre (II) : Les cyclodextrines | |
| II.1.1)- Introduction..... | 14 |
| II.1.2) Caractéristiques structurales des cyclodextrines..... | 14 |
| II.1.3) Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines..... | 15 |
| II.1.3.1) Solubilité dans l'eau..... | 15 |
| II.1.3.2) Aspect énergétique de l'hydratation et de la dissolution..... | 17 |
| II.1.5) Les complexes d'inclusion..... | 17 |
| II.1.5.1) Propriété de complexation des CDs et stœchiométrie..... | 17 |
| II.1.3.2) Facteurs influençant la complexation des molécules organiques par les CD. | 18 |
| a) Facteurs stériques..... | 18 |
| b) Polarité et charge | 19 |
| II.1.3.3) Mécanisme de complexation..... | 19 |
| II.1.3.4) Les forces conductrices de la complexation..... | 20 |
| II.1.3.5) Conséquences de la complexation et applications..... | 21 |
| II.2) Méthodes de la modélisation moléculaire | 23 |
| II.2.1)- Introduction | 23 |
| II.2.2)- Méthodes empiriques: | 23 |
| II.2.3)- Méthodes quantiques et semi-empiriques..... | 24 |
| - AM1..... | 26 |
| - PM 3..... | 26 |
| II.2.4)- La minimisation d'énergie..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| II.3) Conclusion..... | 29 |
| Chapitre (III) Résultats et discussions | |
| III.1) Synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone..... | 33 |
| III.1.1) Caractérisation du produit obtenu..... | 34 |
| III.1.1.1) Caractérisation par spectrométrie (IR)..... | 35 |
| III.1.1.2) Caractérisation par spectrométrie UV-Visible..... | 35 |
| III.2) Préparation des complexes d'inclusion de la Benzoxazolinone et son dérivé N-méthylé dans la β -cyclodextrine..... | 37 |
| III.2.1) Préparation des complexes à l'état solide..... | 37 |
| III.2.2) Préparation des complexes en solution..... | 38 |
| III.2.3) Caractérisation des complexes obtenus a l'état solide..... | 38 |
| III.2.3.1) Caractérisation par spectrométrie (IR)..... | 39 |
| III.2.2) Caractérisation par spectrométrie UV des complexes formés..... | 41 |
| III.3) Etude théorique de l'interaction de la Benzoxazolinone et son dérivé N-méthyl é avec la β - cyclodextrine..... | 43 |
| III.3.1) Introduction..... | 43 |
| III.3.2) Procédure théorique de la formation d'un complexe d'inclusion..... | 45 |
| III.3.2) Recherche du minimum d'énergie..... | 45 |
| III.3.3) Calcul des chaleurs de formation et des énergies de complexation dans le vide..... | 49 |
| III.3.4) Calcul des énergies de complexation en solution..... | 55 |
| III.4) Conclusion..... | 58 |
| IV) Protocoles experimentale | |
| IV.1) Remarques générales..... | 60 |
| IV.2) Pastillage dans le KBr..... | 60 |
| IV.3) Synthèse de la methyl-3-benzoxazolinone..... | 60 |
| Réactifs..... | 61 |
| Mode opératoire..... | 61 |
| IV.4) Préparation des complexes d'inclusion à l'état solide..... | 62 |
| IV.4.1) Préparation du complexe BcD – Benzoxazolinone | 62 |
| Mode opératoire..... | 62 |
| IV.4.2) Préparation du complexe β CD -N- methyl-Benzoxazolinone..... | 63 |
| Mode opératoire..... | 63 |
| IV.5) Préparation des complexes d'inclusion à l'état solution..... | 64 |
| Mode opératoire général..... | 64 |
| IV.5.1) Caractérisation par spectrometrie uv-visible des complexes obtenus en solution..... | 64 |
| IV.5.1.1) Complexe d'inclusion BCD-Benzoxazolinone..... | 64 |
| IV.5.1.2) Complexe d'inclusion β CD-N-methyl-Benzoxazolinone..... | 64 |
| Conclusion générale..... | 66 |
| Bibliographie | |

Introduction générale

Introduction

La Benzoxazolinone et certains nombre de ces dérivés étaient déjà connus à la fin du siècle dernier époque ou ils avaient fait l'objet de travaux orientés exclusivement sur l'aspect chimique. De nombreuses études sont consacrées à la préparation des dérivés de la Benzoxazolinone en vue de la recherche de leurs propriétés pharmacologiques.

D'autres études ont suscité depuis lors un intérêt énorme et avaient apporté une importante contribution à la connaissance de la Benzoxazolinone tant sur le plan chimique que sur celui de ses propriétés biologique. La Benzoxazolinone souffre d'un inconvénient majeur qui est sa faible solubilité dans l'eau. La pharmacie galénique moderne développe 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. De nombreux systèmes de délivrance de molécules actives, possédant des propriétés spécifiques avantageuses pour des applications dans le domaine de la vectorisation, ont été élaborés.

Les cyclodextrines qui sont des oligosaccharides cycliques pouvaient être utilisés comme vecteurs de choix par formation des complexes d'inclusion avec les molécules hydrophobes et permettre ainsi la solubilisation de ces molécules dans des milieux aqueux.

De nombreuses applications ont été proposées pour tirer profit de ce phénomène, en particulier dans le domaine pharmaceutique.

Notre objectif dans ce travail consiste à étudier selon deux approches expérimentale et théorique, la possibilité de former des complexes d'inclusion entre la β -cyclodextrin (β CD) et la benzoxazoline et son dérivé N-méthylé, et ce dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité.

Le présent mémoire comprend quatre chapitres:

- Le premier comprend un aperçu bibliographique sur la Benzoxazolinones et ses produits de transformation.
- Le deuxième chapitre est réservé aux cyclodextrines, et leur intérêt en tant que vecteurs biologiques par formation de complexes d'inclusion.
- Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré aux travaux personnels décrivant les résultats et discussion sur la préparation, la caractérisation et l'étude théorique des complexes d'inclusion entre la β -cyclodextrin (β CD) et la benzoxazoline et son dérivé N-méthylé.
- Le dernier chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux et des Essais de complexation que nous avons conduits au cours de ce travail, ainsi que certaines caractéristiques des produits obtenus.

Nous achevons ce travail par une conclusion générale.

Chapitre (I)

La Benzoxazolinone

Benzoxazolinone & produits de transformation

I-1) Description de la Benzoxazolinone:

Découverte en 1876 par « GROENWK » [1], la Benzoxazolinone est un uréthane cyclique, formé de l'accolement d'un noyau benzénique et d'un ensemble oxazolinonique, elle répond à la formule générale suivante :

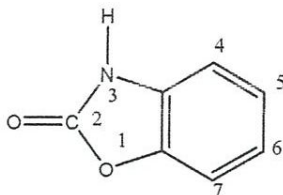


Figure .I.1: Structure générale de la benzoxazolinone.

La Benzoxazolinone a déjà fait l'objet de nombreux travaux chimiques et pharmacodynamiques, qui ont démontré son intérêt en chimie médicamenteuses, diverses revues bibliographiques lui ont été consacrées [2, 3,4].

I-2- Préparation de la Benzoxazolinone:

La Benzoxazolinone est accessible par voie biologique ainsi que par voie chimique.

I-2-a) Voie biochimique:

Selon VIRTAREN [5], il existait dans certains plantes de seigle, un composé, qui par dégradation donne naissance à la Benzoxazolinone, il s'agirait d'un glucoside dont l'aglycone, libéré par l'action des enzymes est un dérivé benzoxazinique que la chaleur décompose en Benzoxazolinone. Le schéma simplifié de la biosynthèse de la Benzoxazolinone est le suivant :

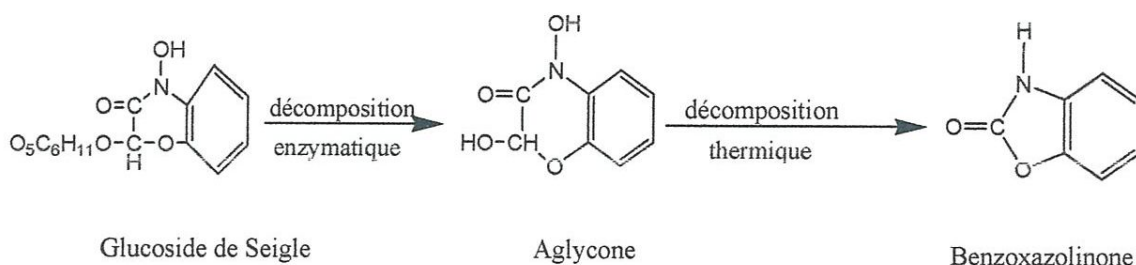


Schéma.I.1: Biosynthèse de la Benzoxazolinone.

I-2-b) Voie chimique :

La Benzoxazolinone est obtenue par synthèse pour la première fois à partir de l'ortho-hydroxyphényl-uréthane et depuis, elle a été préparée par de nombreuses voies [6].

Préparation à partir de l'ortho-amino-phénol:

a) Par fusion avec l'urée: cette préparation a été mise en œuvre à l'échelle industrielle.

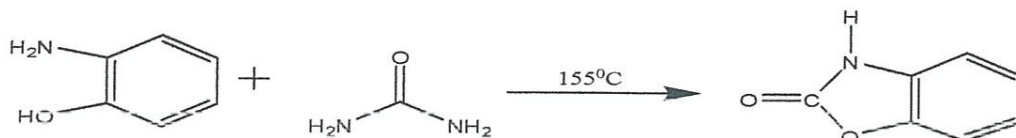


Schéma .I.2: Préparation de la benzoxazolinone par fusion de l'urée avec de l'ortho-amino-phénol.

b) Par action du phosgène en milieu alcalin:

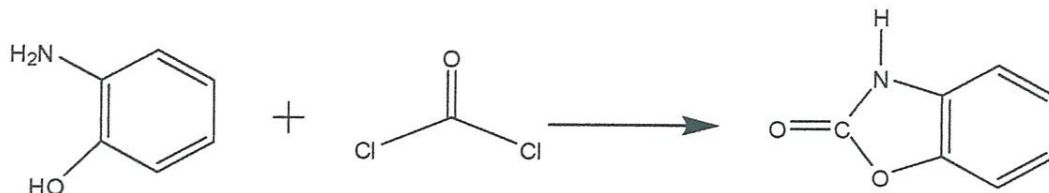


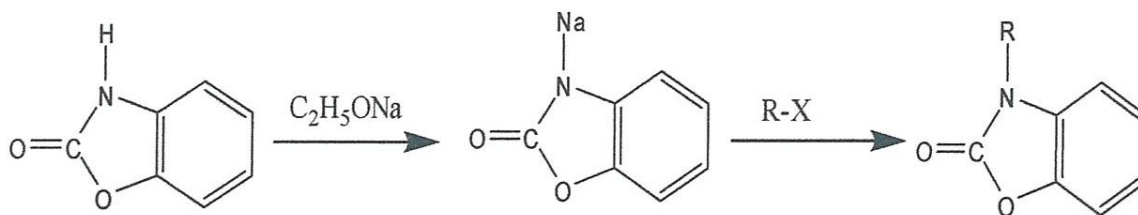
Schéma .I.3: Préparation de la la benzoxazolinone par action du phosgène sur l'ortho-amino-phénol.

I-3) Propriétés chimiques de la Benzoxazolinone:

Sur le plan chimique, la réactivité de la Benzoxazolinone peut être classée en trois grandes séries de réactions [7].

I-3-1) Substitution à l'azote:

a) L'atome d'hydrogène porté par l'azote de la Benzoxazolinone (hydrogène labile) est facilement remplacé par un ion sodium sous l'action de l'éthylate de sodium en milieu alcoolique, ou même de soude en solution aqueuse, le dérivé sodé ainsi obtenu constitue l'intermédiaire de synthèse des alkyles -3- Benzoxazolinones.



R-X : est un halogénure d'alkyle

Schéma.I.4: Réaction de substitution sur l'azote de la benzoxazolinone.

b) La mobilité de l'hydrogène lié à l'azote (hydrogène acide) permet également à la Benzoxazolinone de réagir avec des réactifs variés, citons par exemple la formation des bases de Mannich à partir du formol et les amines secondaires [8].

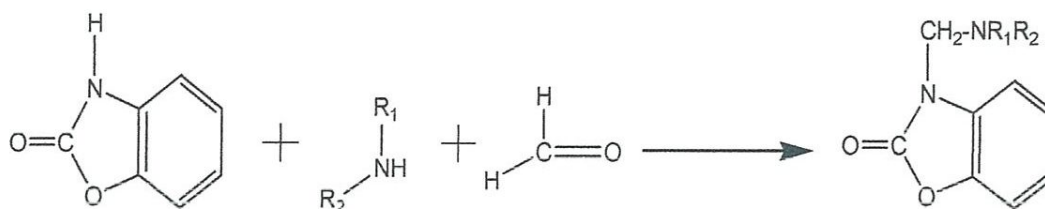


Schéma.I.5: Réaction de formation des bases de Mannich avec la Benzoxazolinone.

I-3-2) Ouverture du cycle oxazolinonique (Hydrolyse alcaline et hydrolyse acide):

L'ouverture du cycle oxazolinonique en milieu acide et surtout alcalin conduit à des amino-phénols diversement substitués.

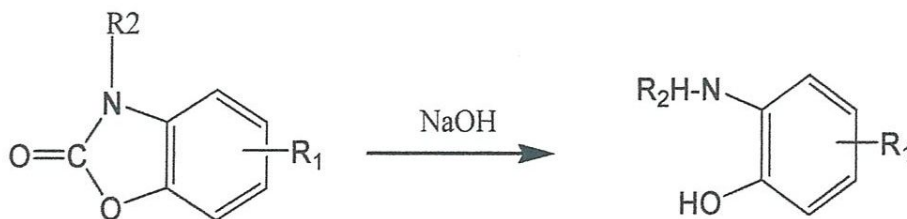


Schéma.I.6: Hydrolyse alcaline de la Benzoxazolinone.

I-3-3) Substitution sur le noyau benzénique de la Benzoxazolinone:

Le comportement général du noyau aromatique de la Benzoxazolinone vis-à-vis des réactifs de substitution électrophiles classiques (agent de nitration, halogénéation, sulfonation, alkylation ... etc.) est connu depuis longtemps.

Cette substitution conduit selon les conditions expérimentales et la nature des réactions, à des dérivés monosubstitués en position **6** et souvent accompagnés de dérivés disubstitués ce qui montre une particulière réactivité du noyau aromatique.

Acylation de la Benzoxazolinone :

L'acylation de la Benzoxazolinone n'a été décrite que beaucoup plus récemment (1973) [9], elle se déroule commodément par l'action d'acides organique utilisés comme agents acylants en présence d'acide phosphorique (P.P.A), qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. Ce procédé ne s'est pas révélé général, puisqu'il s'applique uniquement aux acides ou aux chlorures d'acides aliphatiques, aromatiques et aussi à quelques acides hétérocyclique et halogéno-acides qui conduit aux dérivés acyles monosubstitués en position **6**.

