



Université 08 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences et de l'Ingénierie
Département de Génie des procédés

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

ETUDE SPECTROFLUORIMETRIQUE DES COMPLEXES D'INCLUSION DES CENU PAR LA β -CYCLODEXTRINE

Chimie Industrielle

Option: Génie des procédés organique

Intitulé: Chimie physique

Année 2008

Présenté par :

Hassina FISLI

Directeur du mémoire

Pr. Mohamed ABDAOUI

Devant le jury composé de :

MM.

AOUF Nouredine	Professeur Université Annaba	Président
ABDAOUI Mohamed	Professeur Université Guelma	Rapporteur
MERDES Rachid	Professeur Université Guelma	Examineur
BOUDJAHM A.G.	M. conférences Université Guelma	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Appliquée de l'Université de Guelma, sous la direction de Monsieur le Professeur ABDAOUI Mohamed. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus chaleureux, pour sa droiture, sa disponibilité, son aide, son soutien, ses précieux conseils et surtout pour sa patience ; ainsi que ses nombreuses qualités professionnelles et humaines, qui m'ont permis de réaliser ces travaux de thèse dans une atmosphère des plus agréables. Je tiens également à lui exprimer ma plus profonde reconnaissance pour m'avoir permis de m'épanouir au sein de son groupe. Je le remercie de m'avoir offert d'excellentes conditions de travail.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à M^{me} Dhaoui Nabila qui est un exemple de soin et d'organisation dans son travail, pour l'aide et le support qu'elle m'a apportée par ses conseils et sa gentillesse.

Je remercie très sincèrement M^{lle} Chéghib Nadjoua, M^{lle} Nigri Soraya et très particulièrement M^{me} Ben Souilah Ndjia, pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie le Chef de Département de Chimie Industrielle Monsieur Ben Hamza M. H., ainsi que Mr Nemamcha A., qui m'ont souvent dépanné et par conséquent m'ont permis de travailler dans des conditions optimales.

Mes sincères remerciements s'adressent à Messieurs les Membres du Comité de Thèse.

Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger cette thèse ; Monsieur Merdas Rachid, Professeur à l'Université de Guelma et Monsieur Boudjahem Abdelghani, Maître de conférences à l'Université de Guelma, ont accepté d'être les examinateurs scientifiques de ce travail. Qu'ils en soient vivement remerciés.

Je remercie sincèrement Monsieur Aouf Noureddine Professeur à l'Université d'Annaba, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Enfin, un très grand merci à mon mari et mes parents pour m'avoir apporté un soutien sans faille. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, même dans les moments difficiles.

Merci à tous

*A mon mari
A mes très chers parents
Et à toute ma famille*

Résumé

La chimiothérapie antitumorale s'est largement intéressée aux composés du type N-(2-chloroéthyl) nitrosourées (CENU). Les générations les plus récentes de ces composés associent au pharmacophore (2-chloroéthyl)-nitrosocarbamate un vecteur biologique dans le but d'une meilleure assimilation. Les cyclodextrines apparaissent comme d'excellents candidats pour optimiser leurs actions, en particulier pour ceux qui présentent une stabilité très limitée et/ou sont insolubles dans l'eau.

Dans une optique d'amélioration de la solubilité et de la stabilité des CENU et afin d'introduire des possibilités de pharmacomodulation, nous avons envisagé la préparation d'une nouvelle génération de CENU.

Les interactions d'inclusion entre une série de chloroéthylnitrosourées (les CENU dérivées de la dibenzylamine, diphénylamine, aniline, 2-méthoxyaniline, 2-méthylaniline et 2-fluoroaniline) et la β -cyclodextrine ont été étudiées en solution par spectrofluorimétrie. La caractérisation des complexes, leur stoechiométrie, leur comportement en solution et leur stabilité, ainsi que la détermination des constantes d'association et l'étude de l'effet du solvant ont été établies et montrent que l'inclusion dans la β -cyclodextrine apparaît comme un mode de formulation prometteur pour les CENU.

Mots clés

Chimiothérapie- Agents alkylants- Nitrosourées- Cyclodextrines- Spectrofluorimétrie- Stoechiométrie- Méthode des variations continues- Méthode des rapports molaires- Constante de stabilité- Méthode de Benessi-Hildebrand.

Abstract

The antitumor chemotherapy is largely interested in compounds of the type N-(2-chloroethyl) nitrosoureas (CENU). The most recent generations of these compounds associate the pharmacophore (2-chloroethyl)-nitrosocarbamate to a biological vector for a better assimilation. Cyclodextrins appear as excellent candidates to optimize their actions, particularly for those which present a limited stability and/or which are insoluble in water.

For the purpose of the improvement of solubility and stability of the CENU and for introducing possibilities of pharmacomodulation, we considered the preparation of a new generation of CENU.

Host-guest association between chloroethylnitrosoureas (CENU) (derivated from dibenzylamine, diphenylamine, aniline, 2-methoxyaniline, 2-methylaniline and o-fluoroaniline) and β -cyclodextrin was carried out in solution by spectrofluorometry. Characterisation, stoichiometry, solubility, dissociation constants stability and solvent effect of such complexes were studied, showing that the inclusion with β -CD appears as a promising mode of formulation of 2-chloroethylnitrosoureas.

Key words

Chemotherapy- 2-Chloroethylnitrosoureas- β -Cyclodextrin- Inclusion complexes- Spectrofluorometry- Stoichiometry- Job's method- Ratio molar method- Association constant- Benesi-Hildebrand method.

ملخص

ان النتائج الملحوظة للعلاج الكيميائي ضد الاورام حفز البحوث نحو تحسين مواد قيد الاستعمال و محاولة ايجاد مواد اخرى ذات فاعلية بيولوجية اكبر و اقل سمية.

و في نفس الصدد فان فاعلية المواد المؤكدة على الاورام الصلبة ادت الى تطوير جيل جديد يضم حامل بيولوجي.

بالرغم من الفاعلية العالية لمركبات الكلوراثيل نتروزيوريا، الا ان هذه الاخيرة قليلة الذوبان و الثبات مما دفعنا الى اللجوء الى β دكسترين الحلقي نظرا لكونه يمتلك خاصية تكوين مركبات التداخل.

ان العمل المنوط بنا يتمثل في دراسة لمركبات تداخل الكلوراثيل نتروزيوريا بواسطة β دكسترين الحلقي مركب جديد يعول على كونه اكثر فاعلية للجسم و اكثر استقرارا، بواسطة طريقة عالية الحساسية و الدقة، مقياس شدة التفلور.

ان النتائج المتحصل عليها تشير الى ان المركبات الجديدة تتمتع بميزات جيدة من حيث تحسين الخصائص التي اجريت الدراسة من اجلها.

الكلمات الدالة

العلاج الكيميائي- المواد المؤكدة- الكلوراثيل نتروزيوريا- β -دكسترين الحلقي- مقياس شدة التفلور.

Table des matières

Table des matières.....	i
Liste des abréviations.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures et schémas.....	viii
Introduction.....	1

Première partie

Aperçu bibliographique

Chapitre 1 Le cancer et la chimiothérapie.....	4
1.1 Le cancer.....	4
1.1.1 Introduction.....	4
1.1.2 Principes de la thérapie anticancéreuse.....	4
1.2 La chimiothérapie.....	6
1.2.1 Agents anticancéreux.....	6
1.2.2 Classification des agents antinéoplasiques selon leur mode d'action.....	7
1.2.3 Les agents alkylants.....	7
1.2.4 Mécanisme de cytotoxicité des agents alkylants.....	9
Chapitre 2 Les nitrosourées.....	10
2.1 Les nitrosourées.....	10
2.1.1 Propriétés des CENU.....	10
2.1.2 Mécanisme d'action des CENU.....	12
2.2 L'isocyanate.....	13
2.2.1 Propriétés chimiques.....	14
2.2.2 Propriétés physiques.....	17
Chapitre 3 Les cyclodextrines.....	18
3.1 Introduction.....	18
3.2 Production des cyclodextrines.....	18
3.3 Structure des cyclodextrines.....	19
3.4 Caractéristiques physicochimiques.....	20
3.5 La β -cyclodextrine naturelle.....	22
3.6 Cyclodextrines modifiées.....	22
3.7 Toxicité.....	23
3.8 Applications.....	24
3.9 Exemples.....	25
Chapitre 4 Les complexes d'inclusion.....	28
4.1 Généralités sur la complexation.....	28

4.1.1	Forces impliquées dans les complexes d'inclusion des cyclodextrines.....	29
4.1.2	Formation d'un complexe d'inclusion.....	31
4.1.3	Conséquences de la complexation.....	31
4.2	Méthode de caractérisation des complexes d'inclusion	32
4.3	Préparation des complexes d'inclusion.....	33
4.3.1	Complexation en solution.....	33
4.3.2	Complexation en système hétérogène	33
4.4	Détection de la formation d'un complexe d'inclusion	34
4.4.1	Détection de l'inclusion à l'état solide	34
4.4.2	Détection de l'inclusion en solution	34
4.5	Caractéristiques des complexes d'inclusion.....	34
4.5.1	Détermination de la stoechiométrie.....	34
4.5.1.1	Méthode des variations continues	35
4.5.1.2	Méthode des rapports molaires	35
4.5.2	Détermination de la constante de stabilité.....	36
4.6	Travaux antérieurs de notre groupe.....	36
Chapitre 5	La spectrofluorimétrie	38
5.1	Généralités.....	38
5.2	La fluorescence	39
5.2.1	Principe de la fluorescence.....	39
5.2.2	Analyse spectrofluorimétrique	40
5.2.3	Caractéristiques des fluorophores	41
5.2.4	Caractéristiques de l'émission de fluorescence	41
5.2.4.1	Déplacement de Stokes.....	41
5.2.4.2	Relation entre le spectre d'émission et la longueur d'excitation.....	42
5.2.4.3	Spectre d'excitation de fluorescence	43
5.2.4.4	Relation fluorescence et diffusion de lumière.....	43
5.2.5	Spectrométrie de fluorescence.....	44
Deuxième partie		
Résultats et discussion		
1	Synthèse des 2-chloroéthylurées.....	45
1.1	Caractéristiques physico-chimiques.....	46
1.2	Caractéristiques spectroscopiques.....	46
2	Synthèse des 2-chloroéthylnitrosourées.....	49
2.1	Propriétés physico-chimiques et spectrales.....	49
2.2	Discussion des résultats obtenus	54
3	Etude en solution des complexes d'inclusion β -CD-CENU	56

3.1	Mise en évidence de la formation des complexes	56
3.2	Détermination de la stoechiométrie.....	59
3.2.1	Méthode des variations continues	59
3.2.2	Méthode des rapports molaires	60
3.3	Effet de l'ajout de la β -CD sur l'intensité de fluorescence des CENU	62
3.4	Détermination de la constante de stabilité.....	65
3.5	Effet du solvant	76
4	Etude des complexes d'inclusion à l'état solide.	78

Troisième partie

Résultats et discussion

1	Mode opératoire général de la synthèse des 2-chloroéthyl urées.	81
2	Nitrosation des urées.....	84
3	Etude en solution des complexes d'inclusion.....	87
3.1	Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion β -CD-CENU	87
3.2	Détermination de la stoechiométrie des complexes β -CD-CENU.....	89
3.2.1	Méthode des variations continues	89
3.2.2	Méthode des rapports molaires	91
3.3	Détermination des constantes de stabilité des complexes β -CD-CENU.....	95
3.4	Effet du solvant	99
4	Préparation des complexes à l'état solide.....	100
	Conclusion générale.	104

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

CENU: Chloroéthylnitrosourée(s)

CENS: Chloroéthylnitrososulfamide(s)

CD: Cyclodextrine(s)

α -, β - et γ -CD: Alpha, Bêta et Gama cyclodextrine(s)

ISC: Isocyanate de 2-chloroéthyle

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CLHP: Chromatographie liquide à haute performance

MVC: Méthode des variations continues

MRM: Méthode des rapports molaires

B-H: Méthode de Benessi-Hildebrand

Pf: Point de fusion

Rf: Rapport frontal

IR: Spectrométrie infrarouge

RMN ¹H: Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton

SM: Spectrométrie de masse

DCM: Dichlorométhane

1u: N-(2-chloroéthyl) N', N'-dibenzylurée

2u: N-(2-chloroéthyl) N',N'-diphénylurée

3u: N-(2-chloroéthyl) N'-phénylurée

4u: N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée

5u: N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée

6u: N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée

1n: diBn-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-dibenzylurée

2n: diPh-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-diphénylurée

3n: Ph-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(phényl) urée

4n: 2-F-Ph-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée

5n: 2-Me-Ph-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée

6n: 2-OMe-Ph-CENU: N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée

IF: Intensité de fluorescence

ϵ : Constante diélectrique

1c: β -CD-1n

2c: β -CD-2n

3c: β -CD-3n

4c: β -CD-4n

5c: β -CD-5n

6c: β -CD-6n

Liste des tableaux

Première partie

Aperçu bibliographique

Chapitre 1 Le cancer et la chimiothérapie

Tableau 1	Agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie.....	6
------------------	--	---

Chapitre 2 Les nitrosourées

Tableau 2	Caractéristiques physicochimiques des principales CD natives	21
------------------	--	----

Deuxième partie

Résultats et discussion

Tableau 3	Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des urées synthétisées	48
------------------	---	----

Tableau 4	Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des CENU	53
------------------	---	----

Tableau 5	Variation des intensités de fluorescence en fonction de l'ajout de la β -CD	62
------------------	--	----

Tableau 6	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 1c à $\lambda_{EM} = 368$ nm	66
------------------	---	----

Tableau 7	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 2c à $\lambda_{EM} = 362$ nm	67
------------------	---	----

Tableau 8	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm	69
------------------	---	----

Tableau 9	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm	70
------------------	---	----

Tableau 10	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm	72
-------------------	---	----

Tableau 11	Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm	73
-------------------	---	----

Tableau 12	Valeurs des constantes de stabilité des complexes 1c-6c dans l'acétonitrile ...	75
-------------------	---	----

Tableau 13	λ_{EX} , λ_{EM} et leurs intensités de fluorescence pour chaque solvant.....	76
-------------------	--	----

Tableau 14	Données spectroscopiques des complexes 1c-6c et de la β -CD libre.....	79
-------------------	--	----

Troisième partie

Partie expérimentale

Tableau 15	Mise en évidence de la formation du complexe 1c.....	87
-------------------	--	----

Tableau 16	Mise en évidence de la formation du complexe 2c.....	87
-------------------	--	----

Tableau 17	Mise en évidence de la formation du complexe 3c.....	88
-------------------	--	----

Tableau 18	Mise en évidence de la formation du complexe 4c.....	88
-------------------	--	----

Tableau 19	Mise en évidence de la formation du complexe 5c.....	88
-------------------	--	----

Tableau 20	Mise en évidence de la formation du complexe 6c.....	88
-------------------	--	----

Tableau 21	Fractions molaires de la β -CD utilisées dans la méthode des variations continues	89
-------------------	---	----

Tableau 22	Méthode des variations continues pour 1c, $\lambda_{EM} = 356$ nm	89
-------------------	---	----

Tableau 23	Méthode des variations continues pour 2c, $\lambda_{EM} = 357$ nm	89
-------------------	---	----

Tableau 24	Méthode des variations continues pour 3c, $\lambda_{EM} = 357$ nm	90
-------------------	---	----

Tableau 25	Méthode des variations continues pour 4c, $\lambda_{EM} = 358$ nm	90
-------------------	---	----

Tableau 26 Méthode des variations continues pour 5c, $\lambda_{EM} = 361$ nm	90
Tableau 27 Méthode des variations continues pour 6c, $\lambda_{EM} = 368$ nm	90
Tableau 28 Rapports des concentrations utilisés dans la méthode des rapports molaires .	91
Tableau 29 Méthode des rapports molaires pour 1c	92
Tableau 30 Méthode des rapports molaires pour 2c	92
Tableau 31 Méthode des rapports molaires pour 3c	93
Tableau 32 Méthode des rapports molaires pour 4c	93
Tableau 33 Méthode des rapports molaires pour 5c	94
Tableau 34 Méthode des rapports molaires pour 6c	94
Tableau 35 Concentrations utilisées lors de la détermination des constantes de stabilité..	95
Tableau 36 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 1c.....	96
Tableau 37 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 2c.....	96
Tableau 38 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 3c.....	97
Tableau 39 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 4c.....	97
Tableau 40 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 5c.....	98
Tableau 41 Méthode de Benessi-Hilledrand pour 6c.....	98
Tableau 42 Longueurs d'onde d'excitation et d'émission et intensités de fluorescence, du complexe 6n- β -CD dans quelques solvants.....	99

Liste des figures et schémas

Première partie

Aperçu bibliographique

Chapitre 1 Le cancer et la chimiothérapie

Figure 1 Mécanisme d'action des principaux groupes d'agents antinéoplasiques 7

Chapitre 2 Les nitrosourées

Figure 2 Pharmacophore CENU..... 10

Figure 3 Exemples de CENU 12

Figure 4 Mécanisme proposé pour la liaison croisée de l'ADN par les 2-(chloroéthyl) nitrosourées 13

Figure 5 Formation de l'isocyanate par réarrangement de Curtius..... 14

figure 6 Formes mésomères de l'isocyanate 14

Figure 7 Obtention de l'uréthane à partir de l'isocyanate et l'alcool..... 14

Figure 8 Formation des liaisons allophanate 15

Figure 9 Formation d'un noeud biuret substitué..... 15

Figure 10 Dimérisation de l'isocyanate 16

Figure 11 Formation de liaisons carbodiimide..... 16

Figure 12 Formation de liaisons urétonimines 16

Figure 13 Formation de noeuds isocyanurate..... 16

Figure 14 Polymérisation linéaire des isocyanates 16

Chapitre 3 Les cyclodextrines

Figure 15 Action de la CGTase sur l'amidon 18

Figure 16 Formule développée générale des cyclodextrines naturelles..... 19

Figure 17 Structure simplifiée montrant la forme tronconique 20

Figure 18 Localisation des hydroxyles sur des unités α -D-glucopyranose de la CD 23

Figure 19 Structure du complexe d'inclusion entre la propionate de rétinol et la β -CD.... 26

Figure 20 Le premier exemple de vrai vecteur 26

Figure 21 Principe de base de la vectorisation..... 27

Chapitre 4 Les complexes d'inclusion

Figure 22 Structures en solution aqueuse de complexes cyclodextrines-invités décrits dans la littérature	28
Figure 23 Complexe d'inclusion de type 1:1	29
Figure 24 Chromophores CENU, CENS.....	37
Figure 25 Complexe d'inclusion CENS- β -CD.....	37

Chapitre 5 La spectrofluorimétrie

Schéma 1 Diagramme de Jablonski.....	40
Schéma 2 Spectrofluorimétrie	44

Deuxième partie

Résultats et discussion

Schéma 3 Schéma réactionnel d'obtention des urées.....	45
Figure 26 Spectre RMN du proton à 400 MHz de 1u	46
Figure 27 Spectre de masse en ESI de 1u à 30v.....	47
Schéma 4 Schéma réactionnel d'obtention des nitrosourées	49
Schéma 5 Génération de l'ion nitrosonium.....	49
Figure 28 Spectre RMN de proton de 1n à 400 MHz	51
Figure 29 Spectre RMN de proton de 6n à 400MHz	51
Figure 30 Spectre de masse en ESI de 6n à 30 v (a) et à 10 v (b).....	52
Figure 31 Liaison hydrogène au niveau des nitrosourées	54
Figure 32 Positions susceptibles de réagir lors d'une nitrosation	55
Figure 33 Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion	57
Figure 34 Détermination de la stoechiométrie des complexes 1c-6c par la méthode des variations continues.....	59
Figure 35 Détermination de la stoechiométrie des complexes 1c-6c par la méthode des rapports molaires	60
Figure 36 Spectre de fluorescence des CENU (1.00×10^{-5} M) dans l'acétonitrile contenant différentes concentrations de β -CD (2.00×10^{-5} à 1.00×10^{-5} M), à température ambiante.....	63
Figure 37 La courbe de Benesi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 1c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm	66

Figure 38 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 1c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm	67
Figure 39 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 2c à $\lambda_{EM} = 362$ nm, $\lambda_{EX} = 272$ nm	68
Figure 40 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 2c à $\lambda_{EM} = 362$ nm, $\lambda_{EX} = 272$ nm	68
Figure 41 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm, $\lambda_{EX} = 264$ nm	69
Figure 42 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm, $\lambda_{EX} = 264$ nm	70
Figure 43 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm	71
Figure 44 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm	71
Figure 45 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 268$ nm	72
Figure 46 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 268$ nm	73
Figure 47 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm, $\lambda_{EX} = 266$ nm	74
Figure 48 La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm, $\lambda_{EX} = 266$ nm	74
Figure 49 Courbes d'excitation et d'émission de 6c dans quelques solvants.....	76
Figure 50 Effet du solvant sur l'intensité de fluorescence du complexe 6c	77
Schéma 6 Schéma général de la complexation.....	78

Introduction

Introduction

Durant la dernière décennie, d'énormes efforts ont apporté l'espoir d'améliorer le traitement des maladies cancéreuses. De nombreuses alternatives de traitements ont été découvertes incluant des agents cytotoxiques nouveaux et des combinaisons d'agents multiples, des analogues d'hormones, et des agents biologiques. Parmi ces différentes approches thérapeutiques, la chimiothérapie demeure un traitement de choix pour les maladies avancées¹.

La chimiothérapie antitumorale s'est largement intéressée aux composés de type nitrosourées et plus particulièrement aux N-(2-Chloroéthyl) nitrosourées (CENU). Ce sont des composés organiques de synthèse, hautement réactifs, exclusivement utilisés comme agents chimiothérapeutiques anticancéreux. Ils présentent de puissantes classes d'agents cytotoxiques, et possèdent un large spectre d'activité contre de multiples cancers humains².

Cependant la plupart des molécules utilisées actuellement demeurent liposolubles toxiques et peu stables.

Une des approches permettant de solubiliser les CENU est leur complexation par un ou plusieurs composés polaires. Cet objectif peut-être atteint au moyen de complexants présentant une couronne ou une cavité apolaire suffisamment grande pour accueillir les CENU en leur sein.

Les cyclodextrines apparaissent comme d'excellents candidats pour optimiser leurs actions. Ce sont des oligosaccharides cycliques hydrophiles, qui possèdent une cavité hydrophobe permettant la formation de complexes d'inclusion avec de nombreux composés. Ces complexes d'insertion peuvent se former tant à l'état solide qu'en solution aqueuse, hydro-organique voire totalement organique.

Les principaux avantages des cyclodextrines naturelles en tant que transporteurs de médicaments sont : la structure avec plusieurs sites de modifications chimiques, plusieurs tailles de cavité disponibles, la faible toxicité par voie orale et une faible activité biologique qui dépend de la modification, une certaine solubilité et la protection de l'hôte contre la biodégradation. Pour toutes ces raisons les cyclodextrines sont utilisées couramment dans l'industrie pharmaceutique pour augmenter la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité des molécules actives par relargage différé.

¹ - Carter, S. K., Bakowski, M. T., Hellman, K. *Chemotherapy of Cancer*, 3rd edn, Churchill Livingstone, New York, (1987).

² - Eisanbrand, G., Bartsch, H., O'Neill, I. K., Schulte-Herman, R., In *Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer. Exposure and Mechanisms*, Eds, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, (1984) p 685.

Un paramètre important dans la formation des complexes d'inclusion est la correspondance entre la taille de la cavité interne et les dimensions de la molécule complexée. Sur cette base, seule la β -cyclodextrine est susceptible de former des complexes d'inclusion avec les CENU. Ainsi on a choisi d'utiliser la β -cyclodextrine (β -CD) étant, en plus la moins toxique.

Beaucoup de composés possèdent le degré d'aromaticité nécessaire pour être fluorescents. Les composés étudiés (CENU), ayant une partie aromatique à laquelle la β -CD peut se lier, étant fluorescents, peuvent donc être étudiés directement par spectrofluorimétrie.

La spectrofluorimétrie³ avec l'utilisation d'un chromophore comme les CENU permet de caractériser leurs complexes d'inclusion de façon rapide et fiable.

D'après notre recherche bibliographique, on n'en a trouvé aucune référence se rapportant à l'étude en solution par spectrofluorimétrie des complexes d'inclusion entre les CENU et la β -CD.

La contribution de notre recherche mène à fournir des bases théoriques pour développer de nouveaux médicaments transporteurs et de nouvelles formes de médicaments.

Donc, c'est dans une optique d'amélioration de la solubilité et afin d'introduire une nouvelle possibilité de pharmacomodulation des Chloroéthylnitrosourées (CENU) que nous avons envisagé la préparation d'une nouvelle génération de CENU issues d'amines aromatiques primaires (aniline, 2-fluoroaniline, 2-méthylaniline et 2-méthoxyaniline) et secondaires (dibenzylamine et diphenylamine) associant le pharmacophore 2-chloroéthylnitrosourée à la β -cyclodextrine naturelle et ceci par la formation de complexes d'inclusion CENU- β -cyclodextrine. La β -CD pourra fournir le vecteur biologique, améliorer la solubilité, et assurer la stabilité de son hôte en le protégeant par encapsulation.

L'évaluation rapide de la stabilité des complexes formés entre une cyclodextrine et une molécule cible présente un intérêt notable dans les industries pharmaceutique, cosmétique, phyto-sanitaire et agro-alimentaire.

C'est dans cette perspective que nous avons présenté une série d'oncostatiques potentiels, les chloroéthylnitrosourées (CENU) complexées par la β -CD, et exploré la possibilité d'utiliser la spectrofluorimétrie pour l'étude en solution des complexes d'inclusion β -CD-CENU, afin de confirmer leur formation et de déterminer leur stabilité.

Le plan suivi en pratique lors de la réalisation de ce travail est le suivant :

³ - a- Albani, J. R., Absorption et fluorescence, principes et applications, Ed. TEC et DOC., 17-81.

b- Calleja, G., Thèse de Doctorat présentée à l'Université Montpellier II- Sciences et Techniques du Languedoc (2000), 110-112.

- Synthèse et caractérisation de quelques CENU d'amines aromatiques primaires et secondaires.
- Formation des complexes d'inclusion des CENU par la β -CD à l'état solide.
- Etude physico-chimique des complexes d'inclusion par spectrofluorimétrie.

Ce mémoire sera présenté comme suit :

- L'étude physico-chimique des complexes d'inclusion des CENU par la β -CD nécessite la connaissance des CENU d'une part et de la β -CD de l'autre part, des complexes d'inclusion et de la spectrofluorimétrie ce qui est donné dans la première partie sous forme d'un aperçu bibliographique.
- La deuxième partie est consacrée aux résultats et discussion sur la synthèse des CENU, l'étude en solution des complexes d'inclusion par spectrofluorimétrie (mise en évidence de la formation des complexes, détermination de la stœchiométrie, de la constante de stabilité et l'étude de l'effet de solvant), et la synthèse des complexes d'inclusion à l'état solide.
- La troisième partie rassemble les protocoles expérimentaux concernant les axes détaillés dans la partie précédente.

Première partie
Aperçu bibliographique

Chapitre 1

Chapitre 1

Le cancer et la chimiothérapie

1.1 Le cancer

1.1.1 Introduction

Le cancer est une pathologie de l'ADN. C'est un état où une (des) tumeur (s) se développe (nt) aux dépens de l'organisme.

D'un point de vue cellulaire, une tumeur se définit comme plusieurs cellules, ayant une prolifération anarchique et incontrôlée. Elle se développe suite à une :

- Accumulation d'anomalies cytogénétiques irréversibles au sein d'une même cellule.
- Prolifération de cette cellule dont les caractères cytogénétiques et antigéniques sont communs à toute descendance: population monoclonale.
- Cette population envahit et détruit le tissu qu'elle a pour origine. Elle est capable également d'envahir les tissus voisins pour produire d'éventuelles métastases⁴.

1.1.2 Principes de la thérapie anticancéreuse

L'objectif ultime de la thérapie anticancéreuse est de bloquer la croissance d'une tumeur et de la détruire. Les traitements anticancéreux poursuivent donc plusieurs buts, soit l'excision des cellules cancéreuses par chirurgie, leur destruction par radiothérapie, chimiothérapie ou par stimulation du système immunitaire, l'élimination des agents endogènes qui stimulent la croissance tumorale par l'hormonothérapie et en stimulant la différenciation des cellules cancéreuses, régressant ainsi la croissance de la tumeur⁵. Plusieurs cancers libèrent des métastases et engendrent ainsi la formation de sites cancéreux secondaires⁶. Pour contrer ce phénomène, la chirurgie est, le plus souvent, combinée à un autre traitement comme, par exemple, la radiothérapie.

La chirurgie et les radiations ne sont pas toujours en mesure de traiter ou de contrôler les tumeurs, suite à la présence de métastases, la chimiothérapie devient alors l'alternative suivante⁷.

La chimiothérapie est une destruction sélective d'une population cellulaire tumorale par interaction au niveau d'une ou plusieurs étapes clés du métabolisme des cellules cancéreuses. C'est l'une des plus vieilles techniques recensées. Cependant, la chimiothérapie moderne a pris sa véritable envolée vers les années 1940. Depuis, les découvertes de nouvelles molécules

⁴- Gaudraut, R., Alaoui-Jamali, M. A., Lacroix, P. X., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1994) 33, 489-492.

⁵- Béchard, P., Lacroix, J. Poyet, P., *J. Med. Chem.* (1994) 29, 963-966.

⁶- Boyd, N. F., *Cellular Basis of Radiotherapy: 1.* F. Tannock et R. P. Hill (eds.). *The basic science of oncology*, pp. 259-275. Toronto: McGraw-Hill, inc. 1992.

⁷- Poyet, P., Ritochon, N., Béchard, B., *Anticancer Res.* (1993) 13, 1447-1993.

se succèdent et la synthèse de nouvelles drogues va bon train de nos jours, de plus, la mise en commun des connaissances des diverses disciplines (chimie, pharmacologie, biologie moléculaire, physiologie, etc.) contribue grandement aux progrès actuels⁸.

L'avènement de la chimiothérapie a considérablement modifié l'évolution clinique d'un certain nombre de néoplasies. On a pu observer de véritables guérisons de certaines tumeurs solides, de lymphomes et de leucémies⁹. Elle peut permettre également des progrès substantiels du point de vue du soulagement des effets secondaires ressentis par la personne traitée et l'allongement de sa survie^{2,3}. Des régressions spectaculaires ont pu contribuer à l'amélioration des stratégies thérapeutiques combinant les trois grandes modalités que sont la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux.

L'obstacle majeur qui s'est pourtant rapidement dessiné tient à la toxicité des antimétabolites sur les tissus sains et à leurs effets sur le matériel génétique, sources de mutations et de phénomènes de résistance parfois très rapidement acquis. Ces dernières années ont été marquées par une meilleure connaissance des mécanismes de la mort cellulaire et de la sensibilité cellulaire vis à vis des drogues, ce qui laisse entrevoir de nouvelles cibles thérapeutiques, afin d'augmenter la sensibilité des cellules anormales vis à vis des antimétabolites (voire même contourner une résistance intrinsèque), de diminuer celle des cellules normales et donc d'éviter des toxicités trop importantes⁵.

Les médicaments anticancéreux, groupés sous le terme de chimiothérapie, constituent un groupe hétérogène aux modes d'action complexes. Ils n'interagissent pas avec un système physiologique de l'organisme mais sont des poisons cellulaires. Cette action toxique s'exerce par interaction avec des protéines intracellulaires, ou avec les acides nucléiques du système génétique. Leur mode d'action est souvent complexe avec plusieurs sites d'interaction¹.

Les agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie sont représentés dans le tableau 1.

⁸ - Patterson, R., Nugent, K. M., Harris, K.E. and Eberle, M.E., Am. Rev. Resp. Dis. (1990) 141, 226-230.

⁹ - Levin, V. A., Edwards, N. S., Chemotherapy of primary malignant tumors. In Brain Tumours. Scientific Basis, Clinical Investigation and Current Therapy. Thomas, D. G. T. and Graham D. I., Eds. London: Butterworth, 1980, pp 344-358.

Tableau 1: Agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie⁴.

