

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*



*Thèse de Doctorat*

*Présentée à l'Université de Guelma*

*Faculté des Mathématiques, Informatique et Sciences de la matière*

*Département de : Sciences de la matière*

*Spécialité : Science Chimique*

*Par : MESSIAD Hanane*

---

*Isolement de polyphénols à partir des sarments de vigne *Vitis vinifera* L. et étude de leur stabilité par complexation avec les béta-cyclodextrines native et modifiée*

---

### Membres de JURY

**Président :** Mr OUMEDDOUR Rabah                      Prof                      Université de Guelma

**Directeur de Thèse :** AMIRA-GUEBAILIA Habiba    MCA                      Université de Guelma

**Examineurs :**

Mr ABDAOUI Mohamed                      Prof                      Université de Guelma

Mr Akkal Salah                                      Prof                      Université de Mentouri, Constantine

Mr GHERRAF Noureddine                      Prof                      Université d'Oum el bouaghi

Mr SALHI Ramdane                                      Prof                      Université de Mentouri, Constantine

---

Soutenue publiquement le 2013

---

---

## Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'extraction, et la purification des polyphénols à partir des sarments de la vigne (*Vitis vinifera* L.) par les techniques usuelles de chromatographie. L'élucidation structurale a été principalement accomplie par Résonance Magnétique Nucléaire du proton et par spectrométrie de masse. Deux polyphénols appartenant à la classe des stilbènes ont été identifiés, ce sont le résvératrol, et le picéatannol.

Ces molécules sont caractérisées par leur faible hydrosolubilité, stabilité et biodisponibilité, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de leur complexation par la bêta-cyclodextrine native ( $\beta$ -CD) et l'hydroxypropyl  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). L'étude de la complexation du picéatannol et du résvératrol en présence de la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD par RP-HPLC, en solution aqueuse a mené à la corrélation négative entre le temps de rétention et la concentration des cyclodextrines. Dans l'intervalle de concentration étudiée (0-4mM), lorsque la concentration de la  $\beta$ -CD ou de l'HP- $\beta$ -CD augmente, le temps de rétention de l'invité diminue, ce qui indique une amélioration de la solubilité en raison de la formation du complexe d'inclusion. Les constantes de formation (KF) dépendent de la nature de la molécule invitée, et varie considérablement avec et la concentration du méthanol dans la phase mobile et la température. La stœchiométrie des complexes était 1:1 pour tous les complexes étudiés, dans toutes les conditions physico-chimiques établies.

Ensuite, Les complexes d'inclusion à l'état solide PIC/  $\beta$ -CD et PIC/HP-  $\beta$ -CD ont été préparés par la méthode de Co-précipitation. Les méthodes spectroscopiques  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN et ESI-MS ont été mises à profit pour établir les caractéristiques structurales propres à ces complexes d'inclusion.

Enfin, une étude théorique par l'application des techniques de la modélisation moléculaire a été conduite en vue de mieux comprendre le processus d'inclusion du PIC/  $\beta$ -CD. En plus des minimas énergétiques, le calcul des énergies de liaison, de complexation, de déformation de la  $\beta$ -CD et du PIC à l'état libre a permis de distinguer entre les deux orientations et a mené à conclure que l'orientation où le picéatannol pénètre la cavité de la CD par le cycle A est la plus stable.

**Mots clés :** Stilbènes, complexe d'inclusion,  $\beta$ -cyclodextrine, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine, HPLC, RMN, ESI-MS, stabilité, modélisation moléculaire.

**Abstract**

In this work, we were initially interested in the extraction, purification and structural elucidation of polyphenol from the stems of the vine (*Vitis vinifera* L.) by conventional chromatographic techniques. Structural elucidation was achieved by NMR and mass spectrometry. Two polyphenols belonging to stilbenes family have been identified, and these are resveratrol (RES) and piceatannol (PIC).

These compounds are characterized by poor water-solubility, stability and bioavailability; we were therefore interested in the study of their complexation by native beta-cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and hydroxy-propyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). The study of PIC and RES complexation by  $\beta$ -CD or HP- $\beta$ -CD using RP-HPLC, in aqueous media led to a negative correlation between retention time and cyclodextrines concentration. Within the concentration interval studied (0-4 mM), whenever the concentration of CDs increased, retention time of guests decreased; indicating an enhancement of solubility due to the formation of host-guest complexes. The formation constants (KF) depend on the nature of the guest molecule and varied significantly with both the methanol concentration in the water-methanol mixture and the temperature. Moreover, in all the physicochemical conditions, stoichiometry (host: guest) was 1:1 for all complexes.

Moreover, inclusion complexes of PIC/ $\beta$ -CD and PIC/HP- $\beta$ -CD in the solid state were prepared by co-precipitation method. Spectroscopic methods,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and ESI-MS were used to establish the structural characteristics of these inclusion complexes.

Finally, a theoretical study applying molecular modeling techniques was conducted to better understand the process of PIC inclusion in  $\beta$ -CD. Besides energetic minimas, calculation of binding, complexation, and deformation energies at the free state, allowed us to distinguish between the two orientations of piceatannol and leads to conclude that the one where PIC is included by the A ring within  $\beta$ -CD was the most stable.

**Key words:** stilbenes, inclusion complex,  $\beta$ -cyclodextrin, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, HPLC, RMN, ESI-MS, stability, molecular modeling.

في هذا العمل بالتركيز في البداية على استخلاص وتنقية جزيئات عائلة البوليفينول من فروع الكرمة ( ) وهي « *vitis vinifera L.* » بواسطة تقنيات الطيف التقليدية. وحتى تتضح لنا البنية الكيميائية اعتمدنا تقنية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون  $^1\text{H RMN}$  و طيف الكتلة ESI-MS حيث قمنا بتحديد مركبي البوليفينول اذ انهما ينتميان الي عائلة الستيلبان وهما علا التوالي الريسفيراترول البيسيتنول.

لكن معظم هذه المركبات تمتاز بقلة الذوبان في الماء، الأمر الذي يحد من خاصية التوافر البيولوجي والاستقرار والنفاذية عبر الغشاء البيولوجي، وكساهمة في حل هذه المشكلة، اقترحنا دراسة المدمجة لهذه - سيكلوديكستريين الطبيعية و المتغيرة ; الهيدروكسي بروبييل - - سيكلوديكستريين .

- سيكلوديكستريين الطبيعية و المتغيرة مع البيسيتنول و الريسفيراترول

تقنيات الكروماتوغرافي المعكوسة, اذ انه في المحلول المائي لوحظ علاقة سلبية بين الزيادة في تركيز السد ديكستريين و زمن ظهور الجزئي , على مستوى مجال التركيز 0-4 mM , يلاحظ وبصورة واضحة علا التوالي عند زيادة تراكيز الجزيئات - سيكلوديكستريين الطبيعية و الهيدروكسي بروبييل - سيكلوديكستريين المتغيرة نلاحظ نقصان زمن ظهور الضيف , و هذا يشير إلى حدوث تحسن في قابلية للذوبان وفقا لتشكيل جزيئات الادماج المجمع .

(KF) تتعلق بالطبيعة الكيميائية للجزئي الضيف و تتغير نسبيا مع تركيز الميثانول للطبقة المتحركة

1:1 ميع المدمجات المدروسة وفي جميع

الشروط الفيز و كيميائية المحققة .

PIC/HP- -CD PIC/ -CD

كمرحلة ثانية , تم الحصول على

عن طريق تقنية الترسيب المرافق , و اعتمادا على الطرق الطيفية لرنين النووي المغناطيسي (للبروتون و الكر ) ,

الطيف الكتلي المدقق تحققنا من البنية الكيميائية والخصائص الفيزيوكيميائية

وأخيرا , تم إجراء دراسة نظرية من خلال تطبيق تقنيات النمذجة الجزيئية لفهم أفضل لظاهرة الادماج ,

بالإضافة الى قيم التعديل الطاقوي الادنى , حساب طاقة الترابط , الادماج والتغير لمركبات

PIC/ -CD

- سيكلوديكستريين و البيسيتنول يمكننا التمييز بين نهجي الادماج

التي يتم فيها ادماج البيسيتنول من الحلقة (A) هو الاكثر استقرار كيميائيا .

\_\_\_\_\_ :ستيلبين , - سيكلوديكستريين الهيدروكسي بروبييل - سيكلوديكستريين , تقنية

, تقنية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و طيف الكتلة , النمذجة الجزيئية.

---

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma  
vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la Mémoire de Mon Père*

*A Ma Chère Mère*

*A Mon Cher Mari*

*A Mes Deux Frères*

*A Mes Deux Sœurs*

*A toute Ma Famille et ma belle famille*

*A Tous ceux qui m'ont soutenu et  
encouragé pendant mes études*

*Je dédie Ce Modeste Travail*

---

## **REMERCIEMENTS**

*Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de chimie Appliquée (LCA) de l'université du 8 Mai 1945 Guelma, sous la direction de Mme **AMIRA-GUEBAILIA HABIBA**.*

*Je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail :*

*Je souhaite remercier en premier lieu ma directrice de thèse, **Madame AMIRA-GUEBAILIA HABIBA**, Docteur Maître de Conférences à l'Université du 8 Mai 1945 de Guelma, pour son encadrement, et tous les précieux conseils qu'elle m'a donnés. Je lui suis également reconnaissante pour sa disponibilité et ses qualités pédagogiques et scientifiques. J'ai beaucoup appris à ses côtés. Quand il le fallait pour discuter des résultats, pour confronter nos idées, pour imaginer de nouvelles pistes de recherche, vous avez toujours pu être à mes côtés et même quand les résultats n'étaient pas là... votre force de caractère et votre patience étaient d'un grand réconfort pour moi. Votre amour(le mot n'est pas trop fort) pour la phytochimie et votre façon de travailler, m'ont permis d'apprendre beaucoup dans ce domaine et sont un exemple à suivre. Le travail avec vous était une opportunité et une grande chance pour moi, Je vous dois tout mon respect et ma profonde gratitude.*

*J'adresse mes vifs remerciements à **Mr Rabah Oumeddour**, professeur à l'université de Guelma, la définition même de la générosité et de la gentillesse, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.*

*Mes remerciements les plus chaleureux sont adressés à **Mr Mohamed Abdaoui**, professeur à l'université de Guelma, et directeur du Laboratoire (LCA), dont je suis membre, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner mon travail de thèse. Qu'il soit aussi remercié pour tous les efforts qu'il fournit pour la progression de notre laboratoire et de la recherche en chimie à l'université de Guelma. Merci aussi d'avoir initié l'idée de l'étude de la stabilité des biomolécules par complexation, dont nous nous sommes inspirées dans ce travail.*

---

*Je voudrais réserver de grands mercis aux examinateurs de cette thèse **Mr Akkal Salah et Mr SALHI Ramdane**, professeurs à l'université Mentouri de Constantine, et **Mr GHERRAF Noureddine**, professeur à l'université d'Oum el bouaghi, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés d'examiner mon travail.*

*Je tiens également à exprimer une reconnaissance toute particulière à **Madame Djemil Rayenne**, Maître de Conférences à l'Université du 8 Mai 1945 de Guelma, pour son soutien moral et son aide précieuse dans la partie théorique. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude.*

*Un grand merci à **Mr Omar Houache**, professeur à l'université de Sultan Qaboos, Omane.*

*Je souhaite aussi remercier toutes les personnes de l'unité de recherche en technologie industriel (URTI/CSC), Université Badji Mokhtar Annaba, où j'ai travaillé comme attachée de recherche, pour trois ans. Je remercie aussi et mes collègues membres du laboratoire (LCA) avec qui j'ai travaillé (ou pas), mangé au RU (ou pas), discuté de tout et de rien mais surtout que j'ai eu le plaisir de côtoyer tout au long de ces 5 dernières années.*

*Mes remerciements vont également aux équipes des différents laboratoires avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler : laboratoire de groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB), Université de Victor Segalen Bordeaux2, France et la plateforme d'analyse RMN à l'université de Barcelone, Espagne.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ces années, je pense particulièrement à ma famille et mes amis.*

---

## Liste des Figures

|                      |   |           |
|----------------------|---|-----------|
| <b>Figure I.1 :</b>  | Schéma simplifié des voies principales conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec le métabolisme primaire  | <b>10</b> |
| <b>Figure I.2 :</b>  | Exemples de cépages de <i>Vitis vinifera</i> .  | <b>11</b> |
| <b>Figure I.3 :</b>  | les activités biologiques des polyphénols   | <b>14</b> |
| <b>Figure I.4 :</b>  | Structure de cinq stilbènes de la vigne   | <b>15</b> |
| <b>Figure I.5 :</b>  | Structure chimique du (a) <i>trans</i> et (b) <i>cis</i> -resvératrol   | <b>16</b> |
| <b>Figure I.6 :</b>  | Quelques plantes contenant le resvératrol   | <b>17</b> |
| <b>Figure I.7 :</b>  | Activité biologique du resvératrol  | <b>19</b> |
| <b>Figure I.8 :</b>  | Structure du picéatannol  | <b>20</b> |
| <b>Figure I.9 :</b>  | Evolution du nombre de publications concernant les cyclodextrines   | <b>23</b> |
| <b>Figure I.10 :</b> | structures de l' $\alpha$ - (n=6) <b>(a)</b> , $\beta$ - (n=7) <b>(b)</b> et $\gamma$ - (n=8) <b>(c)</b> cyclodextrines. d) structure de l'unité répétitive constituant les cyclodextrines et nomenclature commune des atomes                 | <b>24</b> |
| <b>Figure I.11 :</b> | a),b) représentation schématique de la forme d'une cyclodextrine et du positionnement des différentes fonctions   | <b>25</b> |
| <b>Figure I.12 :</b> | Représentation schématique des structure 3-dimensionnelle et des différentes zones de polarité des cyclodextrines   | <b>26</b> |
| <b>Figure I.13 :</b> | Densités de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des cyclodextrines d'après la référence  | <b>27</b> |
| <b>Figure I.14 :</b> | Représentation des familles de cyclodextrine amphiphiles  | <b>31</b> |
| <b>Figure I.15 :</b> | L'inclusion d'une molécule à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine   | <b>34</b> |
| <b>Figure II.1 :</b> | Organigramme de la modélisation moléculaire   | <b>48</b> |
| <b>Figure IV.1 :</b> | Chromatogramme HPLC de la fraction contenant le resvératrol et le picéatannol (appareil : HPLC -DAD, Varian, France).   | <b>66</b> |
| <b>Figure IV.2 :</b> | Plaque CCM montrant le resvératrol et le picéatannol, CCM en mode normal, éluant : CHCl <sub>3</sub> /MeOH/CH <sub>3</sub> COOH (v/v/v = 85/15/3), réactif de révélation H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Et OH/anisaldéhyde (v/v/v = 5/90/5). | <b>66</b> |
| <b>Figure IV.3 :</b> | Certaines propriétés des Picéatannol et Resveratrol utilisées   | <b>67</b> |
| <b>Figure IV.4 :</b> | Chromatogramme du picéatannol pur utilisé   | <b>68</b> |
| <b>Figure IV.5 :</b> | Spectre UV du picéatannol   | <b>68</b> |