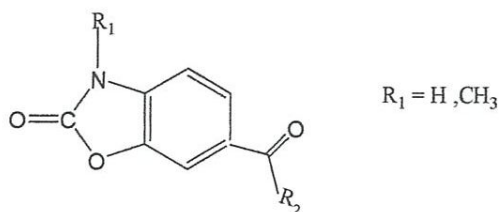


Figure.I.2:Structure générale des acyl-6-Benzoxazolinones .

Les limites de cette méthode d'acylation ont été remédiées par d'autres conditions utilisant le chlorure d'aluminium($AlCl_3$)- diméthyle formamide(DMF) et les halogénures d'acides organiques ou leurs anhydrides comme agents acylants [10].

Cette nouvelle méthode avait permis non seulement d'obtenir des acyl-6 - Benzoxazolinones non accessible avec la première méthode utilisant le P.P.A mais également d'améliorer sensiblement les rendements.

Cette méthode est donc plus générale, elle a été appliquée aux dérivés aliphatiques, aromatiques, halogéno- aliphatiques, et surtout aux anhydrides et aux diacides organiques.

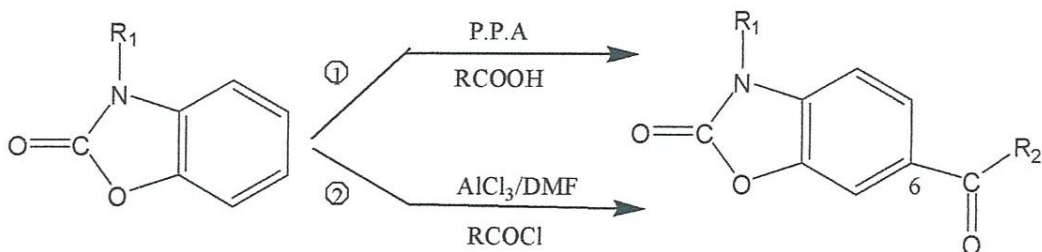


Schéma.I.7:Réaction d'acylation de la Benzoxazolinone.

Les composés obtenus selon cette méthode [11] se sont révélés dans tous les cas identiques aux produits obtenus dans le P.P.A (même propriétés physico-chimiques et spectrales)

Il est intéressant de remarquer que malgré la grande réactivité de noyau aromatique de la Benzoxazolinone qui est très riche en électrons appartenant à des orbitales " π " et " n " une tentative d'acylation ou d'une alkylation cyclisante en position 5 de la molécule avec des réactifs tels que les anhydrides d'acides et les halogéno- 3propionyle n'avait pas eu lieu, et que cette cyclisation intramoléculaire ne se produisait pas dans les conditions expérimentales et que l'on obtient uniquement dans tous les cas des dérivés acyles en position 6 de la molécule, ceci traduit parfaitement l'influence désactivante du groupement carbonyle sur le noyau aromatique de l'ensemble Benzoxazolinone.

I-4) Relation entre la structure chimique et les propriétés pharmacodynamiques:

Certaines relations entre structure chimique et activité pharmacodynamique connues en chimie pharmaceutique par **QSAR** (Quantitative Structure-Activity Relationships), et qui consistent à rechercher les points communs pouvant exister par exemple au niveau structural, fonctionnel, géométrique etc, entre les structures moléculaires ayant la même activité, ont servi comme hypothèse dans les recherches des propriétés biologiques de la Benzoxazolinone.

L'intérêt et l'intensité des recherches consacrées à cette molécule se justifient par le fait qu'il s'agit d'une structure biologique. En effet la structure de la Benzoxazolinone existe à l'état naturel dans le règne végétal, plus particulièrement chez les graminées. La Benzoxazolinone elle-même a été isolée de certaines variétés de seigles. Mais c'est surtout la méthoxy-6 Benzoxazolinone qui semble la plus répandue, elle a été identifiée dans le blé, maïs et autres graminées. Elles seraient (Benzoxazolinone et dérivés homologues) responsables de la résistance des graminées à certaines maladies bactériennes et fongiques [12].

Parmi les propriétés pharmacologiques de la Benzoxazolinone, on peut citer les propriétés antiallergiques et anti-inflammatoires, ainsi que les activités sédatives du système nerveux central, antibactériennes, analgésiques, herbicides, insecticides et antifongiques.

- a) La particularité structurale qui a attiré initialement l'attention sur la Benzoxazolinone est la présence dans la molécule d'un fragment qui l'apparente aux uréthanes.

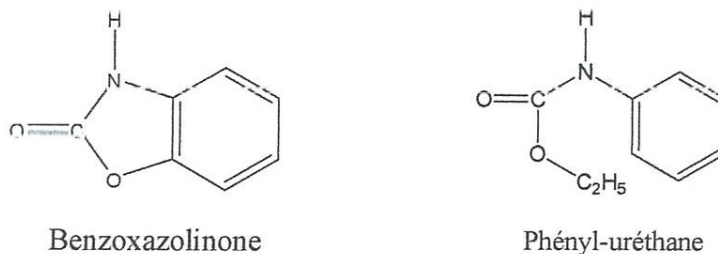


Figure.I.3 : Analogie structurale entre la benzoxazolinone et les uréthanes.

Cette analogie de structure a orienté les premiers travaux pharmacodynamiques vers la recherche de propriétés rencontrées dans la série des uréthanes : propriété hypnotiques, antipyrétiques, analgésiques....Etc.

- b) Il existe une similitude structurale entre la Benzoxazolinone et la coumarine, identique à celle qui se retrouve entre le benzène et le pyrrole (remplacement du groupement $-NH$ par $-HC=CH-$).

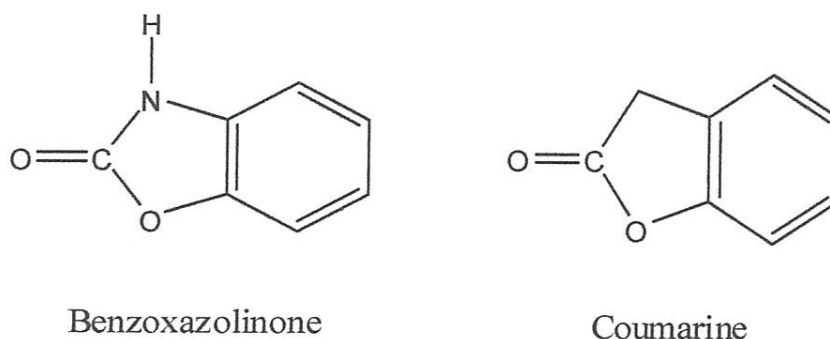


Figure.I.4: Similitude structurale entre la Benzoxazolinone et la coumarine.

- c) L'intérêt pharmacologique de la Benzoxazolinone s'est trouvé considérablement confortée en partie par des publications récentes décrivant la méthoxy-6-Benzoxazolinone comme analogue de la mélatonine, capable de stimuler la fertilité de divers espèces animales [13].

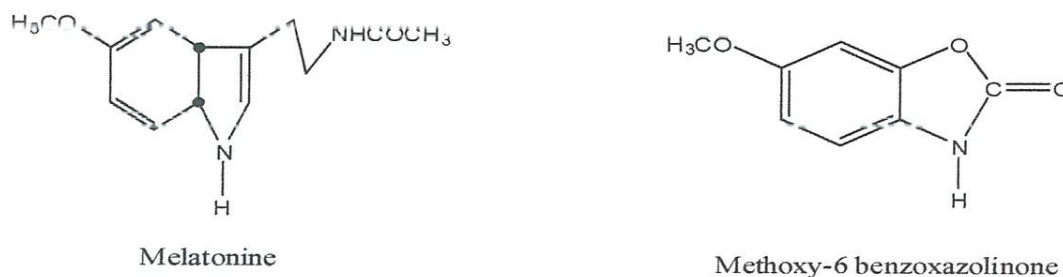


Figure.I.5 : Analogie structurale entre la méthoxy-6-benzoxazolinone et la mélatonine.

- d) De nombreux dérivés de la benzoxazolinone ont été décrits en thérapeutique comme possédant des activités pharmacologiques très variées. Parmi ces dérivés on peut citer les acyl- 6 benzoxazolinones et leurs dérivés (Figure I.7). C'est ainsi que la benzoyle-6-benzoxazolinone possède une activité analgésique intense ; Développé jusqu'au stade des essais cliniques ,ce composé se montre dépourvu d'activité anti-inflammatoire et possède un profil pharmacologique apparenté à celui de la glafinine avec l'avantage d'une toxicité nettement moindre.

- e) Récemment, l'affinité exceptionnelle de divers (amino-2-ethyl)-6-benzoxazolinone pour les récepteurssérotoninergiques (traitement des troubles du sommeil et des troubles du caractère et du comportement) a été indiquée [14].

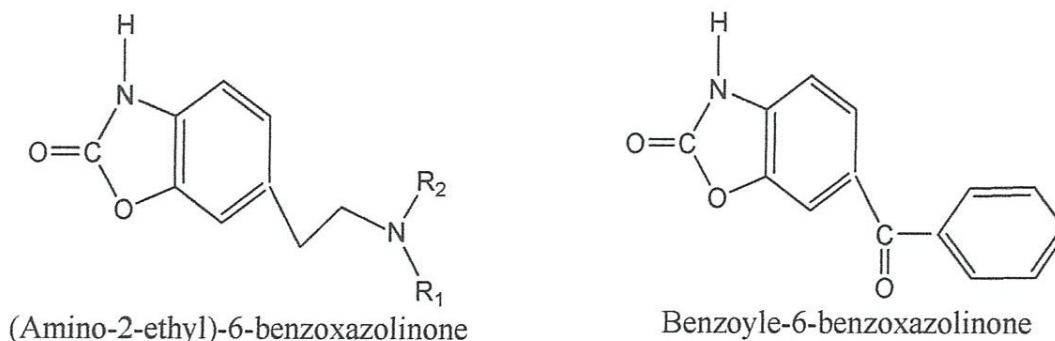


Figure.I.6 Exemples d'acyle-6-benzoxazolinone et ses dérivés utilisés en thérapeutique.

Le choix d'agents d'acylation trouve sa justification dans les arguments suivants orientés par les études pharmacologiques [15].

- L'introduction d'un substituant acyl sur le noyau Benzoxazolinone étant en effet susceptible de renforcer le pouvoir hypnotique et neurolipémiant de la molécule fondamentale
- La substitution par un reste de type acide gras devrait permettre l'obtention de composés lipophiles et améliorer ainsi leur passage au niveau du système nerveux central.

en outre ,les acyl- 6- benzoxazolinones sont doués d'une activité analgésique dépourvue d'activité anti-inflammatoire et d'un niveau nettement plus intéressant que la plupart des substances analgésiques non morphiniques connues à ce jour par exemples : les salicylés et les pyrazolés.,ces derniers possèdent également une activité anti-inflammatoire et ils interviennent par conséquent sur les processus impliqués dans l'inflammation.; il s'ensuit donc de multiples effets secondaires dont les plus connus sont : attaque de la muqueuse gastrique avec possibilité d'ulcères.

I-5) Conclusion:

La Benzoxazolinone qui est une structure naturelle peut être considérée comme une plateforme pour la conception et la synthèse de nouveaux médicaments.

Les produits de transformation de cette biomolécule en particulier les acyl-6-Benzoxazolinones représentent une étape importante dans la pharmacomodulation et la chimie de la Benzoxazolinone. Outre leur intérêt pharmacologique propre, les dérivés acylés obtenus constituent des matières premières d'un intérêt considérable sur le plan chimique et pharmacologique. Ils ont donné toute une série de travaux intéressants particulièrement le domaine analgésique, dont certains ont montré une activité supérieure à celle de la morphine.

Chapitre (II)

Les cyclodextrines

II.1) Les cyclodextrines

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 (α -CD), héptamères (β -CD) et octamères (γ -CD) contenant respectivement 6,7 et 8 unités D-glucopyranosiques liées entre elles par des liaisons glucosidiques α 1-4 (Figure.II.1). La β -CD étant la plus accessible, la moins chère et la plus utile.

II.1.1) 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 asymétrique. La β -CD contient donc 35 atomes de carbone asymétriques.

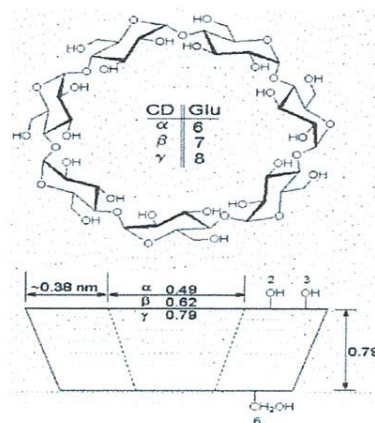


Figure II.1: Structure moléculaire et forme géométrique des cyclodextrines (α , β , γ).les dimensions respectives des CDs obtenues d'après les données cristallographiques.

Conformément aux figures II.1, et II.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).

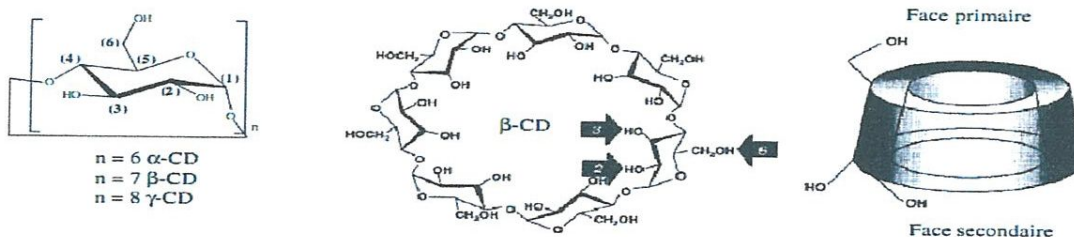


Figure II.2: Représentations de la structure chimique des cyclodextrines naturelles.

II.1.2) Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines:

a) 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.

b) Aspect énergétique de l'hydratation et de la dissolution:

Les études concernant les interactions entre les cyclodextrines natives et l'eau ont permis de mieux comprendre les différences de solubilités constatées. Les cyclodextrines cristallisent sous forme d'hydrates non définis (CD, nH₂O) et leur taux d'hydratation est largement dépendant des conditions de cristallisation et de la nature de la cyclodextrine.

En fait, les molécules d'eau d'hydratation les entourant sont relativement labiles et peuvent être éliminées par séchage, alors que celles incluses dans la cavité ne peuvent être que remplacées, mais non éliminées. Concernant la β -CD qui a été la plus étudiée, l'hydratation moyenne est de 10 à 12 molécules d'eau [7, 8], celles des autres CDs sont regroupées dans le tableau II.1. D'un point de vue énergétique, les mesures des enthalpies de dissolution des cyclodextrines anhydres et hydratées ont permis de calculer les enthalpies de déshydratation [9].