Classe	Agent
Agents alkylants	Moutardes à l'azote
	Ethylanimines et Méthylmélamines
	Nitrosourées
	Triazènes
Antimétabolites	Analogues des acides foliques
	Analogues des pyrimidines
	Analogues des purines
Produits naturels	Alcaloïdes de Vinca
	Epipodophyllotoxines
	Antibiotiques
	Enzymes
	Modulateur biologique

1.2 La chimiothérapie

1.2.1 Agents anticancéreux

Les gents anticancéreux (antinéoplasiques) sont des substances qui inhibent ou préviennent la prolifération des néoplasmes. Ils peuvent être divisés en trois catégories principales, classification d'après Kauffman⁴, D. Belpomme¹⁰, G. Kerr¹¹, C. Erlidunan¹² et R.

B. Silverman:

- AGENTS CYTOTOXIQUES
- Agents alkylants
- Antimétabolites
- Antibiotiques^{13, 7}.
- Antimitotiques^{7,14,15,16,17}.

¹⁰- Belpomme, D. Principes de chimiothérapie anticancéreuse. Dans: Cancérologie générale, pp. 177-227. Dans: Editions J.-B. Baillière, 1979.

¹¹- Kerr, I. G. et Erlidunan, C. Antheoplastic drugs. Dans: H. Kalant et W. E. Roschlau (eds.), Principles of medical phamacology, pp. 604- 614. Ontario: B. C. Becker, 1989.

¹²- Erlichman, C. Immunopharmacology. Dans: H. Kalant et W. E. Roschlau (eds.), Principles of medical pharmacology, pp. 615-617. Ontario: B. C. Becker, 1989.

¹³- Jean, Y. La chimiothérapie: Biologie cellulaire et cancer, pp. 430-439. Québec: Université du Québec, 1990.

¹⁴-Kenis, Y. et Mathé, G. Les principales drogues et leurs mécanismes d'action. Dans: La chimiothérapie des cancers (leucémies, hématosarcomes et tumeurs), pp. 47-90. Paris: Expansion scientifique française, 1974.

¹⁵- Erlidunan, C. et Tannock, I. F. Pharmacology and biological properties of anticancer drugs. Dans: I. F. Tamock et R. P. Hill (eds.), The basic science of oncology, pp. 302-337. Toronto: McGraw- Hill, inc., 1992.

¹⁶- Prakash, V., Timasheff, S. N., J. Biol. Chem. (1983) 258, 1689-1697.

¹⁷- Owellen, R. J., Owens, A. H., Donigian, D. W., Biochem. Biophys. Res. Commun, (1972) 47, 685-691.

- E-Enzyme (L-asparagine)^{12,4,8}.
- HORMONES ET ANTIHORMONES¹⁸.
- MODIFICATEURS DE LA RÉPONSE BIOLOGIQUE¹⁹.

Parmi les nombreuses substances utilisées en chimiothérapie, les agents antinéoplasiques, inhibant la croissance des cellules, représentent une classe importante de molécules. À l'intérieur de cette classe, plusieurs sous-classes s'y retrouvent selon le mécanisme d'action².

1.2.2 Classification des agents antinéoplasiques selon leur mode d'action

Sur la base de leur action sur le cycle cellulaire, les agents antinéoplasiques peuvent être divisés en deux catégories distinctes, soit ceux qui agissent au niveau du cycle cellulaire et ceux qui en sont indépendants. Ils peuvent réagir aussi bien avec le noyau de la cellule, qu'avec la membrane cellulaire et, quelquefois, avec les organites cellulaires.

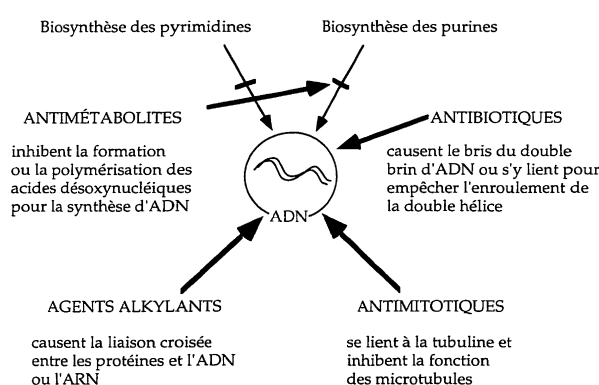


Figure 1 : Mécanisme d'action des principaux groupes d'agents antinéoplasiques⁸.

1.2.3 Les agents alkylants

La chimie des agents alkylants, qui ont montré une remarquable efficacité dans le cas des tumeurs solides, s'est développée depuis les années 1960, essentiellement autour des trois classes de composés agissant sur le matériel nucléaire suivantes :

1. les composés nitrosés, précurseurs de diazoalcanes²⁰.
2. les composés halogénés, et plus particulièrement ceux qui contiennent le motif 2-chloroéthylhétéroatome (O, N, S) et les moutardes à l'azote qui en dérivent, greffées à des radicaux aliphatiques, aromatiques, osidiques, ou hétérocycliques, et les phosphoramides²¹.
3. les esters de l'acide méthane sulfonique, tels que les diesters de butanediol²².

Un certain nombre de médicaments ayant généralement une grande réactivité chimique, comme les agents alkylants, établissent des liaisons covalentes avec diverses molécules

¹⁸- Belpomme, D. Principes d'hormonothérapie. Dans: Cancérologie générale, pp. 231-237. Paris: Editions J.-B. Baillière, 1979.

¹⁹- Jean, Y. Immunothérapie: Biologie cellulaire et cancer, pp. 446-462. Québec: Université du Québec.

²⁰- Skipper, H.E., Schabel Jr, F.M., Trader, M.W. et Thomson, J.R. Cancer Res. (1961) 21-1154.

²¹- Gilman, A. et Philips, F. S., Chem. Rev. (1946) 45, 103-409.

²²- Roberts, J. J., et Warwick, G.P., Am. Rev. Nat. (1959) 105, 184-1298.

biologiques qu'ils rencontrent, en particulier l'ADN, ce qui perturbe la synthèse des protéines et la division cellulaire.

Même s'ils constituent une classe assez hétérogène, tous sont des composés électrophiles, capables d'introduire une ou plusieurs chaînes alkyles à de nombreux substrats nucléophiles (groupements phosphates, hydroxyles, carboxyles, amines, sulfures, etc.)

Dans les molécules biologiques, les groupes les plus sensibles aux agents alkylants sont SH, OH, COOH, NH₂ et NH, inclus dans une chaîne linéaire ou dans un cycle comme celui des bases puriques et pyrimidiques, ainsi que les phosphates des liaisons phosphodiester.

Ces groupes réactifs comportent, en général, un proton mobile qui peut s'échanger contre un groupe alkyle. Dans la guanine, c'est l'azote N7 et, à moindre degré, l'oxygène O6 qui sont les plus réactifs et établissent des liaisons covalentes avec les agents alkylants. L'existence de formes cétone et énol de l'adénosine et de la cytosine illustrent la mobilité de certains de leurs protons²³.

Possédant un ou plusieurs groupements alkyles très nucléophiles, les agents alkylants sont donc des substances qui :

- interagissent avec différentes macromolécules (ADN, ARN...) en établissant des liaisons covalentes sur certains des atomes des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN.
- inhibent la transcription et la réplication de l'ADN entraînant des lésions cellulaires létales.
- libèrent des radicaux libres provoquant des cassures de la chaîne d'ADN.
- sont des agents mutagènes et ont par conséquent un potentiel leucémogène.

Les agents alkylants les plus utilisés sont :

- les dérivés de la moutarde à l'azote
- les nitrosourées
- les sels de platine²⁴.

²³ - Devit, V. T., Denham, C. et al, Clin. Pharmacol. Ther. (1967) 8, 566-577.

²⁴ - Hill, D. L., Kerk, M. C., Struck, R. F., Cancer Res. (1975) 35, 296-301.

1.2.4 Mécanisme de cytotoxicité des agents alkylants

Ces produits peuvent se lier chimiquement avec de nombreuses protéines cellulaires, mais ce sont les liaisons avec l'ARN et surtout l'ADN qui expliquent leur action antimitotique. Ils exercent leurs effets cytotoxiques en formant des adduits, radicaux liés de manière covalente, et des liaisons intra- et intercaténares au niveau de l'ADN. La création de plusieurs liaisons covalentes au niveau de l'ADN modifie sa structure. Ces lésions sont capables d'inhiber la transcription, la réplication, et aboutiront à la mort cellulaire²⁵.

On distingue des agents alkylants monofonctionnels, c'est-à-dire n'ayant qu'une seule fonction alkylante et n'établissant qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents bifonctionnels possédant deux fonctions alkylantes, qui créent de véritables ponts entre différents secteurs de l'ADN. Ainsi l'interaction d'un alkylant avec l'ADN peut conduire à l'établissement d'une ou deux liaisons covalentes:

- Une liaison covalente entre le médicament et un noyau purique ou pyrimidique d'un brin d'ADN.
- Deux liaisons covalentes formant un pont entre deux bases par l'intermédiaire du médicament bifonctionnel: les deux groupements réactifs se fixent sur l'ADN et forment des ponts intracaténares entre deux guanines adjacentes sur le même brin d'ADN. Ces ponts peuvent, aussi être intercaténares, entre deux guanines situées presque face à face sur deux brins opposés de l'ADN, bloquant ainsi sa réplication.

Du fait de l'existence d'enzymes de réparation de l'ADN, (ligase, endonucléase), les premiers peuvent ne pas entraîner un véritable avortement cellulaire, et au contraire, favoriser l'apparition d'ADN porteur de malformations, susceptibles de dégénérer secondairement en cancers chimioinduits.

Les alkylants provoquent aussi des cassures dans la chaîne d'ADN et des pontages ADN-protéines. Ils induisent, uniquement dans les cellules tumorales, le processus naturel d'autodestruction (apoptose). Ils sont capables d'établir des liaisons covalentes avec l'ADN de toutes les cellules, normal ou tumorales, surtout celles qui se reproduisent rapidement. Leur effet est donc peu spécifique²¹.

Parmi les agents alkylants les plus utilisés en chimiothérapie, notre choix s'est porté essentiellement sur les agents alkylants et en particulier les 2-chloroéthylnitrosourées. A cet effet, le chapitre suivant fera l'objet d'une étude bibliographique sur les chloroéthylnitrosourées.

²⁵ - Prakash, V. et Timasheff, S. N., J. Biol. Chem. (1983) 258, 1689-1697.

Chapitre 2

Chapitre 2

Les nitrosourées

2.1 Les nitrosourées

L'association au sein d'une même molécule de deux ou plusieurs sites générateurs d'entités électrophiles a donné naissance à de nouvelles séries, de potentialité antimittotique supérieure. Depuis 1961, la chimiothérapie antitumorale s'est largement intéressée aux composés du type nitrosourées, et plus particulièrement aux N-(2-chloroéthyl) nitrosourées (CENU), utilisées en clinique et qui font toujours l'objet d'actives recherches²⁶.

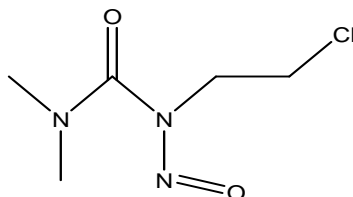


Figure 2 : Pharmacophore CENU.

2.1.1 Propriétés des CENU

Les nitrosourées ont en commun la même structure, ce sont des chloroéthylnitrosourées. Ce sont des alkylants, interagissant directement par liaison chimique nucléophile, elles entraînent une déplétion en glutathion, inhibent la réparation de l'ADN, et altèrent la maturation de l'ARN. Leurs propriétés alkylantes sont les plus importantes. Elles expliquent également leur haut pouvoir mutagène. La première cible visée par ces agents est non seulement l'ADN mais aussi les protéines et les phosphates.

Contrairement à d'autres agents antinéoplasiques, les nitrosourées sont des molécules dont l'action est indépendante du cycle cellulaire, c'est-à-dire qu'elles agissent à n'importe laquelle des phases du cycle cellulaire.

Du fait de leur grande liposolubilité, les nitrosourées passent la barrière hémato-méningée, et peuvent être utilisées dans le traitement des tumeurs cérébrales.

Les analogues des chloro-nitrosourées (CNU) tels que le 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU), 1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourée (CCNU), 1-(2-chloroéthyl)-3-méthylcyclohexyl-1-nitrosourée (méthyle-CCNU), ou 1-(2-chloroéthyl)-1-nitroso-3-(2-hydroxyéthyl) urée (HECNU), sont utilisés dans le traitement de plusieurs cancers en particulier les gliomes, lymphomes, mélanomes, myélomes multiples, et les cancers du tractus digestif, et ont une certaine activité contre le mélanome, mais aussi les tumeurs digestives, le cancer bronchique et certaines hémopathies malignes.

La toxicité hématologique des nitrosourées est particulière car elle survient après une latence relativement longue. Elles entraînent une myélosuppression longue et ont un risque

²⁶- Hallett, G. and Williams, D. L. H., J. Chem. Soc., Perkin Trans. (1980) 2, 1371.

important de leucémies induites, probablement parce qu'elles touchent directement les cellules souches médullaires, et que les réparations des lésions induites sont longues à être effectuées.

Les principaux médicaments utilisés en clinique sont :

- CCNU (ou lomustine, Bélustine) : surtout utilisé dans le traitement des tumeurs cérébrales (primitives ou métastatiques), et dans le traitement des formes évoluées de la maladie de Hodgkin. Il est donné par voie orale. Sa principale toxicité est hématologique. Elle peut être prolongée, et dépend de la dose cumulée administrée. Une néphrotoxicité est également possible.
- BCNU (ou carmustine, BICNU) : composé très voisin, mais qui ne peut être administré qu'en perfusion intraveineuse. Il est utilisé en particulier en hématologie. Une toxicité pulmonaire (fibrose) est parfois rencontrée lors d'administrations prolongées, et une maladie veino-occlusive du foie après administration à très forte dose.
- Fotémustine (Muphoran) : elle semble intéressante pour le traitement des mélanomes malins évolués. Elle peut être administrée par voie intraveineuse ou intra-artérielle.
- Streptozotocine (Zanosar) : elle est plus hydrophile que les autres nitrosourées. Elle peut interférer avec la néoglucogénèse, et induire un diabète. La streptozotocine a une activité en clinique à l'encontre des tumeurs endocrines et carcinoïdes du pancréas. Elle doit être administrée par voie veineuse. Sa principale toxicité dose limitante est rénale, et non hématologique²⁷.

Les générations les plus récentes de ces composés associent au pharmacophore (2-chloroéthyl)-nitrosocarbamate un vecteur biologique dans le but d'une meilleure assimilation, (oses, stéroïdes, bases nucléiques, aminoacides)²⁸.

²⁷- Fischel, J. L., Formento, P. and Elienne, M. C., *Cancer Chem. Pharmacol.* (1990) 25, 727-729.

²⁸ - Montgomery, J. A., Mayo, J. G., Hansch, C., *J. Med. Chem.*, (1974) 17-477.

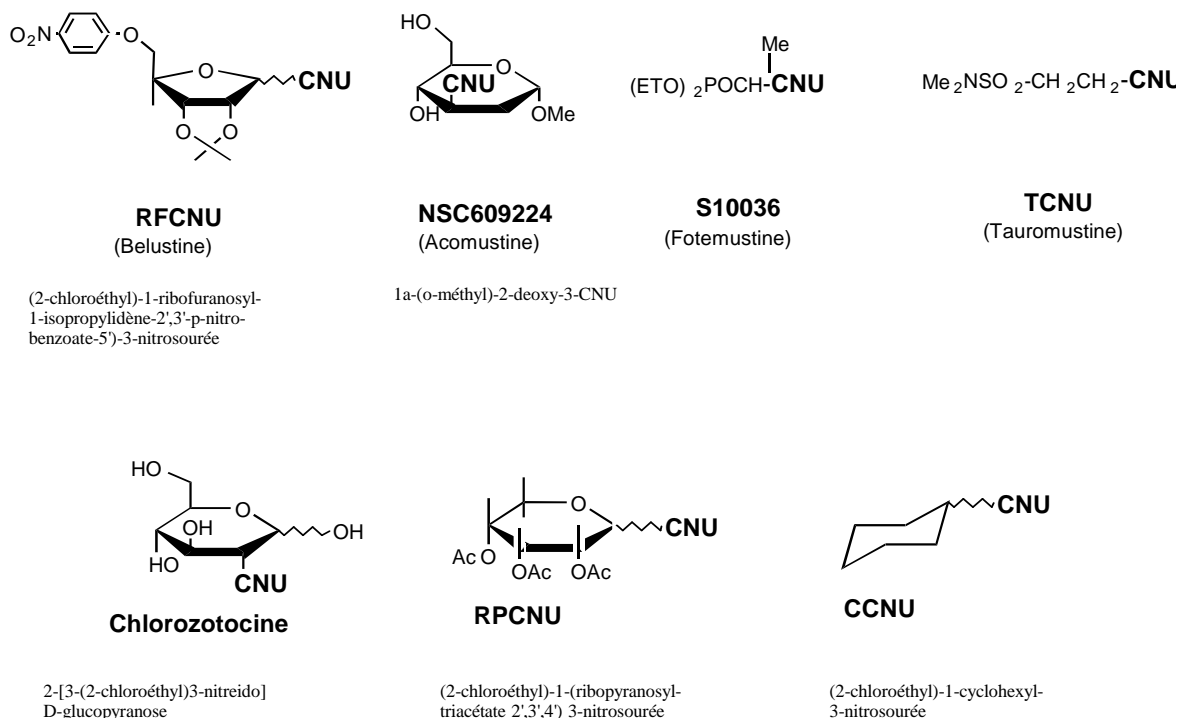


Figure 3 : Exemples de nitrosourées.

2.1.2 Mécanisme d'action des CENU

Plusieurs schémas de décomposition des CENU dans des conditions physiologiques ont été proposés par J.A.Montgomery²⁹, et par J.W.Lown³⁰. Les nombreux produits de dégradation isolés dépendent de la nature du milieu, de la concentration, du pH et de la température. La mise en évidence d'une structure chélatée au niveau du motif nitrosourée^{31,32,33} a permis de proposer un schéma de décomposition qui montre la formation de deux espèces réactives : un isocyanate et un précurseur d'ion carbénium.

Néanmoins, malgré la complexité du phénomène, il convient de souligner les rôles-clés de l'entité (2-chloroéthyl) diazohydroxyde, génératrice d'espèces électrophiles aux propriétés alkylantes, et de l'isocyanate, responsable de l'activité carbamoylante. L'association de ces deux activités confère aux CENU l'essentiel de leurs propriétés antitumorales.

La décomposition des 2-chloroéthyl nitrosourées avec formation de la liaison croisée de l'ADN sont indiquées dans la figure ci-dessous:

²⁹- a- Montgomery, J. A., James, R., Caleb Mc, Johnston T. P., J. Med. Chem., (1967) 10-668.

b- Colvin, M., Brundrett, R. B., Cowens, W., Jardine, Lundlum, D. B., Biochem. Pharmacol., (1976) 25-695.

c- Brundrett, R. B., Colvin, M., White, E. H., Mc Kee, J., Hartman, D. B., Cancer Res., (1979) 39-1328.

³⁰- Lown, J. W., Chuhan, M. S., J. Org. Chem., (1981) 24-270.

³¹- Snyder, J. K., Stock, L. M., J. org. Chem., (1980) 45-1990.

³²- Diksic, M., Sako, K., Feindel, W. et al. Cancer Res. (1984) 44, 3120-3124.

³³- Colvin, M., Brundrett, R. B., Cowens, W., Biochem. Pharmacol. (1976) 25, 695-699.

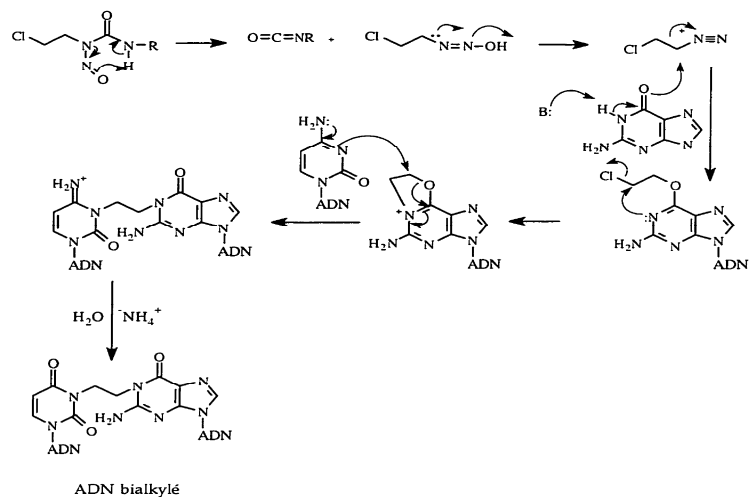


Figure 4 : Mécanisme proposé pour la liaison croisée de l'ADN par les (2-chloroéthyl) nitrosourées³⁴.

Le mécanisme d'action des CENU nécessite une activation par décomposition ou métabolisation. Les métabolites obtenus s'avèrent plus efficaces que le produit de départ. Autrement dit, ce sont des médicaments qui subissent une transformation chimique et non enzymatique, pour donner naissance au chloroéthyl-diazohydroxyde capable d'alkyler l'ADN (pour certaines CENU il y a également formation d'isocyanates capables de carbamoyer les protéines cellulaires, ils peuvent aussi inhiber l'épissage de l'ARNm et la réparation de l'ADN). Le chloroéthyl-diazohydroxyde forme un lien covalent avec l'oxygène 6 de la guanine. Le lien covalent au niveau de l'oxygène 6 subit un réarrangement après déplacement de l'atome de chlore, et réagit par la suite avec la cytosine au niveau du brin opposé pour donner naissance à des ponts intercaténaires entre guanine et cytosine, d'où le nom d'agents alkylants bifonctionnels donné aux nitrosourées. Ces ponts bloquent la réplication et, par conséquent, aboutissent à la mort cellulaire³⁵.

2.2 L'isocyanate

Un isocyanate est un composé organique caractérisé par la séquence : $-N=C=O$. Les isocyanates sont très réactifs, c'est pour cela que parfois ils sont bloqués, ils ne peuvent pas réagir, par contre la présence d'amine (NH) permet de les débloquent.

Les isocyanates sont très utiles en synthèse organique. Ils peuvent conduire à plusieurs composés azotés tels qu'une amine primaire, un sel carbamique, un carbamate, un amide et une urée. Les isocyanates sont facilement formés suite à un réarrangement de Curtius (figure 5). Cette réaction débute par la mise en contact d'un acide carboxylique et une source

³⁴- Silverman, R. B., Academic Press, Inc., (1992) 422.

³⁵- Freed, B. R., Mc Quinn, R. L., Tilbury, R.S., Digenis, G. A., Cancer Chemother. Pharmacol. (1982)10, 16-21.

d'azote. L'intermédiaire formé, soumis à une source de chaleur, perd une molécule d'azote entraînant ainsi la formation d'un nitrène. Il se produit ensuite la migration de la chaîne sur l'atome d'azote, soit le réarrangement de Curtius.



Figure 5 : Formation de l'isocyanate par réarrangement de Curtius³⁶.

Compte tenu de la répartition des charges dans le groupement isocyanate, celui-ci présente deux formes mésomères :

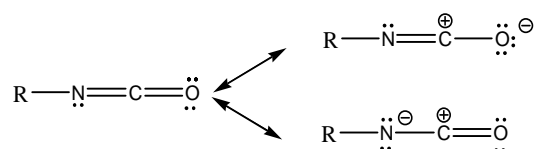


Figure 6 : Formes mésomères de l'isocyanate.

Le groupement isocyanate, très insaturé, peut réagir avec toute espèce contenant un hydrogène actif comme les alcools ou les amines. La réaction avec une amine donne un groupement urée substituée (R-NH-CO-NH-R'). La réaction avec un alcool conduit à un groupement uréthane (R-NH-CO-OR').

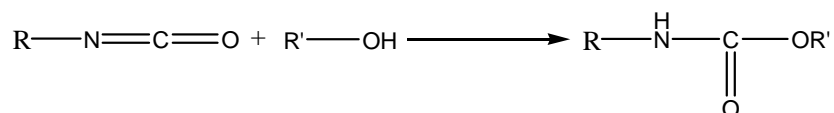


Figure 7 : Obtention de l'uréthane à partir de l'isocyanate et l'alcool.

Un groupement isocyanate est plus réactif avec une amine qu'avec un alcool. La réactivité d'un alcool primaire vis-à-vis d'un isocyanate est légèrement supérieure à celle de l'eau. Un alcool secondaire est moins réactif qu'un primaire.

En fonction de la nature de l'alcool, l'ordre de réactivité observé est :



La réactivité d'un isocyanate devient plus importante si les substituants augmentent son caractère électrophile. Un isocyanate aliphatique est donc moins réactif d'un aromatique.

2.2.1 Propriétés chimiques

L'isocyanate de 2-chloroéthyle est un composé très réactif.

Il est susceptible de se polymériser quand il est très pur ou en présence de divers catalyseurs (métaux, sels, bases ou certaines amines).

Il réagit au contact de l'eau avec formation de dioxyde de carbone, d'urée ou de biuret. D'une manière générale, les produits qui possèdent un hydrogène actif (alcools, amines, acides, urées...) peuvent réagir avec l'isocyanate de 2-chloroéthyle³⁷.

³⁶ - Kinsman, A. C., Kerr, M. A., J. Am. Chem. Soc. (2003)125, 46: 214120-14125.

- Formation des liaisons allophanate (réaction avec un uréthane)

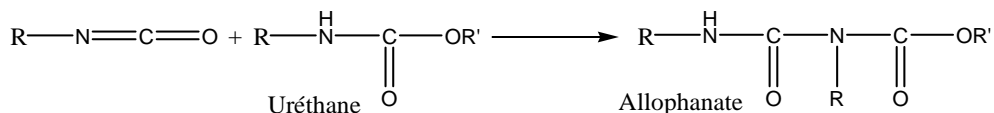


Figure 8 : Formation des liaisons allophanate.

Les groupements allophanate sont formés à la suite de la réaction d'un groupement uréthane, déjà présent, avec un autre isocyanate. Cette réaction est favorisée par une température élevée (100-140°C) et un excès d'isocyanate³⁸.

- Formation des liaisons biuret (réaction avec l'eau)

L'isocyanate peut aussi réagir avec l'eau pour donner l'acide carbamique. Cet acide étant instable, il se décompose pour donner du CO₂ et une amine. L'amine peut ensuite réagir avec un autre isocyanate pour donner un groupement urée substituée. Eventuellement, celui-ci peut réagir avec un autre isocyanate pour donner un biuret substitué. Les nœuds biuret sont les points de jonction des trois fonctions isocyanate.

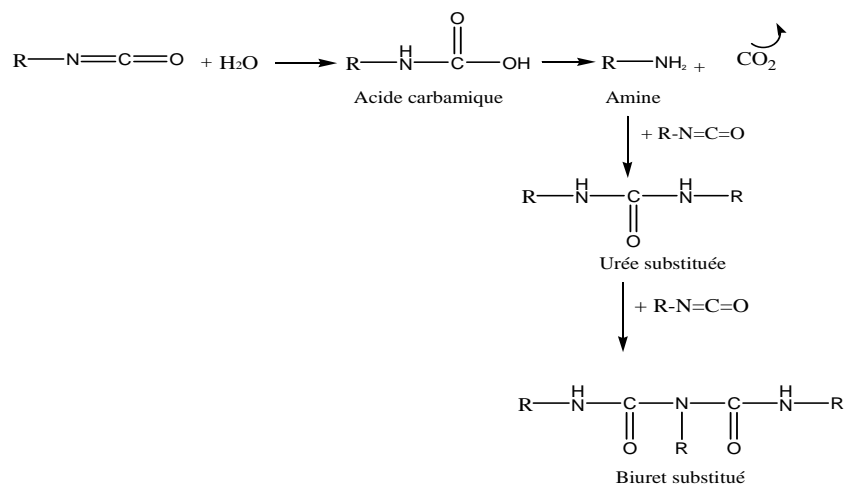


Figure 9 : Formation d'un nœud biuret substitué.

- Réaction des groupements isocyanate seuls

Les groupements isocyanate peuvent réagir entre eux pour donner des dimères, trimères ou polymères. Ces réactions peuvent apparaître si une impureté peut jouer le rôle d'un catalyseur nucléophile. Ainsi, elles sont favorisées par l'augmentation de la concentration des diisocyanates.

- Formation de liaisons urétidione (dimérisation)

L'apparition des cycles urétidione est favorisée par une température de réaction basse en présence d'un catalyseur basique.

³⁷ - a- Baker, J. W., J.B., J. Chem. Soc., (1974) 19, 713-726.

b- Ephraim, S., Woodward, A.E., Mesrobian, R.B., J. Am. Soc., (1958) 80, 1326-1328.

³⁸ - Sauer, K., Kasparian, M. H., J. Org. Chem., (1961) 26, 3498-3504.

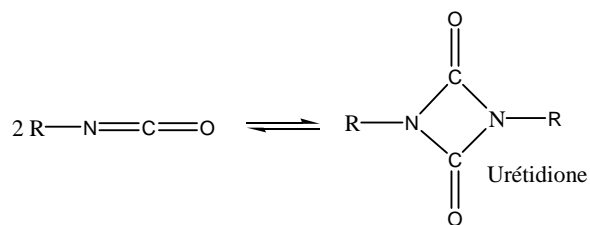


Figure 10 : Dimérisation de l'isocyanate.

- Formation de liaisons carbodiimide

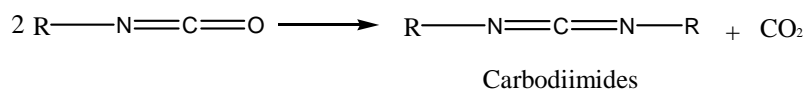


Figure 11 : Formation de liaisons carbodiimide.

Les liaisons carbodiimide peuvent apparaître sans catalyseur entre 150 et 300°C. Cette fonction peut encore réagir avec un isocyanate pour donner des urétonimines substituées.

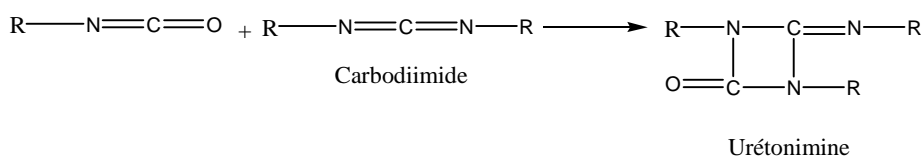


Figure 12 : Formation de liaisons urétonimines.

- Formation de nœuds isocyanurate (trimérisation)

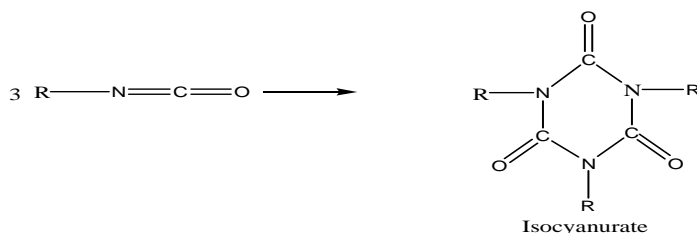


Figure 13 : Formation de nœuds isocyanurate (trimérisation).

La trimérisation est la réaction qui conduit à la formation du cycle isocyanurate³⁹.

- Polymérisation linéaire des isocyanates

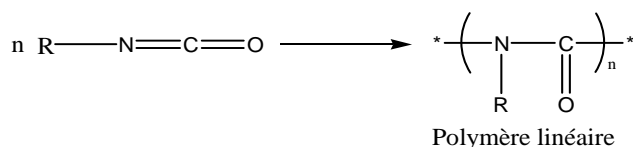


Figure 14 : Polymérisation linéaire des isocyanates.

Cette polymérisation peut avoir lieu à des températures très basses (-100 à -20°C pour certains monoisocyanates⁴⁰.

Jusqu'à ce jour, les isocyanates servent à la préparation de nitrosourées et, pour ce faire, sont mis à réagir avec une amine primaire ou secondaire, ce qui conduit à l'obtention de la

³⁹- Sayigh, A. A. R., *Plym. J.* (1978) 14, 675-678.