---

|                       |   |    |
|-----------------------|---|----|
| <b>Figure IV.6 :</b>  | Spectre de masse du picéatannol   | 70 |
| <b>Figure IV.7 :</b>  | Spectre <sup>1</sup> H RMN du resvératrol   | 70 |
| <b>Figure IV.8 :</b>  | Certaines propriétés des cyclodextrines utilisées   | 71 |
| <b>Figure IV.9 :</b>  | (A) Diminution du temps de rétention du picéatannol en présence de concentrations croissantes de β-CD (0; 0,5; 2; 3 et 4mM) dans la phase mobile. (n = 3).<br>(B) les chromatogrammes HPLC du picéatannol en présence de concentrations croissantes de β-CD dans la phase mobile MeOH-eau (30/70, V/V) .                    | 77 |
| <b>Figure IV.10 :</b> | (A) Diminution du temps de rétention du picéatannol en présence des concentrations croissantes de HP-β-CD (0; 0, 5;2; 3 et 4 mM) dans la phase mobile (n = 3).<br>(B) Histogrammes rapportant une diminution de temps de rétention du picéatannol en présence de concentrations croissantes de HP-β-CD dans la phase mobile | 78 |
| <b>Figure IV.11 :</b> | (A, A') Histogrammes rapportant une diminution du temps de rétention du resvératrol en présence de concentrations croissantes de β-CD (0; 0, 5;2; 3 et 4 mM) dans la phase mobile ,n=3.   | 79 |
| <b>Figure IV.12 :</b> | Histogrammes rapportant une Diminution du temps de rétention de resvératrol en présence de concentrations croissantes de HP-β-CD (0; 0, 5; 2; 3 et 4 mM) dans la phase mobile à 25±1°C .  | 79 |
| <b>Figure IV.13 :</b> | Corrélation entre Log K du picéatannol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau) ,(♦) sans β-CD dans la phase mobile; (▲) avec 2mM β-CD dans la phase mobile;(Δ) avec 4mM β-CD dans la phase mobile. (n = 3).  | 82 |
| <b>Figure IV.14 :</b> | Corrélation entre Log K du picéatannol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau). (♦) Sans HP-β-CD dans la phase mobile; (▲) avec 2mM HP-β-CD dans la phase mobile;(■) avec 4mM HP-β-CD dans la phase mobile.(n = 3).  | 82 |
| <b>Figure IV.15 :</b> | Corrélation entre Log K du resvératrol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau) ,(♦) Sans β-CD dans la phase mobile; (■) avec 2mM β-CD dans la phase mobile;(▲) avec 4 mM β-CD dans la phase mobile. (n = 3).   | 83 |

---

|                       |   |            |
|-----------------------|---|------------|
| <b>Figure IV.16 :</b> | Corrélation entre Log K du resvératrol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau). (♦) Sans HP-β-CD dans la phase mobile; (■) avec 2mM HP-β-CD dans la phase mobile;(▲) avec 4mM HP-β-CD dans la phase mobile. (n = 3). | <b>83</b>  |
| <b>Figure IV.17 :</b> | Constante de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe picéatannol/β-CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile.  | <b>88</b>  |
| <b>Figure IV.18 :</b> | Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe picéatannol / HP-β-CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile (méthanol-eau).   | <b>88</b>  |
| <b>Figure IV.19 :</b> | Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe resvératrol/ β-CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile (méthanol-eau).   | <b>89</b>  |
| <b>Figure IV.20 :</b> | Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe resvératrol/HP-β-CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile.  | <b>89</b>  |
| <b>Figure IV.21 :</b> | L'équation de Van't Hoff ( $\ln(K_F)$ vs $1/T$ ) pour le complexe picéatannol/β-CD avec un mélange méthanol-eau (30-70%, v/v) de phase mobile.  | <b>90</b>  |
| <b>Figure IV.22 :</b> | Equation de Van 't Hoff ( $\ln(K_F)$ vs $1/T$ ) pour le complexe PIC/β-CD et PIC /HP-β-CD, phase mobile : 30-70%, v/v, MeOH-eau.  | <b>91</b>  |
| <b>Figure IV.23 :</b> | Equation de Van 't Hoff ( $\ln(K_F)$ vs $1/T$ ) pour le complexe RES/β-CD et RES /HP-β-CD, phase mobile : 30-70%, v/v, MeOH-eau,  | <b>91</b>  |
| <b>Figure IV.24 :</b> | Disposition des protons de la cyclodextrine   | <b>97</b>  |
| <b>Figure IV.25 :</b> | Spectre RMN $^1H$ de la β-CD  | <b>97</b>  |
| <b>Figure IV.26 :</b> | Spectre RMN $^1H$ de l'HP-β-CD dans le DMSO   |            |
| <b>Figure IV.27 :</b> | Spectre $C^{13}$ RMN de la β-CD dans DMSO-d6  | <b>99</b>  |
| <b>Figure IV.28 :</b> | Spectres ESI TOF (+) du complexe $C_1$  | <b>102</b> |
| <b>Figure IV.29 :</b> | les spectres ESI TOF (+) du complexe $C_2$  | <b>102</b> |
| <b>Figure IV.30 :</b> | Schéma global du complexe d'inclusion du picéatannol en présence de la β-CD   | <b>103</b> |
| <b>Figure IV.31 :</b> | Structures de la β-cyclodextrine (gauche) et du picéatannol   | <b>104</b> |

---

(droite).

|                       |   |            |
|-----------------------|---|------------|
| <b>Figure IV.32 :</b> | les deux orientations (A et B) du picéatannol vers la cavité de la cyclodextrine  | <b>105</b> |
| <b>Figure IV.33 :</b> | Energies de liaison du complexe d'inclusion PIC / $\beta$ -CD en différentes positions Z ( $\text{\AA}$ ), pour les deux orientations A et B. | <b>107</b> |
| <b>Figure IV.34 :</b> | Structures des complexes PIC/ $\beta$ -CD obtenu par un calcul PM3 correspondants aux deux orientations A et B du PIC.                        | <b>111</b> |
| <b>Figure IV.35 :</b> | Les orbitales HOMO et LUMO du picéatannol   | <b>115</b> |

### Liste des Tableaux

|                     |   |           |
|---------------------|---|-----------|
| <b>Tableau I.1</b>  | Exemples de structures de différentes classes de composés phénoliques   | <b>12</b> |
| <b>Tableau I.2</b>  | Liste non exhaustive de stilbènes identifiés dans les sarments de <i>Vitis vinifera</i> .   | <b>15</b> |
| <b>Tableau I.3</b>  | Principales caractéristiques et dimensions de l' $\alpha$ -, $\beta$ - et $\gamma$ - cyclodextrines   | <b>28</b> |
| <b>Tableau I.4</b>  | Solubilité en g/100 ml (25°C) des cyclodextrines dans quelques solvants   | <b>29</b> |
| <b>Tableau I.5</b>  | Les cyclodextrines naturelles et leurs dérivés d'intérêts pharmaceutiques   | <b>30</b> |
| <b>Tableau IV.1</b> | Données RMN 1H du trans-picéatannol dans l'acétonitrile <i>d</i> -3   | <b>69</b> |
| <b>Tableau IV.2</b> | Données RMN 1H du <i>trans</i> -resvératrol dans l'acétonitrile <i>d</i> -3   | <b>71</b> |
| <b>Tableau IV.3</b> | Coefficients de corrélation pour les complexes PIC / $\beta$ -CD pour des stœchiométries 1:1 et 1:2 pour différents mélanges MeOH- eau.   | <b>75</b> |
| <b>Tableau IV.4</b> | Effet des additives dans la phase mobile sur le facteur de capacité de picéatannol (K). (n = 3).  | <b>81</b> |
| <b>Tableau IV.5</b> | Effet des additives dans la phase mobile sur le facteur de capacité de resvératrol (K) (n = 3).   | <b>81</b> |
| <b>Tableau IV.6</b> | Détermination des facteurs de capacité du picéatannol pour trois différents pourcentage méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contient des concentrations de 0 à 4 mM de $\beta$ -CD .(n = 3).    | <b>85</b> |
| <b>Tableau IV.7</b> | Détermination des facteurs de capacité du picéatannol pour trois différents pourcentage méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contient des concentrations de 0 à 4 mM de HP- $\beta$ -CD.(n = 3). | <b>86</b> |

---

|                      |  |            |
|----------------------|--|------------|
| <b>Tableau IV.8</b>  | Détermination des facteurs de capacité du resvératrol pour trois différents pourcentages méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4 mM de $\beta$ -CD. (n = 3).   | <b>86</b>  |
| <b>Tableau IV.9</b>  | Détermination des facteurs de capacité du resvératrol pour trois différents pourcentages méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4 mM de HP- $\beta$ -CD, (n = 3).   | <b>86</b>  |
| <b>Tableau IV.10</b> | Les valeurs des constantes de formation apparentes ( $K_F$ ) pour les deux complexes PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD et RES/ $\beta$ -CD et RES/HP- $\beta$ -CD à 25°C dans un mélange moyen méthanol: eau (30:70%).   | <b>90</b>  |
| <b>Tableau IV.11</b> | Paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusions de PIC/CDs à 25 ° $\pm$ 0,2° C.   | <b>91</b>  |
| <b>Tableau IV.12</b> | Paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusions de RES/CDs à 25 ° $\pm$ 0,2° C.   | <b>92</b>  |
| <b>Tableau IV.13</b> | Les propriétés des complexes PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD obtenus   | <b>94</b>  |
| <b>Tableau IV.14</b> | Déplacements chimiques en RMN $^1$ H ( $\delta$ en ppm), de la $\beta$ -CD et du complexe PIC/ $\beta$ -CD dans le DMSO-d <sub>6</sub> , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\beta\text{-CD libre}}$ ).   | <b>96</b>  |
| <b>Tableau IV.15</b> | Déplacements chimiques RMN $^1$ H ( $\delta$ en ppm), de l'HP- $\beta$ -CD et du complexe d'inclusion PIC/HP- $\beta$ -CD dans le DMSO-d <sub>6</sub> , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\text{HP-B-CD libre}}$ ).   | <b>98</b>  |
| <b>Tableau IV.16</b> | Attribution des signaux du spectre $^{13}$ C RMN de la $\beta$ -CD, ( $\delta$ en ppm), et du complexe d'inclusion PIC/ $\beta$ -CD dans DMSO-d <sub>6</sub> , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\beta\text{-CD libre}}$ ).                                       | <b>99</b>  |
| <b>Tableau IV.17</b> | Attribution des signaux du spectre $^{13}$ C RMN de l'HP- $\beta$ -CD ( $\delta$ en ppm), et du complexe d'inclusion PIC/HP- $\beta$ -CD dans le DMSO-d <sub>6</sub> , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\text{HP-B-CD libre}}$ ).                                | <b>100</b> |
| <b>Tableau IV.18</b> | Caractérisation des deux complexes d'inclusion par spectroscopie de masse.   | <b>103</b> |
| <b>Tableau IV.19</b> | Energies de liaison ( $E_{\text{binding}}$ ) pour les deux orientations <b>A</b> et <b>B</b> .   | <b>108</b> |
| <b>Tableau IV.20</b> | Energies optimisées ( $E_{\text{opt}}$ ), énergies de liaison, énergies de complexation PIC/ $\beta$ -CD ( $E_{\text{complex}}$ ), énergies de déformation de la $\beta$ -CD ( $\text{DEF}_{\beta\text{-CD}}$ ) et du PIC ( $\text{DEF}_{\text{PIC}}$ ), pour les deux orientations. | <b>109</b> |
| <b>Tableau IV.21</b> | Paramètres thermodynamiques des complexes selon les deux orientations.   | <b>111</b> |
| <b>Tableau IV.22</b> | les énergies de l'HOMO et de la LUMO obtenues par le calcul PM3 du complexe PIC/ $\beta$ -CD.  | <b>113</b> |

---

---

## Liste des schémas

- Schémas IV.1** Equilibres proposé pour un complexe d'inclusion de picéatannol /  $\beta$ -CD avec une stœchiométrie (A); 1:1, (B) 1:2. 75
- Schémas IV.2** Equilibres proposé pour un complexe d'inclusion de resvératrol /  $\beta$ -CD avec une stœchiométrie (A); 1:1, (B) 1:2. 75

---

## *Liste des abréviations et symboles*

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>CD :</b>               | Cyclodextrine   |
| <b>PIC</b>                | picéatannol   |
| <b>Res :</b>              | resvératrol   |
| <b>β-CD:</b>              | béta-cyclodextrine  |
| <b>HP-β-CD:</b>           | hydroxypropyle-béta-cyclodextrine                               |
| <b><sup>13</sup>CRMN</b>  | RMN de Carbone 13   |
| <b><sup>1</sup>HRMN :</b> | RMN de proton   |
| <b>AcOEt:</b>             | Acetate d'éthyl   |
| <b>MeOH :</b>             | Méthanol  |
| <b>R<sub>f</sub>:</b>     | Rapport frontal   |
| <b>S :</b>                | singulet  |
| <b>t :</b>                | triplet   |
| <b>ESI TOF :</b>          | Ionisation par électron ébuliseur, Spectrométrie à temps de vol |
| <b>Uma :</b>              | Unité de Masse Atomique   |
| <b>nm :</b>               | Nanomètre   |
| <b>MNDO:</b>              | Modified Neglect of Diatomic Overlap                            |
| <b>SAM<sub>1</sub>:</b>   | Semi-empirical <i>Ab initio</i> Method version 1                |
| <b>B3LYP:</b>             | Becke 3-parameters Lee-Yang-Parr.                               |
| <b>DFT:</b>               | Density Functional Theory                                       |
| <b>MO:</b>                | Molecular Orbital   |
| <b>HOMO:</b>              | Highest Occupied Molecular Orbital                              |
| <b>LUMO :</b>             | Lowest Unoccupied Molecular Orbital                             |
| <b>MM:</b>                | Mécanique moléculaire   |
| <b>λ<sub>max</sub> :</b>  | Maximum d'absorption  |
| <b>DMSO</b>               | diméthylsulfoxyde   |
| <b>CI:</b>                | Configuration Interaction                                       |
| <b>AM1</b>                | Austin Model1   |
| <b>TFA :</b>              | Trifluoroacetic acid  |
| <b>m/z :</b>              | Rapport masse/charge électrique                                 |

---

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>m :</b>               | Multiplet  |
| <b>NDDO:</b>             | Neglect of Diatomic Differential Overlap                               |
| <b>PM3:</b>              | Parametrized Model number 3  |
| <b>PM6:</b>              | Parametric Method 6  |
| <b>CHCl<sub>3</sub>:</b> | Chloroform   |
| <b>QM/MM:</b>            | Quantum mechanics/ Molecular mechanics                                 |
| <b>OL:</b>               | Orbitale localisée   |
| <b>RMN :</b>             | Résonance Magnétique Nucléaire   |
| <b>CLHP:</b>             | Chromatographie Liquid Haute Performance                               |
| <b>δ ppm:</b>            | Déplacement chimique exprimé en partie par million                     |
| <b>mL</b>                | Millilitre   |
| <b>CCM</b>               | Chromatographie sur couche mince                                       |
| <b>ONIOM:</b>            | Our Own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics |

---

## Sommaire

|                         |      |
|-------------------------|------|
| Résumé                  | i    |
| Liste des Figures       | vii  |
| Liste des tableaux      | xi   |
| Liste des schémas       | xiii |
| Abréviation et symboles | xiv  |
| Introduction .....      | 01   |

### Chapitre I : Rappels Bibliographiques

#### *PARTIE 1*

|  |    |
|--|----|
| I.1.1 Le métabolisme secondaire.....                               | 09 |
| I.1.2 Les composés phénoliques ou les polyphénols de la vigne..... | 10 |
| I.1.3 Classification des composés phénoliques.....                 | 13 |
| I.1.3.1 Les composés phénoliques du raisin.....                    | 13 |
| I.1.4 Propriétés biologiques des polyphénols.....                  | 13 |
| I.1.5 Les stilbènes.....   | 14 |
| I.1.5.1 Le resvératrol.....  | 16 |
| I.1.5.1.1 Activités biologiques du resvératrol.....                | 17 |
| I.1.5.1.1.1 Activité antioxydante... ..                            | 17 |
| I.1.5.1.1.2 Le domaine cardiovasculaire.....                       | 17 |
| I.1.5.1.1.3 Activité immunomodulatrice.....                        | 18 |
| I.1.5.1.1.4 Activités anticancéreuses.....                         | 18 |
| I.1.5.2 Le picéatannol.....  | 19 |
| I.1.6 Propriétés des polyphénols.....                              | 20 |
| I.1.6.1 Biodisponibilité.....                                      | 20 |
| I.1.6.2 Solubilité des polyphénols dans l'eau.....                 | 21 |

#### *PARTIE 2*

#### *Les Cyclodextrines*

|   |    |
|---|----|
| I.2 Les Cyclodextrines.....                           | 22 |
| I.2.1 Historiques.....                                | 22 |
| I.2.2 Structure et propriétés.....                    | 23 |
| I.2.3 Les caractéristiques des cyclodextrines.....    | 26 |
| I.2.4 La solubilité dans les solvants organiques..... | 29 |
| I.2.5 Les dérivés des cyclodextrines.....             | 29 |
| I.2.6 Utilisation des cyclodextrines.....             | 31 |

#### *PARTIE 3*

#### *les complexes d'inclusions*

|   |    |
|---|----|
| I.3 les complexes d'inclusion des cyclodextrines.....                 | 33 |
| I.3.1 Le mécanisme de formation.....                                  | 33 |
| I.3.2 Forces de liaison impliquée dans les complexes d'inclusion..... | 34 |
| I.3.3 Aspect thermodynamique et constante d'association.....          | 35 |



|           |  |    |
|-----------|--|----|
| I.3.4     | Caractéristiques des complexes d'inclusion.....                          | 36 |
| I.3.4.1   | stoechiométrie.....  | 36 |
| I.3.4.2   | Détermination de la constante de formation.....                          | 36 |
| I.3.5     | Les techniques de préparation des complexes avec les cyclodextrines..... | 37 |
| I.3.5.1   | La Co-précipitation.....   | 37 |
| I.3.5.2   | Complexation par extrusion.....  | 37 |
| I.3.5.3   | Complexation par malaxage physique.....                                  | 37 |
| I.3.5.4   | Complexation en suspension.....  | 38 |
| I.3.6     | Méthodes de caractérisation des complexes.....                           | 38 |
| I.3.6.1   | Chromatographie Liquide à Haute Performance.....                         | 38 |
| I.3.6.2   | Etude par spectrométrie.....   | 39 |
| I.3.6.2.1 | La spectroscopie UV-Vis.....   | 39 |
| I.3.6.2.2 | La spectroscopie infrarouge.....   | 39 |
| I.3.6.2.3 | La Résonance Magnétique Nucléaire.....                                   | 39 |
| I.3.7     | Facteurs importants pour la réaction de complexation.....                | 40 |
| I.3.7.1   | la température.....  | 40 |
| I.3.7.2   | Le solvant.....  | 40 |
| I.3.8     | Avantages de la complexation.....  | 41 |
| I.3.9     | Applications des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines...        | 41 |

## Chapitre II : Méthodes théoriques

|          |  |    |
|----------|--|----|
| II.      | Introduction.....                      | 48 |
| II.1     | Méthodes de Mécaniques Quantiques..... | 49 |
| II.1.1   | Généralités.....                       | 49 |
| II.1.2   | Les méthodes semi-empiriques.....      | 51 |
| II.1.2.1 | La méthode AM1.....                    | 53 |
| II.1.2.2 | La méthode PM3.....                    | 54 |
| II.1.2.3 | La méthode PM6.....                    | 55 |

## Chapitre III Matériels et Méthodes

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| III.      | Techniques de séparation.....  | 57 |
| III.1     | Conditions générales.....  | 57 |
| III.2     | Techniques spectroscopiques et spectrométriques.....   | 58 |
| III.3     | Extraction du matériel végétal .....   | 59 |
| III.3.1   | Broyage et Macération.....   | 59 |
| a.        | Extraction liquide- liquide.....   | 60 |
| III. 4    | Etude physico-chimique du complexe d'inclusions.....   | 60 |
| III.4.1   | Préparation des complexes d'inclusion (RES / $\beta$ -CD, PIC / $\beta$ -CD, RES / HP- $\beta$ -CD et PIC /HP- $\beta$ -CD), en solution ..... | 60 |
| III.4.1.1 | Mode Opératoire général.....   | 60 |
| III.4.1.2 | Préparation de la phase mobile.....  | 61 |
| III.4.1.3 | Détermination des constantes de stabilité des complexes  | 62 |

|   |    |
|---|----|
| d'inclusions (KC).....                                |    |
| III.4.1.3.1 Détermination du temps mort.....          | 62 |
| III.4.1.4 Etude de l'effet de la Température.....     | 63 |
| III.5 Evaluation et analyse statistique.....          | 64 |
| III.6. Préparation des complexes à l'état solide..... | 64 |

## Chapitre IV. Résultats et Discussions

|   |     |
|---|-----|
| IV.1 Caractéristiques des molécules invitées.....   | 66  |
| IV.1.1 Interprétation des spectres RMN du picéatannol.....  | 68  |
| IV.2 Etude des complexes d'inclusion en solution.....   | 71  |
| IV.2.1 Détection de la formation des complexes d'inclusion en solution.....   | 71  |
| IV.2.2 Paramètres de performance.....   | 72  |
| IV. 2.2.1 Facteur de capacité.....  | 72  |
| IV.2.2.1.1 Calcul du temps mort $t_0$ ( $t_m$ ).....  | 72  |
| IV.2.2.3 Mécanisme de complexation du RES/ $\beta$ -CD, RES/HP- $\beta$ -CD, PIC/ $\beta$ -CD, PIC/HP- $\beta$ -CD..... | 72  |
| IV.2.2.4 Détermination chromatographique de la constante apparente d'association.....                                   | 76  |
| IV.2.2.5 Sélection d'un solvant organique de la phase mobile :  | 80  |
| IV.2.2.6 L'effet des additifs dans la phase mobile sur la rétention de l'invité.....                                    | 80  |
| IV.2.2.7 Effet de la concentration et le pourcentage du méthanol sur la rétention de l'invité.....                      | 81  |
| IV.2.2.8 Effet de la concentration de la $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD sur la rétention de l'invité.....             | 84  |
| IV.2.2.9 Effet du pourcentage du méthanol sur les constantes de formation apparentes.....                               | 87  |
| IV.2.2.10 Effet de la température sur les constantes apparentes de formation.....                                       | 89  |
| IV.2.2.11 Détermination des paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusions.....                                 | 92  |
| IV.3 Détection de la formation des complexes d'inclusion PIC / $\beta$ -CD et PIC /HP- $\beta$ -CD à l'état solide..... | 95  |
| IV.3.1 Caractérisation spectrale des complexes d'inclusion à l'état solide.....   | 95  |
| IV.3.1.1 Etude des complexes d'inclusion par RMN $^1\text{H}$ .....   | 96  |
| IV.3.1.2 Etude des complexes d'inclusion par la RMN $^{13}\text{C}$ .....   | 101 |
| IV.3.1.3 Etude des complexes d'inclusion par spectrométrie de masse (ESI -TOF (+) 175V).....                            | 104 |

### *Etude par modélisation moléculaire du complexe d'inclusion du picéatannol avec $\beta$ -cyclodextrine*

|                        |     |
|------------------------|-----|
| IV.4 Introduction..... | 108 |
|------------------------|-----|

|   |     |
|---|-----|
| IV.5 Simulation par la méthode semi-empirique PM3.....                                    | 108 |
| IV.5.1 Structures de Départ.....  | 108 |
| IV.5.2 Construction du modèle .....   | 108 |
| IV.6 Analyse des résultats .....  | 110 |
| IV.6.1 Résultats du calculs.....  | 110 |
| IV.6.1.1 Recherche du minimum .....   | 110 |
| IV.6.1.2 Les énergies de déformation.....   | 114 |
| IV.6.1.3 Analyse thermodynamique du processus de complexation de<br>la B-CD avec PIC..... | 115 |
| IV.6.1.4 Approximation des orbitales frontières.....                                      | 116 |
| Conclusions.....  | 119 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....  | 123 |



## INTRODUCTION

Les produits phytonaturels offrent des intérêts multiples, judicieusement exploités par les industries notamment, agroalimentaire, cosmétologique, et pharmaceutique. En effet, un grand nombre des médicaments mis récemment sur le marché sont d'origine végétale, citons à titre d'exemple, le taxol, un anticancéreux, qui n'est autre qu'un triterpène isolé de l'if (*Taxus baccata*). La lovastatine, un hypocholestérolémiant, est un composé isolé chez *Aspergillus terreus* (levure de riz rouge). Ces molécules naturelles exploitables par l'être humain à des fins pharmaceutiques sont appelées métabolites secondaires, par opposition aux métabolites primaires biosynthétisés par les plantes pour subvenir à leur propres besoins.

Parmi les métabolites secondaires, le groupe des composés phénoliques suscite un grand intérêt sur le plan pharmacologique. Cependant ces molécules sont en majorité biologiquement actives *in vitro* mais leur activité se trouve amoindrie *in vivo* est ceci est dû principalement à leurs faibles hydrosolubilité et biodisponibilité.

L'un des moyens les plus utilisés actuellement pour contourner ce problème est la formation des complexes d'inclusion avec la  $\beta$ -CD ou ses dérivés. Mettre en évidence la formation de ces complexes par des moyens que ce soient permet de conclure sur l'amélioration des propriétés des molécules invitées. En effet, l'encapsulation d'un principe actif par une cyclodextrine permet d'augmenter sa solubilité aqueuse, sa vitesse de dissolution et par conséquent d'accroître sa biodisponibilité. La bibliographie est submergée d'exemples de

molécules encapsulées dans des cyclodextrines. Ces dernières sont utilisées pour augmenter la solubilité de l'ibuprofène, le nimésulide [1] et le naproxène [2] qui sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens, le terféndine et la cinnarizine [3] qui sont des antihistaminiques ou le miconazole [4] et le kétoconazole [5] qui sont des antimycosiques, et ceci est pour ne citer que quelques exemples.

Par ailleurs, le principal inconvénient de la plupart des stilbènes biologiquement actifs, à l'instar de la plus grande majorité des polyphénols, est leur faible solubilité dans l'eau et par voie de conséquence dans les liquides biologiques. Ceci implique inéluctablement une faible biodisponibilité de ces substrats.

Le resvératrol, un composé ayant des activités biologiques prometteuses, est le stilbène le plus étudié en termes de son interaction avec les CDs tant à l'état de solution qu'à l'état solide. Lopez-Nicolas et al. [6] ont étudié la complexation du resvératrol avec la  $\beta$ -CD en utilisant l'HPLC. Avec phase mobile, un mélange méthanol-eau dans une étude reportée en 2006. Ultérieurement, en 2008 ces mêmes auteurs ont utilisé l'eau pure comme phase mobile [7].

Par surcroît, des études du mécanisme de complexation resvératrol/CDs et leur stabilité ont été menées par modélisation moléculaire [8].

En plus du resvératrol, des résultats sur la variation de la rétention en HPLC à polarité de phase inversée (RP-HPLC), en présence et en absence de CDs

dans la phase mobile, ont été récemment reportés pour d'autres stilbènes comme, l'oxyresvératrol [9], le ptérostilbène [10] et la pinosilvine [11].

Le picéatannol (trans-3, 5, 3', 4'-tetrahydroxystilbène) est un stilbène qui a été isolé à partir de plusieurs plantes comme la vigne (*Vitis vinefera. L*) (pélicule des raisins, rafles et sarments) la rhubarbe, les mûres et la canne à sucre [12].

Le picéatannol est un analogue du resvératrol possédant un groupement hydroxyle supplémentaire, au voisinage du groupement actif 4'-OH du resvératrol. Des études ont suggéré que le picéatannol est dérivé du resvératrol via les cytochromes P450 1B1 [13]. Les activités biologique; antioxydante, chimio-préventive, anti-leucémique, anti-cardiovasculaire et anti-tumorigénique *in vivo* et *in vitro* sont les principales activités rapportées pour le picéatannol [14,15].

Une étude a reporté que le picéatannol possède une faible absorption intestinale d'autant plus que la fraction absorbée est métabolisée en un dérivé glucuronide, détecté dans le plasma [16].

Tout comme le resvératrol, un potentiel pharmacologique important caractérise le picéatannol mais une solubilité limitée dans l'eau pourrait être un véritable handicap quant à l'utilisation de ce métabolite dans les industries alimentaire et pharmaceutique et à l'instar d'une multitude de principes actifs naturels ou de synthèse, l'inclusion avec les cyclodextrines est un choix avisé pour pallier les problèmes rencontrés dans l'administration de composés hydrophobes.

Pour cette raison, nous avons procédé à l'étude des complexes d'inclusion du picéatannol /  $\beta$ -CD et picéatannol / HP- $\beta$ -CD, en solution sous différentes conditions physico-chimiques et à l'état solide.

↻ A l'état solide, les complexes ont été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et spectrométrie de masse en mode positif et avec « l'electrospray » comme moyen d'ionisation.

↻ Le but de l'étude en solution, suivie par HPLC est multiple: **(i)** Dans un premier temps nous avons déterminé le mécanisme de la complexation de l'invité dans un système à polarité de phase inversée impliquant la formation de complexe d'inclusion avec les CDs dans la phase mobile, **(ii)** En second lieu nous avons procédé à la détermination chromatographique d'une manière quantitative des constantes d'association apparentes permettant d'évaluer la stabilité du complexe et de prévoir ainsi sa solubilité et sa biodisponibilité sous différentes conditions (composition du solvant organique pour la phase mobile); **(iii)** Ensuite nous avons étudié les effets de la concentration des CDs et du pourcentage du méthanol dans la phase mobile sur la rétention de l'invité, ainsi que la température de la colonne sur les constantes de formation apparente **(iv)** Et finalement nous avons calculé les paramètres thermodynamiques ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$ ) afin d'obtenir des informations sur les caractéristiques de l'affinité du picéatannol envers les CDs.