Les résultats montrent que les énergies de liaison H₂O/CD sont de l'ordre d'une dizaine de Kilo joules par molécule d'eau, c'est à dire cohérentes avec les énergies mises en jeu dans les liaisons hydrogène. Certaines études s'accordent pour montrer qu'il existe un échange permanent des molécules d'eau intra- et intermoléculaire dans la β -CD [10]. Les différences de comportement des CDs par rapport à l'eau, en particulier, en terme de solubilité ont été reliées à la possibilité (ou non) d'établir des liaisons hydrogène interglucose et intramoléculaires qui dans le cas de la β -CD stabilise le macrocycle. Cette possibilité dépend de la distance moyenne entre les atomes d'hydrogène et d'oxygène (OH en C₂ et C₃), qui est fonction du nombre d'unités glucose de la CD [11].

II.1.3) Les complexes d'inclusion:**1- Propriété de complexation des CDs et stœchiométrie:**

De par leur structure cyclique tridimensionnelle, leur cavité et leur caractère amphiphile, les CDs 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.II.3).

4 - Les forces conductrices de la complexation:

Le phénomène de complexation est la résultante de nombreuses interactions mettant en jeu la molécule hôte, la molécule invitée et le solvant et conduisant à l'état thermodynamique le plus stable.

La nature et l'importance relative des différents phénomènes responsables de la formation d'un complexe CD: soluté sont encore débattus et font toujours l'objet d'une controverse. Les « forces directrices », traduction de l'expression couramment employée « driving forces », les plus discutées sont de type interactions faibles et correspondent aux [15] :

* Interactions électrostatiques (ion-ion, ion-dipôle, dipôle-dipôle).

* Interactions de Van der Waals (VdW):

Ces interactions englobent trois types distincts de forces: les interactions entre deux dipôles permanents (forces de Keesom), les interactions entre un dipôle permanent et un dipôle induit (forces de Debye) et les forces de dispersion entre dipôle induit-dipôle induit (forces de London). Ce sont des forces faibles (< 8kJ/mol) et globalement non directionnelles

* Liaisons hydrogènes (qui sont en fait de nature électrostatique): Elles résultent des interactions entre un atome fortement électronégatif (oxygène, azote, fluor...) et un atome d'hydrogène lié par une liaison covalente à un atome plus électronégatif que lui.

De force variable, selon les électronégativités des atomes mis en jeux, elles présentent également une directionalité variable, l'angle variant de 120° à 180°. De même, la distance entre les atomes électronégatifs peut varier entre 2,5 et 3,2 Å. Son énergie est comprise entre 10 et 65 kJ/mol.

* Interactions hydrophobes

* Relâchement des tensions du macrocycle: En fait, la modification des contraintes conformationnelles de la CD ne semble pas être déterminante mais permet par contre de maximiser les différentes interactions entre le soluté et la CD.

* Relargage des molécules d'eau à "haute enthalpie", initialement présentes dans la cavité, favorisé par un gain entropique.

* Interactions de transfert de charges.

Notons qu'il existe une ambiguïté attachée au terme d'interactions de van der Waals et que les auteurs qui l'emploient ne désignent pas toujours les mêmes phénomènes. Dans le domaine des CDs, les chercheurs désignent généralement par ce terme soit la combinaison des forces d'induction (forces de Debye) et des forces de dispersion (forces de London), soit les forces de dispersion uniquement [16].

Les forces de Keesom sont implicitement incluses dans les interactions électrostatiques. Quand aux liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques faisant intervenir les fonctions hydroxyle ou leurs substituants, elles seraient impliquées, en particulier, dans l'orientation relative des deux molécules visant à maximiser l'interaction entre les moments dipolaires [17].

5 - 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 [18]:

- * 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 II.1) en résume les plus importantes [19].

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

| Propriétés | Domaines d'application |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Amélioration de la solubilité | |
| Amélioration de la biodisponibilité | pharmaceutique |
| Diminution des effets secondaires | |
| Stabilisation | |
| Stabilité des produits volatils | alimentaire |
| Extraction de composants indésirables | |
| Diminution de la toxicité | agrochimiques: Herbicides, fongicides |
| Masquage d'odeurs désagréables | |
| Stabilité des parfums | cosmétologie |

La somme de ces fonctions est exprimée sous la forme d'un champ de force moléculaire [22]. Chaque modèle possède sa propre forme de la fonctionnelle correspondant aux termes analytiques composant l'énergie potentielle totale, donnée par l'expression suivante :

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

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

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

Chacun de ces termes possédant une position d'équilibre préférentielle (longueur de liaison, angle de liaison..). La recherche de l'énergie minimale par optimisation de la géométrie joue un rôle primordial. L'énergie de la molécule est exprimée sous la forme d'une somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence. A cet égard, la mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type "tiges et boules", mais elle est beaucoup plus quantitative. L'idée directrice de cette méthode est d'établir, par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique, le "champ de force", qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire.

Cependant, il n'existe pas encore de modèle unique permettant de simuler tous les aspects du comportement moléculaire, mais un ensemble de modèles [23].

- Les points forts de la mécanique moléculaire sont les suivants:

- a) c'est mathématiquement simple et donc pas exigeant sur le plan calcul. En conséquence, la mécanique moléculaire ne demande pas des temps prohibitifs de calcul et peut quelques fois être effectuée sur des ordinateurs personnels (PC).
- b) on peut manipuler et traiter de larges molécules contenant même des milliers d'atomes avec une assez grande exactitude.

c) la technique fonctionne très bien pour les macromolécules biologiques comme les protéines et les acides nucléiques.

- Les points faibles sont les suivants:

a) la mécanique moléculaire ne fournit aucune information sur les propriétés électroniques de la molécule à l'étude

b) la méthode n'est pas universellement transposable et les équations du champ de force doivent être "paramétrisées" pour chaque nouvelle classe de composés.

c) plusieurs programmes commerciaux de mécanique moléculaire ont des valeurs de paramétrisation qui sont discutables.

II.2.2)- Méthodes quantiques et semi-empiriques:

En mécanique quantique on se préoccupe de la distribution des électrons (orbitales) dans l'espace. Les meilleurs programmes comportent des processus d'optimisation de la géométrie.

L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique. 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). Plusieurs logiciels sont disponibles

Pour les systèmes polyélectroniques, l'équation de Schrödinger n'est pas résolue car on traite ici d'un problème à N-corps. Il faut donc aussi faire des approximations orbitales en tenant compte de chaque électron de façon indépendante. On parle alors d'un développement linéaire de combinaisons d'orbitales atomiques ("LCAO") pour chaque électron.

Par l'approximation de Bohn-Oppenheimer on suppose que les noyaux bougent beaucoup plus lentement que les électrons et on les considère alors comme des masses fixes [24]. Ce qui sépare l'équation de Schrödinger en deux termes. Faut alors une solution approximative selon:

1) la méthode de Hückel.

2) le "Self-Consistent Field.

D'autre part, la mécanique moléculaire, appelée parfois "calcul de champ de force empirique", permet le calcul de la structure et de l'énergie d'entités moléculaires, en prenant le contre-pied de toutes les méthodes quantiques.

Exemple :

- **AM1** : (Austin Model 1)

Proposée par Dewar en 1985. Il a tenté de corriger les défauts du modèle MNDO. La stratégie adoptée était de modifier le terme de répulsion noyau-noyau en utilisant des fonctions gaussiennes. Des fonctions gaussiennes attractives et répulsives ont été utilisées; les gaussiennes attractives ont été conçues pour surmonter la répulsion directement et ont été centrées dans la région où les répulsions étaient trop grandes. Des fonctions gaussiennes répulsives ont été centrées aux petites séparations internucléaires.

- **PM3** : (Parametric Method 3)

Proposée par Stewart en 1989. Présente beaucoup de points en commun avec AM1, D'ailleurs il existe toujours un débat concernant les mérites de paramétrisation de chacune d'elles. PM3 est également basée sur MNDO (le nom dérive du fait que c'est la troisième paramétrisation de MNDO, AM1 étant considérée la seconde). L'hamiltonien de PM3 contient essentiellement les mêmes éléments que celui pour AM1 mais les paramètres pour le modèle PM3 ont été dérivés en utilisant une procédure de paramétrisation automatisée conçue par J. J. P. Stewart. En revanche, beaucoup des paramètres dans AM1 ont été obtenus en appliquant la connaissance et l'intuition chimiques. Par conséquent, certains des paramètres ont significativement différentes valeurs dans AM1 et PM3 quoique les deux méthodes utilisent la même forme fonctionnelle et prévoient de diverses propriétés thermodynamiques et structurales approximativement au même niveau de l'exactitude [25].

- Les points forts de la mécanique quantique sont:
 - a) une information rigoureuse et de haute qualité sur les propriétés de la molécule
 - b) contrairement à la mécanique moléculaire, ici on est moins dépendant des paramètres empiriques et spécifiques
 - c) les programmes commerciaux de mécanique quantique sont excellents et donnent d'excellents résultats
- Les faiblesses sont:
 - a) la méthode est très exigeante en temps de calcul et demande de gros ordinateurs
 - b) actuellement, la mécanique quantique est valable que pour des systèmes de nombre d'atomes limité
 - c) l'interprétation des résultats est plus difficile et requière beaucoup plus d'expertise de la part de l'utilisateur que la mécanique moléculaire

II.2.3)- La minimisation d'énergie:

Une minimisation d'énergie en mécanique moléculaire implique une computation successive et interactive d'une molécule à partir d'une conformation initiale, laquelle est soumise à une optimisation géométrique complète. Tous les paramètres définissant la géométrie du système sont systématiquement modifiés par petits "incréments" jusqu'à ce que l'énergie structurale moyenne atteigne un minimum local [26].

Le but de l'exercice est donc d'atteindre un minimum local sur la surface de potentiel dans un temps minimum.

En principe on calcul l'énergie du système avec des fonctions énergétiques empiriques. Chaque logiciel à ces valeurs à lui, qui sont plus ou moins meilleures qu'un autre logiciel.

En fin de compte, on va chercher un minimum qui converge et on va faire une vérification par "recuit" pour voir s'il n'y aurait pas un minimum d'énergie plus bas. A ce titre, la modélisation moléculaire reste un moyen efficace de prédiction des conformations stable d'une structure moléculaire correspondant aux minima de son énergie intramoléculaire.

Chapitre (III)

Résultats & Discussions

Résultats et discussions

III.1) Synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone:

Nous avons préparés ce produit intéressant par action de l'iodure de méthyle sur le dérivé sodé Benzoxazolinonique dans l'éthanol à la température ambiante (Schéma.III.1).

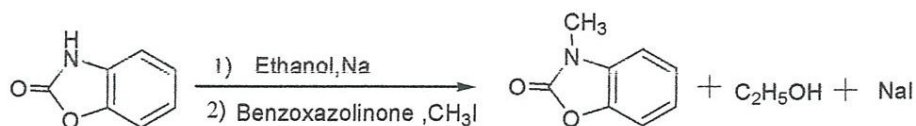


Schéma.III-1: synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone

Le mécanisme réactionnel proposé pour cette réaction est présenté sur le schéma.III.2 :

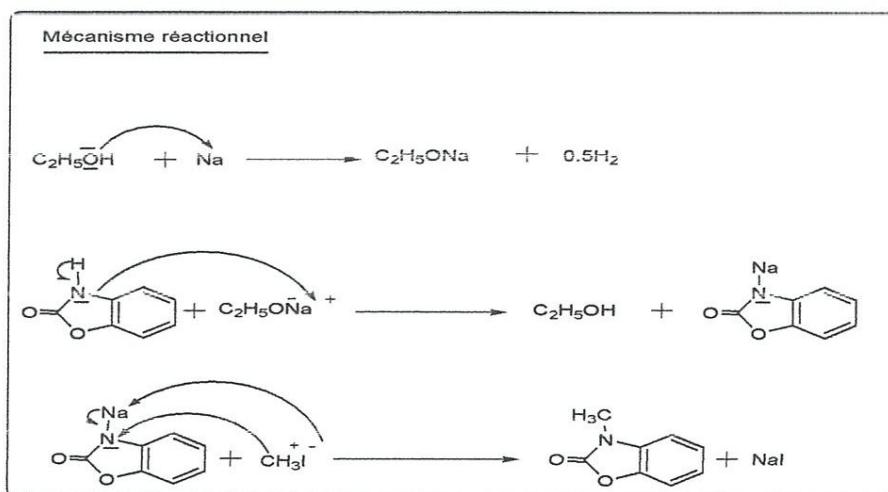


Schéma.III-2: Mécanisme proposé pour la synthèse de la methyl-3-Benzoxazolinone

La réaction est presque quantitative (90%), après traitement et recristallisation dans un mélange éthanol/eau, on obtient de beaux cristaux sous forme d'aiguilles.

III.1.1) Caractérisation du produit obtenu:

Outre ses propriétés odorantes rappelant celles de la coumarine, la méthyl-3-Benzoxazolinone possède un point de fusion très bas (88°C) comparativement à celui de la Benzoxazolinone (147°C), cette dernière présente également une similitude structurale avec la coumarine, mais il est surprenant que la Benzoxazolinone elle-même est dépourvue d'odeur [1].

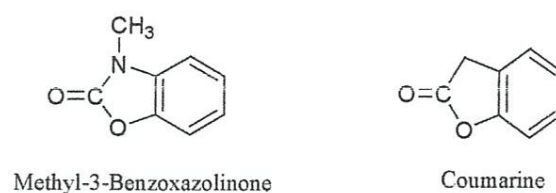


Figure. III-1: Similitude structurale entre la méthyl-3-Benzoxazolinone et la coumarine

Les résultats de caractérisation de cette molécule bioactive sont rassemblés dans le tableau suivant:

Tableau.III.1 : Caractéristiques physicochimiques et spectroscopiques de la méthyl-3-Benzoxazolinone

| M(g/mol) | Rf* | Pf (°C) | IR(KBr), ν (cm ⁻¹) | | | UV, λ (nm) | |
|----------|------|---------|------------------------------------|------|------------------|--|--------------------------------------|
| | | | C-H(CH ₃) | C=O | N-H ₃ | CH ₃ CN(10 ⁻⁴ M) | H ₂ O(10 ⁻⁴ M) |
| 149 | 0.83 | 88 | 2932 | 1762 | 1261 | 276 | 272 |

* éluant : Acétate d'éthyle/cyclohexane

III. 1.2) Caractérisation par spectrométrie (IR):

En spectrométrie (IR) à Transformée de Fourier (FTIR), la Méthyl-3-Benzoxazolinone montre une absorption vers 2932 cm^{-1} caractéristique de la liaison C-H du groupement CH_3 et une bande d'absorption vers 1261 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence de N- CH_3 . Le groupement C=O oxazolinonique absorbe à 1762 cm^{-1} (Figure.III.2).