⁴⁰- Markert, H., Kertzschmar, K., Rogler, W., Hauschildt, K. R., *Simens Forsch-U. Entwickl., Ber. Bd., Vol. 16, N°3*, 105-111.

fonction laquelle est ensuite éventuellement nitrosée, par exemple à l'aide d'un nitrite de métal alcalin tel que le nitrite de sodium.

On utilise également les isocyanates pour préparer les nitrosurées dans un schéma réactionnel qui consiste à faire réagir un isocyanate, tel que l'isocyanate de méthyle, l'isocyanate de chloro-2 éthyle ou le cyclohexylisocyanate, sur un phénol activé, tel que le trichlorophénol-2,-4,-5, le pentachlorophénol ou le penta fluorophénol⁴¹ ce qui conduit à l'obtention d'urées lesquelles sont ensuite transformées en nitrosurées par le chlorure de nitrosyle.

Or, les isocyanates sont des produits relativement toxiques, qui compte tenu de certaines réglementations doivent être fabriqués sur place et utilisés in situ.

On a également décrit la nitrosation de N-alkyl carbamate par divers agents de nitrosation, en particulier N_2O_4 , N_2O_3 , NOBr, NOCl, nitrites alcoyl, ou acide (chlorhydrique ou sulfurique) et le nitrite de sodium. Dans ce dernier cas, il peut y avoir des réactions parallèles, les rendements ne sont pas toujours satisfaisants et le produit obtenu est difficile à purifier⁴².

2.2.2 Propriétés physiques

L'isocyanate du 2-chloroéthyle se présente sous la forme d'un liquide incolore, très volatil, d'odeur particulièrement âcre. Ses vapeurs sont lacrymogènes. Il est peu soluble dans l'eau, au contact de laquelle il se décompose, il se dissout dans de nombreux solvants organiques ; hydrocarbures, solvants halogénés, diméthylsulfoxyde, etc⁴³.

Les nitrosurées sont de puissantes classes d'agents cytotoxiques, utilisées en chimiothérapie. Cependant la plupart des molécules utilisées actuellement demeurent liposolubles et peu stables.

Une des approches permettant d'améliorer la solubilité des CENU et d'assurer leur stabilité, est leur complexation par un ou plusieurs composés polaires. Cet objectif peut-être atteint au moyen de complexants permettant d'accueillir les CENU en leur sein.

Les cyclodextrines figurent parmi les meilleurs complexants, la partie suivante sera consacrée à leur étude bibliographique.

⁴¹ - Cf. brevet français N° 80 16453, J. Med. Chem. (1982) Vol. 25, N° 2, 178-182.

⁴² - Brevet français N° 73625 et brevet US N° 3345256.

⁴³ - Knights R.J. et coll. Anal. Biochem., Etats Unis, (1977) 77, 176-184

Chapitre 3

Chapitre 3

Les cyclodextrines

3.1 Introduction

Le mode d'administration d'un médicament joue très souvent un rôle déterminant dans l'expression de l'activité pharmacologique. L'encapsulation du principe actif dans une molécule hôte constitue une des approches les plus récentes et les plus prometteuses du transport des médicaments.

De nombreuses molécules minérales ou organiques présentent une "cavité" leur permettant de donner naissance à des complexes d'inclusion. Dans ce processus, la molécule "hôte" admet à l'intérieur de sa cavité une ou plusieurs autres molécules "invitées" sans qu'aucune liaison covalente ne s'établisse. La stabilité du complexe ne repose donc que sur la qualité de l'adaptation entre les partenaires.

Les cyclodextrines (CD) sont des molécules-cages d'origine naturelle qui permettent d'encapsuler diverses molécules. Elles ont aujourd'hui d'innombrables applications industrielles, et on les retrouve dans une multitude de produits courants. Elles sont aussi l'objet de très nombreuses recherches scientifiques⁴⁴.

3.2 Production des cyclodextrines

Ces produits naturels découverts en 1891 par Villiers, s'obtiennent industriellement par la dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase), d'origine bactérienne.

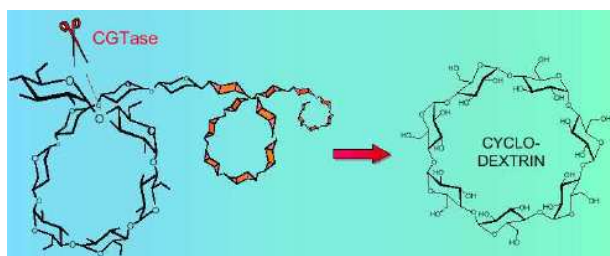


Figure 15 : Action de la CGTase sur l'amidon.

La structure hélicoïdale de la macromolécule est alors détruite au profit d'une structure cyclique (figure 15). Ainsi les spires que forme naturellement cette macromolécule en solution aqueuse sont reliées par transfert de liaisons pour donner des oligosaccharides cycliques⁴⁵.

La production des cyclodextrines comporte les étapes suivantes :

- Culture d'un micro-organisme producteur de CGTase
- Séparation de l'enzyme, concentration et purification
- Conversion enzymatique d'amidon préhydrolysé en dextrines cycliques et non cycliques

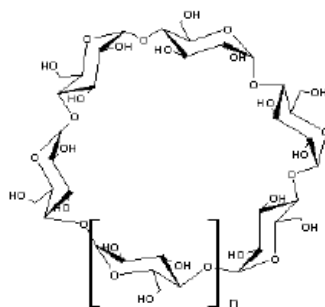
⁴⁴- Bellanger, N., Djedaïni-Pilard, F., Berthault, P., Perly, B., Phases Magazine, (1992), N°9.

⁴⁵- A. Villiers, Compt. Rend. (1891)112, 536.

- Séparation des cyclodextrines du milieu de conversion, purification et cristallisation.

Bacillus macerans est le micro-organisme le plus utilisé pour produire la CGTase, mais d'autres comme Klebsiella pneumoniae et Alkaliphilic bacillus peuvent être également utilisés. Les proportions relatives des différentes CD obtenues varient selon les microorganismes à l'origine de la CGTase utilisée, le pH, le temps, et la température d'incubation.

Les principales CD ainsi obtenues sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucose.



n = 1 α -cyclodextrine n = 2 β -cyclodextrine n = 3 γ -cyclodextrine

Figure 16 : Formule développée générale des cyclodextrines naturelles.

Il existe également des CD de plus grandes tailles (δ -CD, ϵ -CD... respectivement constituées de 9, 10... unités) et de taille plus petite (4, 5 unités) qui ont été isolées ou synthétisées. La synthèse totale de ces molécules demeure marginale car les rendements obtenus lors des réactions de glycosylation sont souvent très faibles⁴⁶.

3.3 Structure des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides de structure cyclique comportant de 6 à 12 unités D-glucose en conformations chaise liées entre elles en α -(1,4). Elles sont également connues comme cycloamyloses, cyclomaltoses et dextrines de Scharfing.

La cyclisation des unités glucose empêche la rotation de ces unités et les fait adopter une configuration fixe, ce qui donne aux cyclodextrines une forme de cône tronqué plutôt que de cylindre^{2,3,47}.

Les groupes hydroxyle secondaires des unités glucopyranose, portés par les carbones C2 et C3, sont situés sur la partie la plus large du cône et on parle souvent de « face secondaire ». La formation de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle situés sur les carbones C2 et C3 de deux unités adjacentes augmente la rigidité de la structure des CD. Les groupes hydroxyle primaires, portés par les carbones C6, sont localisés sur l'extrémité la plus étroite

⁴⁶- Jacob, J. Gebler, K., Hoffman, D., Sanbe, H., Koizumi, K., Smith, S. M., Tkaha, T., Saenger, W., Angew. Chem. Int. Ed. (1998) 37, 606.

⁴⁷- Lahaue, G., Chem. Ber. (1967), 100-2719.

(« face primaire »), rendue plus étroite par leur libre rotation (arrangement stérique optimal par rapport aux hydroxyles secondaires fixes).



Figure 17 : Structure simplifiée montrant la forme tronconique.

Ces nombreux groupes hydroxyle procurent à l'extérieur des CD un caractère hydrophile conduisant à une bonne solubilité, mais fortement variable selon les dérivés, des cyclodextrines en milieu aqueux.

La paroi de la cavité centrale est constituée d'atomes de carbone, d'hydrogène et de liaisons étheroxydes (figure 17).

Les oxygènes inter-glucosidiques (O-4) sont situés sur l'équateur, les doublets non-liants des atomes d'oxygène sont dirigés vers l'intérieur de la cavité où la densité électronique est donc élevée. Les hydrogènes H1, H2 et H4 sont dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que les hydrogènes H3 et H5 sont orientés vers l'intérieur. Ces derniers sont les seuls pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité. L'intérieur des CD est donc une cavité relativement apolaire et hydrophobe⁴⁸.

En résumé, les CD ont une structure macrocyclique dont l'extérieur est hydrophile et l'intérieur hydrophobe. Ces caractéristiques structurales sont à l'origine des propriétés très particulières des CD : former des complexes supramoléculaires avec une ou plusieurs molécules invitées hydrophobes. Pour cette raison, elles appartiennent à la famille des « molécules cages »⁴⁹.

3.4 Caractéristiques physicochimiques

Les trois principales CD natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques des principales CD natives⁵⁰.

Propriétés	α -Cyclodextrine	β -Cyclodextrine	γ -Cyclodextrine
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$

⁴⁸ - Szejtli, J., Pure Appl. Chem. (2004) 76, 1825-1845.

⁴⁹ - Saenger, W., Jacob, J., Gessler, K., Steiner, T., Hoffmann, D., Sanbe, H., Koizumi, K., Smith, S. M., Takaha, T., Chem. Rev. (1998) 98 (5), 1787-1802.

⁵⁰ - Szejtli, J., Chem. Rev. (1998) 98, 1743-1753.

Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å°)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Hauteur du tore (Å°)	7,9	7,9	7,9
Diamètre extérieur (Å°)	14,6	15,4	17,5
Volume de la cavité (Å ³)	174	262	472
Solubilité dans l'eau (g/100ml, 25° C)	14,5	1,85	23,2
Point de fusion (°C)	275	280	275
pKa (25° C)	12,3	12,2	12,1
Hydrolyse enzymatique	Nulle	Lente	Rapide

Grâce aux structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X, la forme tronconique des cyclodextrines a pu être déterminée, ainsi que le réseau de liaisons hydrogène interglucosidiques des hydroxyles primaires et des hydroxyles secondaires⁵.

La cavité des CD leur permet d'inclure de nombreux composés organiques pour former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution⁵¹.

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose.

Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' α -CD à la γ -CD.

De par la taille de sa cavité, la β -CD est celle qui complexe le plus grand nombre de composés, et elle et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CD⁵².

La solubilité dans l'eau varie de façon plus inattendue. En effet, la β -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' α -CD et la γ -CD, possède la solubilité la plus faible. Cette perte de solubilité, dont les causes n'ont pas été totalement éclaircies peut s'expliquer par les liaisons hydrogène intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyles secondaires⁷. Au sein de la β -CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau. Par contre, elle n'empêche pas la déformation de la cavité de la β -CD. Cette déformation va en s'accroissant avec les CD dont le nombre d'unités glucose est supérieur à 8 et agit de façon défavorable sur leur propriétés d'inclusion.

Dans l' α -CD, cette ceinture est incomplète car l'une des unités glucopyranose est dans une position distordue.

La γ -CD, non planaire et plus flexible, possède la plus grande solubilité dans l'eau.

⁵¹- E. Martin del Valle, Proc. Biochem. (2004) 39, 1033-1046.

⁵²- Theo. Chem. Journal of molecular structure, (1996) 366 (1, 2), 113-117.

La β -CD étant la plus intéressante du point de vue de la complexation, plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité en solution. L'une d'elles consiste en l'addition de solvants organiques. Il a été montré que l'acétonitrile et l'éthanol permettent d'augmenter cette solubilité, contrairement au méthanol^{53,54}.

Une autre méthode consiste à substituer les groupes hydroxyle par divers autres groupes fonctionnels, ce qui sera discuté au paragraphe 3.6.

Notons enfin que les CD sont biodégradables, ce qui, ajouté au fait qu'elles sont produites à partir d'une ressource renouvelable, constitue une autre caractéristique encourageant leur utilisation⁸.

3.5 La β -cyclodextrine naturelle

La β -CD est la plus accessible, la moins coûteuse et généralement la plus utile des CD. Notons que les CD font l'objet de plusieurs dénominations qui varient selon les époques et les auteurs. Ainsi, la β -CD est aussi désignée sous les termes de β -dextrine de Schardinger, cyclomaltoheptaose, cycloheptaamylose, cycloheptaglucone, ou bien encore C7A.

Dans cette étude le terme β -CD ou β -cyclodextrine a été utilisé⁷.

3.6 Cyclodextrines modifiées

La modification chimique des cyclodextrines offre à la fois d'énormes opportunités et de réels défis pour les chimistes.

Les CD sont modifiées chimiquement afin d'améliorer ou modifier certaines propriétés de ces molécules hôtes. Leur modification peut en effet permettre d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques (augmenter leur solubilité dans un solvant donné) et/ou le pouvoir de complexation de leur cavité avec une molécule invitée. C'est également un moyen de créer des molécules originales avec des fonctions spécifiques, trouvant des applications variées au-delà des frontières de la chimie classique (une activité catalytique de type enzymatique, des propriétés de vectorisation, etc.).

De nombreux dérivés peuvent ainsi être obtenus à partir des CD naturelles.

Les cyclodextrines possèdent trois types de fonctions hydroxyles situées sur les positions 2, 3 et 6 des unités glucoses (figure 18). Seules ces trois positions peuvent être modifiées car les positions 1 et 4 des glucoses forment les liaisons inter-glycosidiques de la molécule cyclique. Ces groupements hydroxyle sont les points d'ancrage de modifications structurales de ces molécules, et de nombreux groupements peuvent y être greffés, ils peuvent être aminés, estérifiés ou étherifiés.

⁵³- Taghvaei, M., Stewart, G., Anal. Chem. (1991) 63, 1902-1904.

⁵⁴- Chatjigakis, A., Donzé, C., Coleman, A., Anal. Chem. (1992) 64, 1632-1634.

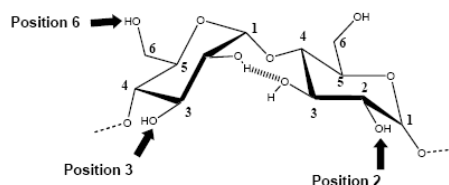


Figure 18 : Localisation des hydroxyles sur des unités α -D-glucopyranose de la cyclodextrine.

Les hydroxyles en 6 sont des hydroxyles primaires, plus réactifs que les hydroxyles secondaires en position 2 et 3. De plus, ceux de la position 6 sont aussi les plus basiques, les plus accessibles et souvent les plus nucléophiles. Ceux de la position 2 sont les plus acides et ceux de la position 3 les plus inaccessibles et de loin les moins réactifs, d'autant plus que la couronne d'hydroxyles secondaires est encombrée, moins flexible et rigidifiée par la ceinture de liaisons hydrogène⁵⁵.

Le défi qui est posé aux chimistes est celui de développer des méthodes efficaces pour modifier de manière sélective les nombreuses fonctions hydroxyles portées par les CD⁷.

3.7 Toxicité

En général, les cyclodextrines naturelles et leurs dérivés plus hydrophiles sont seulement capables de passer à travers les membranes biologiques lipophiles, telles la cornée, les muqueuses ou la peau, avec de grandes difficultés. On peut supposer que le haut poids moléculaire des CD est une des causes limitant ce passage.

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

Ainsi, la FDA (Food and Drugs Agency) autorise l'utilisation de la β -CD comme additif alimentaire (E 459) à hauteur de 0.5 à 2 % selon les produits.

Le caractère hémolytique des cyclodextrines est bien connu mais n'apparaît en fait qu'à forte concentration : en effet à faible concentration (5 mmol pour l' α -CD et 10 mmol pour la β -CD) les cyclodextrines protègent les globules rouges contre l'hémolyse osmotique et l'hémolyse induite par la chaleur alors qu'à forte concentration elles provoquent l'hémolyse en complexant et relargant le cholestérol des membranes cellulaires. Cette action hémolytique est faible avec la γ -CD mais plus forte avec l' α -CD et la β -CD, et cette propriété conditionne les effets des CD par voie intraveineuse ou intramusculaire. Un certain nombre d'études toxicologiques ont montré que la γ -CD, la 2-hydroxypropyl- β -CD, la sulfobutyléther- β -CD et la maltosyl- β -CD, sont sans danger même pour l'administration parentérale. Par contre, l' α -CD, la β -CD et les β -CD méthylées ne sont pas acceptables pour l'administration parentérale (irritation à l'injection pour les trois et très forte néphrotoxicité pour α et β).

⁵⁵ - Eastburn, S. D., *Biotechnol. Adv.* (1994) 12, 325-339.

Ces molécules peuvent être considérées comme éco-compatibles et se dégradent dans le milieu naturel. Toutefois la cyclodextrine naturelle se dégrade plus facilement que les cyclodextrines modifiées : 82 % de biodégradation de la β -CD en 28 jour mais seulement 9 % pour la HP-CD et 9 % pour la M-CD^{56,5,8}.

3.8 Applications

La configuration des cyclodextrines crée un anneau hydrophile au sommet et à la base du cône formé par la molécule et une cavité hydrophobe au milieu, leur conférant des capacités de piégeage ou de protection de molécules organiques.

L'intérêt principal des CD réside dans leur capacité à modifier, par inclusion, les propriétés physico-chimiques de l'invité, ce qui permet d'améliorer des procédés ou des produits finis. L'exploitation de ces capacités d'inclusion et la biocompatibilité des CD ont entraîné un accroissement du nombre et de la diversité de leurs applications.

La complexation peut stabiliser la dégradation de certains composés par photolyse, oxydation, hydrolyse acide ou enzymatique. Elle peut aussi mettre la coexistence de composés incompatibles au sein d'une même formulation. L'inclusion d'une partie d'une substance permet d'améliorer la sélectivité d'une réaction par masquage de certains groupements fonctionnels. Dans le même objectif, l'inclusion peut limiter les effets secondaires indésirables d'un médicament comme l'irritation locale, l'hémolyse ou l'attaque de tissus musculaires.

D'autres avantages de l'inclusion résident dans la possibilité de transformer une formulation normalement liquide à température ambiante en poudre (par précipitation des complexes d'inclusion), ceci facilitant la manutention ou le procédé industriel de formulation.

Les CD peuvent également être utilisées en :

- Cosmétique : elles permettent de stabiliser des émulsions et les molécules odorantes ou actives.
- Désodorisation : les cyclodextrines sont utilisées comme agent masquant contre les mauvaises odeurs (la complexation rend les molécules odorantes moins volatiles).
- Textiles spéciaux : elles sont utilisées pour fixer au tissus des composés actifs (parfums, antibactériens).
- Catalyseur de réactions chimiques : en chimie organique, elles permettent de contrôler la régiosélectivité de certaines réactions tout en améliorant le rendement, et permettent de travailler avec des molécules hydrophobes en milieu aqueux⁵⁷.

Elles sont également très utilisées dans le domaine des sciences de la séparation car elles ont un grand potentiel de sélectivité et de stéréosélectivité. Elles sont utilisées dans tous les

⁵⁶ - Irie, T., Uekama, K., J. Pharm. Sci. (1997) 86, 147-162.

⁵⁷- Tait, R., Thompson, D., Stella, V., Stobaugh, J., Anal. Chem. (1994) 66, 4013-4018.

types de chromatographie (CCM, CPG, ...) mais c'est en CLHP que l'on observe le plus fort intérêt pour ces molécules. Les cyclodextrines peuvent être greffées sur la phase stationnaire ou alors être des additifs de la phase mobile⁵⁸.

Dans le diagnostic in vitro : alors que des produits tels que les composés fluorescents, fortement hydrophobes, doivent être solubilisés en milieu organique par ajout de solvant, les cyclodextrines permettraient le recours à des procédés 100 % aqueux.

Leur caractère biodégradable les prédispose à des applications importantes dans les domaines agro-alimentaires et pharmaceutiques. L'encapsulation dans les cyclodextrines permet en effet de protéger des molécules fragiles, ou d'assurer leur libération lente et contrôlée. De plus, la solubilisation de médicaments insolubles dans l'eau sous forme de complexes d'inclusion dans les cyclodextrines permet de disposer de préparations injectables. Ce processus s'applique à de très nombreux médicaments insolubles dans l'eau et dans les fluides physiologiques (anti-inflammatoires, stéroïdes, anti-tumoraux, ...) ⁵⁹.

3.9 Exemples

La représentation du complexe obtenu par encapsulation de la propionate du rétinol avec la β -cyclodextrine naturelle est indiquée dans la figure ci-dessous.

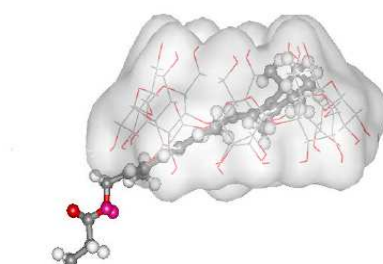


Figure 19 : Structure du complexe d'inclusion entre la propionate de rétinol et la β -cyclodextrine naturelle.

On peut envisager d'améliorer les performances des cyclodextrines vis à vis d'une classe thérapeutique donnée. Dans un premier temps, sélectionner la cyclodextrine naturelle la mieux adaptée (α , β ou γ).

Ultérieurement, on peut modifier chimiquement cette cyclodextrine pour optimiser les interactions entre la molécule incluse et la cyclodextrine, pour augmenter la solubilité dans l'eau du complexe d'inclusion ou pour diriger ce complexe vers l'organe à traiter. Ce dernier aspect constitue le "ciblage moléculaire".

⁵⁸- Schneiderman E., Stalcup A.M., J. Chromatogr. (2000) 745, 83-102.

⁵⁹- Rajewski, R., A., Stella, V., J., J. Pharm. Sci. (1996) 85 (11), 1142-1159.

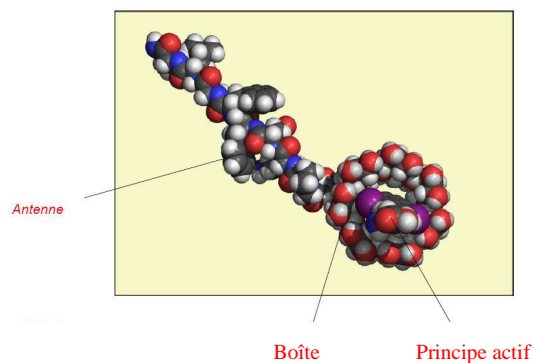


Figure 20 : Le premier exemple de vrai vecteur.

Dans cette approche, le transporteur doit permettre d'acheminer le médicament vers le site où son action doit s'exprimer.

La molécule représentée sur la figure 21 est destinée au ciblage de médicaments neurotropes c'est à dire agissant directement au niveau cérébral. Elle est obtenue par greffage sur la β -cyclodextrine d'un peptide (la Leucine-enképhaline) présentant une très grande affinité pour les récepteurs cérébraux de la morphine⁶⁰.

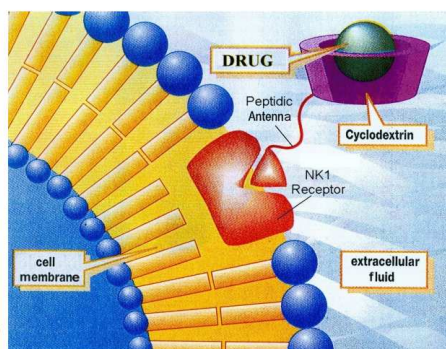


Figure 21 : Principe de base de la vectorisation.

Les cyclodextrines apparaissent donc comme d'excellents candidats pour optimiser l'action des médicaments, en particulier pour ceux très peu solubles dans l'eau^{61,62}. Ces propriétés sont dues essentiellement au pouvoir complexant de ces molécules par la formation de complexes d'inclusion.

⁶⁰ -Matsuda, H., Arima, H., Adv. Drug. Deliv. Rev. (1999) 36, 81-99.

⁶¹ - Hedges A. R., Chem. Rev. (1998) 98 (5), 2035-2044.

⁶² - Zia, V., Rajewski, R., Stella, V., Pharm. Res. (2000) 17, 956-961.

Chapitre 4

Chapitre 4

Les complexes d'inclusion

De par leur structure et leur cavité, les CD peuvent former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules (neutres, chargées, polaires ou apolaires) d'une grande variété de composés solides, liquides ou gazeux. Cette propriété, mise en évidence dans les années 1930^{63,64} et largement acceptée à partir des années 1950^{65,66} est à l'origine de la plupart des applications industrielles des CD.

4.1 Généralités sur la complexation

Un complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules dont l'une, le substrat (ou « invité ») est encapsulé de façon totale ou partielle par l'autre, le récepteur (ou « hôte ») sous l'effet d'interactions faibles⁶⁷. Aucune liaison covalente n'est créée, ce qui permet une dissociation aisée et douce du complexe formé.

Les complexes formés entre la (les) cyclodextrine(s) "hôte(s)" et la (les) molécule(s) "invitée(s)" peuvent être de plusieurs types⁶⁸ (figure 22) : on distingue les complexes d'inclusion (a-f) et les complexes d'association (g). De nombreux exemples, avec divers arrangements structuraux, se trouvent ainsi décrits dans la littérature.

Les structures des principaux complexes ayant fait l'objet de publications sont représentées sur la figure suivante :

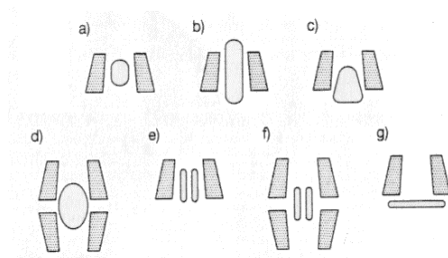


Figure 22 : Structures en solution aqueuse de complexes cyclodextrines-invités décrits dans la littérature; a) inclusion complète ; b) inclusion "axiale" ; c) inclusion partielle (capping) ; d) complexe 2:1; e) complexe 1:2; f) complexe 2:2; g) complexe "non-spécifique".

⁶³- Pringsheim, H., Walton, R., A., Comprehensive Survey of Starch Chemistry, Ed. Chemical Catalogue Co., New York, 1928.

⁶⁴- Pringsheim, H., Chemistry of the Saccharides, McGraw-Hill, New York, 1932.

⁶⁵- Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H., Ger. Patent, (1953), 895,769.

⁶⁶- French, D., Adv. Carbohydr. Chem. (1957) 12, 189-260.

⁶⁷- Crini, G., Morcellet, M., Morin, N., L'actualité chimique, (2001) 247, 18-25.

⁶⁸- Wenz, G., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1994) 33, 803-822.

L'association d'une CD et d'une molécule invitée S, ainsi que la dissociation du complexe formé CD-S, le complexe étant régi par des forces d'interactions faibles, est gouvernée par un équilibre thermodynamique de la forme⁶⁹: $CD + S \rightleftharpoons CD-S$

La stabilité du complexe peut être exprimée par la constante de stabilité K_S (également appelée constante d'association) ou la constante de dissociation K_D :

$$K_S = 1 / K_D = ([CD-S]) / ([CD] [S])$$

où [CD-S], [CD] et [S] sont les concentrations du complexe, de la CD et du soluté, respectivement.

Les complexes CD-S formés sont généralement du type 1:1, comme celui décrit ci-dessus, c'est-à-dire qu'une CD complexe une molécule de soluté. Toutefois, il existe aussi des complexes du type 2:1, 1:2, 2:2 ou d'ordre supérieur⁷⁰.



Figure 23 : Complexe d'inclusion de type 1:1 (cyclodextrine-molécule invitée).

4.1.1 Forces impliquées dans les complexes d'inclusion des cyclodextrines

Le phénomène de complexation est la résultante de nombreuses interactions mettant en jeu la molécule hôte, la molécule invitée et le solvant, dans le cas d'une inclusion en solution, et conduisant à l'état thermodynamique le plus stable. La nature et l'importance relative des différents phénomènes responsables de la formation d'un complexe CD-soluté sont encore mal connues. Les « forces directrices » les plus discutées sont les suivantes⁷¹:

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

Depuis que les complexes d'inclusion utilisant les CD sont connus, les interactions intermoléculaires responsables de la stabilité des complexes ont souvent été discutées et critiquées. En fait, il a été démontré que plusieurs forces intermoléculaires existent simultanément, la relativité de chacune des forces dépend du substrat et du solvant.

⁶⁹- Connors, K., Chem. Rev. (1997) 97, 1325-1357.

- Szejtli, J., (1982), Cyclodextrins and their Inclusion Complexes, AKadémiai Kiado, Budapest.

⁷⁰- Rekharsky M. V., Inoue Y., Chem. Rev. (1998) 98 (5), 1875-1918.

⁷¹- Liu, L., Guo, Q. -X., J. Incl. Phenom. (2002) 42, 1-14.

La théorie la plus acceptée est l'interaction de van der Waals⁷², qui serait prédominante. Le substrat est lié à la cyclodextrine par des interactions faibles avec les hydrogènes H3 et H5. D'après cette théorie, si la forme générale de la molécule invitée complémente parfaitement la cavité, la complexation est favorisée.

Pour d'autres auteurs, le phénomène régissant la complexation serait la substitution des molécules d'eau présentes dans la cavité par la molécule invitée. C'est la cohésion des molécules d'eau qui favorise l'interaction hydrophobe, plutôt que l'attraction entre l'hôte et l'invité. Cette théorie propose une interaction inhérente au solvant due à une forte énergie des molécules d'eau se trouvant à l'intérieur de la cavité. Les molécules d'eau situées dans la cavité se trouvent dans un état énergétiquement défavorable (interactions polaire-apolaire) et leur expulsion à l'extérieur de la cavité par la molécule invitée sera favorisée par un gain entropique et d'énergie potentielle^{73,74}.

Toutefois, d'autres auteurs avancent le fait que ces molécules d'eau doivent avoir un degré de liberté conformationnelle plus grand que celles présentes dans la solution et entretenant des liaisons hydrogène avec leurs voisines. Leur exclusion est donc un processus au cours duquel l'enthalpie et l'entropie se compensent et elle ne constitue pas un facteur déterminant lors de la complexation^{8,9}. De même, la modification des contraintes conformationnelles de la CD ne semble pas être déterminant mais permet par contre de maximiser les différentes interactions entre le soluté et la CD.

Une troisième théorie, uniquement applicable aux composés polaires, évoque la formation de liaisons hydrogène entre les hydroxyles de la cyclodextrine et les hétéroatomes du substrat⁷⁵. Les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques faisant intervenir les fonctions hydroxyle ou leurs substituants seraient impliquées, en particulier, dans l'orientation relative des deux molécules⁹.

D'autres auteurs pensent que les interactions responsables sont du type interactions dipolaires⁷⁶, c'est-à-dire que le substrat et la cyclodextrine s'orientent de façon à ce que l'interaction entre les moments dipolaires soit maximum. D'autres théories proposent des interactions coulombiques, hydrophobes⁷⁷, des forces d'induction (essentiellement dipôle permanent-dipôle induit, aussi appelé effet d'induction de Debye) et dispersion⁷⁸, des forces de tension conformationnelle⁷⁹.

En plus des interactions discutées ci-dessus, la complexation fait intervenir des paramètres stériques, c'est-à-dire les dimensions et la géométrie des deux molécules qui interagissent⁸⁰.

⁷²- Linert, W., Han, L., Lukovits, I., Chem. Phys. (1989) 139, 441.

⁷³- Tabushi, I., Kuroda, Y., Mizutani, T., J. Am. Chem. Soc. (1986) 108, 4514.

⁷⁴- Van Etten, R. L., Sebastien, J. F., Clowers, G. A., Bender, N. L., J. Am. Chem. Soc. (1976) 89, 3253.

⁷⁵- Park, J. H., Nah, T. H., J. Chem. Soc. Perkin Trans. (1994) 2, 1359.

⁷⁶- Kitagawa, M., Sakurai, M., Hoshi, H., Chûjô, R., Inoue, Y., Bull. Chem. Soc. Jpn. (1988) 61, 4225.

⁷⁷- Frank, H. S., Evans, M. W., J. Chem. Phys. (1945) 13, 507.