Pour réaliser ce travail, la méthodologie suivante a été adoptée :

- ✓ Isolement, purification et caractérisation des stilbènes à partir des fractions issues des sarments de vigne,
- ✓ Synthèse et caractérisation des complexes d'inclusion,
- ✓ Mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion picéatannol / $\beta$ -CD, picéatannol /HP- $\beta$ -CD, resvératrol / $\beta$ -CD et resvératrol /HP- $\beta$ -CD en solution, au moyen d'une technique HPLC, rapide, sensitive et reproductible.
- ✓ Détermination des constantes de stabilité des complexes à différents gradient de solvants,
- ✓ Détermination des paramètres thermodynamiques des complexes à différentes valeurs de température,
- ✓ Analyses et caractérisation des complexes d'inclusion picéatannol / $\beta$ -CD et picéatannol /HP- $\beta$ -CD à l'état solide,
- ✓ Etude théorique par modélisation moléculaire des complexes d'inclusion picéatannol /  $\beta$ -CD.

Cette thèse est présentée en quatre chapitres.

Le premier chapitre intitulé « *Synthèse Bibliographique* » rassemblera l'ensemble des études déjà effectuées ayant apporté une connaissance générale ou spécifique sur les métabolites secondaires, notamment les stilbènes ainsi que les cyclodextrines, leurs propriétés et leurs domaines d'utilisation. Dans ce même chapitre, nous présentons également les

techniques d'études des complexes d'inclusion cyclodextrine - molécules invitées.

Le second chapitre donne un aperçu sur les différentes méthodes quantiques et semi-empiriques, sur lesquelles s'appuie notre partie théorique consistant en la simulation du mécanisme de complexation du picéatannol avec la  $\beta$ -CD.

Le chapitre « *Matériels et Méthodes* » portant le numéro trois, explicitera les techniques expérimentales utilisées ainsi que le matériel chimique et végétal, utilisé pour l'extraction, la purification ainsi que les techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées pour l'identification structurale des composés (polyphénols) à partir des sarments tout autant que les complexes d'inclusion synthétisés à l'état solide.

Le chapitre quatre est consacré aux « *Résultats et Discussion* » et décrit :

- La caractérisation structurale des molécules invitées,
- Les résultats détaillés de l'étude des complexes en solution par HPLC,
- La caractérisation par RMN du proton et du carbone 13 ainsi que par la spectrométrie de masse des complexes d'inclusion à l'état solide.
- Les résultats de l'étude théorique des complexes d'inclusion picéatannol/ $\beta$ -CD.

Une conclusion générale résumant les principaux résultats et les perspectives futures de ce travail clôturera ce manuscrit.

### Références bibliographiques

- [1]Piel G, 1997. Journal of Pharmaceutical Sciences. 86, p. 475-480.
- [2]Mura P, Maestrelli F, Cirri M, 2003. International Journal of Pharmaceutics. 260,p.293-302.
- [3]Redenti E, Szente L, Szejtli J, 2000. Journal of Pharmaceutical Sciences.89,p. 1-8.
- [4]Barillaro V, 2007. International Journal of Pharmaceutics. 342, p. 152-160.
- [5]Selva A, 1998. Journal of Mass Spectrometry.33,p. 729-734.
- [6]López-Nicolás J M, Delicado E N, Pérez-López A J, Barrachina AC, Cuadra-Crespo P, 2006. J Chromatogr. A. 1135,p.158.
- [7]López-Nicolás J M, García.Carmona F, 2008. Food Chem.109, p. 868.
- [8]Zhong L,Rong C, Hui L, Yeli H,Bo C, Guolin Z, 2009. J Incl Phenom Macrocycl Chem 63, p.295–300.
- [9]Rodríguez-Bonilla P, López-Nicolás JM, Carmona F G, 2010. J. Chromatogr. B 878 , p.1569.
- [10]López-Nicolás J M, Rodríguez-Bonilla P, Méndez-Cazorla L, García-Carmona F, 2009. J. Agric. Food Chem. 57,p.5294.
- [11]López-Nicolás J M, Rodríguez-Bonilla P, García-Carmona F, 2009. J. Agric. Food Chem. 57, p.10175.
- [12]Chang J K, Hsu Y L, Teng I C ,Kuo P L, 2006. Eur. J. Pharmacol. 551,p.1.
- [13]Potter G A, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia k C, Lamb J H, Farmer P B, Stanley L A, Burke M D, Br,2002.J. Cancer 86, p.774.
- [14] Roupe K, Teng X W, Fu X G, Meadows G G, Davies N M, 2004. Biomed. Chromatogr.18, p. 486.
- [15]Wesolowska O, Kuzdzal M, Strancar J, Michalak K, 2009. Biochim. Biophys. Acta 1788,p.1851.

[16]Roupe K A, Remsberg C M, Yanez J A, Davies NM, 2006. Curr .Clin. Pharmacol. 1,p.81.



**CHAPITRE I**  
**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

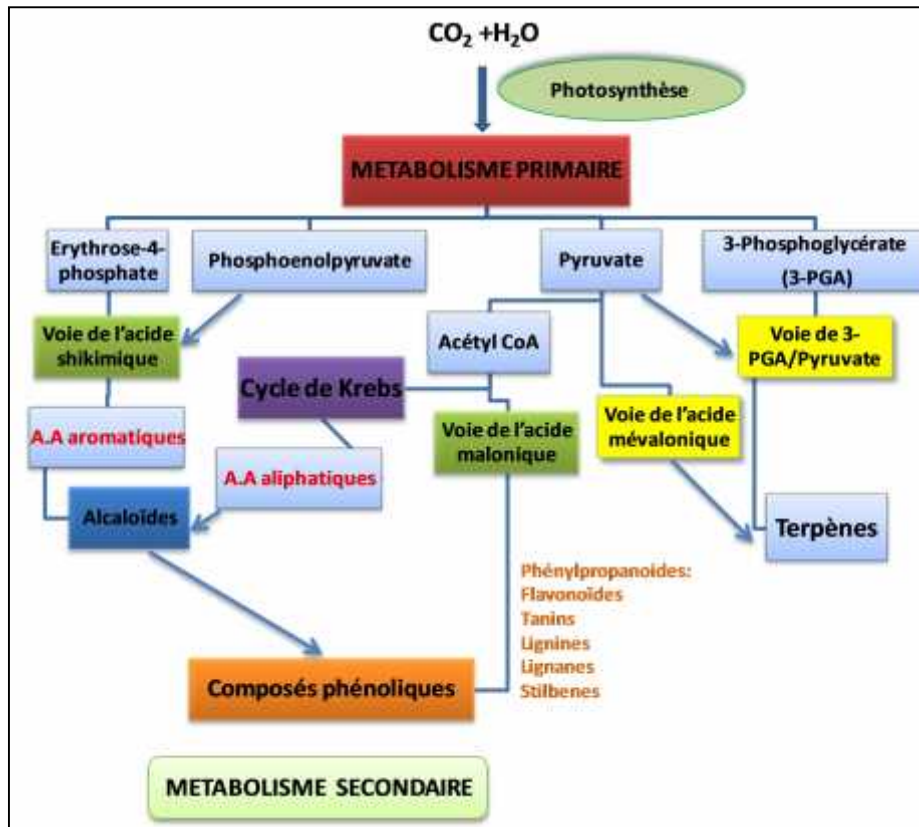
*Vitis vinifera* L.

## ***PARTIE 1***

### **I.1.1 Le métabolisme secondaire :**

L'importance majeure des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, en plus des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelques fois atteindre des valeurs élevées. La notion de « métabolite secondaire » a résulté initialement de trois groupes d'observations: d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, enfin une certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées [1].

Les métabolites secondaires sont, par définition, des composés organiques non indispensables à la croissance, ni au développement ni à la reproduction d'un organisme. Ils dérivent néanmoins de voies de biosynthèse provenant du métabolisme primaire et sont constitués principalement de trois grands groupes de composés: les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques [Figure (I.1)].



**Figure (I.1):** Schéma simplifié des voies principales conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec le métabolisme primaire. (A.A aromatique : Acide aminé aromatique et A.A aliphatique : Acide aminé aliphatique) [1].

### I.1.2 Les composés phénoliques ou les polyphénols de la vigne:

La vigne est une liane de la famille des vitacées qui comporte une dizaine de genres [2]. C'est une plante pérenne du genre *Vitis*, cultivée pour son fruit en grappes, le raisin. Parmi les différentes espèces de vigne cultivée dans le monde, la principale est, de très loin, (*Vitis Vinifera*) L. De cette espèce dérivent de nombreux cultivars (ou cépages) tels que le Cabernet, le Chardonnay, le Merlot ou le Muscat [Figure (I.2)].





Figure (I.2) : Exemples de cépages de *Vitis vinifera* [2].

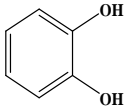
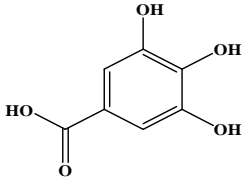
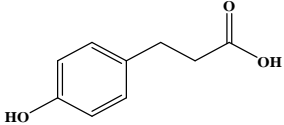
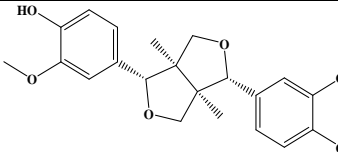

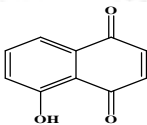
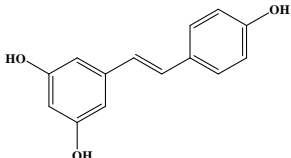
Le terme «*polyphénols*» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les mono-phénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono- di- et polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [1].

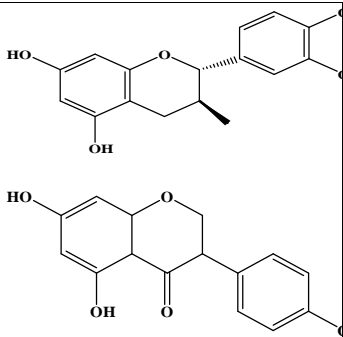
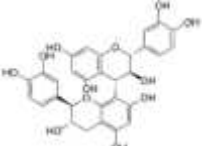
Les composés phénoliques forment un groupe diversifié de métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal et jouent des rôles essentiels pour la survie des végétaux en milieu terrestre [3]. Ils sont porteurs d'au moins une fonction phénol, c'est-à-dire d'un noyau aromatique lié à un ou plusieurs groupement (s) hydroxyle (s), modifié (s) ou non.

Ces polyphénols regroupent plusieurs milliers de molécules possédant une masse moléculaire entre 228 g.mol<sup>-1</sup> et 4000 g.mol<sup>-1</sup> [4-5]. Réparties dans deux grandes familles, les flavonoïdes et les non flavonoïdes [Tableau (I.1)].



Tableau (I.1) : Structures des différentes classes des composés phénoliques.

| Classe                    | Squelette Carbone                              | Structure   | Exemple            | Origines (exemples)                     |
|---------------------------|--|---|--------------------|---|
| Phénols simples           | C <sub>6</sub>                                 |    | Catéchol           | Acacia à cachou, thym, piment de Bethel |
| Acides hydroxy-benzoïques | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                 |    | Acide gallique     | Epices, fraises                         |
| Acide hydroxy-cinnamique  | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 |    | Acide p-coumarique | Pomme de terre, pomme                   |
| Lignanes                  | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |  | Pinorésol          | Pin                                     |
| Lignines                  | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> |  |                    | Fruits à noyaux                         |
| Naphtoquinone             | (C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> ) <sub>n</sub> |  | Juglone            | Noix                                    |
| Stilbènes                 | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> |  | Resvératrol        | Vigne                                   |

|                               |                   |   |                             |                                  |
|-------------------------------|-------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|
| Flavonoïdes<br>isoflavonoïdes | $C_6-C_3-C_6$     |  | Catéchine<br><br>Génisteine | Fruits,<br>légumes<br><br>Fleurs |
| Tanins condensés              | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |  | Procyanidol                 | Raisin,<br>Kaki                  |

### I.1.3 Classification des composés phénoliques :

#### I.1.3.1 Les composés phénoliques du raisin :

Le raisin, fruit de la vigne, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, les terpènes (citrol, géraniol...), les flavones, les aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), les anthocyanes (responsables de la couleur) et les tanins. Le pépin de raisin est aussi une source importante de polyphénols, surtout les catéchines et leurs dérivées.

Les composés phénoliques sont contenus en plus grande quantité dans les autres parties de la vigne, telles que les racines, les sarments et les rafles [6]. Dans ces parties, on trouve les deux familles de polyphénols; les flavonoïdes et les non flavonoïdes telles que les acides phénoliques et les stilbènes.

#### I.1.4 Propriétés biologiques des polyphénols :

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'années, un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Ils font partie des phytomicronutriments.

Ces composés possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques. Ils confèrent une protection contre les UV, les herbivores et les divers facteurs de stress biotique et abiotique (blessures, attaque d'agents pathogènes, carences en minéraux...) [7]. Ils possèdent aussi des propriétés anti-oxydantes contre le

vieillesse cellulaire (cosmétiques), anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-cardio-vasculaires et anti-neurodégénératives [8-9] [(Figure (I.3)).

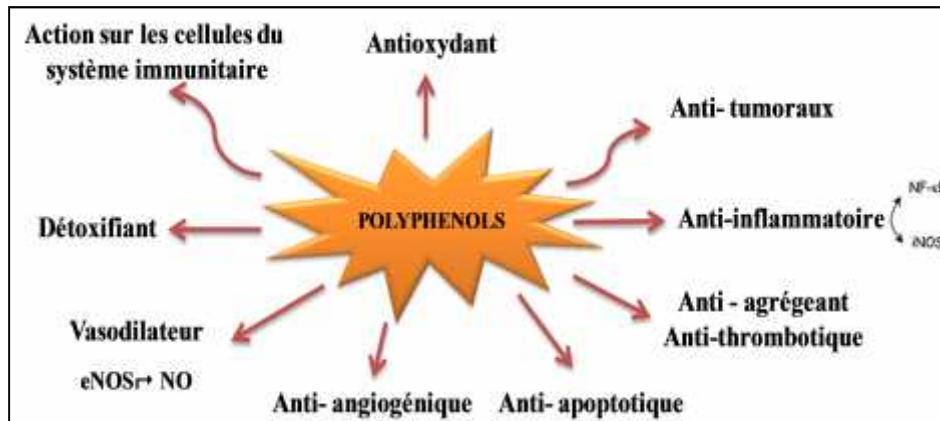


Figure (I.3): les activités biologiques des polyphénols [9].