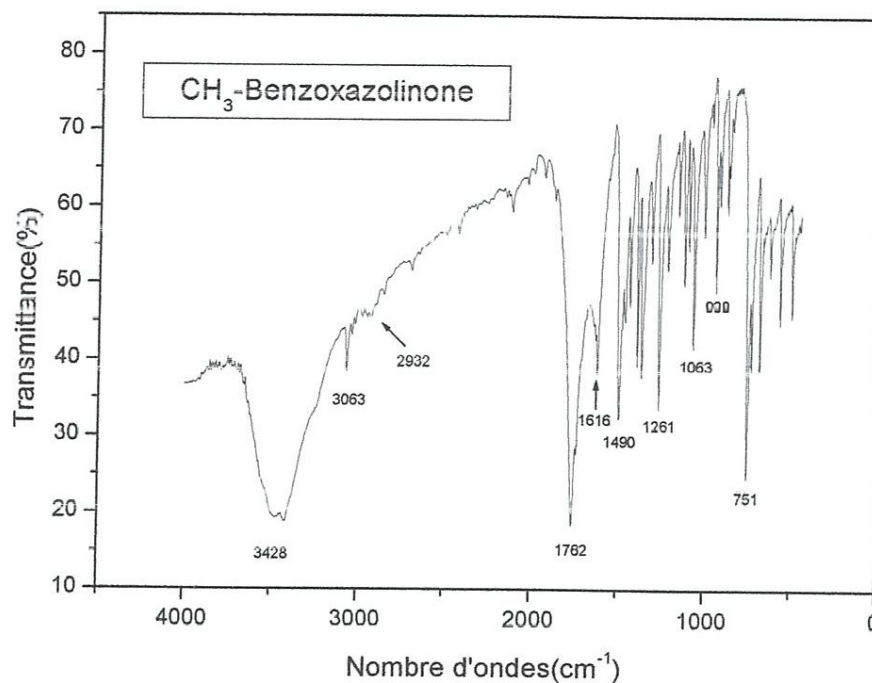


Figure.III.2 : Spectre (IR) de la N-méthylBenzoxazolinone

III.1.3) Caractérisation par spectrométrie UV-Visible:

En spectrométrie UV-Visible, nous avons utilisé les mêmes échantillons qui ont servi à l'enregistrement des spectres en (IR).

Les spectres d'absorption en UV-visible de la Benzoxazolinone désignée par Benzo et son dérivé N-méthylbenzoxazolinone désigné par CH_3 -Benzo enregistrés dans l'eau et l'acétonitrile sont présentés sur la figure (Figure.III.3)

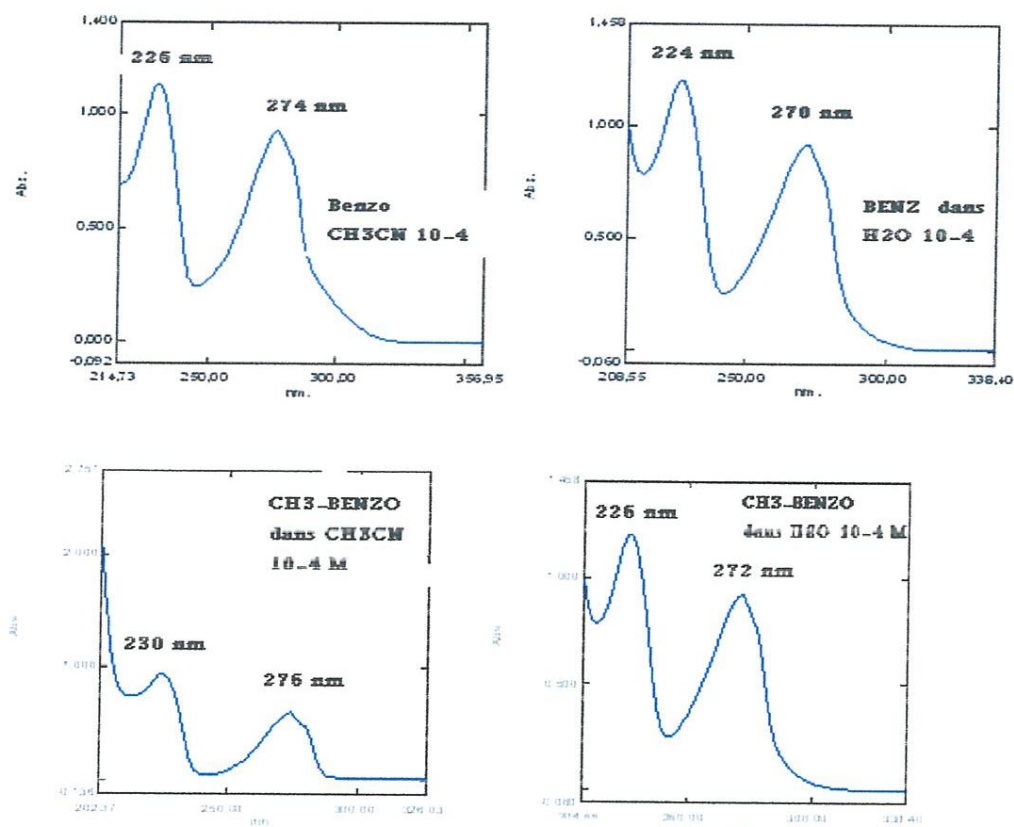


Figure.III.3: Spectres UV de la Benzo et son dérivé CH_3Benzo dans l'eau et l'acétonitrile à 10^{-4}M .

Dans les deux solvants, les spectres de la Benzo et son dérivé N-méthylé présentait chacun deux bandes d'absorption caractéristiques qui sont dues aux transitions $\pi-\pi^*$ et $n-\pi^*$ des molécules Benzo et son dérivé méthylé (Tableau.III.2).

Tableau III.2: Comparaison entre les absorptions caractéristiques de la Benzoxazolinone (Benzo) et son dérivé N-méthylé (CH_3Benzo) dans l'eau et l'acétonitrile à 10^{-4}M .

| solvant | Benzo | | CH_3BENZO | |
|--------------|----------------|-------|---------------------------|-------|
| | λ (nm) | Abs | λ (nm) | Abs |
| eau | 224 | 0,830 | 226 | 1.203 |
| | 270 | 0,440 | 272 | 0,927 |
| acétonitrile | 226 | 0,939 | 230 | 1.134 |
| | 274 | 0,591 | 276 | 0,929 |

On observe une absorption plus intense (effet hyperchrome) en faveur de la méthylBenzoxazolinone avec un petit déplacement bathochrome par rapport à son précurseur la Benzoxazolinone.

III.2) Préparation des complexes d'inclusion de la Benzoxazolinone et son dérivé N-méthylé dans la β -cyclodextrine:

Les complexes d'inclusion de la Benzoxazolinone et son dérivé N-méthylé avec la β -cyclodextrine ont été obtenus soit à l'état solide soit en solution.

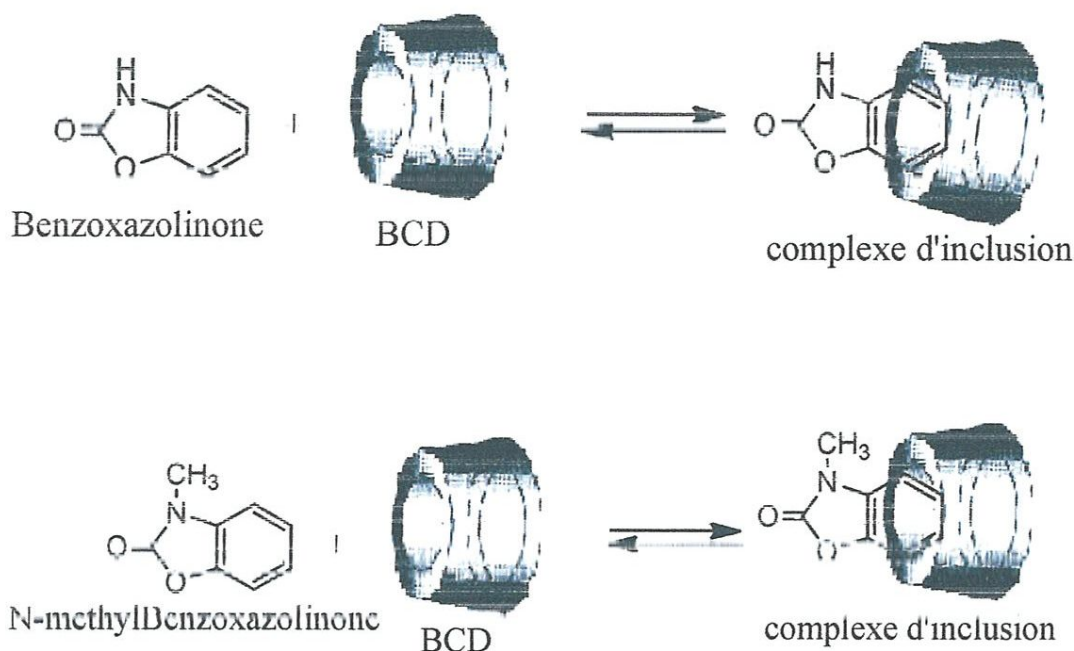


Schéma.III-3 : Représentation schématique de la formation d'une inclusion de la Benzoxazolinone ou son dérivé méthylé dans la β cyclodextrine

III.2.1) Préparation des complexes à l'état solide:

Des quantités équivalentes de Benzoxazolinone ou de son dérivé N-méthylé sont mélangées avec des quantités équivalentes de β -cyclodextrine dans l'éthanol. Le mélange est laissé agité à température ambiante pendant 24 heures jusqu'à l'apparition de précipités stables (méthode de co-précipitation) [2].

La réaction a été suivie par CCM, qui montre l'apparition d'un nouveau produit et disparitions des précurseurs. Les précipités formés sont essorés, lavés et séchés puis caractérisés par les méthodes physicochimiques et spectroscopiques usuelles.

III.2.2) Préparation des complexes en solution:

A l'aide d'un sonificateur de fréquence bien modulée, des quantités équivalentes de β -cyclodextrine et des molécules invités (Benzoxazoline ou son dérivé N-méthylé) sont mélangés à température ambiante pendant un laps de temps jusqu'à atteindre un équilibre dynamique entre la forme libre et la forme complexée de chacun des précurseurs [3].

III.2.3) Caractérisation des complexes obtenus a l'état solide:

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 [4].

Les complexes à l'état solide correspondants à l'inclusion de la Benzoxazolinone ou son dérivé N-méthylé dans la β -cyclodextrine sont désignés respectivement par C_1 et C_2 .

Les résultats de leurs caractérisations sont rapportés dans (le tableau.III.3):

Les valeurs des rapports frontaux (F_R) par rapport au système d'élution: ammoniacque/isopropanol, montrent que le complexe C_1 est plus polaire que le complexe C_2 , car ce dernier renferme un groupement méthyle à caractère aliphatique.

Les deux complexes présentent des points de fusion comparables.

Tableau.III.3 : Caractéristiques physicochimiques et spectroscopiques des produits obtenus

| C | Mg/mol | Rf* | P ^o C | IR(KBr), ν (cm ⁻¹) | | | | | | | UV, λ max(nm) | |
|-------|--------|------|------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------|------|------|------|-------|---|------------------------------------|
| | | | | OH | C-H _{CD} | CH ₂ | C=O | C-O | C-C | C-O-C | CH ₃ CN10 ⁻⁴ M | H ₂ O10 ⁻⁴ M |
| C_1 | 1270 | 0.75 | 278 | 3383 | 3199 | 2929 | 1658 | 1157 | 1074 | 1022 | 274 | 270 |
| C_2 | 1284 | 0.2 | 280 | 3407 | - | 2929 | 1626 | 1157 | 1074 | 1021 | 276 | 272 |

*Eluant : ammoniacque/isopropanol.

III.2.4) Caractérisation par spectrométrie (IR):

Les spectres (IR) des complexes C_1 , C_2 et leurs précurseurs sont présentés sur les (figures III.4 et III.5) successivement. Ils présentent tous deux une série de bandes exprimées en transmittance (%). Les complexes d'inclusion C_1 et C_2 conservent toujours certaines absorptions caractéristiques de leurs précurseurs : Une bande intense vers 1157 attribuée au vibration du groupement C-O oxazolidinonique, et une autre vers 1658 Cm^{-1} et 1626 Cm^{-1} assignées au C=C aromatique, une bande caractéristique aux vibrations C- C_{BCD} vers 1074 Cm^{-1} , mais ils font apparaitre de nouvelles bandes caractéristiques : Une bande larges vers 3383 cm^{-1} dans le complexe C_1 et 3407 Cm^{-1} dans le complexe C_2 , attribuées aux groupements OH_{BCD} . Des bandes d'élongation caractéristiques du groupement CH_2 se situent à 2929 Cm^{-1} .

On constate également la disparition de certaines bandes caractéristiques comme la bande d'élongations du groupement C-H aromatique et la bande très intense des élongations du groupement C=O oxazolidinonique qui est totalement masqué; ce qui est une preuve pour la formation de ces complexes d'inclusion.

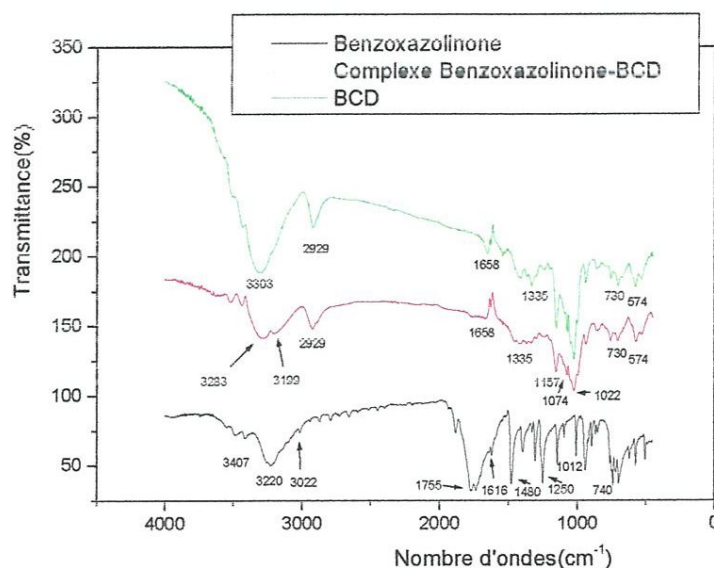


Figure.III.4 : Spectres(IR) de la β -CD(en vert) de la Benzo (en noir) et leur complexe d'inclusion C_1 (en rouge).