⁷⁸- Ohashi, M., Kasatani, K., Shinohara, H., Sato, H., J. Am. Chem. Soc. (1990) 112, 5824.

⁷⁹- Sakuraba, H., Natori, K., Tanaka, Y., J. Org. Chem. (1991) 56, 4124.

La cavité doit être assez grande pour contenir la molécule invitée ou au moins une partie, mais pas trop grande pour que cette molécule ne se contente pas de traverser la cavité sans y établir d'interactions. Nous avons vu au chapitre précédent que les trois CD natives ont des cavités de tailles différentes. Cela a pour conséquence que l' α -CD complexe d'avantage les molécules de faibles masses moléculaires ou ayant une chaîne aliphatique, la β -CD complexe les molécules aromatiques ou hétérocycliques tandis que la γ -CD complexe les molécules plus grosses contenant plusieurs cycles⁸¹.

4.1.2 Formation d'un complexe d'inclusion

On peut séparer la formation d'un complexe en plusieurs étapes :

- Approche de l'invité vers la cyclodextrine.
- Rupture de la structure de l'eau à l'intérieur de la cavité de la CD et éviction de certaines de ces molécules.
- Rupture de la structure de l'eau autour de la molécule invitée et transport de molécules d'eau vers la solution.
- Interaction de certains groupements de la molécule invitée avec l'extérieur ou l'intérieur de la CD.
- Eventuellement, création de liaisons hydrogène entre l'invitée et la CD.
- Reconstitution de la structure de l'eau autour des parties exposées de l'invité après l'inclusion.

4.1.3 Conséquences de la complexation

L'inclusion des molécules invitées dans la cavité des CD constitue une encapsulation moléculaire et ces molécules voient leurs propriétés physicochimiques modifiées. Parmi ces modifications, on peut citer^{19, 82}:

- 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.

De nombreuses techniques d'analyses physico-chimiques, telles que la spectroscopie UV-visible, la spectroscopie de fluorescence, l'analyse cristallographique, la spectroscopie

⁸⁰- Szejtli, J., Chem. Rev. (1998) 98, 1743-1753.

⁸¹ - Martin Del Valle, E., Proc. Biochem. (2004) 39, 1033-1046.

⁸²- Szejtli, J., Pure Appl. Chem. (2004) 76, 1825-1845.

RMN, la spectrométrie de masse ou bien encore des méthodes d'analyses électrochimiques, permettent de mettre en évidence, de caractériser et de déterminer les constantes d'association de ces complexes^{8,83,84,85,86}.

4.2 Méthodes de caractérisation des complexes d'inclusion

L'encapsulation moléculaire peut se produire à l'état liquide et à l'état solide. Les molécules complexées voient certaines de leurs propriétés physico-chimiques modifiées telles que la solubilité dans l'eau, la biodisponibilité (dans le cas de principes actifs), la réactivité, les propriétés spectrales, etc. Les méthodes utilisées pour détecter l'inclusion, se basent sur les mesures de ces propriétés.

Il est important de souligner qu'une analyse complète et efficace d'un complexe d'inclusion potentiel doit fournir des réponses concernant la réalité de l'inclusion, sa stoechiométrie, sa constante d'association et devrait aussi proposer une structure tridimensionnelle de la supramolécule. Or, parmi les techniques d'analyse couramment utilisées, peu peuvent répondre à ces questions. Ceci est dû le plus souvent à des limitations techniques ou théoriques mais dans un certain nombre de situations les incohérences relevées dans la littérature peuvent venir d'une mauvaise interprétation des données expérimentales. Parmi les méthodes utilisées pour détecter l'inclusion on trouve :

- la diffraction des rayons-X⁸⁷.
- les techniques d'analyse de l'état solide.
- les techniques spectrophotométriques^{88,89,90}.
- la résonance magnétique nucléaire¹⁶.

4.3 Préparation des complexes d'inclusion

Pour préparer les complexes d'inclusion, il existe différentes méthodes^{91,92} la plus commune consiste à agiter une solution de CD en présence du composé à inclure. Dans ce cas on obtient une solution dont la formulation doit être optimisée, c'est-à-dire dont la proportion du complexe par rapport aux espèces libres est maximale. Pour cela il faut déterminer la stoechiométrie du complexe ainsi que sa constante d'association, tout d'abord dans l'eau, puis en fonction des variations des propriétés physico-chimiques du milieu de solubilisation. Selon

⁸³- Schneider H.-J., Hacket F., Rüdiger V., Ikeda H., Chem. Rev. 1998, 98 (5), 1755-1786.

⁸⁴- Szente, L., Comprehensive Supramolecular Chemistry, Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F., Lehn J.-M., Eds., vol. 3, Cyclodextrins, chap. 8, Pergamon : Oxford, U.K. (1996) 253-278.

⁸⁵- Tsukube H., Furuta H., Odani A., Takeda Y., Kudo Y., Inoue Y., Liu Y., Sakamoto H., Kimura K., Comprehensive Supramolecular Chemistry, Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F., Lehn J.-M., Eds., vol. 8, Physical methods in supramolecular chemistry, chap. 10, Pergamon : Oxford, U.K. (1996) 425-482.

⁸⁶- Connors K.A., Chem. Rev. (1997) 97, 1325-1357.

⁸⁷-Theo. Chem. Journal of molecular structure, (1996), 113-117.

⁸⁸- Song Li. William. C. Purdy, Chem. Rev. (1992) vol. 92. N° 6, 1457-1470.

⁸⁹- Breslow, R. and Rideout, D.C., J. Am. Chem. Soc. (1980)102, 7816-17.

⁹⁰-Le Thuau P., Martel B., Int. J. Pharm. (1988) 175(2), 205-213.

⁹¹- Ponhert, G., J. Chem. (2003) 4, 713-715.

⁹²-Hirayama, F., Uekama, K., J. Am. Chem. Soc. (1998) 120 (45), 11627-16321.

l'allure de la courbe de solubilité du complexe, il est possible d'obtenir un complexe solide par précipitation et filtration.

Quelques méthodes opératoires d'obtention de complexes en solution homogène ou en solution hétérogène sont résumées comme suit^{28, 93}:

4.3.1 Complexation en solution

- Les CD et les molécules invitées sont mélangés de 60 à 80 °C dans des stoechiométries définies, pour atteindre la solution saturée de la CD et de l'invitée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 8 à 16 heures. Le complexe ainsi formé peut être cristallisé par refroidissement.
- Méthode d'ajout progressif : la quantité calculée de molécules invitées est dissoute séparément dans un solvant approprié et est ajoutée goutte à goutte à la solution de la CD. Après agitation intensive (de 16 à 24 heures), le complexe peut être cristallisé par refroidissement.

4.3.2 Complexation en système hétérogène

- Complexation en suspension : les CD ne sont pas dissoutes, mais finement suspendues dans l'eau. La substance invitée est dissoute dans une quantité de solvant définie ou directement ajoutée à la suspension de CD en agitation. Le mélange réactionnel est mis sous agitation continue pendant 4 heures ou plusieurs jours selon la substance invitée.
- Complexation par malaxage : la CD est intensivement malaxée pendant 1 à 2 heures avec un peu d'eau au quelle l'invité a été ajouté directement sans aucun solvant.
- Complexation en phase solide : des mélanges solides des CD et des substances invitées sont malaxés jusqu'à formation des complexes.

4.4 Détection de la formation d'un complexe d'inclusion^{94,95}

Les complexes peuvent se former aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide.

En solution, il existe un équilibre entre la forme complexée et la forme libre de chacun des composés. En phase solide, les molécules invitées peuvent être incluses dans la cavité ou liées à l'extérieur de la CD. Lorsqu'une molécule est incluse, ses propriétés physico-chimiques (Pf, Rf, solubilité,...) sont modifiées, ces changements permettent de mettre en évidence la formation du complexe.

La mise en évidence peut être généralement effectuée par les moyens suivants :

⁹³ - Sigurdardottir, A. M., Loftsson, T., Anal. Chem. (1998) 70(20), 205-213.

⁹⁴ - Buschmann, H. J., Schollmeyer, E., J. Incl. Phen., (2003) 24, 193-210.

⁹⁵ - Alvarez, R. M. S., Cuten, E. H., Spectrochim. Acta. (1996) 51 A., 555.

4.4.1 Détection de l'inclusion à l'état solide

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

4.4.2 Détection de l'inclusion en solution

En solution, on peut détecter la formation du complexe d'inclusion par les méthodes spectroscopiques (spectroscopie UV/ visible, spectroscopie de fluorescence, spectroscopie de dichroïsme circulaire, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire), et les méthodes électrochimiques, microcalorimétrie et par mesure de la solubilité.

4.5 Caractéristiques des complexes d'inclusion

Lors de l'étude d'un complexe d'inclusion, certains termes sont à prendre en considération ou à étudier comme la stoechiométrie du complexe, la nature du complexe (association ou inclusion), la conformation de la molécule incluse, la géométrie du complexe formé, l'énantiodifférenciation et les calculs des constantes de complexation.

Toutes ces études ont été effectuées et étudiées expérimentalement et théoriquement depuis plus d'une dizaine d'années.

4.5.1 Détermination de la stoechiométrie

Lors de la formation d'un complexe deux cas de figure peuvent se présenter :

- le complexe formé n'est pas ou peu soluble dans le solvant et précipite sous forme d'un solide;
- le complexe est soluble dans le solvant.

La stoechiométrie du complexe n'est pas directement accessible. Dans le dernier cas, les méthodes les plus utilisées pour la détermination de la stoechiométrie des complexes.

d'inclusion des CD sont la méthode des variations continues (MVC) et la méthode des rapports molaires (MRM)^{96, 97}.

4.5.1.1 Méthode des variations continues^{98, 99, 100, 101}

Une détermination fiable des stoechiométries des complexes peut être fournie par la méthode des variations continues (méthode de Job).

C'est une méthode générale qui peut s'appliquer à de nombreuses techniques analytiques du moment que la mesure d'une propriété physique ou chimique permet d'avoir une image de la concentration du complexe formé en solution.

⁹⁶ - Lohaus, G., Chem.Ber. (1997) 100, 2719.

⁹⁷ - Dass, C. R., Jessup, W., J. Incl. Phen. & Mol. Rec. Chem. (1996) 24 (3), 193-210.

⁹⁸ - Connors, K. A., Chem. Rev. (1987) 12, 54-56.

⁹⁹ - Coleman, J. S., Varga, L. P., Mastin, S. H., Inorg. Chem. (1970) 9, 1015-1020.

¹⁰⁰ - Ingham, K. C., Anal. Biochem. (1975) 68, 660 -663.

¹⁰¹ - Job, P., Annal. Chim. (1927) 113-203.

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

Le procédé est particulièrement rapide et économique : il permet de caractériser un complexe à l'aide d'une seule courbe d'écart. Il évite l'usage de solutions à concentrations élevées, avantage à la fois théorique et pratique, puisque de telles solutions sont susceptibles d'échapper à la loi d'additivité et de se décomposer.

Dans notre étude la variable spectrophotométrique, est l'intensité de fluorescence, qui peut être le reflet direct ou indirect de la concentration des complexes en solution. Cette méthode (MVC) exprime l'intensité de fluorescence en fonction de la fraction molaire de l'invité.

4.5.1.2 Méthode des rapports molaires^{36, 102}

Cette méthode consiste à maintenir la concentration totale de la molécule invitée [I] constante et à faire varier la concentration du complexant [C].

Le tracé d'une propriété, propre au complexe, soit l'intensité de fluorescence, en fonction du rapport $[C]_t / [I]_t$ est étudié afin de détecter une éventuelle discontinuité ou un changement brutal de pente correspondant au rapport stoechiométrique (n/m), pour le complexe C_nI_m .

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

Afin de compléter la caractérisation thermodynamique des complexes d'inclusion, il reste encore à déterminer la constante d'association K_a du complexe formé.

4.5.2 Détermination de la constante de stabilité^{103,104,105}

La stabilité d'un complexe d'inclusion formé entre une cyclodextrine et une molécule hydrophobe de taille appropriée est caractérisée par sa constante de stabilité. Cette constante est un paramètre thermodynamique important et largement utilisé.

En spectrophotométrie, la constante de stabilité (d'association) des complexes d'inclusion avec la CD peut être déterminée par la méthode développée par Benesi et Hildebrand (B-H) (en 1949). Initialement utilisée en conjonction avec l'UV/Vis, de nombreuses modifications ont été apportées qui permettent à la méthode de B-H d'être appliquée à d'autres techniques spectroscopiques incluant la fluorescence, l'infrarouge et la RMN.

Dans la méthode de Benesi-Hildebrand, la concentration de la molécule organique hydrophobe est généralement maintenue constante, alors que celle de la

¹⁰² - Meyer, A. S., Ayres, G. H., J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 49-53.

¹⁰³ - Seal, B., Mukherjee, A., Mukherjee, D., Bull. Chem. Soc. Jpn. (1979) 52 (7), 2088-2090.

¹⁰⁴ - Scott, R., Chim. (1956) 75, 787-789.

¹⁰⁵ - Vogsburgh, V. C., Cooper, G. R., J. Am. Chem. Soc. (1941) 63, 437.

cyclodextrine varie dans une gamme donnée de concentrations. Au cours de l'étude, la variable observable est, dans notre étude, l'intensité de fluorescence de la molécule "invitée" quand elle est hydrophobe. Cette approche permet de déterminer graphiquement K_a à condition que l'espèce non observée soit en large excès (d'au moins un facteur 10) par rapport à l'espèce observée.

Dans ces conditions, on établit la relation qui correspond à l'équation d'une droite de type $y = a x + b$, où a représente la pente. Par extrapolation à l'origine, on peut déterminer la valeur permettant le calcul de K_a .

4.6 Travaux antérieurs de notre groupe

Inclusion des chloroéthylnitrososulfamides dans la β -cyclodextrine

Les 2-chloroéthylnitrososulfamides (CENS) ¹⁰⁶ qui constituent une nouvelle série d'oncostatiques potentiels, ont été conçus sur le modèle des chloroéthylnitrosourées (CENU), dans lesquelles le groupement carbonyle a été remplacé par un groupement sulfonyle (fig. 24)

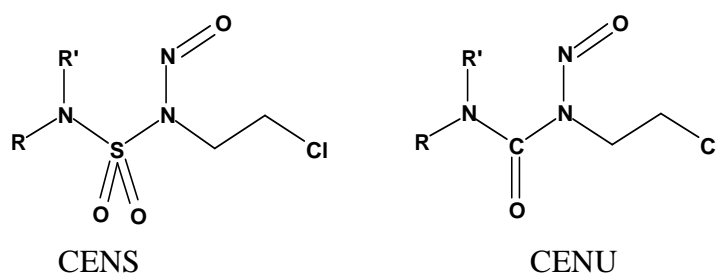


Figure 24 : Chromophores CENU, CENS.

Dans des travaux précédent de notre groupe, des complexes de CENS d'amines secondaires- β -CD¹⁰⁷, de CENS d'aminoesters- β CD ¹⁰⁸ et sulfamoyloxazolidinones - β -cyclodextrine¹⁰⁹ ont été étudiées en solution et à l'état solide par spectrophotométrie UV et par RMN N¹⁵, RMN H¹, RMN C¹³ et ESI-MS. La caractérisation des complexes, leur stoechiométrie, leur solubilité et leur stabilité, ainsi que la détermination des constantes de dissociation ont été établies et montrent que l'inclusion dans la β -cyclodextrine apparaît comme un mode de formulation prometteur pour les CENS.

¹⁰⁶- Abdaoui, M., Dewynter, G., Aouf, N., Favre, G., Morere, A., Montero, JL, Bioorg. Med. Chem. (1996) 4, 1227.

- Abdaoui, M., Dewynter, G., Montero, J.-L., Tetrahedron Lett. (1996) 37, 5695.

- Abdaoui, M., Dewynter, G., Aouf, N., Montero, J.-L., Phosphorus, Sulfur, Silicon. (1996) 118, 39.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Regainia, Z., Montero, J.-L., Tetrahedron. (1996) 52, 14217.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Toupet, L., Montero, J.-L., Tetrahedron Lett. (1997) 38, 8691.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Toupet, L., Montero, J.-L., Tetrahedron. (2000) 56, 2427–2435.

- Seridi, A., Kadri, M., Abdaoui, M., Winum, JY. and Montero, JL, Bioorg. & Med. Chem. Lett. (2006) 16, 1021.

- Seridi, A., Kadri, M., Abdaoui, M., Winum, JY and Montero, JL, Arch. Pharm. Chem. Life Sci. (2006) 339, 521.

¹⁰⁷- Kadri, M., Dhaoui, N., Abdaoui, M., Winum, JY. and Montero, J. L., Eur. J. of Med. Chem. (2004) 39, 79.

¹⁰⁸- Kadri M., Djemil. R., Dhaoui, N., Abdaoui, M., Winum, JY. and Montero JL. Bioorg & Méd. Chem. Lett. (2005) 15, 889.

¹⁰⁹- Thèse Nedjoudja Cheghib, Université de Guelma, 2004.

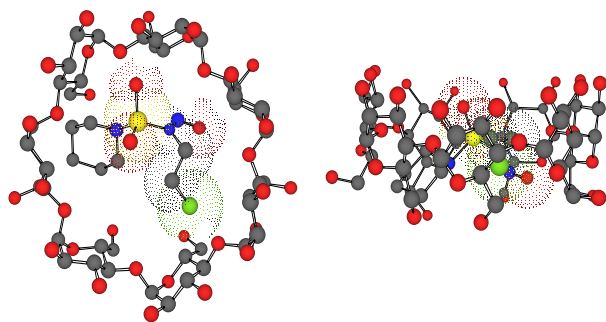


Figure 25 : Complexe d'inclusion CENS- β -CD.

Ces travaux ont porté sur les CENS et leurs dérivés. Quand à nous, nous avons accès nos recherches sur les CENU.

En vu de l'étude bibliographique, relative aux CENU et leur intérêt thérapeutique et leur solubilité et stabilité limitées et aux β -CD et leur capacité à former des complexes d'inclusion, il nous a semblé important de tenter notre contribution en essayant de former des complexes d'inclusion entre une série de CENU et la β -CD, afin de diminuer leur toxicité et d'augmenter leur hydrosolubilité ainsi que leur stabilité. Les complexes obtenus ont fait l'objet d'une étude détaillée, par spectrofluorimétrie.

Chapitre 5

Chapitre 5

La spectrofluorimétrie

5.1 Généralités

En raison de leur sensibilité, sélectivité et simplicité instrumentale, les méthodes spectrofluorimétriques peuvent être utilisées comme ressource pour améliorer la performance des méthodes analytiques et la détermination des constantes d'association des complexes¹¹⁰.

Considérons l'excitation ou l'absorption des électrons d'une molécule par la lumière. Les composantes électrique et magnétique vont réagir avec les électrons. Les contributions électrique et magnétique dans la force F agissant sur un électron en mouvement sont :

$$F = (eE) + (evH/c) \quad (1)$$

où e , c , v , E et H sont respectivement la charge de l'électron, la vitesse de la lumière, la vitesse de rotation de l'électron, la composante électrique et la composante magnétique de l'onde lumineuse.

L'absorption de radiation lumineuse (photons) par une population de molécules provoque le passage d'électrons du niveau électronique fondamental S_0 à un état excité S_n ($n \geq 1$). Le retour à l'état S_0 se réalisera suivant deux étapes (diagramme de Jablonski) :

- retour à l'état S_1 ;
- de S_1 , il y aura retour à l'état S_0 .

Différents processus compétitifs vont désexciter l'état S_1 :

- Il y a émission de photons avec une constante de vitesse k_r , c'est la fluorescence.
- L'énergie absorbée par la transition est dissipée dans le milieu sous forme d'énergie non radiative, avec une constante k_i .
- Les molécules excitées peuvent céder leur énergie à d'autres molécules situées à proximité, avec une constante de vitesse k_q (inhibition par collision), ou avec une constante k_t (transfert d'énergie à distance).

Tout corps qui absorbe des photons s'appelle chromophore, et tout chromophore qui émet des photons s'appelle fluorophore ou fluorochrome.

L'absorption permet le passage du chromophore de l'état fondamental à un état excité, donc l'absorption de photons est synonyme d'excitation¹¹¹.

La luminescence regroupe l'ensemble des phénomènes d'émission de lumière, qui sont la conséquence d'un apport préalable d'énergie. Il existe plusieurs types de luminescences.

Elles se distinguent par le phénomène à la base de cet apport d'énergie (ou excitation). Le terme de luminescence est alors précédé d'un préfixe déterminé par l'origine de l'excitation mise en jeu. Par exemple, on parlera d'électroluminescence lorsque l'excitation provient d'un

¹¹⁰ - Lipinski, J., Chojnacki, H., Spectrochim. Acta. (1995) 51A, 381.

¹¹¹ - Roberts, E. L., Chou, P. T., Alexander, T. A., Agbaria, R. A., Warner, I. M., J. Phys. Chem. (1995) 99, 5431.

courant électrique (électrons), de chimiluminescence si l'origine est une réaction chimique, de bioluminescence dans le cas d'un processus biologique, ou encore de photoluminescence s'il s'agit d'une source lumineuse (photons)¹¹².

Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous allons maintenant aborder les mécanismes qui régissent le processus de luminescence. Pour cela, nous étudierons le cas de la fluorescence, qui est la méthode analytique la plus utilisée.

5.2 La fluorescence

5.2.1 Principe de la fluorescence

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de restituer rapidement une fraction de cette lumière absorbée sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) à une longueur d'onde supérieure. La différence d'énergie correspondant à l'émission fluorescente d'un composé est toujours plus faible que celle correspondant à l'absorption, à cause des phénomènes de relaxation vibrationnelle dans les états excités et fondamentaux.

La loi fondamentale de la fluorimétrie est que l'intensité du rayonnement émis par fluorescence est proportionnelle à la concentration de la molécule interceptant le faisceau lumineux¹¹³.

Lorsque la lumière réagit avec la matière, des photons sont absorbés. La transition électronique se déroule du niveau fondamental S_0 vers les niveaux d'énergie supérieure S_1 , S_2 , S_n . Plus l'énergie absorbée est importante, plus les niveaux électroniques supérieures sont atteints. Le retour au niveau électronique S_1 V_n est atteint par conversion interne. Le passage du niveau V_n au niveau V_0 au sein du niveau S_1 est l'effet des interactions entre les molécules de fluorophore et les molécules de solvant. A partir du niveau S_1 V_0 se déroulent les phénomènes indiqués dans le diagramme de Jablonski.

La fluorescence est l'émission de photons à partir de l'état singulet S_1 . Les transitions $S_1 \rightarrow S_0$ sont permises avec des constantes de vitesse d'émission autour de 10^8 s^{-1} . L'intensité du spectre de fluorescence dépend entre autres de la population de molécules se trouvant à l'état excité S_1 V_0 . Tous les processus qui entrent en compétition avec la fluorescence diminuent la population de molécules à l'état S_1 , induisant ainsi une chute de l'intensité de fluorescence.

¹¹² - Rouessac, F. & Rouessac, A., Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, 2e édition, Masson, 1994. A été récemment réédité chez Dunod. Un classique très complet notamment sur les aspects expérimentaux

¹¹³ - Atkins, P. W., Physical Chemistry, Oxford University Press. Version française publiée par De Boeck.

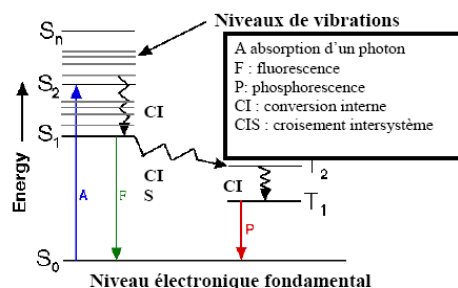


Schéma 1 : Diagramme de Jablonski:

Schéma des phénomènes de fluorescence et de phosphorescence.

Les fluorophores qui fluorescent fortement dans le visible possèdent en général des électrons délocalisés sur des doubles liaisons conjuguées.

Les données spectrales de la fluorescence sont généralement présentées comme un spectre d'émission qui est le tracé de l'intensité de fluorescence en fonction des longueurs d'onde¹¹⁴.

5.2.2 Analyse spectrofluorimétrique

Comme mentionné plus haut, l'absorption de photon par les molécules, donc leur excitation s'accompagne de désexcitation qui peut être radiative (fluorescence). C'est ce rayonnement de fluorescence envoyé dans toutes les directions qu'on analyse en spectrofluorimétrie.

Cette technique peut être appliquée à des molécules naturellement fluorescentes ou rendues fluorescentes par adjonction d'un réactif (molécules modifiées). On mesure généralement la puissance rayonnée par fluorescence à 90 ° du faisceau incident.

La spectrofluorimétrie permet

- une analyse qualitative car les longueurs d'ondes d'excitation et celles qui sont émises sont caractéristiques des substances étudiées.
- une analyse quantitative car dans certaines conditions l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. Il faut en particulier que la concentration soit très faible¹¹⁵.

Il existe une relation linéaire entre la fluorescence d'un composé et la concentration de celui-ci, pour autant que la source lumineuse possède une intensité constante. Il y a cependant deux limitations à la validité de cette relation.

Ceci n'est valable que pour des solutions faiblement absorbantes. En effet, si tel n'était pas le cas, on observerait une diminution de la fluorescence due à la forte absorption propre à la solution. C'est le processus d'auto-absorption. D'autre part, en présence d'espèces étrangères en concentration appréciable, la molécule fluorescente risque de perdre son énergie sous

¹¹⁴ - Matsushita, Y., Hikida, T., Chem. Phys. Lett. (1998) 290, 349.

¹¹⁵ - Bortolus, P., Monti, S., Adv. Photochem. (1996) 21, 1-133.

forme non radiative, par collisions avec ces espèces. Aussi, l'intensité de la fluorescence diminue. C'est le processus de "quenching" (extinction).

Il existe un grand choix de fluorochromes, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres d'excitation et d'émission¹¹⁶.

5.2.3 Caractéristiques des fluorophores

Les différentes caractéristiques des fluorophores sont :

- Longueurs d'onde : celles qui correspondent aux pics des spectres d'excitation et d'émission.
- Coefficient d'extinction (ou absorption molaire) : il relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution.
- Rendement quantique : efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation (= nombre de photons émis / nombre de photons absorbés).
- Durée de vie à l'état excité : c'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal (psec). Cette durée est assimilable à la demi-vie de l'état excité.
- Photoblanchiment (photobleaching) : lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps.

5.2.4 Caractéristiques de l'émission de fluorescence

5.2.4.1 Déplacement de Stokes

Sur le plan de l'énergie, le chemin que suit l'électron est fermé : passage du niveau $S_0 V_0$ pour le niveau $S_i V_j$ avec i et $j > 0$, retour à l'état $S_1 V_0$ par conversion interne et à partir de cet état il y a émission de photons (fluorescence). Dans ce chemin il n'y a ni perte, ni gain d'énergie par la molécule qui restitue à l'environnement toute l'énergie qui lui a été fournie.

L'apport d'énergie est celui du photon absorbé : $E_1 = hv_1$. L'électron va restituer cet apport d'énergie par les conversions internes et par l'énergie associée au photon de fluorescence. Il s'ensuit que l'énergie E_2 du photon de fluorescence est plus faible que celle du photon initialement absorbé : $E_2 < E_1 \rightarrow \lambda_{\text{fluo}} > \lambda_{\text{abs}}$.

On conclue que la longueur d'onde de fluorescence est supérieure à celle d'absorption. Ce déplacement observé pour la première fois par Stokes en 1852 prit le nom de déplacement de Stokes.

¹¹⁶ - Kim, Y.H., Cho, D.W., Yoon, M., Kim, D., J. Phys. Chem. (1996) 100, 15670.

Lorsque le spectre d'absorption ou/et le spectre d'émission de fluorescence d'un fluorophore présentent plusieurs transitions électroniques, donc plusieurs pics, le déplacement de Stokes correspond à la distance qui sépare les deux pics les plus intenses.

Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par le déplacement de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifique délivré par le fluorophore.

5.2.4.2 Relation entre le spectre d'émission et la longueur d'onde d'excitation

Lorsqu'un fluorophore absorbe de l'énergie lumineuse, on dit qu'il est excité par cette lumière incidente. Au paragraphe précédent, nous avons vu que la fluorescence émane du niveau $S_1 V_0$ quelle que soit l'énergie de la lumière absorbée (lumière excitatrice). Donc, en d'autres termes quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, la forme du spectre de fluorescence ne varie pas généralement.

Si l'allure du spectre de fluorescence est indépendante de la longueur d'onde d'excitation, l'intensité de fluorescence ne l'est pas.

Il est important de souligner que lorsqu'une solution contient deux fluorophores, elle présente en général un spectre de fluorescence qui varie avec la longueur d'onde d'excitation, ce qui n'est pas le cas lorsque nous sommes en présence d'un seul fluorophore.

Voyons maintenant l'effet de l'intensité lumineuse I_0 de la source lumineuse sur le spectre de fluorescence. Nous remarquons que I_F est proportionnelle à I_0 . Ceci signifie que pour un produit fluorescent, une excitation à la même concentration et à la même longueur d'onde mais avec deux sources lumineuses différentes donnera des intensités de fluorescence différentes. Par exemple, il est plus facile d'observer la fluorescence d'un fluorophore en l'excitant avec un laser qu'avec une lampe. L'avantage d'avoir une source lumineuse de forte intensité est la possibilité de travailler à des concentrations et des densités optiques faibles. Il faut toutefois savoir qu'une lumière de forte intensité peut détruire un échantillon photosensible plus facilement qu'une lumière de faible intensité.

Tous les spectres de fluorescence d'un fluorophore quelconque enregistrés dans un domaine donné en utilisant différentes longueurs d'excitation présentent le même pic (le même maximum d'émission) quelle que soit la longueur d'onde d'excitation.

5.2.4.3 Spectre d'excitation de fluorescence

Nous pouvons obtenir le spectre d'excitation de fluorescence en fixant la longueur d'onde d'émission et en faisant défiler les longueurs d'onde d'excitation. Le spectre obtenu est en principe identique au spectre d'absorption du fluorophore étudié. L'avantage du spectre d'absorption sur le spectre d'émission est la possibilité de travailler à de faibles concentrations.

La comparaison des spectres d'absorption et d'excitation permet entre autres de savoir si le fluorophore est pur. La présence d'impuretés provoque une modification dans le spectre d'excitation plus facilement détectable que dans le spectre d'absorption.

5.2.4.4 Relation fluorescence et diffusion de lumière

Lorsque les photons entrent en collision avec les électrons des molécules, certains sont absorbés induisant le passage des électrons de l'état fondamental vers l'état excité tandis que d'autres sont diffusés. Il existe deux sortes de diffusion lumineuse : Rayleigh et Raman.

La diffusion Rayleigh a lieu lorsque les photons diffusés par les électrons possèdent la même énergie que les photons qui entrent en collision avec les électrons. Qui dit énergies égales dit longueurs d'onde identiques. Donc, la diffusion Rayleigh est observée à la longueur d'onde d'excitation. Cette diffusion est caractérisée par un spectre dont le maximum est égal à la longueur d'onde d'excitation.

La diffusion Raman est observée à une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde d'excitation. Les photons en question possèdent une énergie inférieure à celle du spectre Rayleigh. Le spectre Rayleigh s'enregistre avant le spectre de fluorescence sans le perturber, particulièrement si le spectre de fluorescence est important. Le spectre de fluorescence est le plus souvent enregistré à partir d'une longueur d'onde où le spectre Rayleigh n'est plus observable ou lorsqu'il est à sa fin. Le spectre Raman lui se trouve dans la région du spectre de fluorescence. Il perturbe le spectre de fluorescence et cette perturbation est d'autant plus importante que l'intensité du spectre de fluorescence est faible.

En milieu aqueux, les liaisons O-H sont responsables du spectre Raman. La position du pic Raman dépendra de la longueur d'onde d'excitation. Il est possible de calculer la position du pic Raman en milieu aqueux grâce à la formule suivante :

$$1/\lambda_{\text{ram}} = 1/\lambda_{\text{ex}} - 0,00034 \quad (2)$$

4.2.5 Spectrométrie de fluorescence

La technique de spectrofluorimétrie ou spectrométrie de fluorescence permet la mesure et l'étude des spectres de fluorescence.