### I.1.5 Les stilbènes :

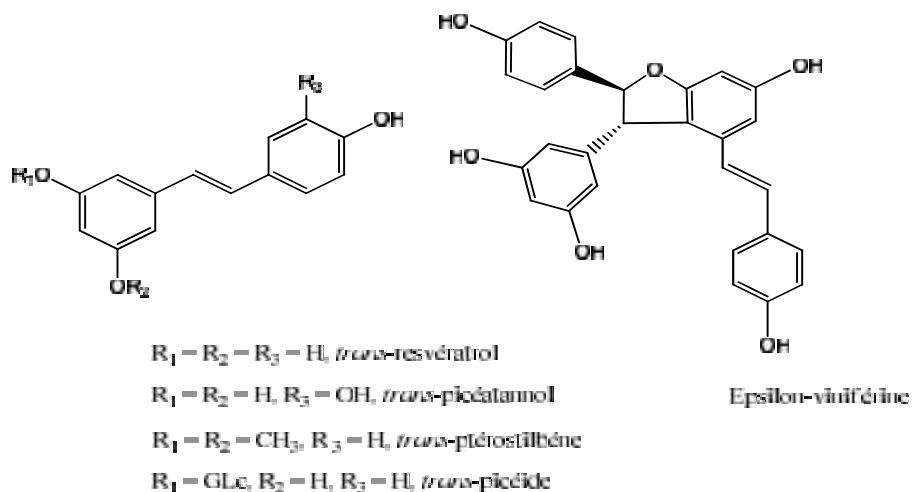
Les stilbènes sont une sous-classe de polyphénols non flavonoïdiques, et ont une structure en C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, composée de deux cycles benzéniques reliés par deux carbones, eux-mêmes unis par une double liaison. Chez la vigne, le terme hydroxy-stilbènes serait plus correct en raison des fonctions hydroxyles présentes sur les cycles.

La molécule référence des stilbènes est le *trans* - 3, 5,4'-trihydroxystilbène ou *trans*-resvératrol. C'est le premier stilbène identifié chez les Vitacées, dans des feuilles de vigne soumises aux UVs ou inoculées [5]. Les dérivés du resvératrol varient en fonction du nombre de groupements hydroxyles, des substitutions par des sucres ou des méthoxyles, de la conformation *cis* ou *trans* et du degré d'oligomérisation. Ces composés peuvent être induits ou constitutifs et sont présents dans toutes les parties de la vigne [10-11] où leur synthèse varie en fonction du tissu, de l'organe et du cépage [12].

Les autres stilbènes sont formés à partir du resvératrol par isomérisation, glycosylation, comme le picéide, par méthylation, comme le ptérostilbène et par oligomérisation comme l' -viniférine. La glycosylation et la

méthoxylation seraient réalisées par des glucosyl transférases et *O*-méthyl transférases, respectivement [13].

Chez *V. vinifera*, 17 monomères, 24 dimères, 6 trimères et 16 tétramères ont été identifiés [14] dont quelques structures sont représentées sur la **Figure (I.4)** et le **Tableau (I.2)**.



**Figure (I.4)** : Structure de cinq stilbènes de la vigne [14].

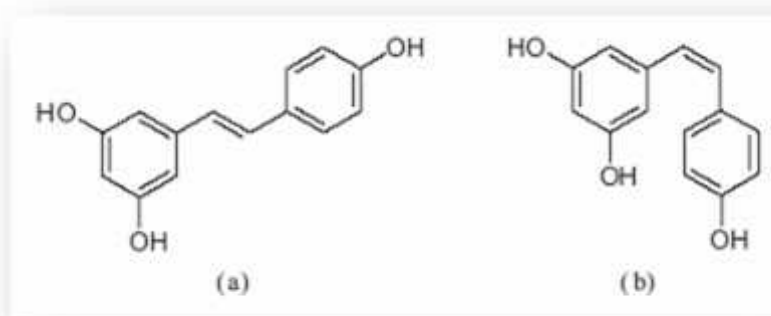
**Tableau (I.2)**: Liste non exhaustive des stilbènes identifiés dans les sarments de *Vitis vinifera* [14].

| Degré de polymérisation | Molécule       | Référence              |
|-------------------------|----------------|------------------------|
| 1                       | Resvératrol    | Langcake&Pryce 1976    |
| 1                       | Picéatannol    | Zga et al. 2009        |
| 2                       | -viniférine    | Boukharta et al.1996   |
| 2                       | Ampélopsine A  | Jean-Denis 2005        |
| 2                       | Malibatol A    | Yan et al. 2001        |
| 2                       | Ampélopsine F  | Yan et al. 2001        |
| 3                       | Miyabénol C    | Barjot et al. 2007     |
| 4                       | Ampélopsine H  | Amalfitano et al. 2005 |
| 4                       | Vitisine C     | Ito&Niwa 1996          |
| 4                       | Vitisine B     | Ito&Niwa 1996          |
| 4                       | Vitisine A     | Yan et al. 2001        |
| 4                       | Hopéaphénol    | Yan et al. 2001        |
| 4                       | Isohopéaphénol | Yan et al. 2001        |
| 4                       | Viniférol A    | Yan et al. 2001        |

### I.1.5.1 Le resvératrol :

Le resvératrol est une phytoalexine; c'est un composé antibiotique produit par la plante en réponse à une blessure, Ou à une attaque pathogène [15].

Il se présente sous deux formes isométriques *cis* et *trans* (**Figure (I.5)**). L'isomère *trans* est stériquement la forme la plus stable et donc la plus fréquemment rencontrée dans la nature [16]. C'est donc cet isomère que nous avons utilisé dans notre étude.



**Figure (I.5) :** Structure chimique du (a) *trans* et (b) *cis*-resvératrol.

Il a été isolé pour la première fois en 1940 à partir des racines de *Veratrum grandiflorum* O., puis des racines de *Polygonum cuspidatum*, (appelé Ko-jo-kon en Japonais), plante utilisée en médecine traditionnelle par les Japonais et les Chinois pour traiter les dermatites suppuratives [17]. En 1976, Le resvératrol a été détecté dans l'épiderme des feuilles et la pellicule du raisin mais pas dans la pulpe [5]. La pellicule fraîche de raisin contient 50-100 mg de resvératrol par gramme, et la concentration dans le vin s'étale de 0.2 mg/L à 7.7 mg/L. Le resvératrol a par la suite été trouvé dans diverses plantes, baies, arachides mûres et rhubarbe (**Figure (I.6)**).



Figure (I.6): Quelques plantes contenant le resvératrol [5].

#### I.1.5.1.1 Activités biologiques du resvératrol:

Les recherches réalisées sur le resvératrol montrent qu'il possède un grand nombre de propriétés biologiques justifiant son utilisation dans de nombreux traitements en pathologies humaines :

##### I.1.5.1.1.1 Activité antioxydante :

Le resvératrol possède une puissante activité antioxydante liée à la présence de groupements hydroxyles capables de capter les radicaux libres produits *in vivo* [4]. L'excès de radicaux libres, ou "stress oxydatif", dans l'organisme participe à de nombreux processus pathologiques en lien avec le vieillissement et les maladies de dégénérescence. Cette capacité antioxydante peut être évaluée *in vitro* aussi bien par le piégeage des radicaux libres que par chélation des métaux largement connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires.

Le resvératrol permet de piéger l'anion superoxyde qui est une espèce souvent à l'origine des dégâts oxydatifs [15].

**I.1.5.1.1.2 Le domaine cardiovasculaire :**

Le resvératrol inhibe la production de médiateurs conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes lors de la formation d'un caillot dans les événements thrombotiques. Il inhibe l'agrégation plaquettaire de manière dose-dépendante permettant ainsi de réduire la mort subite ou les accidents ischémiques graves. Il possède aussi une activité vasodilatatrice due à la stimulation de l'expression du gène eNOS (Endothelial nitric oxide synthase). C'est également un composé anti-inflammatoire inhibant les enzymes, COX1, COX2 (cyclooxygénases 1 et 2), 5- et 15-lypoxgénases, nécessaires à la synthèse des acides gras polyinsaturés (eicosanoïdes) médiateurs biologiques responsables de l'inflammation [15]. De même, en inhibant l'oxydation lipidique, il réduit les dépôts de cholestérol dans les artères et diminue ainsi les accidents cardio-vasculaires [16].

**I.1.5.1.1.3 Activité immunomodulatrice :**

Le resvératrol possède une activité immunomodulatrice, par laquelle, il pourrait jouer un grand rôle dans le traitement des maladies impliquant une surproduction de cytokines inflammatoires. Il inhibe, Par exemple, de façon dose-dépendante, l'expression du facteur tissulaire chez des cellules endothéliales stimulées par divers agonistes, comprenant l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et le LPS, mais aucun effet sur la liaison NF $\kappa$ B, lui a été attribué [15].

**I.1.5.1.1.4 Activités anticancéreuses :**

Le resvératrol possède également des propriétés anticancéreuses puisqu'il est capable de stopper diverses étapes du développement tumoral dans différents types de cancers. En effet, il s'est avéré efficace lors des trois phases du processus tumoral: l'initiation, la promotion et la progression. Il agit par blocage des œstrogènes, et des androgènes et par modulation de l'expression des gènes. Ces propriétés permettent d'envisager son utilisation dans le traitement de différents types de cancers tant au niveau préventif que curatif [18].

Enfin, le resvératrol a la capacité de traiter des maladies autres que le cancer et les maladies cardiovasculaires [Figure (I.7)].

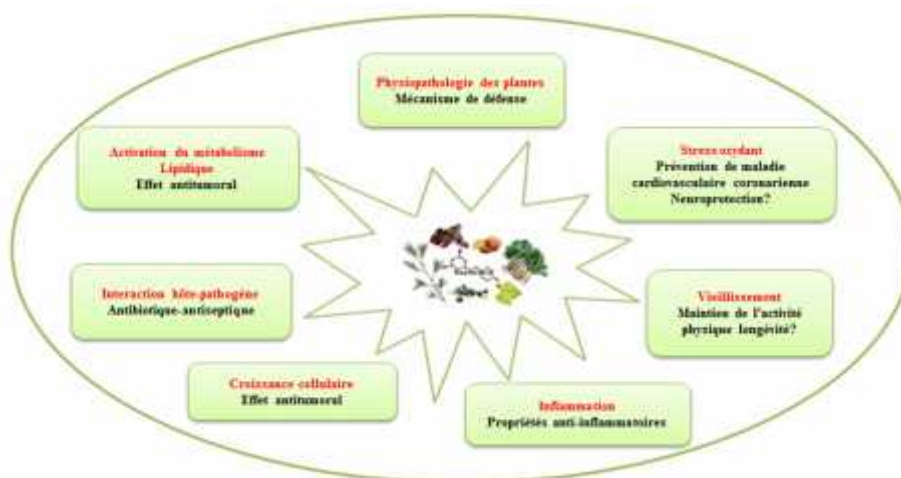


Figure (I.7) : Activités biologiques du resvératrol [18].

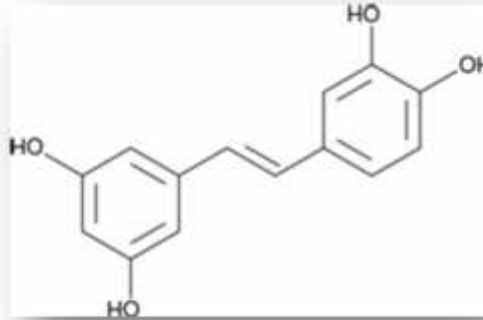
#### I.1.5.2 Le picéatannol :

Le picéatannol (trans-3, 5, 3', 4'-tétrahydroxystilbène) ne diffère du resvératrol que par la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire en position 3' (Figure (I.8)). Il a été isolé pour la première fois des graines d'*Euphorbia lagascae*, (Euphorbiaceae) ( Ferrigni, 1984). Il est aussi présent dans les raisins, les myrtilles, les fruits de la passion et d'autres fruits. Il a déjà été identifié comme ingrédient actif dans les préparations à base de plantes dans la médecine traditionnelle. Le picéatannol a été rapporté comme un anti-leucémique en inhibant sélectivement la tyrosine kinase Syk (Spleen Tyrosine Kinase). De plus, le traitement des cellules myéloïdes humaines avec du picéatannol a permis la suppression de l'activité du facteur NF- $\kappa$ B (nuclear transcription factor) et a montré une activité anticancéreuse [19].

Le picéatannol, a aussi été rapporté comme un anti-inflammatoire; un immunomodulateur et antiprolifératif [20-21]. Il présente aussi une activité antivirale, notamment contre le virus Epstein-Barr responsable de la mononucléose infectieuse et de certains cancers.



Potter et al. [22] ont démontré que le resvératrol est converti en picéatannol par l'enzyme cytochrome P450 CYP1B1, exprimée dans plusieurs types de tumeurs. Une étude a montré que le picéatannol est un inducteur efficace de l'apoptose dans des essais *in vivo* sur des patients atteints de la leucémie lymphoblastique de l'enfance. Le picéatannol a aussi montré un effet inhibiteur de l'activité  $\alpha$ -amylase pour un test sur un plasma isolé de souris, ceci permet de s'attendre à une activité antidiabétique pour ce composé. Matsuda et al. [23] ont rapporté l'activité antiallergique du picéatannol. Les activités antioxydante, pro-oxydante, et cytotoxique du *trans* picéatannol ont été rapportées par Perin et al. [15].



**Figure (I.8) :** Structure du picéatannol.

La molécule perturberait l'expression et la fonction de gènes bien particuliers normalement activés par l'insuline lors d'une phase appelée adipogénèse, elle retarderait la formation des jeunes cellules graisseuses et empêcherait également ces dernières de devenir des cellules graisseuses matures [15].

## **I.1.6 Propriétés des polyphénols :**

### **I.1.6.1 Biodisponibilité:**

Les polyphénols se caractérisent par une faible biodisponibilité dans l'organisme [24]. Premièrement, le taux d'absorption intestinale des polyphénols ingérés peut varier largement d'un polyphénol à l'autre [25]. L'absorption dépend aussi d'autres facteurs comme le dosage, la voie

d'administration, le régime alimentaire, la population microbienne du colon...

#### **I.1.6.2 Solubilité des polyphénols dans l'eau:**

Les polyphénols purs des plantes sont difficilement solubles dans l'eau à l'état naturel.

Les interactions polyphénols-polyphénols assurent une solubilité minimale en milieu aqueux.

Les tannins peuvent être dissous par des solvants organiques comme les alcools ou l'acétone [26].