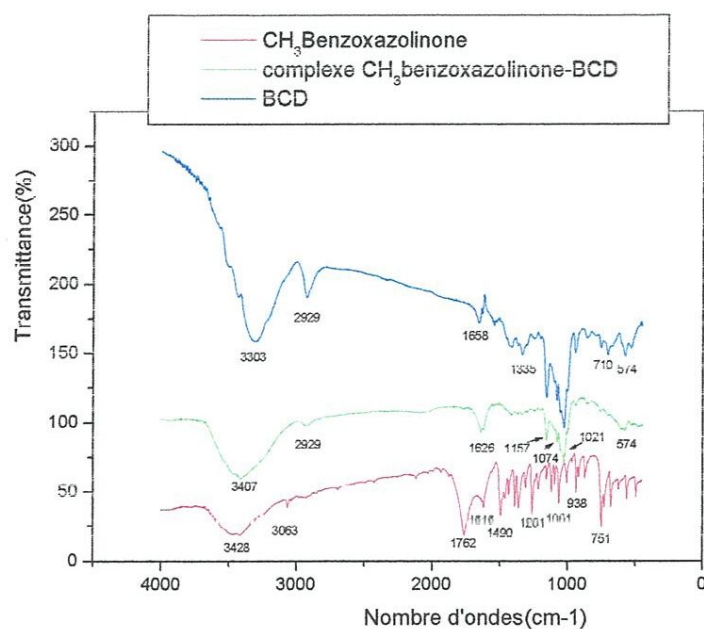


Figure.III.5 : Spectres(IR) de la β -CD(en bleu), de la CH₃Benzo(en rouge) et leur complexe d'inclusion C₂(en vert)

Et Pour faire une comparaison entre les spectres des deux complexes C₁et C₂ nous les avons superposés dans la figure.III.5, qui montre une nette ressemblance entre ces deux spectres.

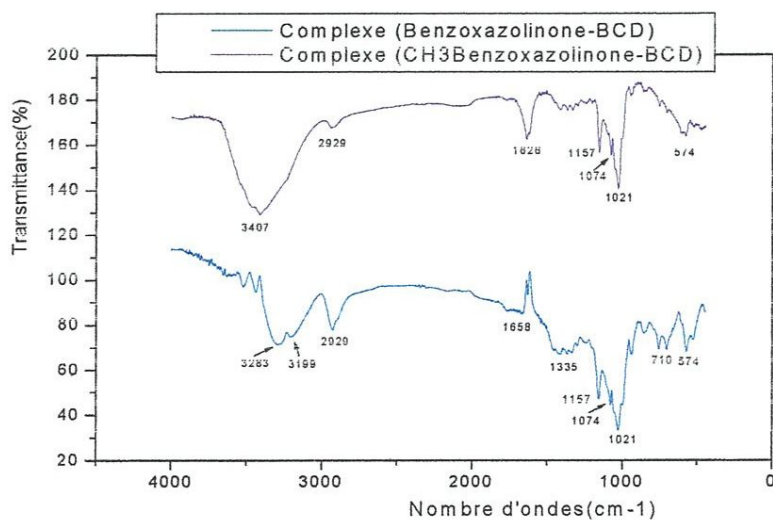


Figure.III.6: Comparaison des absorptions en (IR) des complexes C₁ et C₂ par superposition de leurs spectres.

III.2.5) Caractérisation par spectrométrie UV des complexes formés:

La formation des complexes d'inclusion de la Benzoxazolinone et son dérivé méthylé avec la β -cyclodextrine est confirmée avec la spectroscopie UV-Vis, un outil largement utilisé pour la détection des complexes d'inclusion.

Nous illustrons sur le tableau III.3 les longueurs d'ondes maximales d'absorption de ces complexes préparés à l'état solide et mis en solutions dans l'eau et l'acétonitrile à 10^{-4} M. Par ailleurs, nous avons étudié par UV-Visible dans les mêmes solvants la formation de ces complexes en solutions.

Nous donnons, Sur les figures III.7 et III.8 les spectres UV de ces complexes.

Suite à l'inclusion des molécules invitées dans la cavité de la β -cyclodextrine, leurs spectres UV-Visible se retrouvent perturbés. Le tableau III.4 ci après résume les absorptions caractéristiques de ces complexes.

Ces absorptions sont dues aux transitions π - π^* et n - π^* des molécules incluses. Dans CH_3CN , On observe l'apparition d'une seule bande plus large sur le spectre de chaque complexe et l'augmentation de l'absorbance (effet hyperchrome) avec disparition des bandes 226 nm et 230 nm apparues respectivement sur les spectres de leurs précurseurs: la Benzo et son dérivé N-méthylé.

Dans l'eau, au contraire, les deux bandes d'absorption sont restituées mais avec une diminution significative de l'absorbance (effet hypochrome).

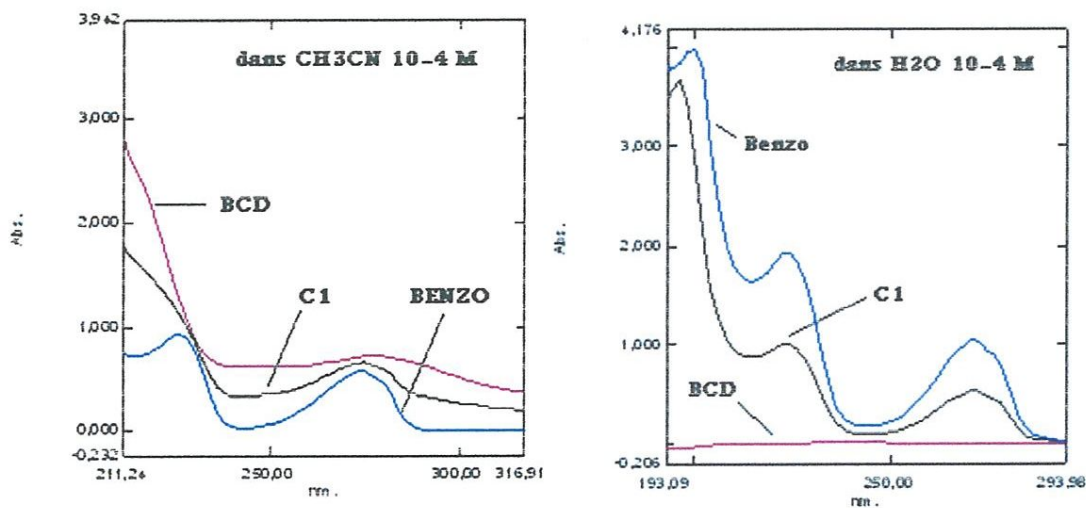


Figure.III.7 : Spectres UV du complexe C₁ et ces précurseurs dans CH_3CN et H_2O à 10^{-4} M.

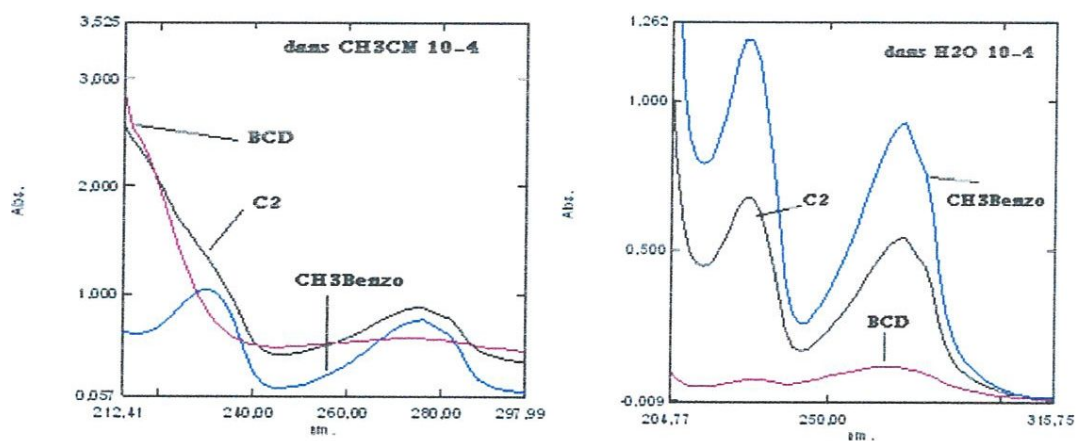


Figure.III.8: Spectres UV du complexe C_2 et ces précurseurs dans CH_3CN et H_2O à 10^4M .

Tableau.III.4 : Résultats d'analyse par spectrométrie UV des complexes C_1 et C_2

| solvant | C_1 | | C_2 | |
|--------------|----------------|-------|----------------|-------|
| | λ (nm) | Abs | λ (nm) | Abs |
| eau | 224 | 0,425 | 226 | 0,675 |
| | 270 | 0,248 | 272 | 0,543 |
| acétonitrile | 274 | 0,665 | 276 | 0,833 |

Tous ces résultats fournissent une preuve directe de la formation d'es complexes d'inclusion Benzo- β -CD (C_1) et CH_3 -Benzo- β -CD (C_2) dans l'eau et l'acétonitrile.

III.3) Etude théorique de l'interaction de la Benzoxazolinone et son dérivé

N-méthylé avec la β -cyclodextrine:

Introduction:

Dans cette partie, nous présentons une étude par modélisation moléculaire de la formation des complexes d'inclusion C_1 et C_2 , les molécules suivantes: la Benzo, la N-méthyl-Benzo et la β -CD qui contribuent à la formation de ces complexes ont été soumises aux mêmes procédures de computations.

Deux logiciels : l'Hyperchem 7.5 (pour les les calculs PM3) et Gaussian 09. (Pour les calculs quantiques) Ont été utilisés pour réaliser notre travail. Ces calculs computationnels comportent essentiellement des optimisations avec les méthodes semi empiriques AM1 et PM3.

Pour éviter toute confusion nous utiliserons pour toutes les optimisations seulement l'algorithme de Polack-Ribière avec un RMS de 0.01 kcal/mol.

Il nous a semblé plus judicieux d'extraire directement la β -CD du help de Chem-office 10:une structure compatible aux données cristallographiques de la β -CD donnée par la data base CSD. En revanche, les structures de la Benzoxazolinone, et son dérivé méthylé, ont été construites à l'aide de l'interface graphique du logiciel Hyperchem ensuite optimisées à différents niveaux de calculs, PM3, AM1 (figure.III.9).

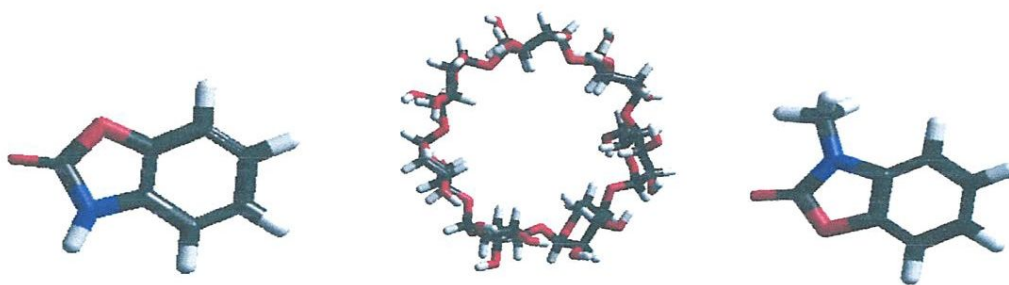


Figure.III.9 : Structures de la Benzo (à gauche), de la CH_3 Benzo (à droite)
Et de la β -CD (au milieu).

III.3.1) Procédure théorique de la formation d'un complexe d'inclusion:

- La première étape consiste à choisir des modes d'introduction de la molécule invitée à l'intérieure de la cavité de la cyclodextrine. Divers facteurs contribuent au choix

du mode d'introduction, on peut citer: la symétrie de la molécule invitée, sa taille, la présence des cycles hydrophobes, groupements polaires ... etc.

Nous avons donc choisi deux orientations de pénétration de la molécule invitée. Dans la première, notée **A**, les hétérocycles de la benzo ou son dérivé méthylé pénètrent en premier, en revanche dans la deuxième, notée **B**, le noyau aromatique pénètre le premier à l'intérieure de la cavité de la cyclodextrine.

- Dans un deuxième temps, la structure de la cyclodextrine est placée au centre d'un référentiel xyz. à l'aide de l'interface graphique d'Hyperchem(ici BCD sous forme space filling).(figure.III.10).

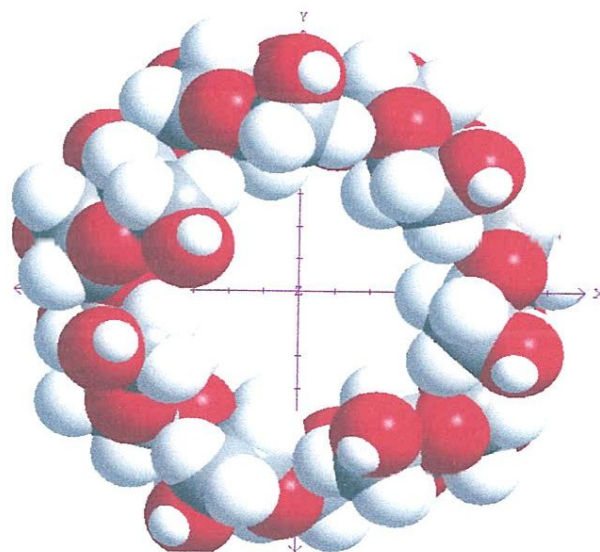


Figure.III.10 : Positionnement de la β CD au centre d'un référentiel xyz.

- Dans la troisième étape, la molécule invitée (la Benzo ou la N-méthyl Benzo) est placée selon l'axe OZ et sont choisis, un atome et une liaison de la molécule invitée pour servir comme élément de référence de déplacement (l'atome) ou de rotation (la liaison). Ensuite, la liaison de référence de la molécule invitée, placée au préalable à la position 9 \AA , est déplacée, par pas de 1 \AA , selon l'axe OZ, vers le point -9 \AA en traversant la cavité de la cyclodextrine.

A chaque déplacement la molécule invitée est tournée autour de la liaison de référence, avec des angles de 40° jusqu'à 360° et cela dans le but pour mieux explorer la surface d'énergie potentielle. A chaque mouvement de déplacement ou rotation, le système est optimisé sans aucune contrainte en utilisant la méthode semi empirique PM3.

Une fois tous les minimums locaux déterminés (à chaque point) il sera, donc, possible de localiser le minimum absolu [5].

III.3.2) Recherche du minimum d'énergie:

Les deux modes d'inclusion décrits précédemment ont été étudiés grâce à la méthode semi-empirique PM3, la minimisation d'énergie est effectuée avec un critère de convergence de 0.01 Kcal/mol. A°.

La détermination du minimum est une opération très difficile, sinon impossible, car il existe une infinité de point à l'intérieur de la cavité de la β -CD qu'il faut explorer [6]. Donc, nous pouvons seulement l'approcher. Nous avons contribué au développement d'une procédure de recherche systématique du minimum propre à nos complexes d'inclusion.