Le principe de cette méthode repose sur le fait que de nombreux composés organiques et inorganiques, en solution ou solide, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Ce phénomène appelé fluorescence permet de caractériser la substance analysée, puisque l'intensité maximale de fluorescence correspond à un couple particulier de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En fluorimétrie, le seuil de détection d'un composé fluorescent en solution est souvent 1000 fois plus faible qu'en absorption UV/visible (colorimétrie). Cette technique est donc très sensible et permet de travailler à de très faibles concentrations. Par rapport à la fluorimétrie, qui permet de doser une substance fluorescente pour une longueur d'onde donnée, la

spectrofluorimétrie fournit les moyens d'identifier l'ensemble des substances en solution. L'analyse de l'échantillon s'effectue en balayant simultanément une large plage de longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ce qui permet la quantification de chaque composé¹¹⁷.

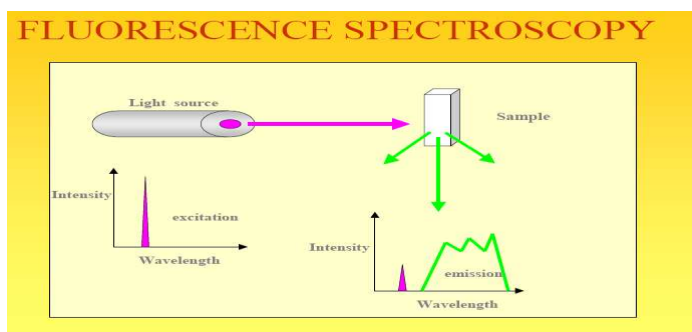


Schéma 2 : Spectrofluorimétrie¹¹⁸.

¹¹⁷ - Guilbault, G.G, Pratical fluorescence, Theory, Methods and Techniques. Marcel Dekker (eds), New York (1973).

¹¹⁸ - The science of spectroscopy: [Http: //www.scienceofspectroscopy.info](http://www.scienceofspectroscopy.info).

Deuxième partie

Résultats et discussion

Deuxième partie

Résultats et discussion

Nous avons envisagé la préparation d'une série de complexes de β -CD-N-(2-chloroéthyl), N-nitrosurées.

La méthodologie suivie consiste à synthétiser les CENU, les caractériser et par la suite les complexer par la β -cyclodextrine. La complexation a été étudiée par spectrofluorimétrie.

Les produits de synthèse et les produits finaux sont caractérisés par leurs R_f , leurs P_f , leurs spectres infrarouge, leurs spectres de RMN du proton et leurs spectres de masse en mode électrospray ionisation (ESI-MS).

1 Synthèse des 2-chloroéthylurées

Le choix des amines utilisées pour la synthèse des urées s'est porté sur des amines aromatiques primaires et secondaires.

Pour les amines aromatiques primaires, nous avons choisi des amines substituées en ortho.

Nous avons prévu, l'étude de l'effet de la nature du substituant sur le noyau aromatique, sur l'orientation de la nitrosation, et sur la stabilité des complexes d'inclusion formés entre les CENU obtenues et la β -CD.

L'obtention de l'urée par condensation de l'amine avec l'isocyanate de 2-chloroéthyle, a lieu par attaque nucléophile de l'azote de l'amine, l'azote par son caractère nucléophile est porté à se lier, sur le carbone déficitaire du C=O, ce carbone participant à une structure non saturée en électron, le mécanisme global de cette addition nucléophile est le suivant:

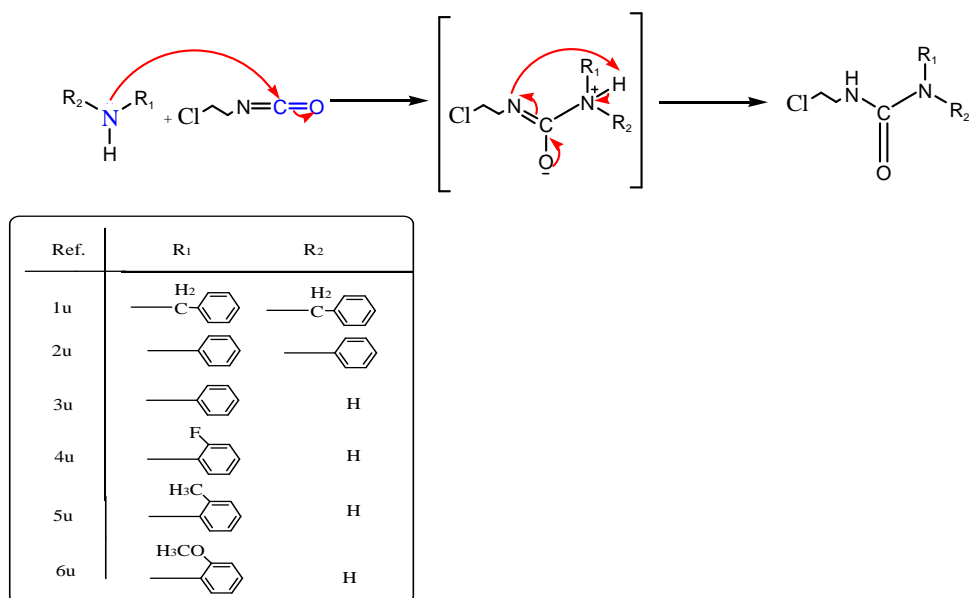


Schéma 3: Schéma réactionnel d'obtention des urées.

1.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les urées 1u-6u ont été isolées sous forme de poudre blanche. Elles sont solubles dans l'acétone. Révélées à la ninhydrine. L'éluant employé est le mélange dichlorométhane-méthanol 95:5.

1.2 Caractéristiques spectroscopiques

En IR, les bandes caractéristiques au groupement N-H, apparaissent entre 3400 et 3300 cm^{-1} . L'absorption du carbonyle apparaît à 1640-1680 cm^{-1} .

En RMN du proton en plus des pics attribués aux noyaux aromatiques entre 6.90-8.50 ppm, les urées sont identifiées par les triplets attribués aux CH_2Cl entre 3.60-3.95 ppm et les quadruplets des CH_2N entre 3.40-3.78 ppm. Les urées sont également caractérisées d'une part par les triplets attribués aux NH éthyléniques entre 4.90- 6.50 ppm et d'autres parts par les NH sous forme de singulet entre 6.95-9.46 ppm pour 3u-6u (celles issues des amines primaires).

En SM, les spectres de masse obtenus par la méthode d'ionisation par pulvérisation (electrospray ionisation (**ESI**)) de 10 à 30 volts, donnent des spectrogrammes avec des pics moléculaires qui correspondent parfaitement aux masses moléculaires des structures **1u-6u** proposées.

A titre indicatif, les figures 26 et 27, montrent respectivement le spectre RMN du proton de 1u et son spectre de masse.

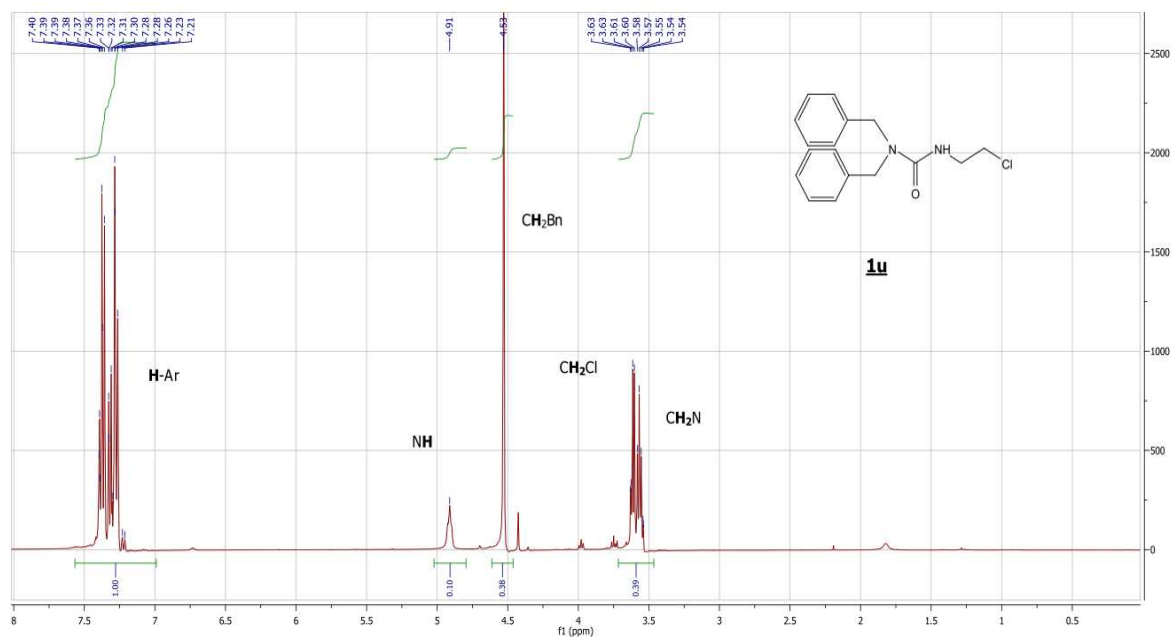


Figure 26 : Spectre RMN du proton à 400MHz de 1u.

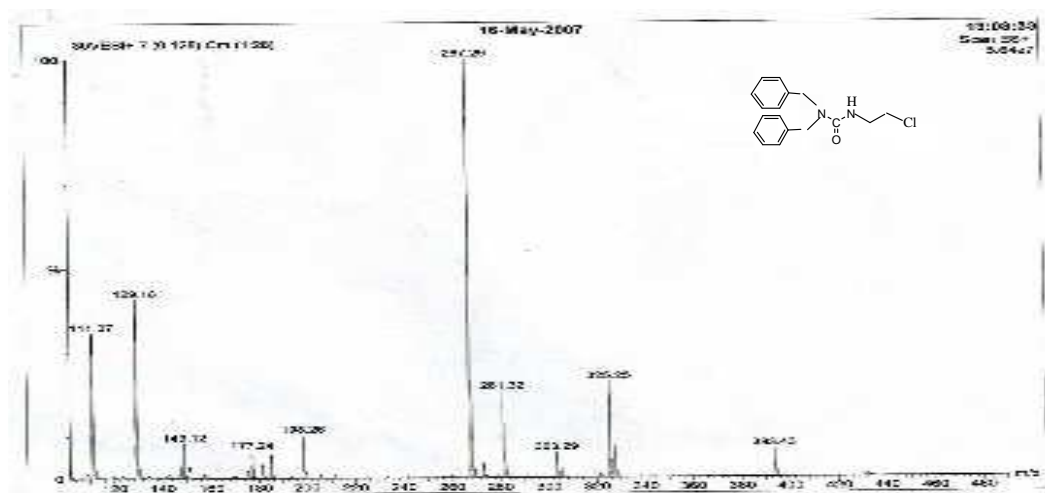


Figure 27 : Spectre de masse en ESI de 1u à 30v.

Nous donnons ci-dessous (tableau 3) les caractéristiques physico-chimiques et spectrales des différentes urées synthétisées sous forme de tableau:

Tableau 3: Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des urées synthétisées.

Composé	Pf (°C)	Rf (*)	IR (KBr, ν cm ⁻¹)		RMN ¹ H (CDCl ₃ , δ en ppm)	SM
			C=O	N-H		
1u C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O M=302,5 g/mol	98-100	0.55	1680	3380	4.90 (t,1H, NH); 3.61(t, 2H,CH ₂ Cl); 3.56 (q,2H,CH ₂ N)	[M+Na] ⁺ = 325.25; [M+H] ⁺ = 303.29
2u C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O M = 274,5 g/mol	72-74	0.55	1675	3300	4.95(t,1H, NH); 3.60(t,2H,Cl-CH ₂); 3.45 (q,2H, N-CH ₂)	[M+Na] ⁺ = 297.65; [M+H] ⁺ = 275.72
3u C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O M = 198,5 g/mol	136-138	0.47	1640	3400	6.95 (s,1H, ArNH); 5.05(t,1H, NHCH ₂); 3.68(t, 2H,Cl-CH ₂); 3.40 (q,2H,N-CH ₂)	[M+Na] ⁺ = 221.32; [M+H] ⁺ = 199.42
4u C ₉ H ₁₀ ClN ₂ OF M = 216,5 g/mol	138-140	0.43	1650	3380	9.50(s,1H,NHPh); 6.43(t,1H, NHCH ₂); 3.85(t, 2H,CH ₂ Cl); 3.65 (q,2H,CH ₂ N)	[M+Na] ⁺ = 239.01; [M+H] ⁺ = 217.11
5u C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O M = 212,5 g/mol	159-161	0.45	1680	3300	9.42(s,1H,NHPh); 6.33(t,1H, NHCH ₂); 3.88 (t, 2H,CH ₂ Cl); 3.42 (q,2H,CH ₂ N)	[M+Na] ⁺ = 235.16; [M+H] ⁺ = 213.36
6u C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂ M = 228,5 g/mol	126-128	0.50	1650	3380	9.46(s,1H,NHPh); 6.50(t, 1H,NHCH ₂); 3.95 (t,2H,CH ₂ Cl); 3.78(q,2H,CH ₂ N)	[M+Na] ⁺ = 251.98

(*)Eluant: Dichlorométhane / Méthanol (95/5)

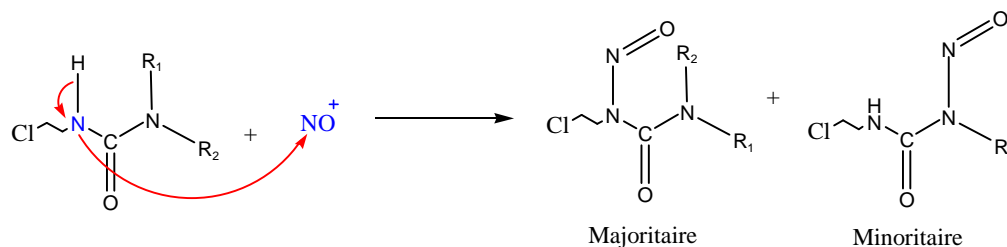
1u \equiv N-(2-chloroéthyl) N', N'-dibenzylurée**2u** \equiv N-(2-chloroéthyl) N',N'-diphénylurée**3u** \equiv N-(2-chloroéthyl) N'-phénylurée**4u** \equiv N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée**5u** \equiv N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée**6u** \equiv N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée

2 Synthèse des 2-chloroéthyl nitrosourées

La nitrosation a été réalisée par addition de nitrite de sodium sur une solution de l'urée, dans l'acide formique, à 0°C.

La méthode « a » présente l'avantage d'une mise en œuvre simple; les rendements sont améliorés dans le cas de la méthode « b ».

C'est une substitution électrophile d'un hydrogène par un groupement nitroso (NO), selon le mécanisme suivant :



Ref.	R ₁	R ₂
1n		
2n		
3n		H
4n		H
5n		H
6n		H

Schéma 4 : Schéma réactionnel d'obtention des nitrosourées.

La génération de l'ion nitrosonium, a lieu selon le schéma suivant :

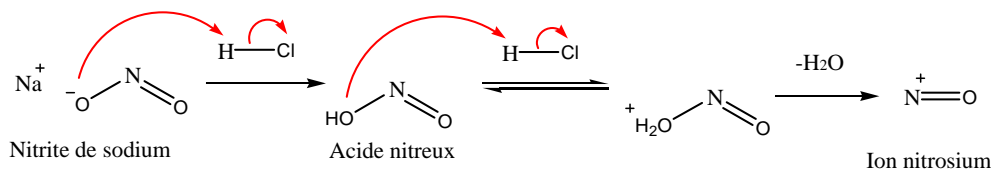


Schéma 5 : Génération de l'ion nitrosonium.

La nitrosation des urées (3u-6u) par le nitrite de sodium n'est pas régiospécifique, elle aboutit à la formation de deux composés mononitrosés, révélés par CCM, séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice, dont la structure est confirmée par spectroscopie de RMN. L'ambiguïté du site de nitrosation peut être levée par l'étude du spectre de RMN de la nitrosourée.

2.1 Propriétés physico-chimiques et spectrales

Les nitrosourées obtenues, sont moins polaires que leurs précurseurs, présentant de bons chromophores en UV, elles sont également révélées à la ninhydrine.

Elles sont isolées après purification sur colonne de gel de silice, sous forme de solides jaune, dont les points de fusion sont plus bas que leurs précurseurs. Ces produits nitrosés sont instables et se décomposent en solution.

En IR, les CENU sont caractérisées par une bande de vibration $\nu_{\text{N=O}}$ à 1470-1485 cm^{-1} .

En SM, les spectres de masse obtenus par la méthode d'ionisation par pulvérisation (electrospray ionisation (**ESI**)) de 10 à 30 volts donnent des spectrogrammes avec des pics moléculaires qui correspondent à $[\text{M-NO+H}]$ pour tous les composés (1n-6n), ceci peut être expliqué par la fragilité de la NNO en SM. Notons que le même phénomène a été relevé dans le cas de leurs séries homologues (CENS)^{119,120,121}.

En RMN du proton, la nitrosation entraîne une modification de certains signaux visibles dans le spectre RMN de proton de l'urée. Elle se traduit par la disparition du proton échangeable et l'apparition d'un système A_2X_2 à 3.10-3.75 ppm pour le triplet des (CH_2Cl) et à 3.65-4.32 ppm pour les triplets des (CH_2NNO). Pour les dérivés nitrosés, les CH_2N seront plus déblindés que les CH_2Cl . Ce comportement est bien vérifié dans la littérature.

Il est à noter que les CH_2Cl (triplet) qui étaient moins blindés que les CH_2N (quadruplet) dans leurs précurseurs respectifs sont devenus plus blindés dans les composés nitrosés.

A titre indicatif, les figures (28, 29 et 30) suivantes, montrent respectivement les spectres RMN ^1H de 1n et 6n et le spectre de masse de 6n.

¹¹⁹- Abdaoui, M., Dewynter, G., Aouf, N., Favre, G., Morere, A., Montero, JL, Bioorg. Med. Chem. (1996) 4, 1227.

- Abdaoui, M., Dewynter, G., Montero, J.-L., Tetrahedron Lett. (1996) 37, 5695.

- Abdaoui, M., Dewynter, G., Aouf, N., Montero, J.-L., Phosphorus, Sulfur, Silicon. (1996) 118, 39.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Regainia, Z., Montero, J.-L., Tetrahedron. (1996) 52, 14217.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Toupet, L., Montero, J.-L., Tetrahedron Lett. (1997) 38, 8691.

- Dewynter, G., Abdaoui, M., Toupet, L., Montero, J.-L., Tetrahedron. (2000) 56, 2427-2435.

- Seridi, A., Kadri, M., Abdaoui, M., Winum, JY. and Montero, JL, Bioorg. & Med. Chem. Lett. (2006) 16, 1021.

- Seridi, A., Kadri, M., Abdaoui, M., Winum, JY and Montero, JL, Arch. Pharm. Chem. Life Sci. (2006) 339, 521

¹²⁰- Kadri, M., Dhaoui, N., Abdaoui, M., Winum, JY. and Montero, J. L., Eur. J. of Med. Chem. (2004) 39, 79.

¹²¹ - Thèse Nedjoudia Cheghib, Université de Guelma, 2004.

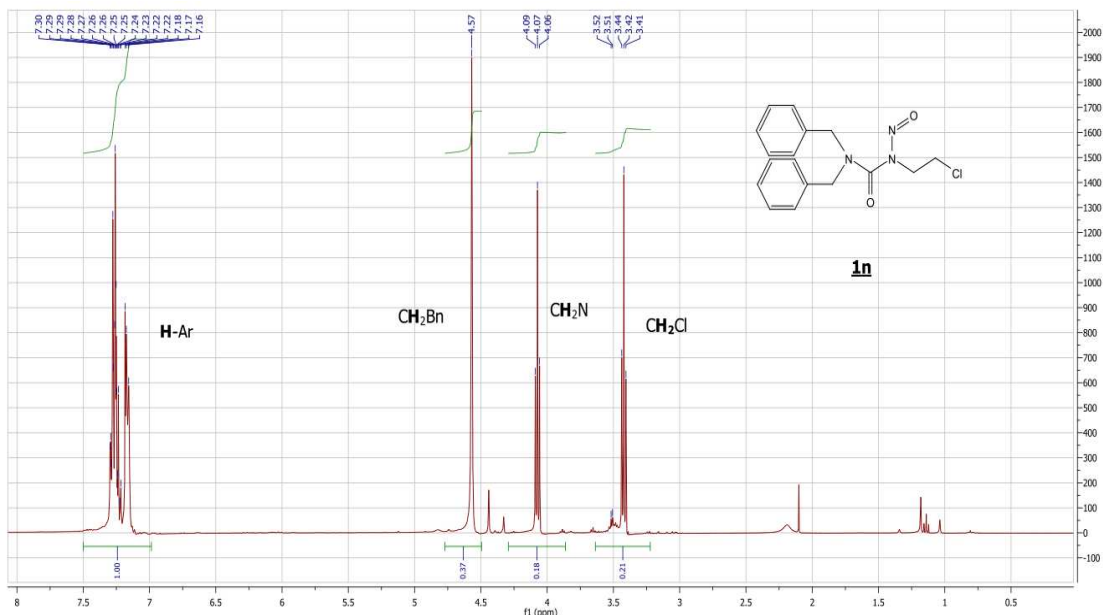


Figure 28 : Spectre RMN de proton de 1n à 400 MHz.

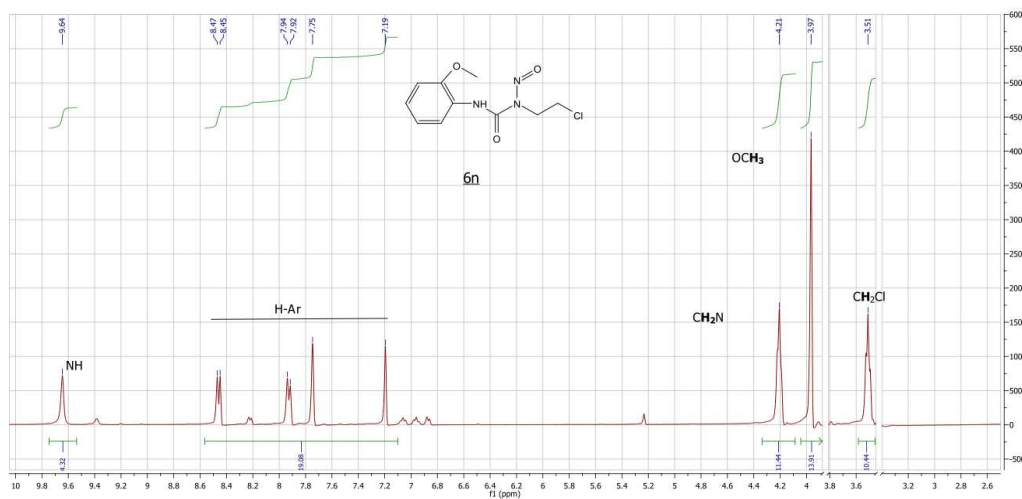


Figure 29 : Spectre RMN de proton de 6n à 400 MHz.

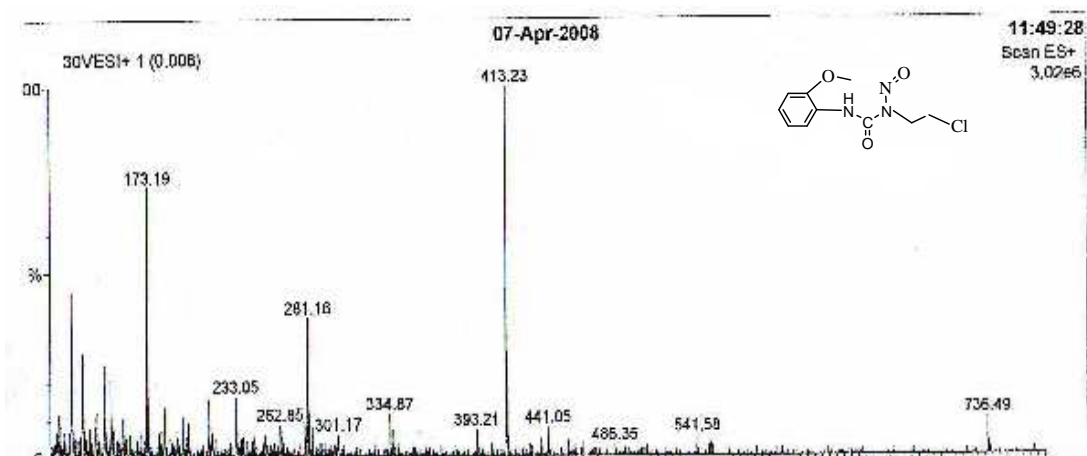


Figure 30 : Spectre de masse en ESI de 6n à 30v.

Le tableau (4) suivant regroupe les caractéristiques physico-chimiques et spectrales des 2-chloroéthylnitrosourées obtenues :

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des 2-chloroéthylnitrosourées.

Composé	Pf (°C)	Rf (*)	IR (KBr, ν Cm ⁻¹		RMN ¹ H (CDCl ₃ , δ en ppm)	SM
			C=O	N=O		
1n C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ M = 331,5 g/mol	74-76	0.87	1680	1480	4.06(t,2H,NCH ₂); 3.40(t,2H,Cl-CH ₂)	[M-NO+Na+H] ⁺ = 325.25; [M-NO+H] ⁺ = 302.29
2n C ₁₅ H ₁₄ ClN ₃ O ₂ M = 303,5 g/mol	48-50	0.89	1680	1470	4.00 (t,2H,N-CH ₂); 3.15 (t,2H,Cl-CH ₂)	[M-NO] ⁺ = 273.14
3n C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O ₂ M = 227,5 g/mol	94-96	0.80	1680	1480	3.65(t, 2H,NCH ₂); 3.10(t,2H, Cl-CH ₂)	[M-NO] ⁺ = 197.24
4n C ₉ H ₉ ClN ₃ O ₂ F M = 245,5 g/mol	56-58	0.73	1675	1480	4.20(t,2H,CH ₂ N); 3.68(t,2H, CH ₂ Cl)	[M-NO+Na+H] ⁺ = 239.01
5n C ₁₀ H ₁₂ ClN ₃ O ₂ M= 241,5 g/mol	104- 106	0.72	1670	1485	4.32 (t,2H,CH ₂ N); 3.75 (t, 2H,CH ₂ Cl)	[M-NO+Na+H] ⁺ = 235,22
6n C ₁₀ H ₁₂ ClN ₃ O ₃ M = 257,5 g/mol	182- 184	0.82	1670	1485	4.21(t,2H,CH ₂ N); 3.51(t,2H, CH ₂ Cl)	[M-NO-H] ⁺ =226.95; [M+Na+H] ⁺ = 281.16

(*) Eluant Dichlorométhane.

1n ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-dibenzylurée**2n** ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-diphénylurée**3n** ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(phényl) urée**4n** ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée**5n** ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée**6n** ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée

2.2 Discussion des résultats obtenus

Comme mentionné plus haut, à la fin de la réaction la CCM révèle une nitrosation parasite, qui aurait pu être non négligeable pour certaines urées, suivant l'encombrement stérique d'une part et les effets électroniques d'autre part, si on n'avait pas eu recours au contrôle cinétique des réactions de nitrosation, ce qui nous a permis d'obtenir l'isomère le plus polaire en quantité majoritaire.

Le mécanisme généralement admis pour une nitrosation d'urée 1-3 disubstituée consiste en une attaque électrophile due à l'ion nitrosonium NO^+ sur un site N-H secondaire. Dans ce type de composés les influences électroniques et stériques orientent la substitution sur l'un ou l'autre des atomes d'azote.

Dans certains cas, la double nitrosation n'a jamais été observée : ceci peut être expliqué par le fait que l'introduction du groupe nitroso empêche vraisemblablement la disponibilité de l'hydrogène de l'autre groupement NH. Outre des considérations d'ordre stérique, l'indisponibilité de cet atome d'hydrogène pourrait être due à l'existence d'une liaison intramoléculaire entre l'oxygène du groupement nitroso et l'hydrogène de l'atome d'azote voisin¹²² (figure 31).

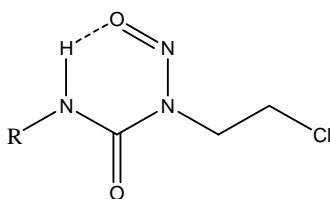


Figure 31 : Liaison hydrogène au niveau des nitrosourées.

Cette chélation provoque une diminution des interactions intermoléculaires qui existent dans les urées.

La plupart des réactifs utilisés pour nitroser les urées, tels que le nitrite de sodium en milieu acide, le chlorure de nitrosyle, l'anhydride nitreux, le tétraoxyde d'azote, le tétrafluoroborate de nitrosyle et le sulfate acide de nitrosyle, entraînent des nitrosations parasites dont l'importance varie suivant l'encombrement stérique¹²³ d'une part et les effets électroniques d'autre part.

Ainsi, au cours de la nitrosation d'une 2-chloroéthylurée d'amine primaire, deux positions de l'urée sont susceptibles de réagir : la position 3' qui donne le composé (n), et la position 1' qui conduit au composé (n').

¹²²- Synder, J. K. et Stock, L. M., J. Org. Chem. (1980) 45, 886.

¹²³- Montgomery, J. A., Thomas, H. J., Brockman, R. W. et Wheeler, G. P., J. Med. Chem., (1981) 24, 184.

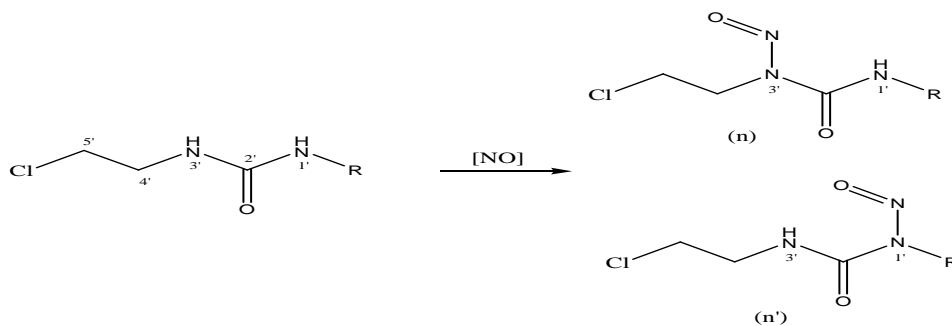


Figure 32 : Positions susceptibles de réagir lors d'une nitrosation.

Seul le composé (n) présente un intérêt thérapeutique : il est susceptible de donner l'ion vinyl carbonium aux propriétés alkylantes. Par contre dans le composé (n'), qui résulte d'une nitrosation parasite, la formation de l'ion vinyl carbonium est impossible et les propriétés oncostatiques disparaissent.

Johnston et coll.^{124, 125} ont constaté l'existence de nitrosation en 1', dans le cas des N-(2-chloroéthyl) urées substituées par un groupement aromatique ou alicyclique. L'influence des conditions expérimentales est importante dans la limitation de la réaction parasite ; en effet ces auteurs ont obtenu en proportion non négligeable un composé nitrosé en 1' en utilisant de l'acide formique à 85 % et une solution aqueuse de nitrite de sodium. Par contre en utilisant l'acide formique pur (98-100 %) et du nitrite de sodium anhydre, ces auteurs obtiennent une nitrosation spécifique en 3'⁴.

Il est difficile de prédire la position de nitrosation dans le cas où les groupes sont des amines aromatiques, ceci est complexe car des effets stériques et électroniques coexistent.

Dans notre cas, pour les deux premières réactions de nitrosation, une seule position de chaque urée (position 3') est disponible pour réagir, ce qui donne, par conséquent le composé présentant un intérêt thérapeutique.

D'autre part, et à titre d'exemple, le doublet non liant de l'atome d'azote de [l'aniline](#) est engagé dans la résonance avec le cycle aromatique.

Le -H, -F, -CH₃ et -OCH₃ sont tous des substituants en position ortho du noyau aromatique, ils activent le cycle, ce qui rend le doublet de l'azote encore moins disponible, cependant, ceci est insuffisant, parce qu'en plus des influences électroniques et stériques qui orientent la substitution sur l'un ou l'autre des atomes d'azote, l'influence des conditions expérimentales est importante dans la limitation de la nitrosation parasite.