## PARTIE 2

### I.2 Les Cyclodextrines:

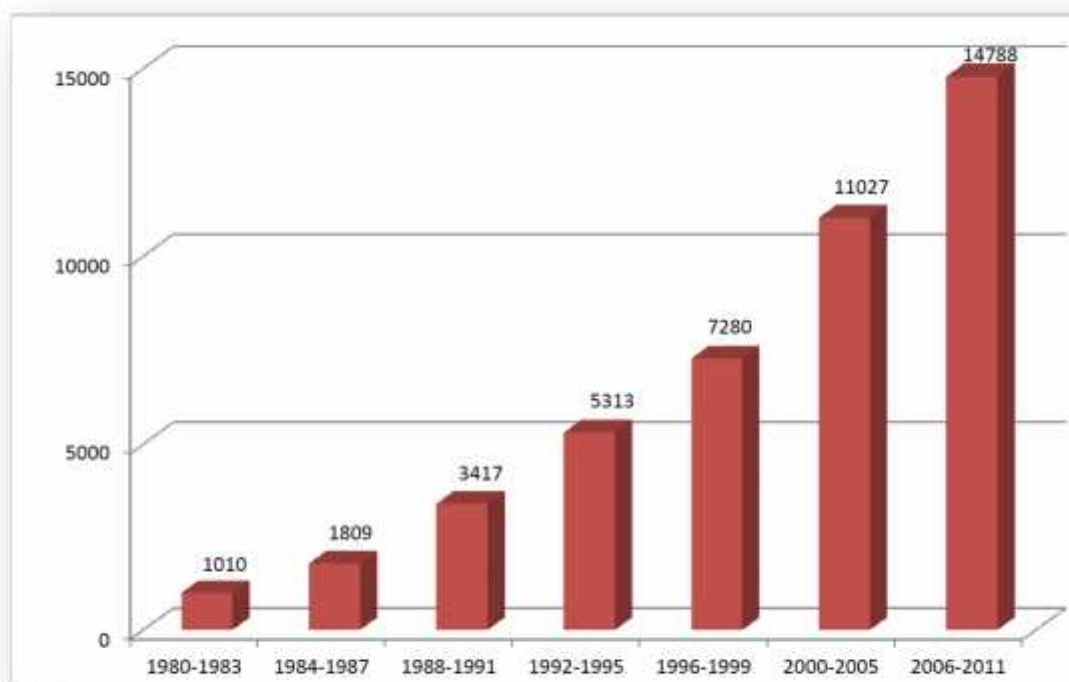
#### I.2.1.1 Historiques :

Les cyclodextrines sont connues depuis plus d'un siècle. Elles sont aussi nommées cycloamyloses, cyclomaltoses, oligosaccharides ou cyclooligoglucanes . Elles portaient aussi le nom de Schradinger à cause de son rôle pionnier dans la connaissance de ces molécules.

Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides constituées d'unités des glucoses. Ces composés ont été isolés pour la première fois par Villiers [27]. Ces molécules naturelles, obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon, se présentent sous forme de cycles comportant de 6 à 12 unités de glucose. Lors de ces travaux, Villiers mit en évidence la présence de deux produits résultant de cette dégradation enzymatique. Ces produits ont des propriétés physico-chimiques proches de celles de la cellulose. En 1904, Schradinger [28] reprend les travaux de Villiers et identifie les structures cycliques des cyclodextrines et les enzymes responsables de leur formation: la cyclodextrinase. Toutefois leur structure chimique ne fut parfaitement élucidée qu'en 1938 grâce aux travaux de Freudenberg et al. [29]. Les cyclodextrines sont alors décrites comme un assemblage cyclique d'unités de D-glucose reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$  (1→4) glucosidiques.

C'est en 1948 que Freudenberg et al. [30] rapportent pour la première fois la possibilité pour ces composés de former des complexes d'inclusion. Néanmoins le développement pionnier fut surtout réalisé par les groupes de Cramer [31] et French [32], dans les années 1950, qui travaillèrent sur la synthèse et la purification des premiers complexes d'inclusion à base de cyclodextrine. Le premier brevet concernant l'utilisation des cyclodextrines pour la conception de composés possédant une activité biologique a été déposé en 1953 et marquera le début de l'essor considérable de l'étude des cyclodextrines durant les dernières décennies et notamment comme modèle de l'activité enzymatique [33, 34,35]. Dans les années 1970-80, Szejtli [36,37] apporte une importante contribution dans le domaine avec notamment une

étude poussée des complexes d'inclusion formés à partir des cyclodextrines et le développement de l'utilisation des cyclodextrines en chromatographie [38]. Le nombre des publications concernant les cyclodextrines n'a cessé de croître depuis la fin des années 1960, période à laquelle les méthodes de production, les structures, les propriétés physiques et chimiques et la formation de complexes d'inclusion ont été découverts. Du fait de leur faible toxicité, les cyclodextrines se retrouvent dans une large gamme de produits commercialisés pour le grand public allant des médicaments (exemple NICORETTEMICROTAB ®) aux produits alimentaires (exemples GLUCIDEX®, KLEPTOSE ®) en passant par les produits ménagers (exemple FEBREZE ®) [39].

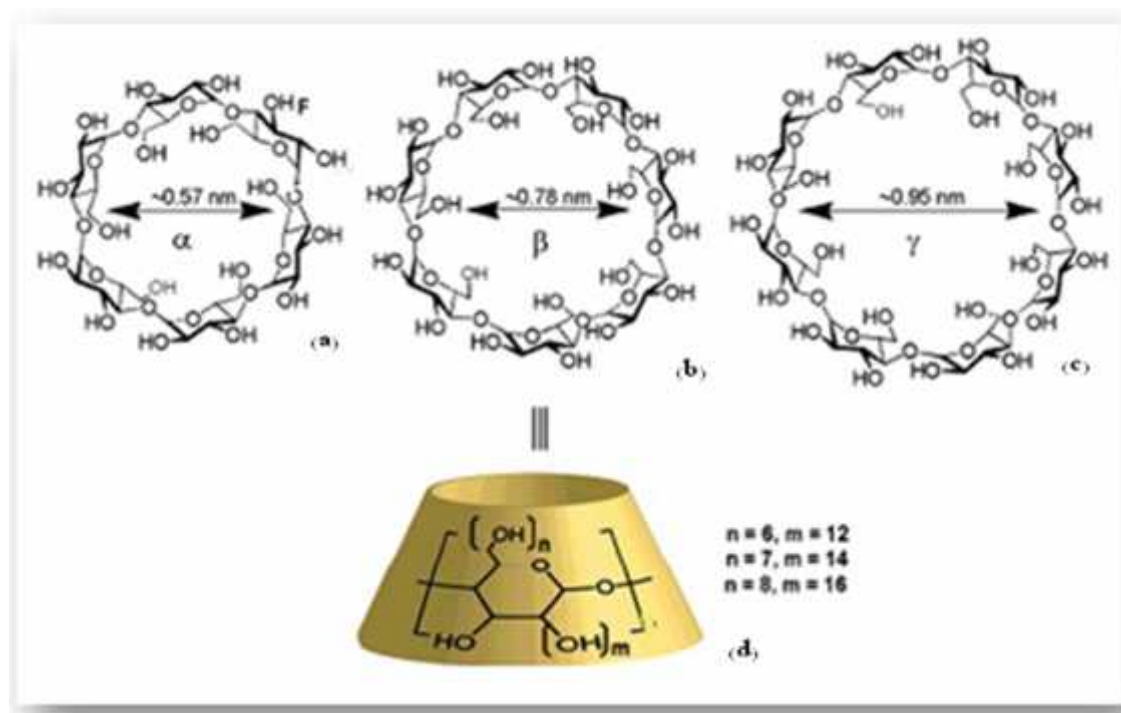


**Figure (I.9) :** Evolution du nombre des publications concernant les cyclodextrines [39].

### I.2.2 Structure et propriétés :

Les cyclodextrines sont obtenues à grande échelle par la dégradation enzymatique de l'amylose. Lors de ce processus, la structure en hélice de l'amidon est brisée. Il s'ensuit une cyclisation intramoléculaire conduisant à la formation de la structure cyclique des cyclodextrines [40]. Par ce traitement,

on obtient majoritairement trois composés cycliques nommés  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines comprenant respectivement six, sept ou huit unités de D-glucose [Figure(I.10)]. Cette conversion enzymatique produit également des produits minoritaires [41] souvent appelés cyclodextrines géantes pouvant contenir jusqu'à 14 unités de D-glucose [42, 43]. Néanmoins leurs coûts de production prohibitifs rendent le développement d'applications pratiques et leur utilisation dans le secteur pharmaceutique limité.



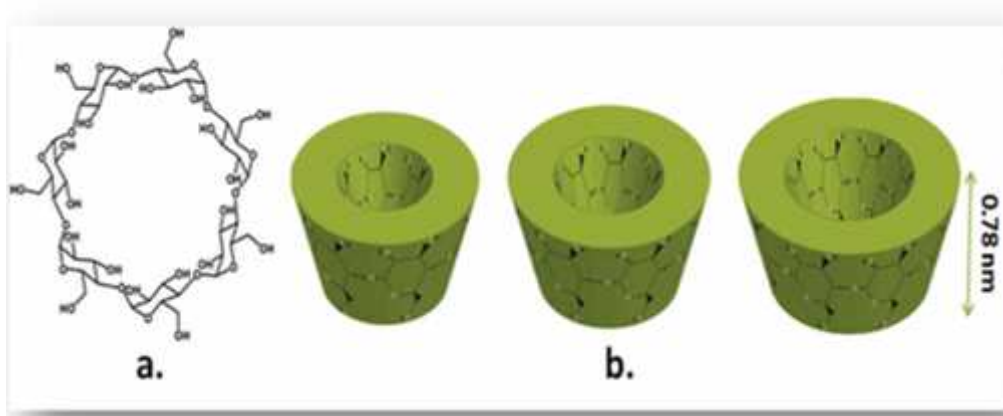
**Figure(I.10) :** structures de l'  $\alpha$ - ( $n=6$ ) (a),  $\beta$ - ( $n=7$ ) (b) et  $\gamma$ - ( $n=8$ ) (c) cyclodextrines. d) structure de l'unité répétitive constituant les cyclodextrines et nomenclature commune des atomes [41].

Grâce aux structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X, la forme d'un anneau tronconique (cône tronqué) des cyclodextrines ainsi que le réseau de liaisons hydrogènes interglucosidiques des hydroxyles primaires et secondaires ont pu être déterminés.

Chaque unité de glucose se trouve ainsi dans la conformation chaise  ${}^4C_1$ . Ainsi les cyclodextrines sont des molécules chirales dans lesquelles chaque unité de glucose possède cinq centres asymétriques. Cette conformation rigide donne

alors aux cyclodextrines leur forme tronconique caractéristique [Figure (I.11)]. La structure du cône est formée autour d'un squelette carboné construit par les unités de glucoses reliées entre elles par les atomes d'oxygène glucosidiques. Ce squelette crée une cavité moléculaire possédant des propriétés très originales dues aux positions spatiales des différents groupements constitutifs de la cyclodextrine. Ainsi les groupements hydroxyles primaires ( $O_6$ ) sont localisés autour de la face étroite du cône tronqué tandis que les groupements hydroxyles secondaires ( $O_2$  et  $O_3$ ) se placent autour de la face large de la cyclodextrine.

De plus, les groupements hydroxyles primaires, de part leur plus grande mobilité, peuvent partiellement obstruer l'entrée de la cavité de la face étroite par rotation autour des carbones  $C_6$  alors que les hydroxyles secondaires de la face large ont énormément moins de degré de liberté à cause de la structure rigide du squelette de la cyclodextrine à laquelle ils sont directement rattachés.

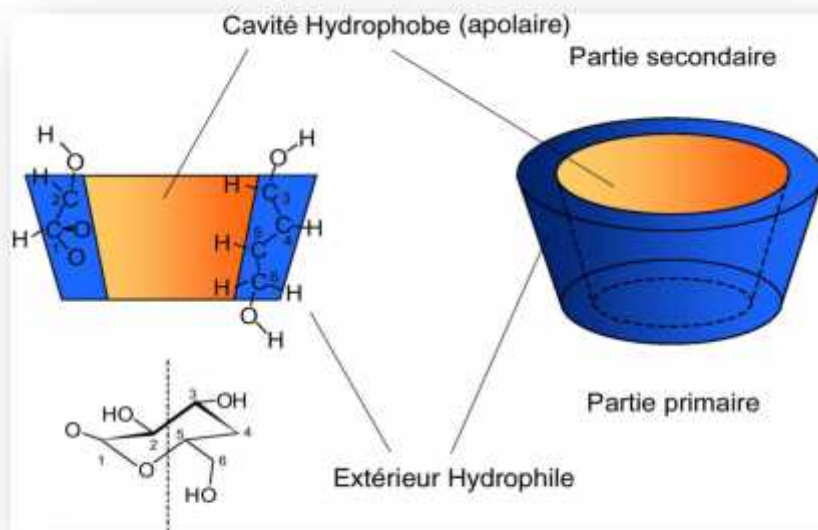


**Figure(I.11):** Représentation schématique de la forme d'une cyclodextrine et du positionnement des différentes fonctions [41].

Les hydrogènes  $H_1$ ,  $H_2$  et  $H_4$  sont quant à eux dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que Les hydrogènes  $H_3$  et  $H_5$  sont orientés vers l'intérieur de la cavité moléculaire de la cyclodextrine et sont alors les seuls à même d'interagir avec un substrat complexé dans cette cavité. Les oxygènes interglucosidiques  $O_4$  forment les ponts entre les différentes unités de glucose

et leurs paires d'électrons non liantes sont dirigées vers l'intérieur de la cavité moléculaire. Cette orientation conduit l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine à posséder une forte densité électronique ce qui lui confère les caractéristiques d'une base de Lewis.

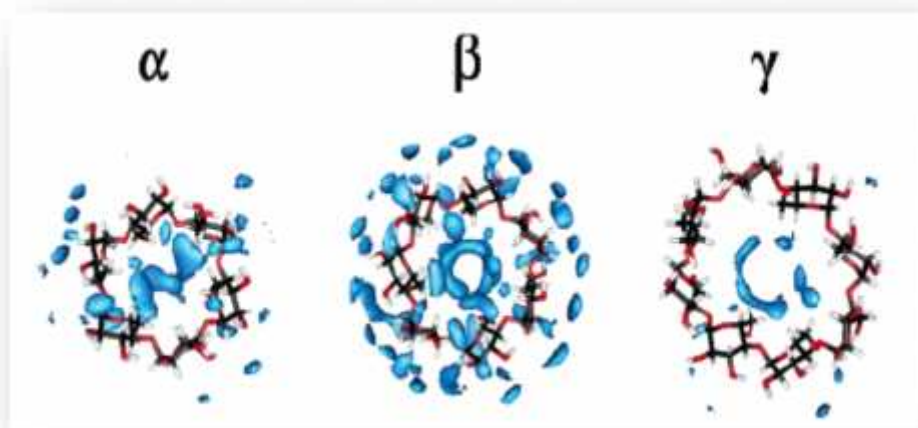
A cause de la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarité distinctes [Figure(I.12)]. L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires : ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires. Ainsi ce sont les hydroxyles primaires et secondaires, se trouvant sur les contours de la cyclodextrine qui rendent cette molécule soluble dans l'eau. En revanche, l'intérieur de la cavité où se trouvent uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire et cette polarité est tout à fait comparable à celle des éthers. Cette zone, plus hydrophobe, prendra une part importante dans les nombreux processus d'inclusion.