Les structures de molécules invitées étudiées sont représentées ci dessous:

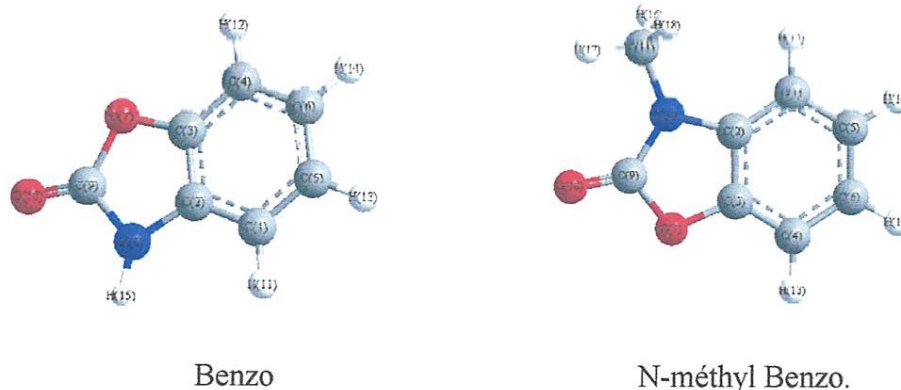


Figure.III.11 : Géométrie de la Benzo et son dérivé N-méthylé

Les résultats du processus théorique de l'inclusion de la Benzo et son dérivé méthylé dans la β CD sont présentés sur les figures et les tableaux donnés ci après :

Tableau.III.5: Énergies des complexes (C1) et (C2) prises pour les deux orientations

A et B



A et B.

| Complexe C ₁ | | | Complexe C ₂ | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Z (A°) | Energie (Kcal/mol) orientation A | Energie (Kcal/mol) orientation B | Z (A°) | Energie (Kcal/mol) orientation A | Energie (Kcal/mol) orientation B |
| 9 | -16102.9901 | -16102.4643 | 9 | -16379.8365 | -16379.2531 |
| 8 | -16102.9832 | -16104.7235 | 8 | -16378.2495 | -16379.2978 |
| 7 | -16102.9020 | -16105.8443 | 7 | -16380.1427 | -16380.7615 |
| 6 | -16102.7832 | -16103.6390 | 6 | -16386.3673 | -16381.0347 |
| 5 | -16103.9124 | -16110.6949 | 5 | -16386.3672 | -16378.6784 |
| 4 | -16106.0590 | -16112.1693 | 4 | -16383.3263 | -16388.9468 |
| 3 | -16106.0797 | -16109.6810 | 3 | -16385.0458 | -16383.2032 |
| 2 | -16108.7207 | -16109.5583 | 2 | -16388.2462 | -16385.3507 |
| 1 | -16108.7100 | -16110.5829 | 1 | -16388.1915 | -16385.4906 |
| 0 | -16111.1791 | -16110.5796 | 0 | -16385.9476 | -16389.7701 |
| -1 | -16111.0882 | -16108.0242 | -1 | -16388.0742 | -16389.7710 |
| -2 | -16108.7134 | -16110.1972 | -2 | -16388.0961 | -16389.7744 |
| -3 | -16108.9767 | -16106.9239 | -3 | -16387.1006 | -16385.8055 |
| -4 | -16107.7304 | -16106.3043 | -4 | -16383.9887 | -16385.8012 |
| -5 | -16107.7233 | -16106.4187 | -5 | -16386.3086 | -16383.7586 |
| -6 | -16106.5627 | -16105.2773 | -6 | -16380.1807 | -16382.9962 |
| -7 | -16102.6356 | -16102.9497 | -7 | -16380.1146 | -16382.6061 |
| -8 | -16106.5614 | -16102.6203 | -8 | -16380.0504 | -16383.2705 |
| -9 | -16103.3170 | -16104.0051 | -9 | -16380.0366 | -16383.2511 |

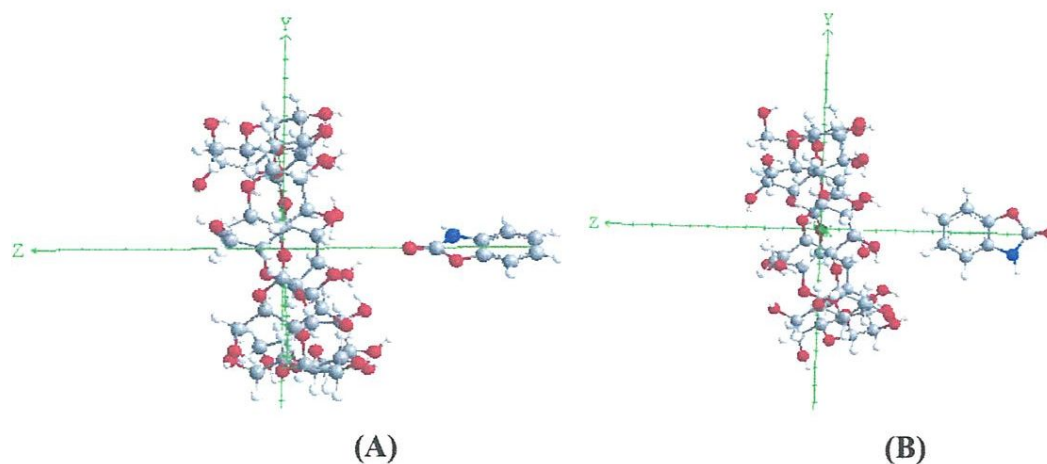


Figure.III.12: les deux orientations (A et B) de la Benzène pointées vers la face large de la β CD

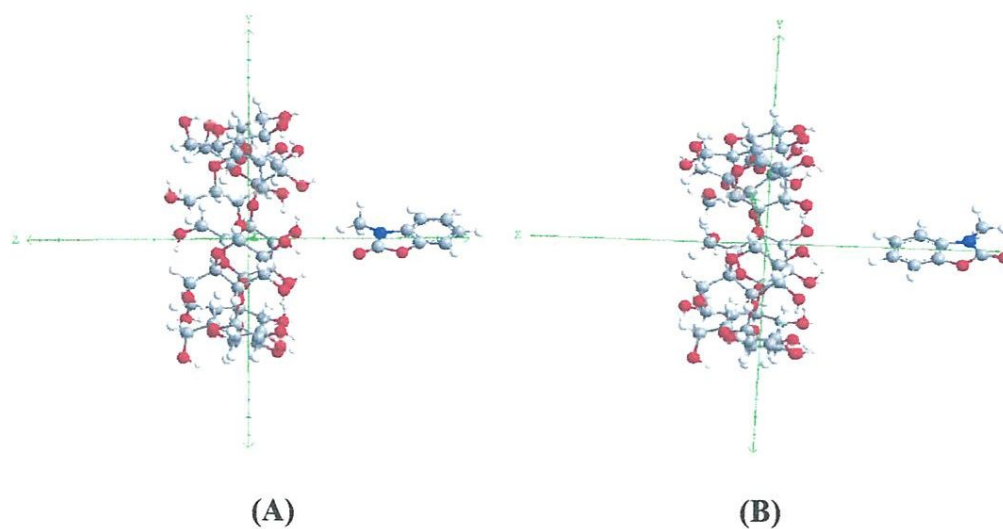


Figure.III.13: les deux orientations (A et B) de la Méthyl Benzène pointées vers la face large de la β CD

L'utilisation de ces minimums locaux permet à la fois de tracer les courbes des énergies des complexes et celles des énergies de complexation en fonction de la distance, séparant l'invitée et l'hôte.

Les calculs théoriques obtenus engendrent plusieurs structures pour les complexes C_1 et C_2 avec des énergies minimales différentes rapportées graphiquement sur (la figure.III.14) et (la figure III.15) successivement.

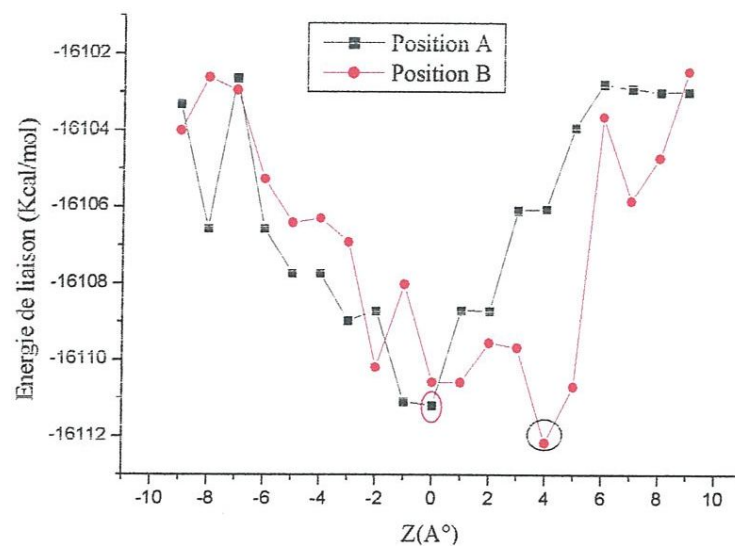


Figure.III.14 Energies du complexe d'inclusion Benzo/ β -CD(C1) en différentes positions Z (A°), pour les deux orientations A et B.

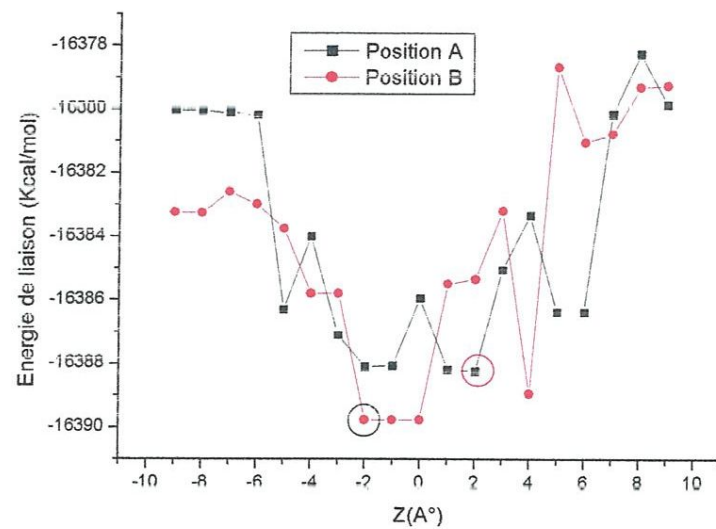


Figure.III.15 Energies du complexe d'inclusion N-méthylBenzo/ β -CD (C2) en différentes positions Z (A°), pour les deux orientations A et B.

D'après ces courbes on constate que les valeurs des énergies sont toutes négatives, ce qui prouve que les complexes d'inclusion formés, pour les deux orientations (A) et (B) des deux complexes C_1 et C_2 , sont thermodynamiquement stables ;

Pour le complexe C_1 un minimum énergétique par rapport à l'orientation A, a été localisé au début du processus c'est-à-dire à 0° correspondant à une énergie équivalente à -16111.1791 kcal/mol (Figure.III.14, position A). Cependant, pour l'orientation B, le minimum énergétique est obtenu à 4° avec une énergie de -16112.1693 kcal/mol (Figure.III.14, position B).

Dans le cas du complexe C_2 , un minimum énergétique par rapport à l'orientation A a été localisé au début du processus à 2° correspondant à une énergie égale à -16388.2462 kcal/mol (Figure.III.15, position A). En revanche, pour l'orientation B, le minimum énergétique est obtenu à -2° une position symétrique à celle trouvée pour l'orientation A avec une énergie égale à -16389.7744 kcal/mol (Figure.III.15, position B).

Les valeurs des énergies obtenues démontrent clairement que les molécules Benzoxazolinone et N-méthylBenzoxazolinone peuvent former des complexes d'inclusion stable avec la β -CD, et que l'orientation B est la plus favorable pour les deux complexes.

III.3.3) Calcul des chaleurs de formation et des énergies de complexation dans le vide:

Afin d'affiner notre étude et savoir la structure 3D la plus probable pour ces complexes, nous avons procédé à une modélisation par les méthodes semi empirique PM3 et AM1 pour tirer les valeurs de chaleurs de formation et calculer les énergies de complexation de ces complexes C_1 et C_2 , les résultats obtenus sont récapitulés dans les tableaux donnés ci-après :

Les résultats liés aux chaleurs de formation pour ces complexes confirment ceux liés aux énergies des complexes optimisés trouvés par le calcul du minimum énergétique, et que globalement l'orientation B est plus favorable par rapport à l'orientation A pour les deux complexes C1 et C2.

Aussi pour confirmer les résultats, obtenus à partir des énergies des complexes optimisés, nous avons calculés les énergies de complexation (stabilisation) pour ces complexes C₁ et C₂, dans le vide et en présence d'eau et d'acétonitrile, pour les deux orientations A et B.

Dans le vide, les calculs d'énergies des complexes optimisés C1 et C2 ont été effectués sur des structures ayant des énergies minimales obtenues avec PM3 et AM1. Les résultats de ces calculs sont illustrés dans (le tableau III.7) et (le tableau III.8) qui renferment également les moments dipolaires des complexes et leurs précurseurs ainsi que les énergies de complexation entre la molécule invitée (Benzo ou méthyl Benzoe) et la β-CD calculées à partir de l'équation suivante:

$$E_{\text{complexation}} = E_{\text{complexe}} - (E_{\beta\text{-CD}} + E_{\text{invitée}}) \quad [7]$$

Où :

$E_{\beta\text{-CD}}$: représente l'énergie de la β-CD optimisée dans le complexe obtenue après élimination de la molécule invitée.

$E_{\text{invitée}}$: représente l'énergie de la molécule invitée optimisée dans le complexe obtenue après élimination de la molécule β-CD.

Tableau.III.7 : Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C1 pour les deux orientations A et B dans le vide calculés par PM3 et AM1.

| | Benzo | BCD | Ort A | Ort B | Δ (A-B) (kcal /mol) |
|-----------------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|
| (PM3) | | | | | |
| E_{Opt} (kcal /mol) | -34.106 | -1456.967 | -1493.404 | -1489.221 | -4.183 |
| $E_{Complexation}$ (kcal /mol) | - | - | -2.330 | 1.852 | -4.182 |
| μ (Debye) | 3.700 | 7.158 | 10.212 | 5.036 | - |
| (AM1) | | | | | |
| E_{Opt} (kcal /mol) | -10.715 | -1604.033 | -1614.883 | -1611.173 | -3.710 |
| $E_{Complexation}$ (kcal /mol) | - | - | -0.135 | 3.575 | -3.71 |
| μ (Debye) | 3.892 | 5.982 | 9.300 | 4.083 | - |

Tableau.III.8 Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C2 pour les deux orientations(Ort) A et B .dans le vide calculés par PM3 et AM1.

| | CH3 -Benzo | BCD | Ort A | Ort B | Δ (A-B)(kcal /mol) |
|-----------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|
| (PM3) | | | | | |
| E_{Opt} (kcal /mol) | -45.215 | -1456.967 | -1504.791 | -1501.780 | -3.011 |
| $E_{Complexation}$ (kcal /mol) | - | - | -2.609 | 0.402 | -3.011 |
| μ (Debye) | 4.077 | 7.158 | 8.678 | 4.256 | - |
| (AM1) | | | | | |
| E_{Opt} (kcal /mol) | 17.577 | 1604.033 | 1616.810 | 1618.458 | 1.648 |
| $E_{Complexation}$ (kcal /mol) | - | - | 9.780 | 3.152 | 6.628 |
| μ (Debye) | 4.309 | 5.982 | 7.691 | 3.155 | - |

On relève que les deux méthodes AM1 et PM3 fournissent des valeurs comparables et que les faibles énergies obtenues représentent une preuve pour la formation de complexes stables.