¹²⁴ - Johnston, T. P., Mc Caleb, G. S., Opliger, P. S. et Montgomery, J. A., Med. Chem., (1966) 9, 892.

¹²⁵ - Johnston, T.P, Mc Caleb, G.S, Opliger, P.S., Laster, W.R. et Montgomery, JA, J. med. Chem., (1971) 14, 600.

3 Etude en solution des complexes d'inclusion β -CD-CENU

Cette étude comprend la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion, la détermination de leurs stœchiométries et de leurs constantes de stabilité, en plus de l'étude de l'effet du solvant.

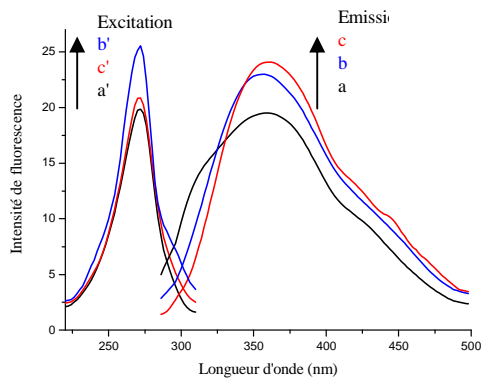
3.1 Mise en évidence de la formation des complexes β -CD-CENU

La complexation en solution a été suivie par spectrofluorimétrie, à température ambiante, dans l'acétonitrile. L'acétonitrile n'entrant pas en compétition avec le soluté pour la cavité hydrophobe de la β -CD, en raison de sa grande polarité ($\epsilon = 36.2$, 25°C).

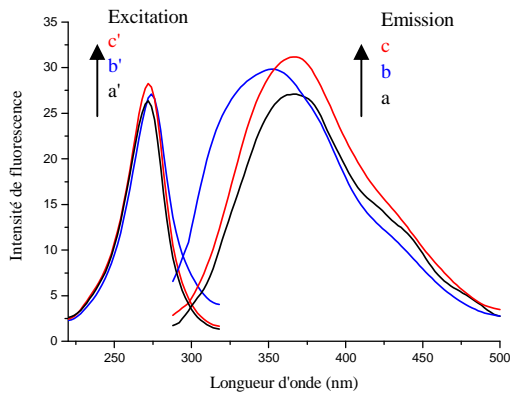
Les CENU utilisées sont : 1n, 2n, 3n, 4n, 5n et 6n. Leurs complexes correspondants sont désignés respectivement par 1c, 2c, 3c, 4c, 5c et 6c.

La technique utilisée pour mettre en évidence la formation des complexes, consiste à comparer les spectres de fluorescence de la β -CD et des CENU avec les spectres de leurs complexes correspondants dans les mêmes conditions, de ce fait de suivre les changements spectraux subis par les fluorophores, suite à la perturbation du milieu environnant (suite à l'inclusion) : la formation d'un complexe est accompagnée par une perturbation spectrale.

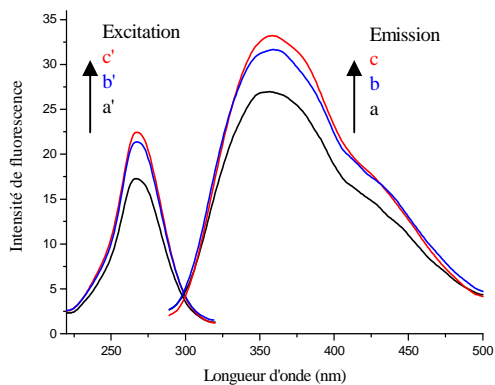
La figure 33 représente les spectres, enregistrés à température ambiante, d'excitation et d'émission de fluorescence des solutions des CENU à $1.00 \times 10^{-5} \text{ M}$, de la β -CD à $1.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ et de leurs mélanges à $1.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ dans l'acétonitrile.



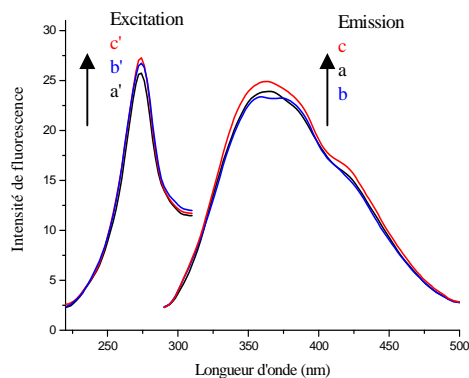
1: Complexe 1c



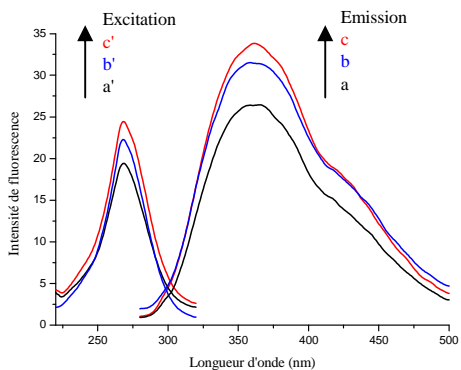
2: Complexe 2c



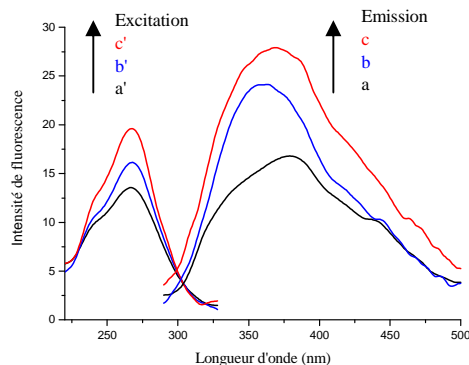
3: Complexe 3c



4: Complexe 4c



5: Complexe 5c



6: Complexe 6c

Figure 33: Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion.

a': spectre d'excitation de la CENU; a: spectre d'émission de fluorescence de la CENU

b': spectre d'excitation de la β -CD; b: spectre d'émission de fluorescence de la β -CD

c': spectre d'excitation du mélange; c: spectre d'émission de fluorescence du mélange.

De nouvelles bandes d'émission se forment avec des maximums différents. L'intensité et la forme des bandes diffèrent de celles des produits de départ. La bande du mélange est légèrement déplacée vers les courtes longueurs d'onde, et un effet hypsochrome est observé,

avec des intensités de fluorescence plus grandes ce qui indique la formation d'une nouvelle espèce.

La présence du phénomène d'inclusion est démontrée sans ambiguïté par la comparaison des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la β -cyclodextrine et des chloroéthylnitrosourées seules avec celui de leurs mélanges. En effet, les molécules hôte et invitée donnent chacune des signaux discernables pour les formes libres et complexées.

Le groupement nitrosourée des CENU est un chromophore parfaitement approprié à la mesure spectrophotométrique.

Les différences entre les spectres sont liées à l'inclusion d'une molécule à l'intérieur de la cavité de la β -CD, formant une nouvelle entité de propriétés spectrales différentes. En effet, la molécule invitée entraîne des modifications de l'environnement de son hôte, et la β -CD de son côté augmente la fluorescence de son invitée après inclusion, lesquelles se traduisent par des variations de l'émission et par suite du spectre d'émission.

La superposition des spectres de fluorescence de la β -CD, des CENU (1n-6n) et des complexes (1c-6c) montre dans chaque cas un effet hypsochrome, (de 2 à 11 nm) caractéristique de la formation d'une nouvelle espèce.¹²⁶

En conclusion, la formation des complexes entre les CENU et la β -CD est mise en évidence par la différence entre les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des deux composés de départ et celui du complexe : il y a apparition d'une nouvelle bande caractéristique dont le maximum et l'intensité sont différents de ceux des réactifs. Un déplacement hypsochrome est visible dans les spectres des complexes.

Après la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion, il convient de déterminer leurs stœchiométries.

¹²⁶ -Cramer, F., Saenger, W., Spatz, H.C., J. Am. Chem. Soc., (1967) 89,14.
- Ikeda, K., Uekama, K., Otagiri, M., Chem. Pharm. Bull., (1975) 23, 201.

3.2 Détermination de la stœchiométrie

Les stœchiométries des complexes d'inclusion β -CD-CENU ont été déterminées par deux méthodes : la méthode des variations continues et la méthode des rapports molaires.

3.2.1 Méthode des variations continues (méthode de Job)¹²⁷

Pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion β -CD-CENU, selon la méthode de Job, nous avons procédé comme suit : les mélanges ont été préparés d'après les tableaux rapportés dans la partie expérimentale, où nous avons fait varier la teneur en β -CD, de manière à obtenir une série de solutions, dans lesquelles sa fraction molaire variait entre 0.20 et 0.80, tout en conservant la somme des concentrations des CENU et de la β -CD constante, et nous avons mesuré la fluorescence maximale, due à l'interaction entre ces deux produits.

En portant l'intensité de fluorescence (IF) en fonction du rapport $[\beta\text{-CD}] / ([\beta\text{-CD}] + [\text{CENU}])$ (figure 34), nous obtenons, pour chaque essai, des courbes de forme convexe ayant un IF max qui correspond à la stœchiométrie du complexe obtenue grâce à la valeur de l'abscisse.

De part et d'autre de IF max, la stœchiométrie n'est pas atteinte, et les IF observées correspondent à des rapports $[\beta\text{-CD}] / [\text{CENU}]$ différents : la partie gauche de la courbe correspond à des concentrations en CENU supérieures à celles de la β -CD, tandis que dans la partie droite nous avons plus de β -CD que de CENU.

Les différents spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés à l'aide du spectrofluoromètre à température ambiante, sur des échantillons en solution 1.00×10^{-5} M dans l'acétonitrile.

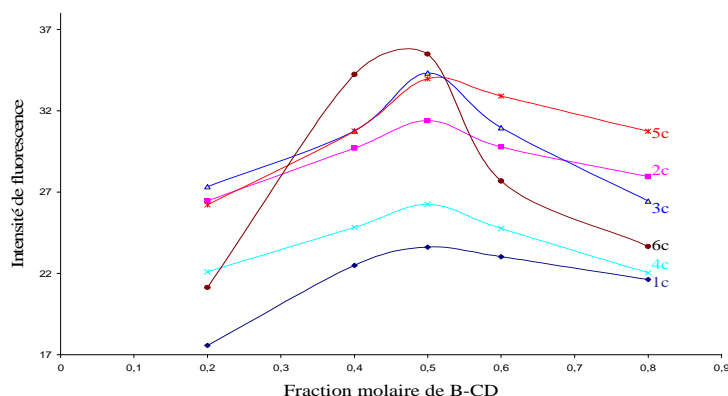


Figure 34 : Détermination de la stœchiométrie des complexes 1c- 6c par la méthode des variations continues.

Le maximum de chaque courbe (figure 34), correspondant au maximum de fluorescence des complexes est atteint pour une fraction molaire de β -CD dans le mélange égale à 0.5, ce qui signifie que la stœchiométrie des complexes d'inclusion étudiés est 1:1.

¹²⁷ - Job, P., Annal. Chim. (1927) 113-203.

Afin de valider les résultats obtenus par la méthode des variations continues lors de la détermination de la stœchiométrie on a utilisé une deuxième méthode, celle des rapports molaires.

3.2.2 Méthode des rapports molaires¹²⁸

Le protocole utilisé ici, pour la détermination de la stœchiométrie, s'appuie sur la méthode des rapports molaires, où l'on exprime l'intensité de fluorescence en fonction du rapport des concentrations de la β -CD et du CENU.

Les différents spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés à température ambiante, sur des échantillons en solution 1.00×10^{-5} M dans l'acétonitrile.

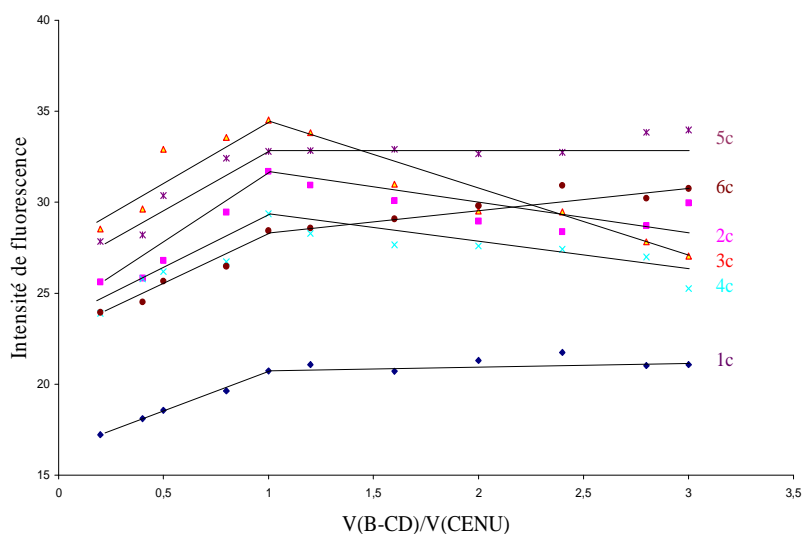


Figure 35 : Détermination de la stœchiométrie des complexes 1c- 6c par la méthode des rapports molaires.

Les résultats expérimentaux obtenus montrent, comme indiqué sur la figure 35, que les courbes $IF = f(V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}})$ présentent une rupture de pente à l'abscisse $V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}} = 1$, ce qui signifie que les complexes d'inclusion formés ont une stœchiométrie 1:1. On ne peut toutefois exclure la possibilité de la formation simultanée de deux stœchiométries 1:1 et d'un mode mineur d'association 2:1, surtout pour le complexe 2c.

¹²⁸ - Connors, K. A., Chem. Rev. (1987) 12, 54-56.

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

Conclusion

Tenant compte des dimensions de la cavité de la β -CD et des CENU étudiées, un complexe d'inclusion de stœchiométrie 1:1 est le plus susceptible d'être formé entre la β -CD et les CENU en question, ceci a été confirmé par la détermination de la stœchiométrie par deux méthodes.

La stœchiométrie des complexes a été étudiée sous les conditions expérimentales établies par les méthodes des rapports molaires et des variations continues. Les deux méthodes ont montré que la composition du complexe était 1:1 (β -CD : CENU). Quand le rapport molaire entre la CENU et la β -CD est 1:1, il y a toujours un point de virage, qui donne une inclusion uniforme entre les CENU et la β -CD, de même pour la méthode de Job où le maximum de fluorescence correspond à une fraction de β -CD égale à 0.5, démontrant la même stœchiométrie.

3.3 Effet de l'ajout de la β -CD sur l'intensité de fluorescence des CENU

Cette étude consiste à faire varier la concentration de la β -CD tout en fixant celle du CENU. La concentration des CENU est fixée à 1.00×10^{-5} M et on fait varier celle de la β -CD (entre 2.00×10^{-5} et 1.00×10^{-4} M).

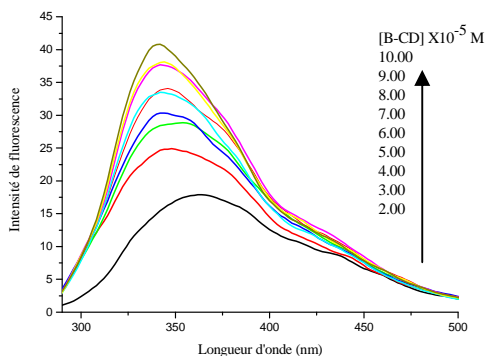
Les différentes valeurs des intensités de fluorescence de chaque complexe sont rassemblées dans le tableau 5 suivant.

Tableau 5 : Variation des intensités de fluorescence en fonction de l'ajout de la β -CD.

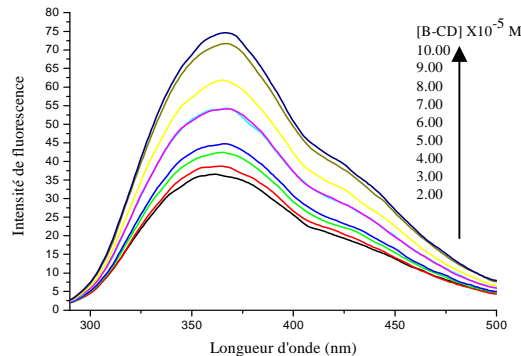
[β-CD] (M)	IF 1c à λ_{EM} : 368 nm	IF 2c à λ_{EM} : 362 nm	IF 3c à λ_{EM} : 360 nm	IF 4c à λ_{EM} : 364 nm	IF 5c à λ_{EM} : 368 nm	IF 6c à λ_{EM} : 369 nm
2.00×10^{-5}	23.51	35.76	30.44	28.68	43.34	21.16
3.00×10^{-5}	23.16	38.84	31.05	29.64	50.23	21.33
4.00×10^{-5}	26.39	42.14	32.81	30.67	52.79	20.96
5.00×10^{-5}	26.36	44.44	33.93	34.14	63.57	21.58
6.00×10^{-5}	28.76	53.88	36.33	36.27	73.08	22.63
7.00×10^{-5}	28.96	53.95	38.40	37.77	82.70	22.48
8.00×10^{-5}	31.46	61.63	42.29	39.02	87.59	24.03
9.00×10^{-5}	32.66	71.12	42.25	40.36	97.34	25.56
1.00×10^{-4}	32.19	73.91	42.80	44.07	102.73	27.39

La figure 36 montre l'évolution des spectres de fluorescence, lors de la détermination des constantes de stabilité des complexes.

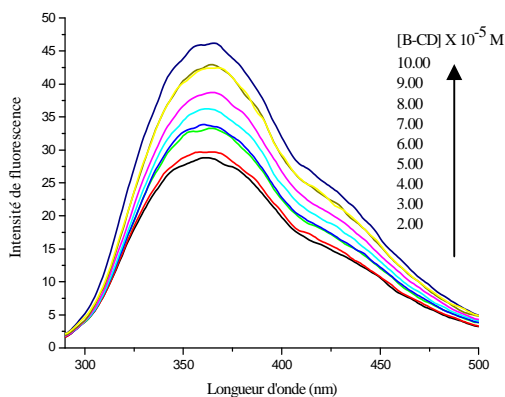
Les différents spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés à température ambiante, sur des échantillons en solution, dans l'acétonitrile.



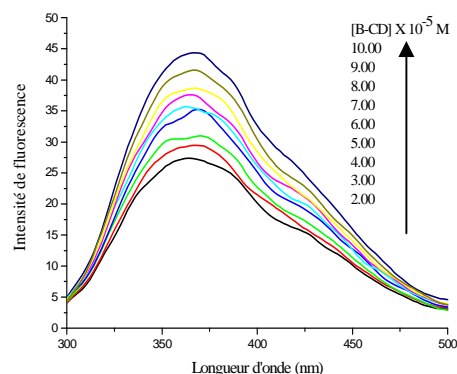
1: Complexe 1c



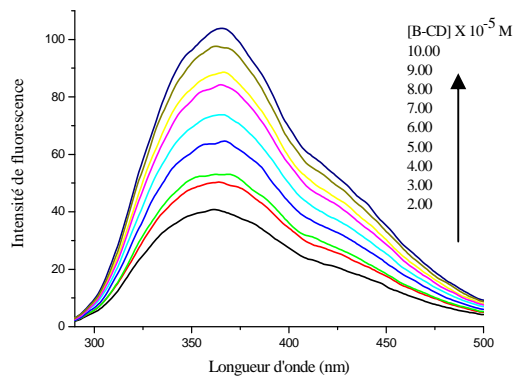
2: Complexe 2c



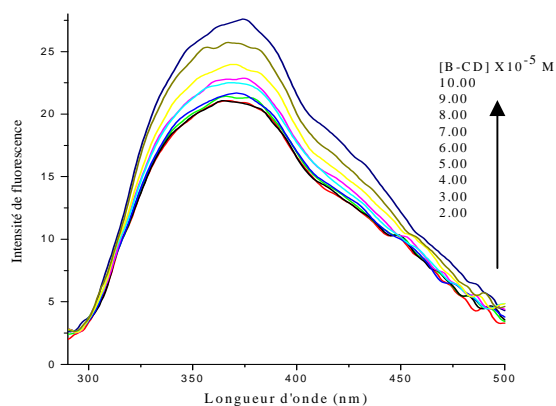
3: Complexe 3c



4: Complexe 4c



5: Complexe 5c



6: Complexe 6c

Figure 36 : Spectres de fluorescence des CENU (1.00×10^{-5} M) dans l'acétonitrile contenant différentes concentrations de β -CD (2.00×10^{-5} à 1.00×10^{-4} M), à température ambiante.

Les figures ci-dessus représentent le suivi de l'émission de fluorescence des CENU dans l'acétonitrile contenant diverses concentrations de β -CD. Elles montrent que, l'intensité de fluorescence émise par les CENU dans l'acétonitrile croît sensiblement quand la β -CD est ajoutée à la solution à des concentrations croissantes avec déplacement de la bande de fluorescence, témoin de l'interaction des CENU avec la cavité relativement non polaire.

Comme la cavité de la β -CD est hydrophobe, l'augmentation de l'intensité de fluorescence des CENU suggère la formation des complexes d'inclusion. La formation du complexe d'inclusion avec la β -CD est indiquée par l'augmentation de la solubilité aqueuse des CENU en présence de β -CD.

Les résultats expérimentaux de fluorescence confirment cette proposition et illustrent que l'augmentation en émission de fluorescence des CENU causée par la β -CD doit être due à la sauvegarde offerte par les cavités hydrophobes des β -CD.

Les effets bathochromes et hypsochromes dans les longueurs d'onde d'émission de fluorescence maximales des CENU étaient intenses en présence de β -CD suggérant que les CENU forment des complexes stables avec la β -CD, ainsi on s'attendait à une grande constante de stabilité du complexe β -CD-CENU.

Conclusion

L'utilisation des solutions de CD et par l'effet de complexation induit l'accroissement de la fluorescence. L'association avec les β -CD est donc une réalité physicochimique à priori exploitable pour les CENU.

Les signaux de fluorescence des CENU se sont intensifiés avec l'augmentation des concentrations de la β -CD. Il est suggéré que des complexes stables sont formés entre les CENU et la β -CD. Les cavités hydrophobes des β -CD fournissent un microenvironnement doux aux CENU, et ainsi, augmentent le rendement du quanta de fluorescence de la molécule invitée.

La constante de formation et la stœchiométrie des complexes sont calculées à partir des données utilisant l'équation modifiée de Benessi-Hildebrand.

3.4 Détermination de la constante de stabilité

La détermination des constantes de complexation repose sur la méthode de Benessi-Hildebrand, qui consiste à faire varier la concentration de la β -CD tout en fixant celle du CENU¹²⁹. La concentration des CENU est fixée à 1.00×10^{-5} M et on fait varier celle de la β -CD (entre 2.00×10^{-5} et 1.00×10^{-4} M).

Etant donné que la β -CD forme des complexes de stœchiométrie 1:1 avec les CENU étudiées, la constante d'association des complexes d'inclusion, désigné par K_1 dans cette étude, est donnée par l'équation suivante¹³⁰:

$$1/(I-I_0) = \{[1/(I_1-I_0)] [1/K_1 [CD]]\} + [1/(I_1 - I_0)] \quad (3)$$

où [CD] représente la concentration analytique de la CD, I_0 et I sont les intensités de fluorescence en absence et en présence de CD, respectivement et I_1 est l'intensité de fluorescence infinie (limite). K_1 est la constante d'association pour un complexe 1:1.

Le tracé $1/(I-I_0) = f(1/[CD])$ selon l'équation (3) doit donner une droite, dont le coefficient $[1/(I_1-I_0)] [1/K_1]$ représente la pente. Par extrapolation à l'origine, on peut déterminer la valeur $1/(I_1-I_0)$ permettant le calcul de K_1 .

Le tracé de Benessi-Hildebrand pour les complexes d'inclusion 2:1 (CD:CENU), peut être représenté par l'équation (4) :

$$1/(I-I_0) = \{[1/(I_1-I_0)] [1/K_2 [CD]^2]\} + [1/(I_1 - I_0)] \quad (4)$$

Qui s'écrit aussi $(I_1-I_0)/(I-I_0) = 1 + [1/K_2 [CD]^2]$

Si le tracé $1/(I-I_0) = f(1/[CD]^2)$ est effectué selon l'équation (4), et si une courbe non-linéaire est obtenue, ceci indique que la stœchiométrie du complexe d'inclusion ne peut en aucun cas être de type **2:1**.

Le traitement des données expérimentales, groupées dans les tableaux 6-11 a permis d'obtenir les graphes représentés sur les figures 37-48.

La cavité de la β -CD est hydrophobe, cette réalité a comme conséquence la réduction de la stabilité du complexe, si l'invité avait une polarité plus grande ou était chargé électriquement, ainsi une molécule invitée neutre serait la plus adéquate pour la cavité de la β -CD.

¹²⁹ - Benessi, H.A., Hildebrand, J. H. J.Am.Chem.Soc., (1949)71, 2703-2707.

¹³⁰ - Connors, K. A., Binding constants, Wiley, New York, 1987.

1. Complexe 1c : 1n-β-CD

Tableau 6 : Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 1c à $\lambda_{EM} = 368$ nm.

Solution	$1/(I-I_0)$	$1/[CD] \text{ (l.mol}^{-1}\text{)}$	$1/[CD]^2 \times 10^8 \text{ (l}^2\text{.mol}^{-2}\text{)}$
1	0.303	50000.00	25.00
2	0.340	33333.33	11.11
3	0.162	25000.00	6.25
4	0.163	20000.00	4.00
5	0.097	16666.67	2.77
6	0.114	14285.71	2.04
7	0.088	12500.00	1.56
8	0.080	11111.11	1.23
9	0.083	10000.00	1.00

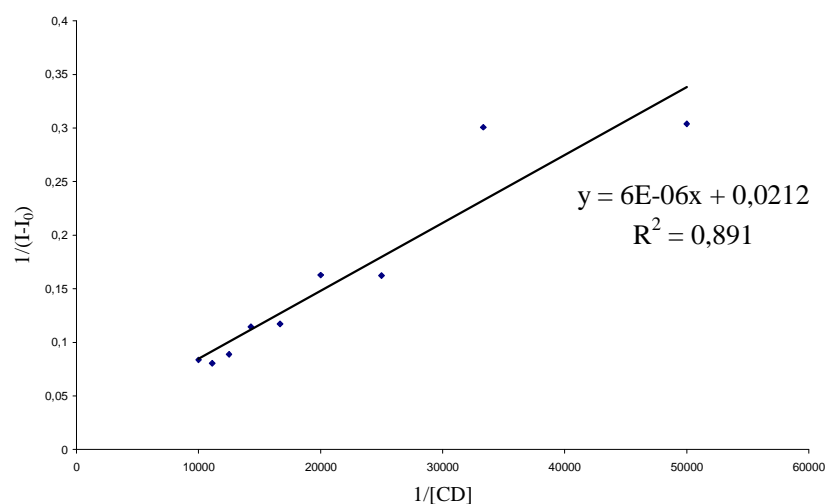


Figure 37 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 1c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm.

La solution graphique du modèle linéaire ci-dessus (Benessi-Hildebrand), est montrée dans la figure 37. Le lissage de la courbe expérimentale obtenu dans ce cas a été effectué sur ordinateur, et a conduit à l'équation de droite de la forme :

$$1/(I-I_0) = 6E-06 \times 1/[CD] + 0.0212 \quad \text{avec } 1/(I-I_0) [1/K_1] = 6E-06$$

d'où $K_1 = 3533.33 \pm 55 \text{ l. mol}^{-1}$ pour le complexe $\beta\text{-CD-1n}$.

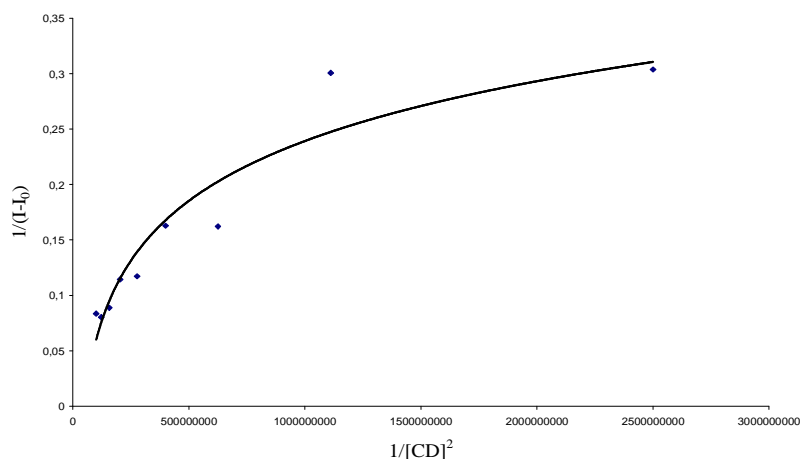


Figure 38 : La courbe de Benesi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 1c à

$$\lambda_{EM} = 368 \text{ nm}, \lambda_{EX} = 274 \text{ nm}.$$

A fin de lever l'ambiguïté sur la présence d'une stœchiométrie 2:1, la courbe de la figure 38 a été tracée. L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 1n et la β -CD est écartée.

2. Complexe 2c : 2n- β -CD

Tableau 7 : Méthode de Benesi-Hildebrand pour le complexe 2c à $\lambda_{EM} = 362 \text{ nm}$.

Solution	$1/(I-I_0)$	$1/[CD] \text{ (l.mol}^{-1}\text{)}$	$1/[CD]^2 \times 10^8 \text{ (l}^2\text{.mol}^{-2}\text{)}$
1	0.103	50000.00	25.00
2	0.078	33333.33	11.11
3	0.062	25000.00	6.25
4	0.054	20000.00	4.00
5	0.036	16666.67	2.77
6	0.035	14285.71	2.04
7	0.028	12500.00	1.56
8	0.022	11111.11	1.23
9	0.020	10000.00	1.00

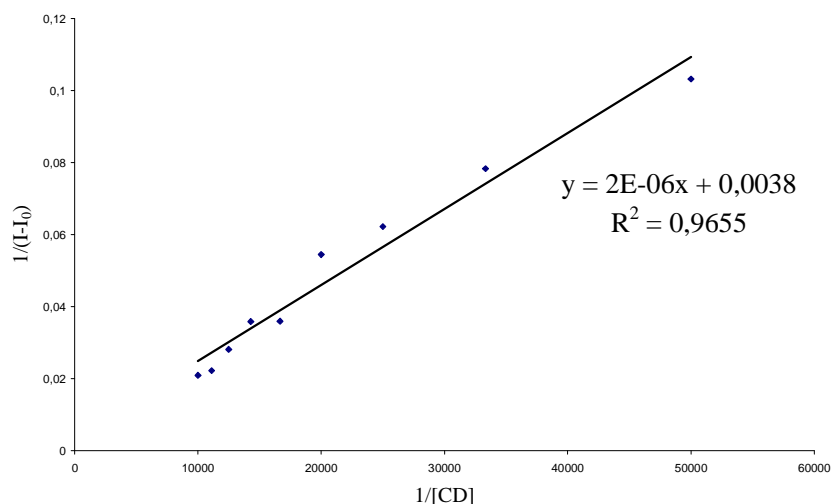


Figure 39 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 2c à $\lambda_{EM} = 362$ nm, $\lambda_{EX} = 272$ nm.

L'équation de droite de la forme :

$$1/(I-I_0) = 2E-06 \times 1/[CD] + 0.0038 \quad \text{avec } 1/(I_1-I_0) [1/K_1] = 2E-06$$

d'où $K_1 = 1900 \pm 40 \text{ l.mol}^{-1}$ pour le complexe $\beta\text{-CD-2n}$.