**Figure(I.12):** Représentation schématique des structures 3-dimensionnelle et des différentes zones de polarité des cyclodextrines [41].

**I.2.3 Les caractéristiques des cyclodextrines :** Les propriétés physico-chimiques essentielles et les dimensions moléculaires des trois principales cyclodextrines sont données dans le Tableau (I.3) montrant une progression régulière des principales caractéristiques en fonction du nombre d'unités de

glucose de la cyclodextrine. Néanmoins la solubilité dans l'eau de la  $\beta$ -cyclodextrine fait figure d'exception puisqu'elle est extrêmement faible comparée à celle des autres cyclodextrines. Cette faible valeur peut être expliquée par la formation d'une chaîne continue de liaisons hydrogène entre le groupement hydroxyle du C<sub>2</sub> d'une unité de glucopyranose et celui du C<sub>3</sub> d'une autre unité adjacente [44] ceci rend la  $\beta$ -cyclodextrine plus rigide que les  $\alpha$ - ou  $\beta$ - cyclodextrines, comme le montre la Figure (I.13).



**Figure(I.13):** Densités de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des cyclodextrines d'après la référence [44].

En effet, la formation de cette chaîne continue n'est pas possible pour les  $\alpha$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines: l' $\alpha$ -cyclodextrine possède une unité de glucose en conformation tordue ce qui ne rend possible que l'établissement de 4 liaisons hydrogène sur les six possibles. La molécule de  $\gamma$ -cyclodextrine est quant à elle non planaire et possède une structure moins rigide, ce qui lui confère la plus grande solubilité parmi les trois cyclodextrines les plus communes.



**Tableau (I.3):** Principales caractéristiques et dimensions de l'  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines.

| Propriétés  | $\alpha$ - CD                                   | $\beta$ - CD                                    | $\gamma$ - CD                                   |
|---|---|---|---|
| N° de glucoses  | 6   | 7   | 8   |
| Formule Brute (anhydre)   | C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub> | C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub> | C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub> |
| Masse Atomique (anhydre)  | 972.85  | 1134.99   | 1297.14   |
| Longueur de la cavité, Å  | 7.9±0.1   | 7.9±0.1   | 7.9±0.1   |
| Diamètre interne, Å   | 4.7-5.3   | 6.0-6.6   | 7.5-8.4   |
| Diamètre Extérieur, Å   | 14.6±0.4  | 15.4±0.4  | 17.5±0.4  |
| Volume de la cavité, Å  | 174   | 262   | 427   |
| PKa, 25°C   | 12.332  | 12.202  | 12.081  |
| $\Delta H^\circ$ (ionisation), kcal.mol <sup>-1</sup>                 | 8.36  | 9.98  | 11.22   |
| $\Delta S^\circ$ (ionisation), cal.mol <sup>-1</sup> .k <sup>-1</sup> | -28.3   | -22.4   | -17.6   |
| $\Delta H^\circ$ (solution), kcal.mol <sup>-1</sup>                   | 7.67  | 8.31  | 7.73  |
| $\Delta S^\circ$ (solution), cal.mol <sup>-1</sup> .k <sup>-1</sup>   | 13.8  | 11.7  | 14.7  |
| Solubilité (eau, 25°C), mol.l <sup>-1</sup>                           | 0.1211  | 0.0163  | 0.168   |
| Solubilité (eau, 25°C,<br>g/100mL)                                    | 14.5  | 18.5  | 23.2  |

Par ailleurs les cyclodextrines montrent une bonne stabilité en conditions alcalines mais peuvent être dégradées par hydrolyse acide, ce qui conduit à la formation de glucose, détruisant ainsi la structure de la cyclodextrine. Elles présentent également une très faible cytotoxicité [45] qui peut être pratiquement éliminée par modifications chimiques des cyclodextrines.

Après que des études toxicologiques aient prouvé que la toxicité attribuée initialement aux CDs provenait en fait d'impuretés complexées, de voies d'administration inadéquates ou de surdosages, le nombre de publications concernant les CDs a connu une croissance exponentielle [Figure(I.9)] [37]. Ainsi, à la fin de 2003, ce nombre était supérieur à 26000 [46].

La formation de complexe en solution aqueuse avec une molécule invitée est ainsi promue par ce caractère amphiphile très particulier. En effet, les

cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion avec des molécules apolaires avec pour force motrice les interactions hydrophobes [47]. L'établissement de telles interactions entre la cyclodextrine et la molécule invitée est une condition essentielle pour la formation et la stabilité du complexe d'inclusion mais il faut également tenir compte des conditions stériques : un complexe d'inclusion ne peut être créé que si les dimensions de la cavité moléculaire de la cyclodextrine correspondent à la taille de la molécule invitée. Il existe dans la littérature de nombreux exemples de complexes d'inclusion avec divers arrangements structuraux et stœchiométries entre l'hôte et l'invité: 1/1 [47, 48], 2/1 [49, 50], et même 1/2 [51] dans quelques rares cas.

#### I.2.4 La solubilité dans les solvants organiques:

En général les cyclodextrines sont insolubles dans la majorité des solvants organiques. Cependant, elles sont solubles dans quelques solvants polaires et aprotiques. Le tableau (I.4) montre la solubilité des cyclodextrines dans quelques solvants.

**Tableau (I.4) :** Solubilité en g/100 ml (25°C) des cyclodextrines dans quelques solvants:

| Eau/solvant | $\alpha$ -CD |       | $\beta$ -CD |       | $\gamma$ -CD |       |
|-------------|--------------|-------|-------------|-------|--------------|-------|
|             | 50/50        | 0/100 | 50/50       | 0/100 | 50/50        | 0/100 |
| Méthanol    | 1.2          | <0.1  | 0.3         | <0.1  | 2.8          | <0.1  |
| Ethanol     | 0.9          | <0.1  | 1.3         | <0.1  | 2.1          | <0.1  |
| Propanol    | 0.8          | <0.1  | 1.1         | <0.1  | 0.7          | <0.1  |
| Isopropanol | 4.7          | <0.1  | 2.6         | <0.1  | 0.6          | <0.1  |
| Acétone     | 1.9          | <0.1  | 0.3         | <0.1  | 0.5          | <0.1  |

### I.2.5 Les dérivés des cyclodextrines :

Afin de remédier au problème de toxicité, améliorer la solubilité et le coût de fabrication, et dans la recherche d'applications thérapeutique plus ciblées, des nombreux dérivés des cyclodextrines ont été élaborés [Tableau(I.5)]. Les modifications chimiques concernent les groupements hydroxyles qui sont substitués en nombre variable selon le type des cyclodextrines natives.

De nombreux dérivés de CDs sont synthétisés. En termes de quantité produite ou d'utilisation, les CDs les plus importantes sont les dérivés ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier [52] :

- Les  $\beta$ -CDs méthylées,
- Les  $\beta$ - et  $\gamma$ -CDs hydroxypropylées,
- Les  $\beta$ -CDs sulfobutylées,
- Les CDs branchées (glucosylées, maltosylées),
- Les CDs sulfatées.

Une comparaison des hydrosolubilités des cyclodextrines naturelles et leurs dérivés sont présentée sur le tableau (I.5).

**Tableau(I.5):** Les cyclodextrines naturelles et leurs dérivés à intérêt pharmaceutique.

| Cyclodextrine                               | Masse molaire | Solubilité dans l'eau g/100 ml |
|---|---------------|--------------------------------|
| $\alpha$ - Cyclodextrine                    | 972           | 14.5                           |
| $\beta$ - Cyclodextrine                     | 1135          | 18.5                           |
| 2- Hydroxypropyl- $\beta$ - Cyclodextrine   | 1400          | > 600                          |
| 2,6 di -o- méthyl - $\beta$ - Cyclodextrine | 1312          | > 500                          |
| $\gamma$ - Cyclodextrine                    | 1297          | 23.2                           |
| 2- Hydroxypropyl- $\gamma$ - Cyclodextrine  | 1576          | > 500                          |

Ces familles des molécules amphiphiles se distinguent selon la ou les positions per substituées [Figure (I.14)].



**Figure (I.14):**Représentation des familles des cyclodextrines amphiphiles [53].

- Les "médusa-like" : per substitution sur la face primaire (en 6) [53]
- Les "skirt-shaped" : per substitution sur la face secondaire (en 2 et 3) [54]
- La per substitution sur toutes les positions (2, 3 et 6) [55]
- Les "molécules bouquets" : Per substitution en 2 et en 6 [56]

### I.2.6 Utilisation des cyclodextrines :

Grâce à leur faible toxicité, le champ d'utilisation des cyclodextrines est très large, elles ont des applications multiples aussi bien en pharmacie et en agroalimentaire qu'en chimie organique et en chromatographie.

L'intérêt majeur des cyclodextrines est l'encapsulation moléculaire des molécules lipophiles. En effet, les complexes d'inclusion modifient les propriétés, notamment la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité de la molécule invitée.

Les cyclodextrines sont souvent utilisées en reconnaissance chirale des molécules invitées ou bien comme vecteurs en industrie pharmaceutique (solubilité, stabilisation, masquage d'effets secondaires, augmentation de la biodisponibilité de principe actifs) et stabilisateurs des molécules fragiles (volatiles sensibles à la lumière, dégradable par oxydation,...).

Elles sont utilisées pour la séparation des énantiomères en électrophorèse capillaire, en chromatographie en phase gazeuse, en chromatographie liquide à haute performance et aussi comme modèles d'enzymes artificielles.

Les applications des cyclodextrines se sont beaucoup développées ces dernières années. Actuellement, de part leurs propriétés antimicrobiennes, de nouvelles applications des CDs sont apparues telles que le traitement de la maladie d'Alzheimer et l'hypercholestérolémie [57-63].

---

## PARTIE 3

### I.3 les complexes d'inclusion des cyclodextrines:

Parmi la grande variété de complexe d'inclusion, ceux où l'inclusion se fait à l'intérieur de la molécule "hôte" occupent une place à part, car dans ce cas la complexation peut aussi avoir lieu en solution.

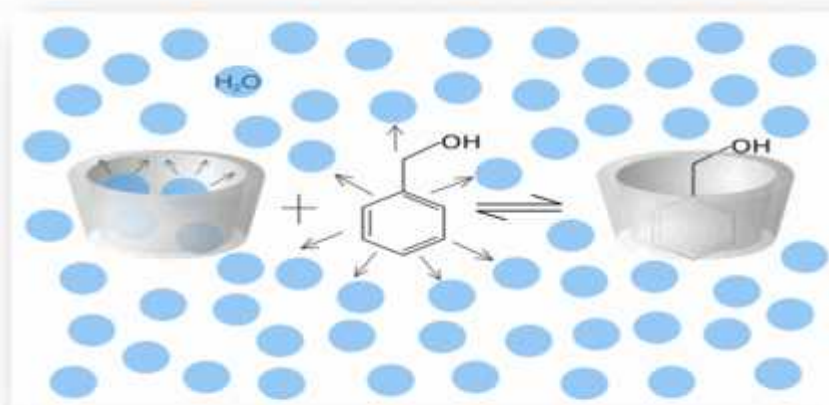
#### I.3.1 Le mécanisme de formation :

Le principe général d'inclusion d'un invité dans la cavité moléculaire de la cyclodextrine est basé sur le gain énergétique réalisé par le système hôte-invité lors du processus d'inclusion. Ceci est basé sur un équilibre dans la solution; les molécules préfèrent toujours le milieu le plus favorable. En solution aqueuse, la cavité légèrement apolaire est occupée par des molécules d'eau, cette association du type polaire-apolaire est énergétiquement défavorisée, les molécules d'eau peuvent donc être facilement substituées par d'autres molécules invitées moins polaires [64-70].

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

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

Dans la **Figure (I.15)** nous présentons un schéma du mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion dans de l'eau.



**Figure(I.15):** Inclusion d'une molécule à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine [70].

### I.3.2 Forces de liaison impliquées dans les complexes d'inclusion :

D'un point de vue théorique, plusieurs forces intermoléculaires existent simultanément lors de la formation de complexe d'inclusion. Les propriétés de la molécule invitée (taille, forme, polarité ...), les propriétés de la molécule hôte (solubilité, diamètre de la cavité), les propriétés du solvant (polarité, pH) sont les facteurs déterminants du processus de complexation [71-73].

La nature des forces de liaison entre la molécule invitée et la molécule hôte est encore controversée. Le processus d'inclusion est gouverné par une interaction énergétique qui met en jeu d'autres forces intermoléculaires:

Les forces mises en jeu sont :

- a- Les interactions de Van der Waals entre la molécule hôte et la CD, qui incluent les interactions induites dipôle-dipôle, et les forces de dispersion de London.
- b- Les liaisons hydrogène entre l'invitée et la CD. Il se manifeste des forces d'attraction entre l'hydrogène et l'atome électronégatif, ce qui provoque une inclusion de l'invité à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine.
- c- Relargage des molécules d'eau de haute énergie lors de l'inclusion : Les molécules d'eau présentes à l'origine dans la cavité, ne peuvent former

autant des liaisons hydrogène que dans la solution, elles sont donc dans un état d'énergie supérieure. Leur remplacement par l'invité provoque donc une diminution de l'enthalpie du système. On passe donc, d'une conformation de haute énergie du complexe  $\beta$ -CD-eau à une conformation  $\beta$ CD-invité de moindre énergie.

### I.3.3 Aspect thermodynamique et constante d'association :

L'étude des paramètres thermodynamiques permet de quantifier les énergies des interactions non covalentes entre les molécules invitées et les cyclodextrines. La connaissance de ces paramètres et plus particulièrement, l'enthalpie libre  $\Delta G^\circ$  est un outil adéquat pour prédire la stabilité d'un complexe. L'enthalpie libre ou l'énergie libre de Gibbs est donnée par l'équation de Van't Hoff [74]:

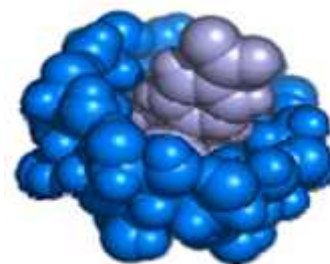
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (1)$$

Dans les conditions standards, à l'équilibre :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (2)$$

$\Delta G^\circ$  peut ainsi être déterminée à partir des concentrations des composés à l'équilibre plutôt qu'en mesurant les changements d'entropie ou d'enthalpie.

Notons que les auto-assemblages formés lors de la complexation par les cyclodextrines s'accompagnent d'une forte élévation de l'ordre et donc d'une baisse d'entropie  $\Delta S^\circ$ . Ceci étant défavorable à la formation des complexes d'inclusion, c'est le terme enthalpique  $\Delta H^\circ$  qui sera déterminant. Ce dernier étant proportionnel aux énergies de liaisons,  $\Delta H^\circ$  augmentera si le nombre de liaisons non covalentes dans le système croît. Ainsi, plus la molécule invitée à l'intérieur de la cavité impliquera des liaisons hydrophobes, plus le complexe sera stabilisé.



Lors des études de la complexation avec les cyclodextrines, la mesure de la stabilité des complexes est exprimée en termes de constante d'association.