Les valeurs des moments polaires révèlent que le complexe C2 est moins polaire que le complexe C1, ce résultat théorique s'accorde bien avec le résultat expérimentale trouvé par chromatographie sur couches minces(CCM) et évoqué précédemment.

Les conformations les plus favorables énergétiquement de ces complexes C1 et C2 pour les deux orientations A et B dans le vide obtenues au moyen des niveaux PM3 et AM1 sont représentées dans les figures ci-dessous:

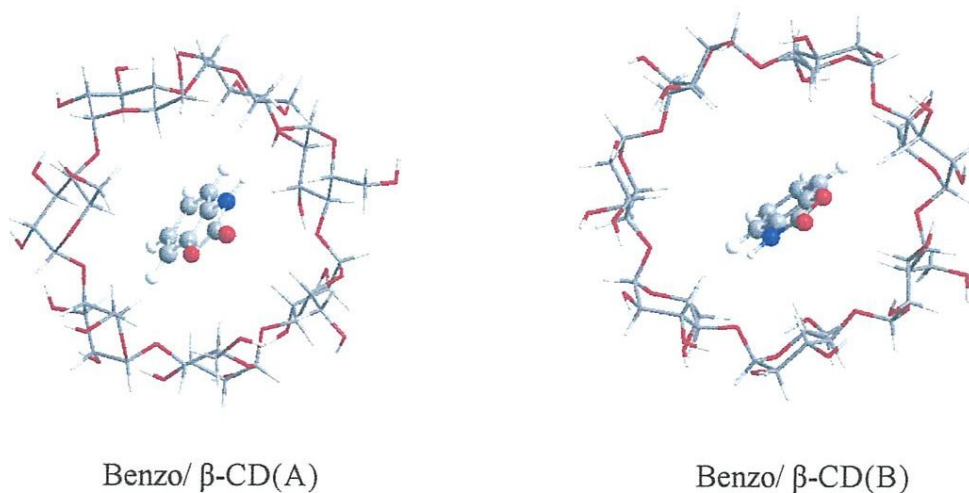


Figure.III.16 : Structures du complexe C1 pour les deux orientations A et B dans le vide correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3.

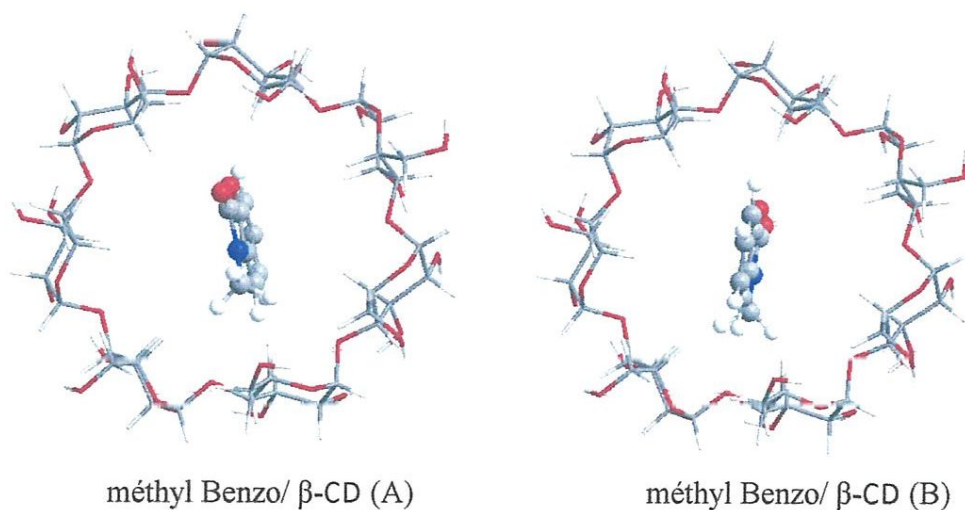


Figure.III.17 : Structures du complexe C2 pour les deux orientations A et B dans le vide correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3.

III.3.4) Calcul des énergies de complexation en solution:

La majorité des réactions chimiques et biologiques ont lieu en solution en particulier l'eau et les effets dus au solvant peuvent être capitales sur le comportement des molécules étudiées en solutions. Le solvant influe directement sur les interactions non liantes et sa présence peut être simulée de deux manières: en introduisant effectivement les molécules de solvant dans le système étudié (solvant explicite) ou bien en mimant sa présence implicitement dans les calculs de la fonction d'énergie (solvant implicite) [8].

Dans notre étude nous avons calculé les énergies de solvation en présence d'eau et d'acétontrile des deux complexes C1 et C2 pour les deux orientations A et B en utilisant seulement la méthode semi empirique PM3. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants:

Tableau.III.10 : Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C1 pour les deux orientations(Ort) A et B en présence d'eau et d'acétontrile calculés par PM3.

| | Benzo | BCD | C ₁ | | Δ (A-B) (kcal /mol)) |
|--|----------|------------|----------------|-----------|--------------------------------|
| | | | Ort A | Ort B | |
| E_{Opt}/H_2O (kcal /mol) | - 38.890 | - 1474.733 | - 1539.401 | -1542.176 | 2.776 |
| $E_{Complexation}/H_2O$ (kcal /mol) | - | - | -25.778 | -28.553 | 2.775 |
| μ/H_2O (Debye) | 4.688 | 3.177 | 13.005 | 6.031 | - |

| | | | | | |
|--|---------|-------|-----------|-----------|--------|
| E_{OPT}/CH_3CN (kcal /mol) | -38.770 | 4.663 | -1538.062 | -1534.142 | -3.920 |
| $E_{Complaxation}/CH_3CN$ (kcal /mol) | - | - | -16.248 | -12.328 | -3.92 |
| μ /CH_3CN (Debye) | 4.663 | 7.605 | 11.077 | 4.459 | - |

Tableau.III.11 : Energies et moments dipolaires des structures optimisées, et énergies de complexation de C2 pour les deux orientations(Ort) A et B en présence d'eau et d'acétontrile calculés par PM3.

| | CH3- Benzo | BCD | C ₂ | | Δ (A-B) (kcal /mol) |
|--|---------------|-----------|----------------|------------|-------------------------------|
| | | | Ort A | Ort B | |
| E_{Opt}/H_2O (kcal /mol) | - 49.830 | -1474.733 | -1533.309 | - 1529.345 | -3.964 |
| $E_{Complaxation}/H_2O$ (kcal /mol) | - | - | -8.746 | - 4.782 | - 3.964 |
| μ /H_2O (Debye) | 5.275 | 3.177 | 10.866 | 4.479 | - |
| E_{OPT}/CH_3CN (kcal /mol) | - 49.713 | -1483.044 | -1532.492 | -1528.567 | - 3.925 |
| $E_{Complaxation}/CH_3CN$ (kcal /mol) | - | - | -0.552 | 3.412 | - 3.964 |
| μ /CH_3CN (Debye) | 5.244 | 7.605 | 10.780 | 4.490 | - |

Les résultats sur l'effet de la solvation représentés par les énergies de complexation indiqués dans les tableaux, montrent que les complexes C1 et C2 sont aussi stables en présence d'eau et d'acétonitrile. Les conformations les plus favorables énergétiquement de ces complexes C1 et C2 pour les deux orientations A et B dans l'eau et l'acétonitril obtenues au moyen des méthodes PM3 et AM1 sont représentées dans les figures ci-dessous:

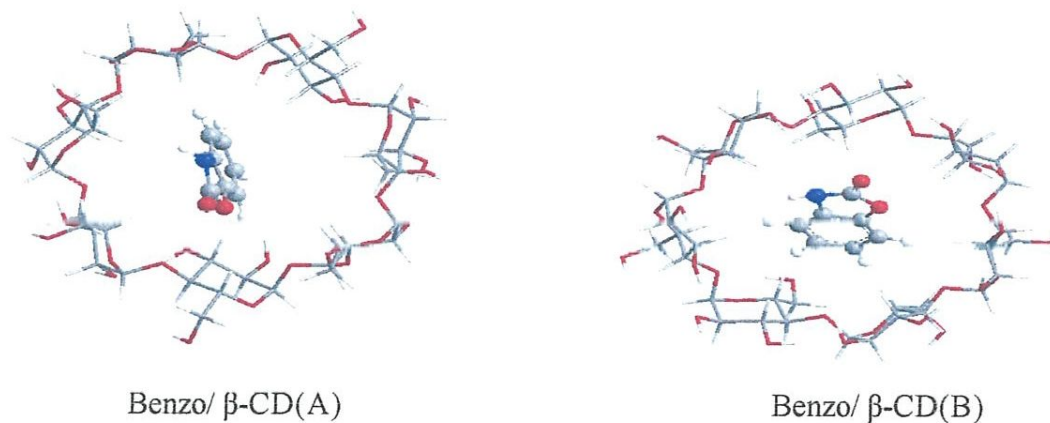


Figure.III.18 : Structures du complexe C1 pour les deux orientations A et B dans l'eau et correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3

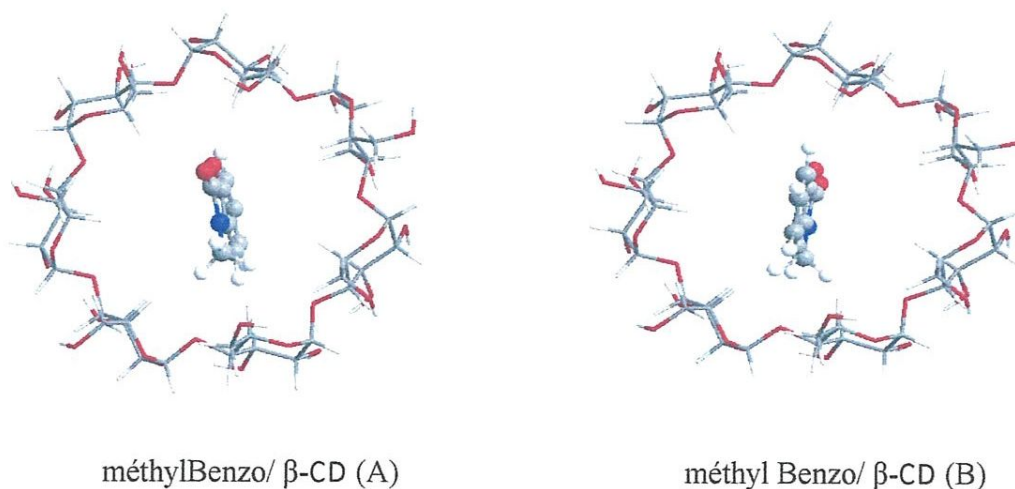


Figure.III.19 : Structures du complexe C2 pour les deux orientations A et B dans l'eau et correspondantes aux minima d'énergies optimisées par PM3.

III.4) Conclusion:

Au cours de ce travail nous avons étudié l'interaction de la benzoxazoline et son dérivé N-méthylé avec la β -cyclodextrine connu comme vecteur biologique.

L'étude expérimentale aux moyens des techniques spectrométriques usuelles des complexes d'inclusion de ces molécules biologiquement actives en état solide et en solution dans l'eau et l'acétonitrile a permis de mettre en évidence la formation de ces complexes. Par ailleurs, l'utilisation de méthodes théoriques de modélisation moléculaire En particulier, les niveaux semi-empirique AMI et PM3 a été envisagée et a permis de déterminer les conformations énergétiquement favorables pour ces complexes dans le vide et en présence d'eau et d'acétonitrile.

On constate que les résultats de l'étude expérimentale s'accordent et se trouvent bien validés par les résultats de l'étude théorique par modélisation moléculaire.

6

✓

Chapitre (IV)

Protocoles Expérimentaux

IV) Protocoles expérimentales

IV.1) Remarques générales:

- Les rendements expérimentaux sont exprimés en pourcentage des produits purs isolés par rapport à la quantité de matières premières mise en œuvre.
- Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil à point de fusion sur capillaire (appareil electrothermal (IA9000)).
- L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince à l'aide de plaques en aluminium enduites de silice (Merck 60 F254, épaisseur de la couche 0,25 mm). Après élution, les tâches sont visualisées sous lumière U.V ($\lambda = 254-366$ nm), solvant de migration acétate d'éthyle/ Cyclohexane et ammoniac /isopropanol.
- 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 (ν) sont indiquées en cm^{-1} .

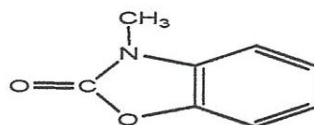
IV.2) Pastillage dans le KBr:

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 interfacé à un microordinateur.

Les longueurs d'onde (λ) sont indiquées en nm.

IV.3) Synthèse de la methyl-3-benzoxazolinone:



Réactifs:

| | |
|-------------------|------------------|
| Sodium | 0.35 g 0.02 mole |
| Ethanol | 50 ml |
| Benzoxazolinone | 2g 0.02 mole |
| Iodure de méthyle | 6.8ml |

Mode opératoire:

Dans un ballon rodé de 250 ml contenant 0.35 g de sodium dissout dans 50.0 ml d'éthanol absolu et 2 g de Benzoxazolinone , puis goutte à goutte et sous agitation à température ambiante, on ajoute 6.8 ml de CH₃I (iodure de méthyle), après 12 heures , le solvant est chassé par le rotavapeur, ensuite on ajoute (30 à 40 ml) d'eau et on porte le mélange sous agitation pendant 1 heure , le précipité obtenu est essoré, lavé ensuite recristallisé dans l'éthanol-eau (80 /10) .