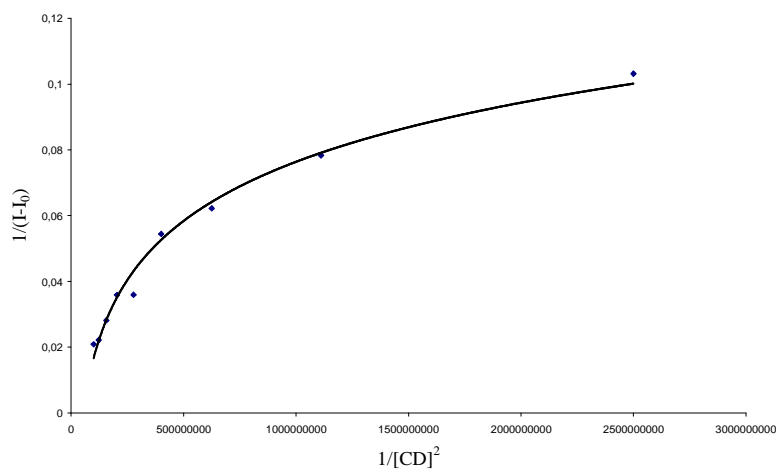


Figure 40 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 2:1 de 2c à $\lambda_{EM} = 362$ nm, $\lambda_{EX} = 272$ nm.

L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 2n et la $\beta\text{-CD}$ est écartée.

3. Complexe 3c : 3n-β-CD

Tableau 8 : Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm.

Solution	1/ (I-I ₀)	1/ [CD] (l.mol ⁻¹)	1/ [CD] ² × 10 ⁸ (l ² .mol ⁻²)
1	0.275	50000.00	25.00
2	0.235	33333.33	11.11
3	0.166	25000.00	6.25
4	0.140	20000.00	4.00
5	0.104	16666.67	2.77
6	0.086	14285.71	2.04
7	0.064	12500.00	1.56
8	0.064	11111.11	1.23
9	0.062	10000.00	1.00

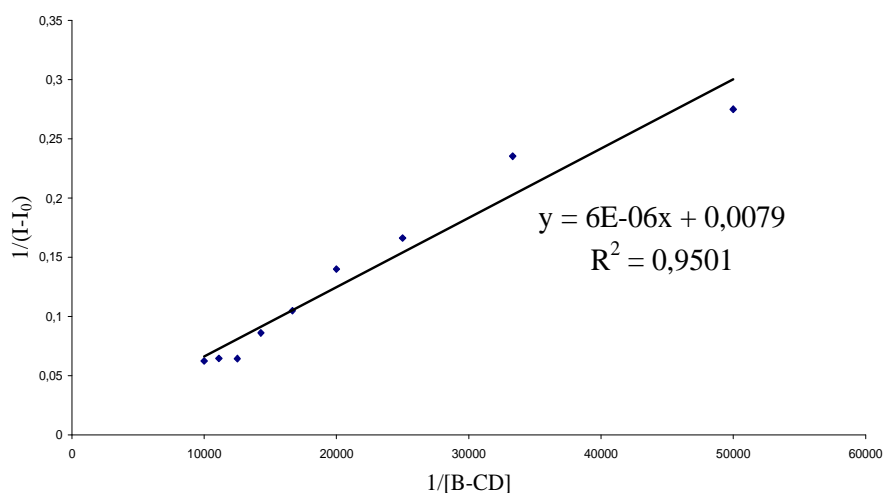


Figure 41 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm, $\lambda_{EX} = 264$ nm.

L'équation de droite de la forme :

$$1/ (I-I_0) = 6E-06 \times 1/ [CD] + 0.0079 \text{ avec } 1/ (I_1-I_0) [1/K_1] = 6E-06$$

d'où $K_1 = 1316.67 \pm 69$ l.mol⁻¹ pour le complexe β-CD-3n.

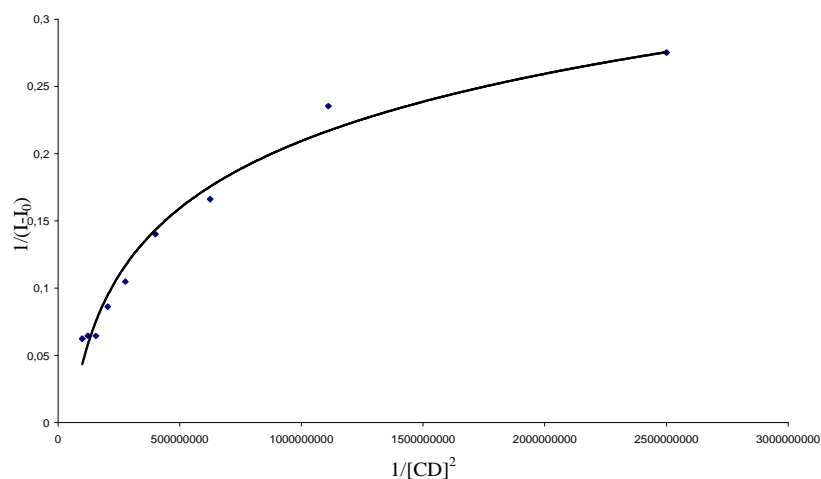


Figure 42 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 3c à $\lambda_{EM} = 360$ nm, $\lambda_{EX} = 264$ nm.

L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 3n et la β -CD est écartée.

4. Complexe 4c : 4n- β -CD

Tableau 9 : Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm.

Solution	$1/(I-I_0)$	$1/[CD]$ ($l.mol^{-1}$)	$1/[CD]^2 \times 10^8$ ($l^2.mol^{-2}$)
1	0.276	50000.00	25.00
2	0.208	33333.33	11.11
3	0.178	25000.00	6.25
4	0.110	20000.00	4.00
5	0.089	16666.67	2.77
6	0.078	14285.71	2.04
7	0.071	12500.00	1.56
8	0.065	11111.11	1.23
9	0.062	10000.00	1.00

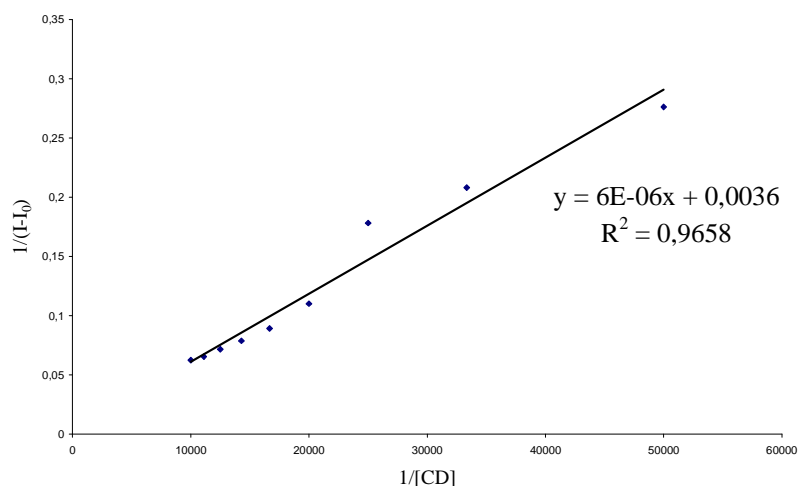


Figure 43 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm.

L'équation de droite de la forme :

$$1/(I-I_0) = 6E-06 \times 1/[CD] + 0.0036 \quad \text{avec } 1/(I_1-I_0) [1/K_1] = 6E-06$$

d'où $K_1 = 600 \pm 65 \text{ l.mol}^{-1}$ pour le complexe $\beta\text{-CD-4n}$.

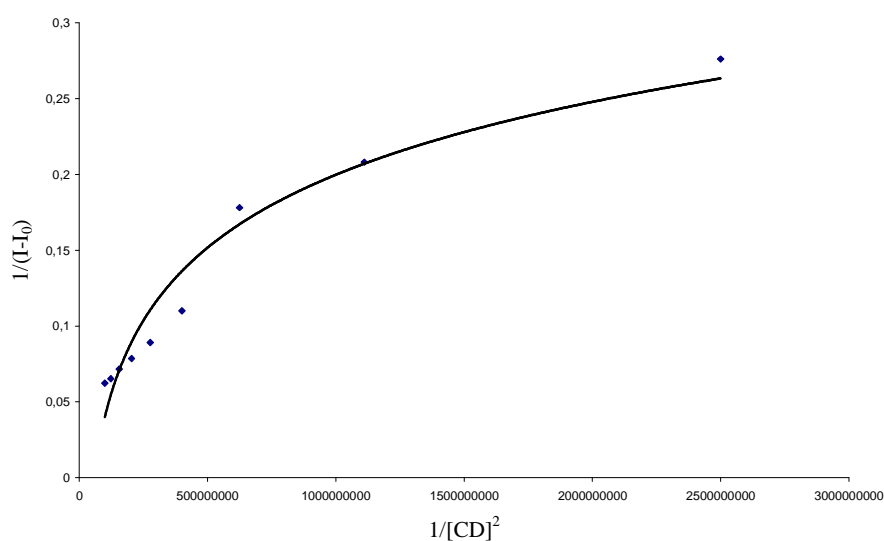


Figure 44 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 4c à $\lambda_{EM} = 364$ nm, $\lambda_{EX} = 274$ nm.

L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 4n et la $\beta\text{-CD}$ est écartée.

5. Complexe 5c : 5n-β-CD

Tableau 10 : Méthode de Benesi-Hildebrand pour le complexe 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm.

Solution	1/ (I-I ₀)	1/ [CD] (l.mol ⁻¹)	1/ [CD] ² × 10 ⁸ (l ² .mol ⁻²)
1	0.059	50000.00	25.00
2	0.042	33333.33	11.11
3	0.038	25000.00	6.25
4	0.026	20000.00	4.00
5	0.021	16666.67	2.77
6	0.017	14285.71	2.04
7	0.016	12500.00	1.56
8	0.014	11111.11	1.23
9	0.013	10000.00	1.00

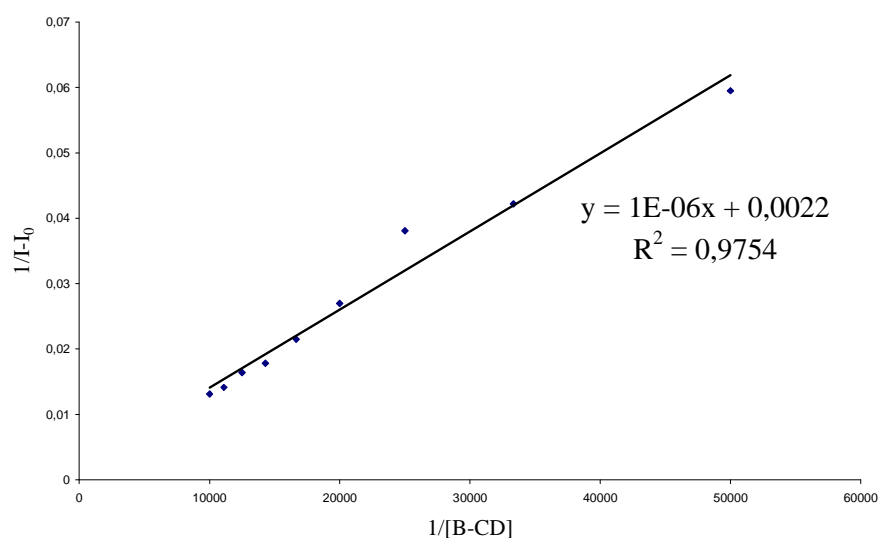


Figure 45 : La courbe de Benesi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 268$ nm.

L'équation de droite de la forme :

$$1/ (I-I_0) = 1E-06 \times 1/ [CD] + 0.0022 \quad \text{avec } 1/ (I-I_0) [1/K_1] = 1E-06$$

d'où $K_1 = 2200 \pm 60$ l.mol⁻¹ pour le complexe β-CD-5n.

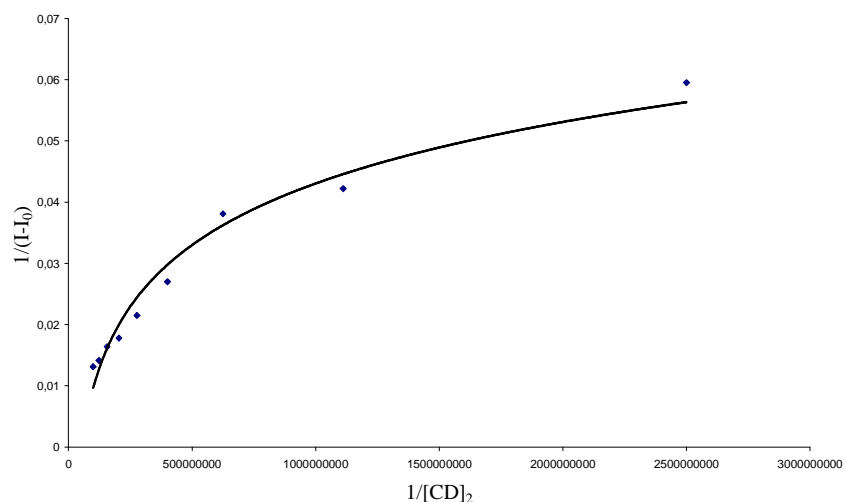


Figure 46 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 5c à $\lambda_{EM} = 368$ nm, $\lambda_{EX} = 268$ nm.

L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 5n et la β -CD est écartée.

6. Complexe 6c: 6n- β -CD

Tableau 11 : Méthode de Benessi-Hildebrand pour le complexe 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm.

Solution	$1/(I-I_0)$	$1/[CD]$ ($l \cdot mol^{-1}$)	$1/[CD]^2 \times 10^8$ ($l^2 \cdot mol^{-2}$)
1	0.344	50000.00	25.00
2	0.286	33333.33	11.11
3	0.226	25000.00	6.25
4	0.166	20000.00	4.00
5	0.15	16666.67	2.77
6	0.122	14285.71	2.04
7	0.121	12500.00	1.56
8	0.098	11111.11	1.23
9	0.091	10000.00	1.00

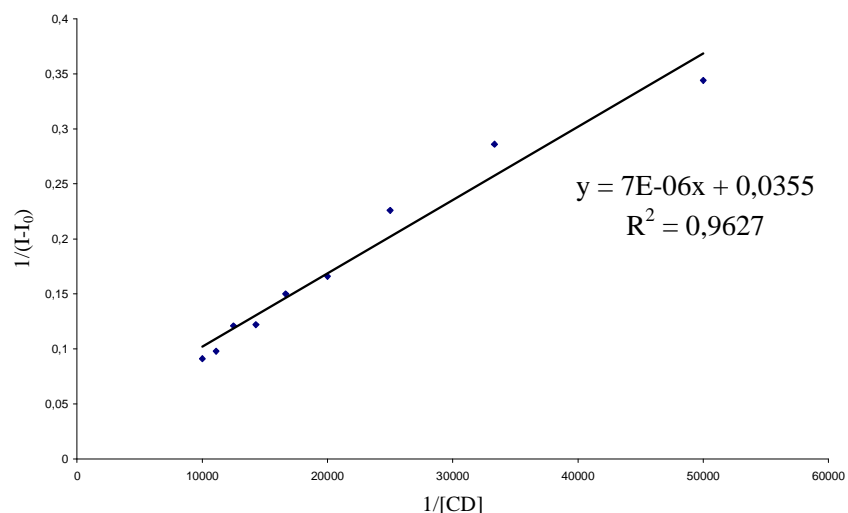


Figure 47 : La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm, $\lambda_{EX} = 266$ nm.

L'équation de droite de la forme :

$$1/(I-I_0) = 7E-06 \times 1/[CD] + 0.0355 \quad \text{avec } 1/(I_1-I_0) [1/K_1] = 7E-06$$

d'où $K_1 = 5071.4 \pm 87 \text{ l.mol}^{-1}$ pour le complexe $\beta\text{-CD-6n}$.

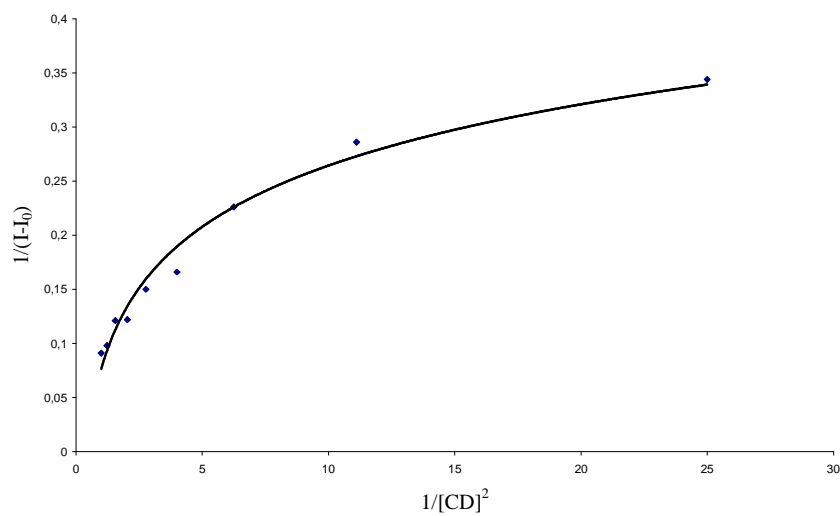


Figure 48: La courbe de Benessi-Hildebrand pour la complexation 1:1 de 6c à $\lambda_{EM} = 369$ nm, $\lambda_{EX} = 266$ nm.

L'allure de cette courbe présente une courbure vers le haut (non linéaire) par conséquent la possibilité de formation d'un complexe d'inclusion 2:1 entre 6n et la $\beta\text{-CD}$ est écartée.

Les graphes $1/(I-I_0) = f(1/[CD])$, donnés par les figures (37, 39, 41, 43, 45 et 47), respectivement, pour les complexes 1c-6c montrent que ce sont des droites. La ligne droite confirme la stœchiométrie 1:1 des complexes d'inclusion β -CD-CENU.

Les résultats des constantes de stabilité des différents complexes, sont récapitulés dans le tableau 12 suivant :

Tableau 12 : Valeurs des constantes de stabilité des complexes 1c-6c dans l'acétonitrile.

Complexe	λ_{EM} (nm)	Stœchiométrie	Constante de stabilité ($l.mol^{-1}$)
1c	368	1:1	3533.33 ± 55
2c	362	1:1	1900 ± 40
3c	360	1:1	1316.67 ± 69
4c	364	1:1	600 ± 65
5c	368	1:1	2200 ± 60
6c	369	1 :1	5071.4 ± 87

L'ensemble des valeurs, regroupées dans le tableau (12), permet de remarquer le bon accord entre la constante de stabilité (K_1) et les substituants dans les CENU. En effet, plus ces substituants sont hydrophobes, plus la constante de stabilité est grande et plus le complexe est stable, ceci est vérifié pour les complexes 3c-6c où l'ordre de stabilité est :



L'ordre global de stabilité des complexes est: $2\text{-MeO-Ph-} > \text{diBn-} > 2\text{-Me-Ph} > \text{diPh-} > \text{Ph-} > 2\text{-F-Ph-}$

En conséquence, les résultats trouvés montrent que les CENU et la β -CD forment des complexes de stœchiométrie 1:1, lesquels présentent une stabilité qui dépend de la nature du CENU.

3.5 Effet du solvant

Pour réaliser cette étude, la 2-méthoxyphényl-CENU (6n) a été choisie pour l'étude de l'effet du solvant sur sa complexation par la β -CD.

La figure 49, compare les longueurs d'onde d'excitation et d'émission aux maximums de fluorescence pour le complexe, 6n- β -CD dans quelques solvants.

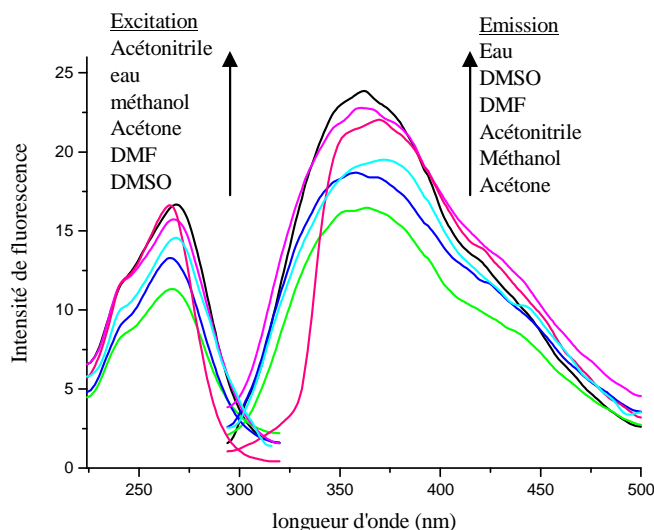


Figure 49 : Courbes d'excitation et d'émission de 6c dans quelques solvants.

On constate que le maximum du spectre d'excitation (absorption) ayant lieu dans un solvant polaire sera décalé vers les courtes longueurs d'onde par rapport au maximum du spectre réalisé dans un milieu de plus faible polarité.

Les solvants choisis sont de polarité différente. Les résultats trouvés sont regroupés dans le tableau 13 suivant.

Tableau 13: λ_{EX} , λ_{EM} et leurs intensités de fluorescence pour chaque solvant.

Solvant	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)	ϵ
Eau	270	17.15	356	23.05	78.5
DMSO	268	11.58	363	22.21	49.0
DMF	265	13.60	359	20.62	36.7
Acétonitrile	268	19.83	373	20.73	36.2
Méthanol	266	16.86	370	19.52	32.6
Acétone	267	15.84	362	18.01	20.7

La figure 50 montre l'effet de la polarité du solvant (la constante diélectrique) sur l'intensité de fluorescence du complexe.

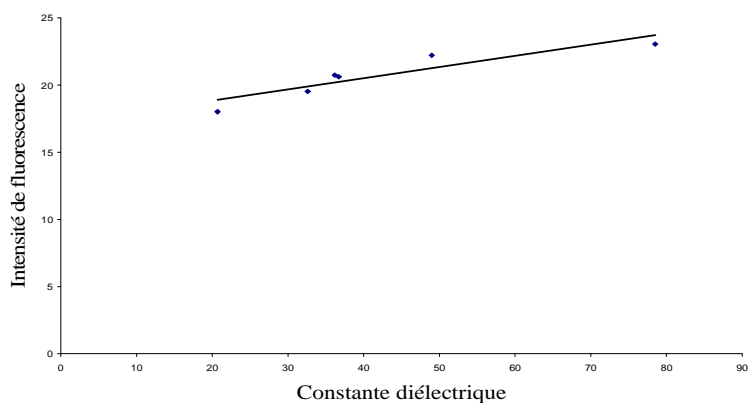


Figure 50 : Effet du solvant sur l'intensité de fluorescence du complexe 6c.

Discussion

La polarité reflète toutes les interactions soluté-solvant, aussi bien les interactions non spécifiques que spécifiques telles que les liaisons hydrogène.

L'interaction solvant-soluté se fait surtout par des liaisons hydrogène et par des liaisons électrostatiques. L'absorption d'énergie électromagnétique par la solution provoque en premier lieu une réorganisation des dipôles du soluté uniquement, puisque c'est lui qui absorbe les radiations électromagnétiques. Plus le solvant est polaire, plus l'interaction entre les dipôles des molécules du solvant et du soluté nécessitera de l'énergie. Dans ce cas, la transition électronique entre le niveau fondamental (non excité) et le niveau excité se fera avec une importante énergie par conséquent l'intensité de fluorescence correspondante sera grande.

Ainsi, la figure 50 montre que plus la polarité du solvant diminue plus l'intensité de fluorescence diminue.

4 Etude des complexes d'inclusion à l'état solide

Parallèlement à l'étude des complexes en solution, une autre étude a été menée sur des complexes d'inclusion à l'état solide formés entre la β -CD et les six CENU.

Ces complexes ont été préparés à partir d'une solution à 2 % de β -CD dans l'eau, et une solution de CENU dans peu de méthanol, ajoutée goutte à goutte, sous agitation magnétique et à température ambiante. Le précipité formé, obtenu après filtration de la solution aqueuse, est séché puis caractérisé par son Pf, Rf, IR et spectrométrie de masse en mode Electrospray ionisation.

Le schéma général de la formation des complexes d'inclusion peut être représenté comme suit:

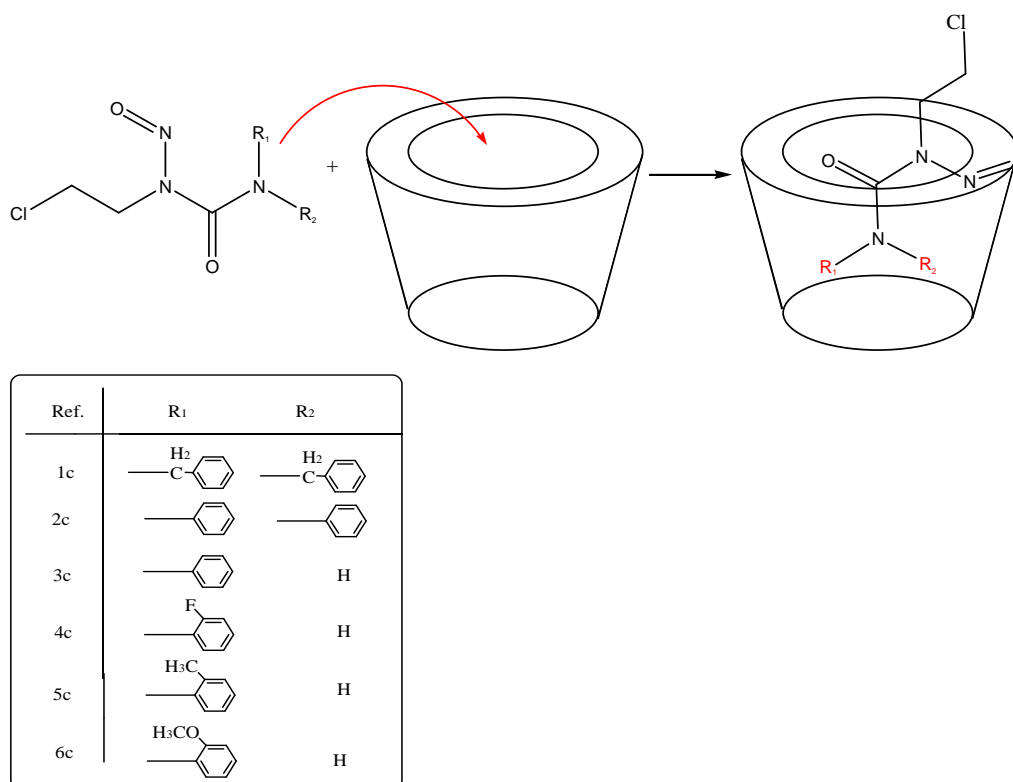


Schéma 6: Schéma général de la complexation.

Le tableau (14) suivant regroupe les propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des complexes 1c-6c et de la β -CD.

Tableau 14 : Données spectroscopiques des complexes 1c-6c et de la β -CD libre.

	M (g/mol)	Pf (°C)	Rf(*)	IR ν en cm^{-1}			ESI-MS
				N=O	C=O	OH	
β -CD	1135.5	280-282	Start	-	-	3400	-
1c	1466.5	149-151	0.50	1620	1730	3300	302.43[M-NO+H] ⁺ (30ev,80%) 1538.24 [M + 4H ₂ O] ⁺ (20%)
2c	1438.5	152-154	0.50	1600	1750	3300	1471.32 (M+MeOH+H ⁺) ⁺ (50ev,28%)
3c	1362.5	227-229	0.63	1610	1730	3300	1333,79 (M-NO+H ⁺) ⁺ (50ev, 28%)
4c	1380.5	>260	0.62	1640	1760	3300	-
5c	1376.5	252-254	0.55	1620	1700	3300	-
6c	1392.5	>260	0.62	1620	1700	3300	-

(*) Eluant : isopropanol / ammoniacque (v/v)

β -CD \equiv **β -cyclodextrine**

1c \equiv **β -CD-diBn-CENU**

2c \equiv **β -CD-diPh-CENU**

3c \equiv **β -CD-Ph-CENU**

4c \equiv **β -CD-2-F-Ph-CENU**

5c \equiv **β -CD-2-Me-Ph-CENU**

6c \equiv **β -CD-2-MeO-Ph-CENU**

Les complexes se présentent sous forme de solides blanc avec des points de fusion totalement différents de ceux de la cyclodextrine seule et des CENU.

En infrarouge, puisque les environnements chimiques des différents groupements fonctionnels sont modifiés et les spectres obtenus lors de la complexation sont différents de ceux des produits isolés. Ainsi le complexe d'inclusion est caractérisé par les bandes d'absorptions suivantes : Une large bande d'absorption à 3300 cm^{-1} qui représente le groupement OH deux intenses absorptions vers 1700-1760 et vers 1600-1620 attribuées respectivement aux groupements C=O, N=O.

Les spectres de masses obtenues confirment la masse des fragments M-NO pour les complexes 1c-3c.

Troisième partie
Partie expérimentale

Troisième partie

Partie expérimentale

Conditions générales

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur feuilles d'aluminium (0.2 mm) recouvertes de gel de silice Merck 60 F₃₅₄. Les spots sont détectés à la lumière UV (254 nm), et révélés par pulvérisation de ninhydrine (0.1 %) dans l'éthanol, puis chauffage. Les chromatographies préparatives ont été effectuées sur colonne contenant du gel de silice Merck 60 H.

Les points de fusion non corrigés ont été déterminés à l'aide d'un band Kofler type W M E, Reicher-jung.

Les solvants utilisés sont du type Aldrich pour analyse.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluoromètre Shimadzu de type RF-5301PC, équipé d'une lampe Xenon, à cellule en quarts de 1.00 cm de diamètre, à température ambiante.

Les spectres IR ont été effectués sur un spectromètre Perkin-Elmer, les échantillons sont analysés sous forme de pastilles avec KBr, les bandes d'absorption sont exprimées en cm⁻¹.

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés à température ambiante sur un appareil 360 WB ou AC 280 (Bruker) à l'Ecole Normale de Chimie de Montpellier, les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au signal DMSO-d₆ fixé à 2.49 ppm ou CH₃Cl fixé à 7.24 ppm pris comme référence interne. La multiplicité des signaux est indiquée par une (ou plusieurs) lettre(s) miniscule(s) : (s) singulier, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (m) multiplet.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse relié à une HPLC (Waters) par la méthode <<Electrospray Ionisation>> positive à 30 v et 20 v à l'aide d'un appareil Jeol SX102 de haute résolution, les analyses de la masse ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Biomoléculaire de l'Université de Montpellier II, France.

1 Mode opératoire général de la synthèse des 2-chloroéthyl urées

Dans un ballon de 100 ml, surmonté d'une ampoule à Brome protégée par une garde à CaCl_2 , est placé 1 équivalent de l'une des amines aromatiques suivantes (dibenzylamine, diphénylamine, aniline, 2-fluoroaniline, 2-méthylaniline ou 2-méthoxyaniline), dans peu de dichlorométhane (DCM) anhydre, auquel est ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome et sous agitation magnétique dans un bain de glace, une quantité équivalente de 2-chloroéthylisocyanate, dans le même solvant. La réaction est suivie à température ambiante sur plaque de silice CCM, éluée dans le dichlorométhane ou dichlorométhane/méthanol, elle est complète au bout de 16 heures.

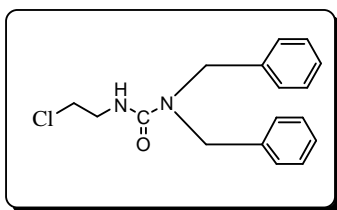
Généralement, on arrête la réaction une fois qu'un précipité blanc apparaisse. On obtient l'urée sous forme de poudre blanche, qu'on récupère après filtration, et séchage à l'air libre.

Dans le cas où le précipité ne se forme pas, le milieu réactionnel est dilué au dichlorométhane, lavé par deux fractions d'une solution d'acide chlorhydrique (0.1 N), puis à l'eau, jusqu'à neutralité. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le solvant est évaporé sous pression réduite.

Le produit obtenu est recristallisé dans un solvant approprié (éther diéthylique), ou dans certains cas, chromatographié sur colonne de gel de silice éluée au dichlorométhane-méthanol.

Nous donnons, ci-après, les caractéristiques des différentes urées préparées par cette méthode.

1u ≡ N-(2-chloroéthyl) N', N'-dibenzylurée



$M = 302.5 \text{ g/mol } [\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}]$

Pf °C: 98-100

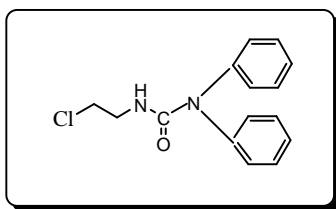
Rf : 0.55; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3380 (NH); 1680 (C=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 7.30-7.29 (m, 10H, 2ArH); 4.90 (t, 1H, NH); 4.52(s, 4H, 2 CH_2 -Bn); 3.61(t, 2H, CH_2Cl); 3.56 (q, 2H, CH_2N)

SM : $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 325.25$; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 303.29$.

2u ≡ N-(2-chloroéthyl) N',N'-diphénylurée



M = 274.5 g/mol [C₁₅H₁₅ClN₂O]

Pf °C: 72-74

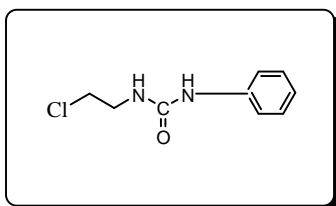
Rf : 0.55; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm⁻¹) : 3300 (NH); 1675 (C=O)

RMN ¹H : (CDCl₃, δ en ppm): 7.40-7.25 (m, 10H, 2ArH); 4.95 (t, 1H, NH); 3.60 (t, 2H, Cl-CH₂); 3.45 (q, 2H, N-CH₂)

SM : [M+Na]⁺ = 297.65; [M+H]⁺ = 275.72.

3u ≡ N-(2-chloroéthyl) N'-phénylurée



M = 198.5 g/mol [C₉H₁₁ClN₂O]

Pf °C: 136-138

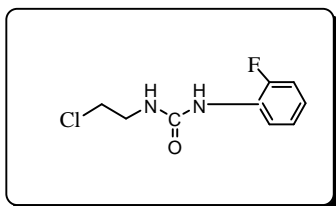
Rf : 0.47; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm⁻¹) : 3400 (NH); 1640 (C=O)

RMN ¹H : (CDCl₃, δ en ppm) : 7.55 (s, 5H, ArH); 6.95 (s, 1H, ArNH); 5.05 (t, 1H, NHCH₂); 3.68 (t, 2H, Cl-CH₂); 3.40 (q, 2H, N-CH₂)

SM : [M+Na]⁺ = 221.32; [M+H]⁺ = 199.42.

4u ≡ N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée



M = 216.5 g/mol [C₉H₁₀ClN₂OF]

Pf °C: 138-140

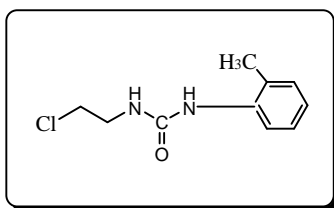
Rf : 0.43; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3380 (NH); 1650 (C=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.50 (s, 1H, NHPh); 7.90-7.10 (4m, 4H, ArH); 6.43 (t, 1H, NHCH₂); 3.85 (t, 2H, CH₂Cl); 3.65 (q, 2H, CH₂N)

SM : $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 239.01$; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 217.11$.

5u \equiv N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée



M = 212.5 g/mol [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$]

Pf °C: 159-161

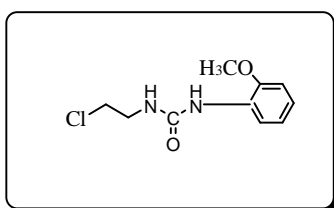
Rf : 0.45; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300(NH); 1680 (C=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.42 (s, 1H, NHPh); 8.5-7.50 (4m, 4H, ArH); 6.33 (t, 1H, NHCH₂); 3.88 (t, 2H, CH₂Cl); 3.42 (q, 2H, CH₂N); 2.32 (s, 3H, CH₃)

SM : $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 235.16$; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 213.36$.

6u \equiv N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée



M = 228.5 g/mol [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$]

Pf °C: 126-128

Rf : 0.50; Dichlorométhane/Méthanol 95/5

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3380(NH); 1650 (C=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.46 (s, 1H, NHPh); 8.25-6.90 (4m, 4H, ArH); 6.50 (t, 1H, NHCH₂); 3.95(t, 2H, CH₂Cl); 3.78(q, 2H, CH₂N)

SM : $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 251.98$.

2 Nitrosation des urées

On procède à la nitrosation en utilisant soit de l'acide chlorhydrique (HCl) soit de l'acide formique (HCOOH), sous agitation magnétique à 0° C, la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM).

Méthode a:

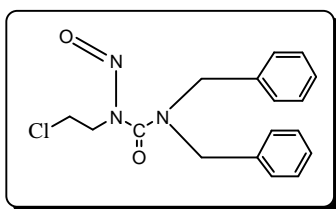
A 1 équivalent de la N-(2-chloroéthyl) urée, dissoute dans un minimum de dichlorométhane (DCM), à 0° C et sous agitation magnétique, sont ajoutés successivement trois équivalents d'acide chlorhydrique concentré et trois équivalents de nitrite de sodium (NaNO₂) par petites fractions. La réaction est suivie sur plaque de silice, éluée au DCM. La suspension de NaCl formée est éliminée par filtration, la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre, et le solvant est évaporé sous pression réduite.

Méthode b:

La nitrosation est conduite à 0° C, sous agitation magnétique, avec 3 équivalents d'acide formique, qui sont ajoutés directement à 1 équivalent d'une solution de N-(2-chloroéthyl) urée, auxquels sont ajoutés par petites fractions 3 équivalents de NaNO₂. L'addition par petites fractions s'échelonne sur 45 minutes. Après dilution au DCM, le milieu réactionnel est lavé à l'eau, puis séché et évaporé.

Nous donnons, ci-dessous, les caractéristiques des différentes CENU.

1n ≡ N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-dibenzylurée



M = 331.5 g/mol [C₁₇H₁₈ClN₃O₂]

Pf °C: 74-76

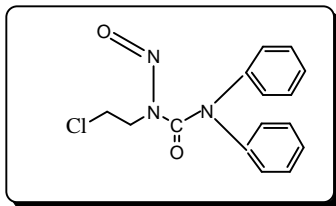
Rf: 0.87; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm⁻¹): 1680 (C=O); 1480 (N=O)

RMN ¹H: (CDCl₃, δ en ppm): 7.28-7.14 (m, 10H, 2ArH); 4.55 (s, 4H, 2CH₂ Bn); 4.06 (t, 2H, N-CH₂); 3.40 (t, 2H, Cl-CH₂)

SM : [M-NO+Na+H]⁺ = 325.25; [M-NO+H]⁺ = 302.29.

2n \equiv N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N', N'-diphénylurée



M = 303.5 g/mol [C₁₅H₁₄ClN₃O₂]

Pf °C: 48-50

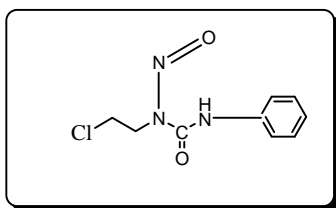
Rf: 0.89; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm⁻¹): 1680 (C=O); 1470 (N=O)

RMN ¹H: (CDCl₃, δ en ppm): 7.50-7.30 (m, 10H, 2ArH); 4.00 (t, 2H, N-CH₂); 3.15 (t, 2H, Cl-CH₂)

SM : 50V(ESI+): [M-NO]⁺ = 273.14.

3n \equiv N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(phényl) urée



M = 227.5 g/mol [C₉H₁₀ClN₃O₂]

Pf °C: 94-96

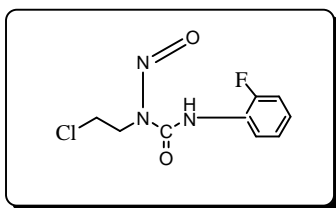
Rf : 0.80; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm⁻¹): 1680 (C=O); 1480 (N=O)

RMN ¹H : (CDCl₃, δ en ppm) : 7.50-7.00 (m, 5H, ArH); 6.10 (t, 1H, NH); 3.65 (t, 2H, NCH₂); 3.10 (t, 2H, Cl-CH₂)

SM : 30V(ESI+): [M-NO]⁺ = 197.24.

4n \equiv N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-fluorophényl) urée



M = 245.5 g/mol [C₉H₉ClN₃O₂F]

Pf °C: 56-58

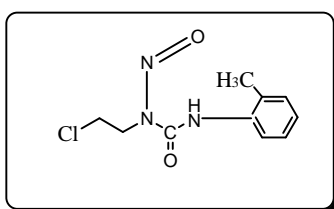
Rf : 0.73; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 1675 (C=O); 1480 (N=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.40 (t, 1H, NH); 8.30-7.20 (m, 4H, ArH); 4.20 (t, 2H, CH_2N); 3.68 (t, 2H, CH_2Cl)

SM : 30V(ESI+): $[\text{M}-\text{NO}+\text{Na}+\text{H}]^+ = 239.01$.

5n \equiv N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthylphényl) urée



M= 241.5 g/mol [$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$]

Pf °C: 104-106

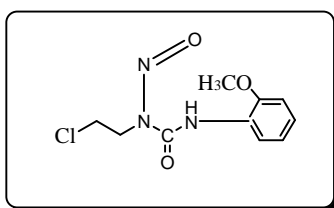
Rf : 0.72; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 1670 (C=O); 1485 (N=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.05 (t, 1H, NH); 8.20-6.90 (m, 4H, ArH); 4.32 (t, 2H, CH_2N); 3.75 (t, 2H, CH_2Cl); 2,32 (s, 3H, CH_3)

SM : 30V(ESI+): $[\text{M}-\text{NO}+\text{Na}+\text{H}]^+ = 235,22$.

6n \equiv N-nitroso, N-(2-chloroéthyl), N'-(2-méthoxyphényl) urée



M = 257.5 g/mol [$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_3$]

Pf °C: 182-184

Rf : 0.82; Dichlorométhane

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 1670 (C=O); 1485 (N=O)

RMN ^1H : (CDCl_3 , δ en ppm) : 9.54 (t, 1H, NH); 8.47-7.19 (m, 4H, ArH); 4.21 (t, 2H, CH_2N); 3.97 (s, 3H, OCH_3); 3.51 (t, 2H, CH_2Cl)

SM : 10V(ESI-): $[\text{M}-\text{NO}-\text{H}]^+ = 226.95$; 30V(ESI+): $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+ = 281.16$.

3 Etude en solution des complexes d'inclusion

Nous relatons dans cette partie du travail, les différentes méthodes utilisées ayant conduit à l'observation et à l'étude en solution de la complexation des CENU par la β -CD.

3.1 Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion β -CD-CENU

Les solutions des CENU sont préparées dans l'acétonitrile à une concentration de $1.00 \times 10^{-5} \text{M}$.

La solution de la β -CD a été également préparée avec l'acétonitrile, à la même concentration ($1.00 \times 10^{-5} \text{M}$).

A 2 ml de la solution d'une CENU on ajoute 2 ml de la solution de la β -CD.

Un échantillon de 3 ml de ce mélange, ainsi que deux autres échantillons, chacun de 3 ml des solutions de la β -CD et des CENU, sont analysés à l'aide d'un spectrofluoromètre Shimadzu de type RF-5301PC, à température ambiante. Les essais effectués ont permis de déterminer les longueurs d'ondes d'excitation (λ_{EX}) et d'émission (λ_{EM}) de fluorescence ainsi que les intensités de fluorescence maximales (IF) correspondantes.

Les différentes valeurs des longueurs d'ondes et des intensités de fluorescence obtenues de la β -CD, des CENU et de leurs complexes, sont regroupées dans les tableaux suivants :

1. Complexe 1c : 1n- β CD

Tableau 15: Mise en évidence de la formation du complexe 1c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
1n	274	21.54	350	20.22
β -CD	272	26.77	356	24.30
Mélange	268	22.13	350	24.53

2. Complexe 2c : 2n- β CD

Tableau 16: Mise en évidence de la formation du complexe 2c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
2n	272	29.02	368	27.92
β -CD	270	29.45	356	31.67
Mélange	272	29.50	366	33.77

3. Complexe 3c : 3n - β -CD

Tableau 17: Mise en évidence de la formation du complexe 3c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
3n	264	17.79	357	27.00
β -CD	270	21.66	356	31.92
Mélange	265	22.77	358	33.56

4. Complexe 4c : 4n- β CD

Tableau 18: Mise en évidence de la formation du complexe 4c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
4n	274	28.39	366	25.06
β -CD	270	29.66	356	24.82
Mélange	274	30.04	358	25.31

5. Complexe 5c : 5n - β CD

Tableau 19: Mise en évidence de la formation du complexe 5c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
5n	268	19.60	364	26.53
β -CD	270	22.80	358	29.55
Mélange	268	25.29	361	33.98

6. Complexe 6c : 6n - β CD

Tableau 20: Mise en évidence de la formation du complexe 6c.

solution	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
6n	266	14.18	379	17.14
β -CD	270	16.51	356	24.30
Mélange	267	19.83	368	27.99

3.2 Détermination de la stoechiométrie des complexes β -CD-CENU

Pour déterminer la stoechiométrie, deux méthodes ont été utilisées : la méthode des variations continues et la méthode des rapports molaires.

3.2.1. Méthode des variations continues

Les solutions des CENU et de la β -CD ont été préparées dans le même solvant (acétonitrile) et à la même concentration (1.00×10^{-5} M).

On fait varier la teneur en β -CD dans le mélange à analyser, de la façon représentée ci-dessous, de sorte qu'on obtienne les fractions molaires de β -CD ($FM_{\beta\text{-CD}}$), indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 21: Fractions molaires de la β -CD utilisées dans la méthode des variations continues.

Solution	1	2	3	4	5
$V_{\beta\text{-CD}}$ (ml)	1.00	2.00	2.50	3.00	4.00
V_{CENU} (ml)	4.00	3.00	2.50	2.00	1.00
$FM_{\beta\text{-CD}}$	0.20	0.40	0.50	0.60	0.80

Les essais ont été réalisés avec un spectrofluoromètre Shimadzu de type RF-5301PC, à la température ambiante.

Nous donnons ci-après, pour les différents complexes, les longueurs d'onde d'émission de fluorescence maximales (λ_{EM}), ainsi que les intensités de fluorescence (IF) mesurées.

1. Complexe 1c : 1n- β -CD

Tableau 22: Méthode des variations continues pour 1c, $\lambda_{EM} = 356$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 356 nm	17.56	22.49	23.61	23.02	21.61

2. Complexe 2c : 2n- β -CD

Tableau 23: Méthode des variations continues pour 2c, $\lambda_{EM} = 357$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 357 nm	26.46	28.71	31.39	29.77	27.95

3. Complexe 3c : 3n-β-CD

Tableau 24: Méthode des variations continues pour 3c, $\lambda_{EM} = 357$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 357 nm	27.33	29.75	34.32	30.97	26.45

4. Complexe 4c : 4n-β-CD

Tableau 25: Méthode des variations continues pour 4c, $\lambda_{EM} = 358$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 358 nm	22.09	24.83	26.24	24.76	22.03

5. Complexe 5c : 5n-β-CD

Tableau 26: Méthode des variations continues pour 5c, $\lambda_{EM} = 361$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 361 nm	26.21	30.75	33.98	32.91	30.73

6. Complexe 6c : 6n-β-CD

Tableau 27: Méthode des variations continues, $\lambda_{EM} = 368$ nm.

Solution	1	2	3	4	5
IF à 368 nm	21.13	34.27	35.48	27.68	23.66

3.2.2 Méthode des rapports molaires

Les solutions des CENU et de la β -CD, de 1 jusqu'à 11, sont préparées de la même façon que dans la méthode des variations continues, à partir de solutions mères de CENU et de β -CD, aux mêmes concentrations de 1.00×10^{-5} M. En revanche, dans ce cas, le volume de la solution de CENU est fixé à 2 ml et on fait varier celui de la β -CD en solution, de 0.4 à 6 ml, pour obtenir les rapports de concentrations utilisées selon ce qui suit :

Tableau 28: Rapports des concentrations utilisés dans la méthode des rapports molaires.

solution	$V_{\beta\text{-CD}}$ (ml)	V_{CENU} (ml)	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$
1	0.40	2.00	0.20
2	0.80	2.00	0.40
3	1.00	2.00	0.50
4	1.60	2.00	0.80
5	2.00	2.00	1.00
6	2.40	2.00	1.20
7	3.20	2.00	1.60
8	4.00	2.00	2.00
9	4.80	2.00	2.40
10	5.60	2.00	2.80
11	6.00	2.00	3.00

Les intensités de fluorescence (IF) aux maximums d'émission (λ_{EM}) ont été mesurées à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimadzu de type RF-5301PC, à la température ambiante.

Nous donnons, ci-après, pour les différents complexes, les valeurs mesurées.

1. Complexe 1c : 1n- β -CD

Tableau 29: Méthode des rapports molaires pour 1c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 350 \text{ nm}$
1	0.20	17.22
2	0.40	18.11
3	0.50	18.56
4	0.80	19.64
5	1.00	20.74
6	1.20	21.07
7	1.60	20.71
8	2.00	21.30
9	2.40	21.75
10	2.80	21.03
11	3.00	21.07

2. Complexe 2c : 2n- β -CD

Tableau 30: Méthode des rapports molaires pour 2c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 361 \text{ nm}$
1	0.20	25.61
2	0.40	25.83
3	0.50	26.79
4	0.80	29.45
5	1.00	31.69
6	1.20	30.93
7	1.60	30.08
8	2.00	28.95
9	2.40	28.37
10	2.80	28.71
11	3.00	29.95

3. Complexe 3c : 3n-β-CD

Tableau 31: Méthode des rapports molaires pour 3c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 358 \text{ nm}$
1	0.20	28.52
2	0.40	29.62
3	0.50	32.90
4	0.80	33.56
5	1.00	34.50
6	1.20	33.83
7	1.60	30.98
8	2.00	29.51
9	2.40	29.46
10	2.80	27.82
11	3.00	27.03

4. Complexe 4c : 4n-β-CD

Tableau 32: Méthode des rapports molaires pour 4c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 366 \text{ nm}$
1	0.20	23.89
2	0.40	25.80
3	0.50	26.18
4	0.80	26.73
5	1.00	29.37
6	1.20	28.28
7	1.60	27.66
8	2.00	27.60
9	2.40	27.42
10	2.80	26.99
11	3.00	25.25

5. Complexe 5c : 5n- β -CD

Tableau 33: Méthode des rapports molaires pour 5c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 360 \text{ nm}$
1	0.20	27.84
2	0.40	28.20
3	0.50	30.37
4	0.80	32.41
5	1.00	32.79
6	1.20	32.83
7	1.60	32.90
8	2.00	32.65
9	2.40	32.74
10	2.80	33.84
11	3.00	33.96

6. Complexe 6c : 6n- β -CD

Tableau 34: Méthode des rapports molaires pour 6c.

Solution	$V_{\beta\text{-CD}}/V_{\text{CENU}}$	IF à $\lambda_{\text{EM}} = 368 \text{ nm}$
1	0.20	23.94
2	0.40	24.52
3	0.50	25.66
4	0.80	26.49
5	1.00	28.43
6	1.20	28.57
7	1.60	29.09
8	2.00	29.80
9	2.40	30.92
10	2.80	30.21
11	3.00	30.76

3.3 Détermination des constantes de stabilité des complexes β -CD-CENU

Les constantes de stabilité ont été déterminées en utilisant la méthode de Benesi-Hildebrand.

Les solutions des CENU sont préparées dans l'acétonitrile à une concentration donnée. En revanche on prépare plusieurs solutions de β -CD, dans le même solvant, à différentes concentrations mais qui sont supérieures à celle des CENU.

Pour préparer les solutions de 1 jusqu'à 9, on mélange deux volumes égaux des solutions de CENU et de β -CD.

L'analyse est effectuée sur un échantillon de 3 ml de ce mélange à l'aide d'un spectrofluoromètre Shimadzu de type RF-5301PC, à la température ambiante.

Pour les différents mélanges, nous donnons, ci-après, les concentrations utilisées.

Tableau 35: Concentrations utilisées lors de la détermination des constantes de stabilité.

Solution	[CENU] (M)	[β -CD] (M)
1	1.00×10^{-5}	2.00×10^{-5}
2	1.00×10^{-5}	3.00×10^{-5}
3	1.00×10^{-5}	4.00×10^{-5}
4	1.00×10^{-5}	5.00×10^{-5}
5	1.00×10^{-5}	6.00×10^{-5}
6	1.00×10^{-5}	7.00×10^{-5}
7	1.00×10^{-5}	8.00×10^{-5}
8	1.00×10^{-5}	9.00×10^{-5}
9	1.00×10^{-5}	1.00×10^{-4}

Les longueurs d'onde d'émission de fluorescence (λ_{EM}), ainsi que les intensités de fluorescence (IF) mesurées, sont regroupées dans les tableaux suivants :

1. Complexe 1c : 1n- β -CD

Tableau 36: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 1c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 368 \text{ nm}$
1	23.51
2	23.16
3	26.39
4	26.36
5	28.76
6	28.96
7	31.46
8	32.66
9	32.19

2. Complexe 2c : 2n- β -CD

Tableau 37: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 2c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 362 \text{ nm}$
1	35.76
2	38.84
3	42.14
4	44.44
5	53.88
6	53.95
7	61.63
8	71.12
9	73.91

3. Complexe 3c : 3n-β-CD

Tableau 38: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 3c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 360$ nm
1	30.44
2	31.05
3	32.81
4	33.93
5	36.33
6	38.40
7	42.29
8	42.25
9	42.80

4. Complexe 4c : 4n-β-CD

Tableau 39: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 4c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 364$ nm
1	28.68
2	29.64
3	30.67
4	34.14
5	36.27
6	37.77
7	39.02
8	40.36
9	44.07

5. Complexe 5c : 5n- β -CD

Tableau 40: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 5c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 368 \text{ nm}$
1	43.34
2	50.23
3	52.79
4	63.57
5	73.08
6	82.70
7	87.59
8	97.34
9	102.73

6. Complexe 6c : 6n- β -CD

Tableau 41: Méthode de Benessi-Hildebrand pour 6c.

Solution	IF à $\lambda_{EM} = 369 \text{ nm}$
1	21.16
2	21.33
3	20.96
4	21.58
5	22.63
6	22.48
7	24.03
8	25.56
9	27.39

3.4 Effet du solvant

Pour réaliser cette étude, les solutions de la 2-méthoxyphényl-CENU et de la β -CD, de concentration 1.00×10^{-5} M, sont préparées dans les solvants suivants : eau, diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMF), acétonitrile, méthanol, et acétone.

En suite, on mélange deux volumes égaux des solutions de CENU et de β -CD. Les mesures sont faites avec un spectrofluorimètre Shimadzu de type RF-5301PC à la température ambiante.

Le tableau suivant regroupe les valeurs des longueurs d'onde aux maximums de fluorescence.

Tableau 42: Longueurs d'onde d'excitation et d'émission et intensités de fluorescence, du complexe 2-MeO-Ph-CENU- β -CD dans quelques solvants.

Solvant	λ_{EX} (nm)	IF _{EX} (u-a)	λ_{EM} (nm)	IF _{EM} (u-a)
Eau	270	17.15	356	23.05
DMSO	268	11.58	363	22.21
DMF	265	13.60	359	20.01
Acétonitrile	268	19.83	373	19.62
Méthanol	266	16.86	370	18.73
Acétone	267	15.84	362	16.52

4 Préparation des complexes à l'état solide

La complexation ayant été menée pour les complexes formés entre la β -cyclodextrine et les CENU synthétisées.

L'approche de préparation des complexes d'inclusion choisie, consiste à utiliser deux solvants miscibles, parmi, ceux-ci on a choisi l'eau et le méthanol. La β -cyclodextrine est soluble dans l'eau, et les CENU le sont dans le méthanol. Les deux solvants étant miscibles, la CENU et les cyclodextrines sont présentes dans une même phase et le complexe peut se former sous simple agitation.

Sur base de la quantité des solides obtenus, la technique décrite semble donner de bons résultats. Toutefois, aucune mesure de rendement n'a été réalisée.

Une évaluation précise du rendement requerrait des mesures de synthèse plus précises. De telles mesures n'ont pas été prises dans le cadre du présent travail.

Mode opératoire

Une solution aqueuse à 2 % de β -CD (1 éq.), et une solution de CENU (1 éq.) dans peu de méthanol ont été préparées.

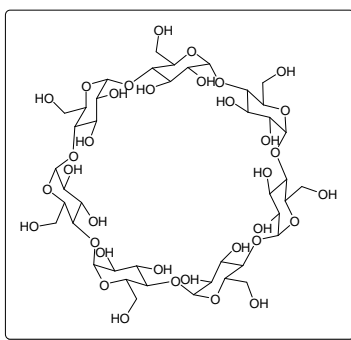
La synthèse du complexe se fait en mélangeant, goutte à goutte, la solution de CENU dans le méthanol, à la solution aqueuse de la β -CD, sous agitation magnétique et à température ambiante.

Après 24 heures d'agitation on obtient un précipité, qu'on récupère par filtration de la solution aqueuse, après séchage sous vide un solide blanc est recueilli. Le solide obtenu contient le complexe, ainsi que la cyclodextrine n'ayant pas réagi.

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

Nous donnons, ci-après, les caractéristiques spectroscopiques des complexes d'inclusion et de la β -CD libre :

β -CD \equiv β -cyclodextrine



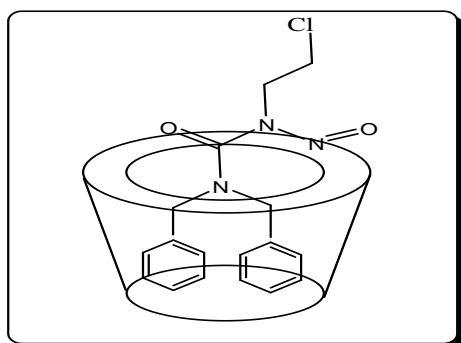
M=1135 g/mole

Pf : 280-282 °C

Rf : start ; isopropanol / ammoniaque (v/v)

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300 (OH) large.

1c \equiv β -CD-diBn-CENU



M= 1466.5 g/mole.

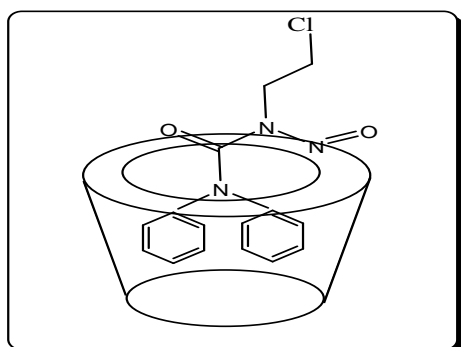
Pf: 149-151 °C

Rf: 0.54; isopropanol / ammoniaque (v/v)

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1730 (C=O); 1620 (N=O)

SM: ESI⁺; m/z = 1538.24 [M + 4H₂O]⁺ (20%); 302.43 [M-NO+H]⁺ (30ev, 80%).

2c \equiv β -CD-diPh-CENU



M= 1438.5 g/mole

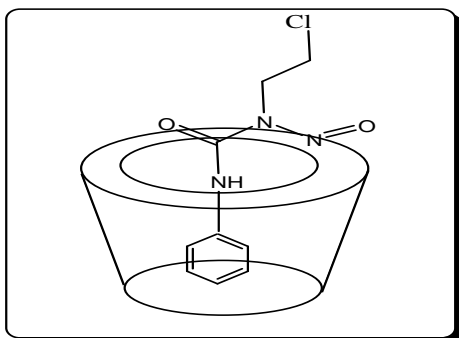
Pf: 152 -154°C

Rf: 0.50; isopropanol / ammoniacque (v/v)

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1750 (C=O); 1600 (N=O)

SM: ESI⁺; $m/z = 1471.32$ (M+MeOH+H⁺)⁺ (50ev, 28%).

3c \equiv β -CD-Ph-CENU



M= 1362.5 g/mole

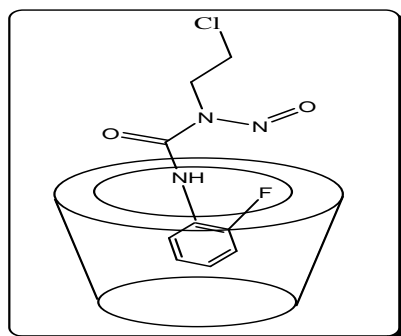
Pf: 227-229 °C

Rf: 0.63 isopropanol / ammoniacque (v/v)

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1730 (C=O); 1610 (N=O)

SM: ESI⁺; $m/z = 1333.79$ (M-NO+H⁺)⁺ (50ev, 28%).

4c \equiv β -CD-2-F-Ph-CENU



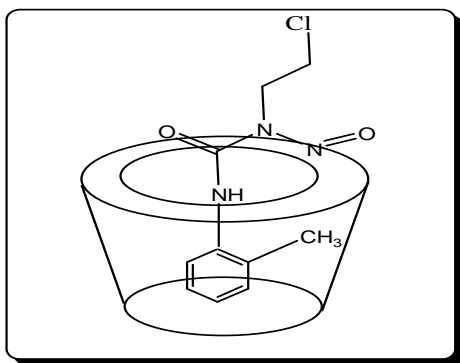
M= 1380.5 g/mole

Pf : > 260°C

Rf : 0.62; isopropanol / ammoniacque (v/v)

IR (KBr, ν en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1760 (C=O); 1640 (N=O).

5c \equiv β -CD-2-Me-Ph-CENU



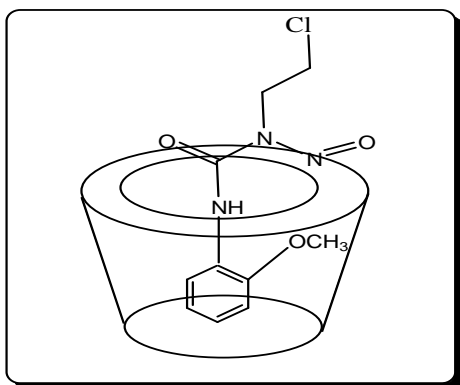
M= 1376.5 g/mole

Pf : 252 -254°C

Rf : 0.55; isopropanol / ammoniacque (v/v)

IR (KBr, v en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1700 (C=O); 1620 (N=O).

6c \equiv β -CD-2-OMe-Ph-CENU



M= 1392.5 g/mole

Pf : > 260°C

Rf : 0.62; isopropanol / ammoniacque (v/v)

IR (KBr, v en cm^{-1}) : 3300 (OH) large; 1700 (C=O); 1620 (N=O).

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de recherche de chimie appliquée (LCA) de l'Université de Guelma il porte essentiellement sur :

- La synthèse de six Chloroéthylnitrosourées (CENU) issus des amines aromatiques (dibenzylamine, diphénylamine, aniline, 2-fluoroaniline, 2-méthylaniline et 2-méthoxyaniline)
- La mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion β -Cyclodextrine-CENU
- La détermination de la stœchiométrie des complexes
- L'étude de leurs stabilités
- L'effet du solvant sur l'intensité de fluorescence des complexes.

La mise à profit de la forte réactivité du chloroéthylisocyanate (CEI), nous a permis d'accéder aux 2-chloroéthylurées qui ont été par la suite nitrosées. Une série de six CENU a été préparée et étudiée.

Compte tenu de la liposolubilité et de l'instabilité des CENU, la formation de complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine a été investiguée.

L'étude en solution des complexes d'inclusion a été menée par spectrofluorimétrie qui nous a permis de mettre en évidence sans ambiguïté la formation de ces complexes, avec un phénomène de complexation host-guest.

Afin de déterminer la stœchiométrie des complexes, deux méthodes ont été utilisées: la méthode des variations continues et celle des rapports molaires. L'étude menée indique un phénomène de complexation principalement équimoléculaire (1:1).

L'évaluation de la stabilité des complexes a été établie par la méthode de Benesi-Hildebrand. Les résultats obtenus ont montré des constantes d'association relativement grande, ce qui traduit une interaction d'inclusion forte.

Comme il est rapporté dans la littérature l'inclusion d'une molécule à l'intérieur de la cavité de la β -CD augmente la fluorescence, ainsi l'effet de l'ajout de la β -CD a validé les résultats de formation de complexes stables. Une amélioration dans l'émission de fluorescence des CENU est obtenue par l'inclusion dans la cavité de la β -CD.

La nature du solvant et la taille de l'invité semblent être les facteurs déterminants de la force et de l'orientation de l'invité par rapport au complexe, et affectent considérablement la stabilité du complexe.

Nous avons donc amélioré la stabilité des CENU, et ceci grâce à un procédé de préparation simple et économique. Ces deux facteurs sont donc en faveur d'un mode de formulation adapté à cette famille de composés.