Solvant de recristallisation , éthanol/eau (80 .10)

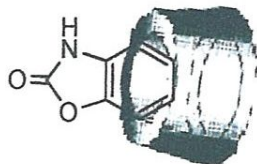
| | |
|-----------------------|---|
| Poids moléculaire | M=149.15 g/mol pour C ₈ H ₇ NO ₂ |
| Rendement | 90 % |
| R _f = 0.83 | (Acétate d'éthyle /cyclohexan) |
| Point de fusion | 88°C |

Spectrométrie dans l'infrarouge:

| | | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|
| 3428 Cm ⁻¹ | Vibration | N-CH ₃ |
| 2932 Cm ⁻¹ | Vibration | (C-H) du CH ₃ |
| 1762 Cm ⁻¹ | Vibration | C=O (oxazol) |
| 1616 Cm ⁻¹ | Vibration | C=C _{Ar} |
| 1490 Cm ⁻¹ | Vibration | (C-O-)(oxazol) |
| 751 Cm ⁻¹ | Déformation | CH ₂ |

Spectrométrie dans l'UV-Vis:

| | | |
|---|-----------------------------------|------------|
| -Dans CH ₃ CN à 10 ⁻⁴ M : | $\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$ | Abs= 0.929 |
| -Dans H ₂ O à 10 ⁻⁴ M : | $\lambda_{\max} = 272 \text{ nm}$ | Abs= 0.927 |

IV.4) Préparation des complexes d'inclusion à l'état solide:**IV.4.1) Préparation du complexe β CD - Benzoxazolinone:**complexe d'inclusion Benzoxazolinone - β CD**Mode opératoire:**

1g (0,00088mol) de β CD(1 éq) sont dissout dans 10 ml d'éthanol absolu, ensuite 0,1188g (0,00088mol) de Benzoxazolinone(1 éq) dissout dans 10 ml du même solvant(éthanol) sont ajouté goutte à goutte ,le mélange réactionnel obtenu est laissé sous agitation magnétique et à température ambiante. Après 24 heures d'agitation on obtient un précipité, qu'on récupère par filtration suivi par lavage avec une petite quantité d'éthanol et d'eau, enfin le précipité est recristallisé dans un mélange (eau /éthanol :20 / 80), après séchage sous vide un solide blanc est recueilli.

- Solvant de recristallisation :(éthanol/eau :(80 /10)

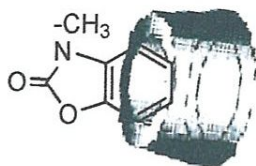
| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| Poids moléculaire | M= 1270 g/mol |
| Rendement | 85 % |
| Rf = 0.75 | (ammoniaque /isopropanol :20/80) |
| Point de fusion | 278°C |

Spectrométrie dans l'infrarouge:

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 3383 Cm^{-1} | Vibration | OH |
| 3199 Cm^{-1} | Vibration | (C-H) CD |
| 2929 Cm^{-1} | Vibration | CH ₂ |
| 1658 Cm^{-1} | Vibration | C=Carom |
| 1157 Cm^{-1} | Vibration | (C-O-)(oxazol) |
| 1074 Cm^{-1} | Vibration | C- C _{BCD} |
| 1022 Cm^{-1} | Vibration | C- O-C _{BCD} |

Spectrométrie dans l'UV-Vis:

| | | |
|---|-----------------------------------|------------|
| -Dans CH ₃ CN à 10 ⁻⁴ M : | $\lambda_{\max} = 274 \text{ nm}$ | Abs= 0.133 |
| -Dans H ₂ O à 10 ⁻⁴ M : | $\lambda_{\max} = 270 \text{ nm}$ | Abs= 0.073 |

IV.4.2) Préparation du complexe β CD -N- methyl-Benzoxazolinone:

complexe d'inclusion Benzoxazolinone -BCD

Mode opératoire:

1.6834g (1.4832 x 10⁻³mol) de β CD (1éq) sont dissout dans 10 ml d'éthanol absolu, ensuite 0,221g (1.4832 x 10⁻³mol) de N-méthyl-Benzoxazolinone(1éq) dissout dans 10 ml du même solvant(éthanol) sont ajoutés goutte à goutte, le mélange réactionnel obtenu est laissé sous agitation magnétique et à température ambiante.

Après 24 heures d'agitation on obtient un précipité, qu'on récupère par filtration suivi par lavage avec une petite quantité d'éthanol et d'eau, enfin le précipité est recristallisé dans un mélange (eau /éthanol :20/80), après séchage sous vide un solide blanc est recueilli.

- Solvant de recristallisation : (éthanol/eau (80 :10)

| | |
|-------------------|------------------------------------|
| Poids moléculaire | M=1284 g/mol |
| Rendement | 90 % |
| Rf = 0.2 | (ammoniaque /isopropanol :20 / 80) |
| Point de fusion | 280°C |

Spectrométrie dans l'infrarouge:

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 3407 Cm ⁻¹ | Vibration | OH |
| 2929 Cm ⁻¹ | Vibration | CH ₂ |
| 1626 Cm ⁻¹ | Vibration | C=Carom) |
| 1157 Cm ⁻¹ | Vibration | (C-O-)(oxazol) |
| 1074 Cm ⁻¹ | Vibration | C- C _{BCD} |
| 1021 Cm ⁻¹ | Vibration | C- O-C _{BCD} |

Spectrométrie dans l'UV-Vis:

- Dans CH₃CN à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$ Abs= 0.148
- Dans H₂O à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 272 \text{ nm}$ Abs= 0.0.017

IV.5) Préparation des complexes d'inclusion à l'état solution:**Mode opératoire général:**

Le processus expérimental de préparation des complexes d'inclusion en solution consiste tout d'abord à préparer des solutions de mêmes concentrations de la Benzoxazolinone ou son dérivé N-méthylé et la β -Cyclodextrine dans l'eau ou l'acétonitrile. Ensuite des quantités égales de benzoxazolinone ou son dérivé N-méthylé sont mélangés avec la β -Cyclodextrine et homogénéisés aux ultrasons pendant un laps de temps jusqu'à atteindre un équilibre thermodynamique entre les précurseurs et les complexes formés. Juste après, une cuve en quartz contenant successivement le solvant puis les échantillons en solution obtenues est exposée à la radiation ultra-violette. Les spectres sont alors automatiquement enregistrés.

IV.5.1) Caractérisation par spectrométrie uv-visible des complexes obtenus en solution :**IV.5.1.1) Complexe d'inclusion BCD-Benzoxazolinone:****Spectrométrie dans l'UV-Vis:**

- Dans CH₃CN à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 274 \text{ nm}$ Abs= 0.133
- Dans H₂O à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 270 \text{ nm}$ Abs= 0.0.073

IV.5.1.2) Complexe d'inclusion β CD-N-methyl-Benzoxazolinone:**Spectrométrie dans l'UV-Vis:**

- Dans CH₃CN à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$ Abs= 0.148
- Dans H₂O à 10⁻⁴M : $\lambda_{\max} = 272 \text{ nm}$ Abs= 0.0.017

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail que nous avons réalisé entre dans un thème général orienté essentiellement au domaine de la pharmacochimie de la Benzoxazoline et ses produits de transformation.

- Le premier chapitre de ce mémoire qui est présidé d'une introduction générale, est une description de la Benzoxazolinone et ses produits de transformation. En effet, outre leur intérêt pharmacologique propre dans les domaines analgésiques et anti-inflammatoire, ces composés constituent des briques de départ essentielles pour la synthèse médicamenteuse.

- Le deuxième chapitre de ce travail donne un aperçu général sur les cyclodextrines qui sont les composés de premier choix pour la formation de complexes d'inclusion de type hôte-invité avec un grand nombre de molécules. Dans ce chapitre, nous avons aussi évoqué la modélisation moléculaire. En effet, les calculs de la modélisation moléculaire, permettent de déterminer à la fois la géométrie et les paramètres caractéristiques de ces complexes. La connaissance de ces paramètres, facilitera la compréhension de leurs propriétés chimique, physico-chimique et pharmacologiques.

- Le chapitre résultats et discussions de ce mémoire est consacré en premier temps à la synthèse et caractérisation de la N-méthyl-Benzoxazolinone : Une molécule possédant un grand intérêt pharmaceutique. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'interaction de la Benzoxazolinone et son dérivé méthylé ainsi synthétisé avec la β -cyclodextrine connue comme vecteur biologique.

L'étude expérimentale aux moyens des techniques spectrométriques usuelles des complexes d'inclusion de ces molécules en état solide et en solution dans l'eau et l'acétonitrile a permis de mettre en évidence leur formation. Par ailleurs, l'utilisation de méthodes théoriques de modélisation moléculaire en particulier, les niveaux semi-empirique AM1 et PM3 a été envisagée et a permis de déterminer les conformations énergétiquement favorables pour une stœchiométrie 1:1 de ces complexes dans le vide et en présence d'eau et d'acétonitrile.


On constate que les résultats de l'étude expérimentale s'accordent et se trouvent bien validés par les résultats de l'étude théorique par modélisation moléculaire.

- Le quatrième chapitre de ce mémoire est réservé aux protocoles expérimentaux et aux résultats de l'étude que nous avons menée.


Bibliographie



Références Bibliographiques**Chapitre (I)**


- [1] Grenwik, bull.Soc.Chimie(1876), 25178.
- [2] Ch.Lespagnol et A. Marcinal.lefebvre.La benzoxazolinone et ses dérivés considérés sous l'angle de la chimie thérapeutique, Chim.Ther-(1967), 5),395.
- [3] G. Mairesse, JC. Boivin, DG. Thomas, MC. Bermann, JP. Bonte, D. Lesieur (1984) Acta Crystallogr C 40: 1019
- [4] H. Aichaoui, JH. Poupaert, D. Lesieur, JP. HeÂnichart (1992) Bull Soc Chim Belg101: 1053
- [5] JP. Bonte, D. Lesieur, C. Lespagnol, M. Plat, JC. Cazin, M. Cazin (1974) Eur J Med Chem 9: 491.
- [6] H. Aichaoui, JH. Poupaert, D. Lesieur, JP. HeÂnichart (1992) Bull Soc Chim Belg 101:1053.
- [7] J -P. Bonte, benzoxazolinones acylées sur le noyau aromatique, thème de doctorat d'état en pharmacie - Lille- 1973
- [8] O.Diouf, P. Depreux, D. Lesieur, JH. Poupaert, DH. Caignard (1995) Heterocycles 41: 1219
- [9] H. Aichaoui., D. Lesieur, JP. HeÂnichart (1992) J Heterocyclic Chem 29: 171
- [10] A. Lespagnol, bubet et Mangy.Sure le pouvoir hypnotique de dérivés de la benzoxazolinone .C.R. Soc .biol -lille -(1941) , 1225 .
- [11] H. Aichaoui, JH. Poupaert, D. Lesieur, JP. HeÂnichart (1991) Tetrahedron 47: 6649.
- [12] J. Sam, J.L.Valentine, préparation and proprieties of 2- benzoxazolinones.J. Pharm , sci (1969) , 58 (9), 1043.
- [13] A. Marcinal-Le febre, Recherche dans la série des benzoxazolinones, theme de doctorat d'état en pharmacie-Lille-1976.
- [14] M. STITI, Thèse de Magister en Pharmacochimie, Benzoxazolinones et produits de transformation, université d'Annaba, 1996.
- [15] F.E. Dayan, S.O. Duke, (2003) Encyclopedia Agrochem. 2 744
- 

Chapitre (II)

- [1] J. Szejtli, Chem. Rev., 98 (1998) 1743-1753.
- [2] W.Saenger, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D.MC Nichol, Academic press, London, 2 (1984) 131-259.
- [3] W.Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha, Chem. Rev., 98(5) (1998) 1787-1802.
- [4] K. Harata., Chem. Rev., 98(5) (1998) 1803-1828.
- [5] J. S. Paginton; Chem. Pharm. Bull., 35(11) (1987) 14609-4615.
- [6] J.Szejtli, " Cyclodextrins and their inclusion complexes", Academiai Kiado, Budapest, Hungary, (1982)100-109 ,
- [7] M.J. Jozwiakowski, K.AConnors, Carbohydr. Res, 143 (1985) 51-59.
- [8] M. Bilal, C.de Brauer, P. Claudy, P. Germain, J.M. Létoffé, Thermochemica Acta, 249 (1995) 63-73.
- [9] P. Germain, J. M. Letoffe, M. P. Merlin, H. J. Buschmann, Thermochem. Acta., 315 (1998) 87-92.
- [10] P.Claudy, P. Germain, J.M. Letoffe, A. Bayol, B. Gonzalez, Thermochemica Acta, 161(1) (1990) 75-84.
- [11] C. De Brauer, M. P. Merlin, P. Germain, T. Guerandel, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 37(1-4) (2000) 75-82,
- [12] Barillaro, V., 2006. 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.
- [13] M. M. Meier, M. Luiz, P. Farmer, B. Szpoganicz, J.Incl. Phenom., 40 (2001) 291-295.
- [14] D. Kois, U.H. Brinker, J. Am. Chem. Soc., 120(45) (1998) 4314-4319.
- [15] L. Liu, Q.-X. Guo, J. Incl. Phenom., 42 (2002) 1-14.
- [16] A. Karlsson, C. Charron, J. Chromatogr. A., 732 (1996) 245-253.
- [17] M. Kitagawa, M. Sakurai, H. Hoshi, R. Chujo, Y. Inoue, Bull. Chem. Soc .Jpn., 61 (1988) 4225-4229.
- [18] C. El fakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A., 727 (1996) 71-82.
- [19] G. Crini, M. Morcell, N. Morin, L'actualité chimique, 247 (2001) 18-25.
- 

- [20] I. Caron, C. El fakir, M. Dreux, J. Liq. Chrom., 20 (1997) 1015-1035.
- [21] "Computational chemistry", HyperChem Manual, Hypercube Inc., Waterloo, Ontario, Canada (1994).
- [22] G. SEGAL, "La modélisation moléculaire - Les logiciels : tendances et évolution", Le Technoscope de Biofutur, n° 34, février 1990.
- [23] J. S. LOMAS, "La mécanique moléculaire, une méthode non quantique pour le calcul de la structure et de l'énergie d'entités moléculaires", L'actualité chimique, mai 1986, 7.
- [24] D.B. BOYD et K.B. LIPKOWITZ, "Molecular Mechanics", Journal of Chemical Education, n°59, 1982, 269 - 274.
- [25] J. P. BAYS, "So You Want To Do Molecular Modeling ?", Journal of Chemical Education, n°69, 1992, 209 - 215.
- [26] M. LOUP, "Le temps des modèles", Le Journal du CNRS, n°50, 1994.

Chapitre (III)

- [1] J P. Bonte, benzoxazolinones acylées sur le noyau aromatique, thème de doctorat d'état en pharmacie – Lille- 1973
- [2] Coe, D.M.; Perciaccante, R.; Procopion, RA, Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 1106.
- [3] Fava, C.; Galeazzi, R.; Orena, M, ECSOC-5. 2001, 1-6.
- [4] Chan Sun Park.; Min Sung Kim. Tae Bo Sim.; Do Kuy Pym.; Cheol Hae Lee;
- [5] Manuel: "HyperChem® Release 7 for Windows®, Tools for molecular modelling", Copyright ©Hypercube, Inc, 2002.
- [6] C.L. Yan, X.H. Li, Z.L. Xiu, C. Hao, J. Mol. Struct. 764 (2006) 95-100.
- [7] D.J. Barbiric, E.A. Castro, R.H. de Rossi, J. Mol. Struct. (THEOCHEM), 532 (2000) 171-181
- [8] C.L. Yan, X.H. Li, Z.L. Xiu, C. Hao, J. Mol. Struct. 764 (2006) 95-100.
- 

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100