### I.3.4 Caractéristiques des complexes d'inclusion:

Les réactions de complexation se caractérisent par la stœchiométrie et la valeur de la constante de stabilité.

#### I.3.4.1 stœchiométrie:

Selon les propriétés des molécules invitées (taille, encombrement stérique, polarité, propriétés hydrophobes) différentes stœchiométries invitées :  $\beta$ CD ont été observées. Le cas le plus fréquent est la stœchiométrie 1:1, il existe cependant des stœchiométries 1:2, 2:1 et 2:2 et parfois même des associations plus compliquées [36-47].

#### I.3.4.2 Détermination de la constante de formation:

Toutes les propriétés des complexes d'inclusion, notamment la solubilité et la stabilité, dépendent de la constante de formation du complexe obtenu.

Le complexe d'inclusion est toujours en équilibre avec le composé libre en solution. L'état d'équilibre d'un complexe de stœchiométrie 1:1 est donc du type:



Où  $S$  : représente l'invité libre et  $\beta$ CD - $S$  : le complexe d'inclusion.

Cet équilibre est caractérisé par une constante d'équilibre appelée constante de formation. Plus sa valeur est élevée plus le complexe correspondant est stable.

$$K_c = \frac{[SCD - S]}{[SCD][S]} \quad (3)$$

La constante de stabilité du complexe  $K_c$ , dépend de la température, de la nature de la molécule invitée, de la nature du solvant et toute variation affectant le milieu réactionnel.

### I.3.5 Les techniques de préparation des complexes avec les cyclodextrines :

Plusieurs techniques permettent la formation de complexe avec les cyclodextrines, parmi lesquelles, on peut citer [75]:

#### **I.3.5.1 La Co-précipitation :**

Cette méthode est la plus utilisée. Après dissolution de la CDs dans une quantité d'eau sous agitation, la molécule invitée est ajoutée. La concentration de la CDs peut atteindre jusqu'à 20% (v/v). Le précipité formé peut être collecté par décantation, centrifugation ou filtration. Il peut être lavé avec de l'eau ou tout autre solvant miscible dans l'eau tel que l'éthanol, le méthanol ou l'acétone.

Le principal inconvénient de cette technique est lié au volume, du fait de la solubilité limitée de la CD, des grandes quantités d'eau sont nécessaires. La formation d'un complexe solide ou semi-solide peut être optimisée par l'utilisation d'additifs tels que l'éthanol. Selon la quantité d'eau utilisée pour le complexe, on obtient un Co-précipité, une suspension ou une pâte solide.

#### **I.3.5.2 Complexation par extrusion :**

La CD, l'invité et l'eau sont mélangés au fur et à mesure dans l'extruder. Le degré de mélange, la température de chauffe et le temps peuvent être contrôlés dans la cuve de l'extruder. Selon la quantité d'eau initiale, le complexe extrudé peut être séché en le refroidissant ou dans un four. Le principal avantage de cette technique est la continuité du processus et l'utilisation d'une faible quantité d'eau. Son inconvénient est que la chaleur générée dans l'extruder peut causer la dégradation de certaines molécules invitées thermolabiles.

#### **I.3.5.3 Complexation par malaxage physique:**

Parfois le complexe d'inclusion peut être obtenu directement par simple malaxage de l'invité et de la cyclodextrine ensemble. Cette méthode est appliquée pour les invités liquides ou huileux. Le temps de mélange nécessaire dépend de la nature de l'invitée. Généralement, ce protocole est

réalisé à température ambiante. Son principal avantage est l'absence d'eau, sauf pour le rinçage, alors que son inconvénient est l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante.

#### **I.3.5.4 Complexation en suspension:**

Une faible quantité d'eau est ajoutée à la cyclodextrine pour former une suspension. La substance invitée est dissoute dans une quantité de solvant et ajoutée à la suspension de la cyclodextrine. Le complexe résultant peut être séché directement ou lavé avec une petite quantité d'eau et rassemblé par filtration ou centrifugation. La suspension formée est séchée donnant une masse dure ou bien une poudre fine, ceci dépend de l'invité et la quantité d'eau utilisée dans la suspension.

#### **I.3.6 Méthodes de caractérisation des complexes :**

La propriété la plus importante des cyclodextrines est leurs capacités de former des complexes hôtes-invités avec une grande variété de molécules hydrophobes. L'encapsulation moléculaire peut se produire en solution ou à l'état solide. En solution, il existe un équilibre entre la forme complexée et la forme libre de chacun des composés.

A l'état solide, les molécules invitées peuvent être incluses dans la cavité ou liées à l'extérieur de la cyclodextrine. Les propriétés physico-chimiques de la molécule invitée changent après l'encapsulation.

Diverses méthodes analytiques sont utilisées pour détecter les propriétés des complexes d'inclusion, parmi lesquelles, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), les spectroscopies UV-VIS ou de fluorescence, les techniques thermo-analytiques, etc...

**I.3.6.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance :** La chromatographie liquide à haute performance est une méthode d'analyse très sensible permettant de doser une quantité infime de molécules chimiques en solution et de déterminer la constante de stabilité ( $K_c$ ) des complexes [76].

Uekama a observé que le temps de rétention des acides et des bases faibles diminue significativement par addition d' $\alpha$ -CD et de  $\beta$ -CD, à différentes concentrations dans la phase mobile (tampon phosphate), la phase stationnaire étant une résine échangeuse d'ions [77]. La mesure des temps de rétention, permet d'accéder à la valeur de  $K_C$ . Des travaux ont montré l'intérêt de l' HPLC pour déterminer la valeur de la constante de stabilité  $K_C$  [78-79].

### **I.3.6.2 Etude par spectrométrie :**

#### **I.3.6.2.1 La spectroscopie UV-Vis:**

Suite à l'inclusion d'une molécule dans la cavité moléculaire de la  $\beta$ CD, son spectre UV-Vis se trouve perturbé. Selon la nature de l'interaction, on observe un déplacement bathochrome (parfois hypochrome, diminution de l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée) avec l'ajout progressif de la  $\beta$ CD et formation d'un point isobestique [80].

#### **I.3.6.2.2 La spectroscopie infrarouge :**

Les spectres des complexes présentent généralement un léger déplacement des pics. Ces modifications discrètes indiquent qu'il n'y a pas de liaisons chimiques fortes (type liaison covalente) entre les composés, mais seulement une interaction : différence de géométrie dans la molécule invitée, dissociation des liaisons hydrogène intermoléculaire dans cette même molécule, ou encore établissement de liaisons hydrogènes de faible énergie entre les deux composés. Chaque bande du spectre caractérise un groupement fonctionnel de la molécule, et leur déplacement permet de désigner la partie de la molécule invitée ayant interagi avec la CD [81].

#### **I.3.6.2.3 La Résonance Magnétique Nucléaire :**

Les spectres de RMN sont indispensables pour affirmer l'inclusion d'une molécule dans une CD. Pour cela, il est possible de réaliser le spectre du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) qui renseigne sur la direction de l'inclusion de la molécule invitée dans la cavité de la  $\beta$ -CD par identification de la position de ses

protons. Cette méthode permet de visualiser les déplacements des bandes de résonance des protons internes de la CD ( $H_3$ ,  $H_5$ ) en cas d'inclusion d'une molécule, alors que les protons externes restent peu affectés ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_4$ ,  $H_6$ ). On étudie de même, toutes modifications des bandes de résonance des protons de la molécule invitée afin de déterminer les atomes interagissant avec la CD. Lorsqu'un complexe est formé, les variations de la densité électronique autour de certains noyaux causent leur blindage ou déblindage par rapport au champ magnétique externe, selon qu'ils se déplacent respectivement vers des champs faibles ou des champs forts. Le déplacement chimique de certains pics change: Ainsi, les hydrogènes  $H_3$  et  $H_5$ , situés à l'intérieur de la cavité, seront déblindés lors de l'interaction avec la molécule invitée, uniquement lorsqu'il y a formation d'un complexe où la molécule invitée est totalement incluse à l'intérieur d'une CD [82-84]. Les spectres RMN du carbone 13 donnent également des informations concernant les propriétés dynamiques du complexe.

### **I.3.7 Facteurs importants pour la réaction de complexation :**

#### **I.3.7.1 la température:**

La température a plus d'un effet sur la complexation par les cyclodextrines. Le chauffage peut augmenter la solubilité des complexes, mais en même temps déstabilise le complexe. Bien que la plupart des complexes commencent à se décomposer à 50°C, certains complexes sont stables à de hautes températures, plus particulièrement lorsque l'invité est fortement lié à la cyclodextrine et si le complexe est fortement insoluble.

#### **I.3.7.2 Le solvant:**

L'eau est le solvant le plus utilisé pour les réactions de complexation. Plus les molécules invitées sont solubles dans le solvant, plus elles deviennent disponibles pour la complexation. Les molécules invitées doivent être capable de déplacer le solvant de la cavité des CDs pour les remplacer. Par exemple, l'eau est très facilement déplaçable de la cavité de la cyclodextrine. La

complexation est favorisée dans une quantité minimale d'eau car par augmentation du volume d'eau, la cyclodextrine et l'invité sont dilués de façon qu'aucun contact ne puisse s'établir entre eux. D'autre part, la présence d'un excès d'eau peut solubiliser le complexe, ce qui rend difficile sa séparation des réactifs.

### **I.3.8 Avantages de la complexation :**

L'inclusion d'une molécule invitée dans une CD constitue donc une encapsulation moléculaire [85] susceptible de modifier les propriétés physico-chimiques, voire biologiques, du substrat. Les avantages qui en découlent sont multiples :

- Protection de l'invité contre la dégradation thermique ou photochimique, l'oxydation, l'hydrolyse ou la sublimation.
- Amélioration de la biodisponibilité, l'hydrosolubilité et la stabilité de l'invité.
- diminution de la volatilité des produits en augmentant leur point d'ébullition.

### **I.3.9 Applications des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines :**

Les cyclodextrines et leurs complexes d'inclusion trouvent de larges applications dans les divers domaines :

- En biologie comme des modèles d'enzymes artificielles [86].
- En chimie comme catalyseurs des réactions chimiques, inducteurs chiraux en synthèse organique asymétrique, séparateurs énantiomériques en chromatographie, stabilisateurs de substance volatiles [47].
- En industrie pharmaceutique, chimique et biotechnologique comme des vecteurs (solubilisation, stabilisation, masquage d'effets secondaires, augmentation de la biodisponibilité) [87-88].
- En agriculture comme stabilisateurs d'arômes [89-91].

**Références bibliographiques**

- [1]Jean J M, Annie F C, Jay A, 2005. Presses polytechniques et universitaires romandes, p1, p 67, p VIII, p 162.
- [2]Janssen F W, Oostra J, Oorschot A, Van Blitters wijk C A, 2006. Biomaterials 27, p. 315-23.
- [3]Hatten S C, Vitousek S P M, 2000. Trends in Ecology and Evolution, 15(6), p. 238-242.
- [4]Fremont L, 2000. Life Sciences, 66(8), p. 663-673.
- [5]Langcake P, Pryce R, 1976. Physiological Plant Pathology, 9(1), p.77-86.
- [6]Scalbert A, Williamson G, 2000. Journal of Nutrition, 130, p. 2073-2085.
- [7]Lattanzio VM T, Cardinali A, 2006. Phytochemistry : Advances in Research (F. Imperato, ed.), p.23-67.
- [8]Sun AY, Simonyi A, Sun G Y, 2002. Free Radical Biology and Medicine, 32(4), p. 314-318.
- [9]Iriti, Faoro M F, 2009. Natural Product Communications, 4(5), p. 611-634.
- [10]Roubelakis -Angelakis K A, 2001. Kluwer Academic Pub.
- [11]Wang W, Tang K, Yang H R, Wen P F, Zhang P, Wang H L, Huang W D, 2010. Plant Physiology and Biochemistry, 48(2-3), p.142-152
- [12]Creasy L L, Coffee M, 1988. Journal of American Society of Horticultural Science.113, p.230-234.
- [13]Hall D, De Luca V, 2007. The Plant Journal, 49(4), p.579-591.
- [14]Pawlus, Waffo T M, 2011. Review, Journal International des Sciences de la Vigneet du Vin, (45) in press.
- [15]Perrin L, Thèse de Doctorat, 2007. Université de Reims Champagne-Ardenne .U.F.R. pharmacie.

- [16]Chong J, Poutaraud A, Huguency P, 2009. *Plant Science* 177, p.143-155.
- [17]Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, Clement C, Courrot E, 2010. *Biofactors* 36, p.331-341.
- [18]Jeandet P, Douillt-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M, 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, p.2731-2741.
- [19]Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R, 1997. *Journal of Chemical Ecology* 23, p. 1689-1702.
- [20]Poutaraud A, Latouche G, Cerovic ZG, Merdinoglu D, 2010. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Special Issue Macrowine* 44, p.27-32.
- [21]Donnez D, Kim KH, Antoine S, Conreux A, De Luca V, Jeandet P, Clement C, Courrot E, 2011. *Process Biochemistry* 46, p.1056-1062.
- [22]Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry P J, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia K C, Lamb J H , Farmer P B, Stanley L A , Burke MD,2002. *British Journal of Cancer* 86, p.774 - 778.
- [23]Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Yoshikawa M, 2004. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, p. 4871-4876.
- [24]Zga N, Papastamoulis Y, Toribio A, Richard T, Delaunay JC, Jeandet P, Renault J H, Monti J P, Mérillon J M, Waffo T P, 2009. *Journal of Chromatography B*, 877(10), p.1000-1004.
- [25]Arts M J T J, Haenen G R M M, Voss H P, Bast A,2001.*Food Chemistry and Toxicology*, 39,p.43-47.
- [26]Loomis W D, Bataille J, 1966. *Phytochemistry* 5, p.423-438.
- [27]Villiers A, Rend, 1891. *Acad. Sci.* 112,p. 536.
- [28]Schardinger F, Wien K, 1904. *Wochenschr.*,17, p.207.
- [29] a) Freudenberg F, Meyer-Delius M, Ber D, 1938 . *Chem. Ges*, 71, p.1596.  
b) Freudenberg K, Plankenhorn E, Knauber H, 1947.*Chem. Ind. London* , p.731.



- [30]Freudenberg K, Cramer F, 1948. Naturforsch, B.3, p.464.
- [31]Cramer F, Henglein F M, 1957. Chem. Ber , 90, p.2561.
- [32]French D, Levine M L, Pazur J H, Norberg E, 1949. J. Am. Chem. Soc, 71,p.353-356.
- [33]Bender M L, Komiyama M, 1978. Springer Verlag, Berlin.
- [34]Thoma J A, Steward L, 1965. eds. R.L. Whistler and E.F. Paschall, Academic Press, New York.
- [35]Senti F R, Erlander S R, 1964. ed. L. Mandelcorn,Academic Press, New York.
- [36]Szetjli J, 1982. Académiai Kiado, Budapest.
- [37]Szetjli J, 1998. Chem. Rev. 98,p.1743-1753.
- [38]Zsardon B, Szilasi M , Tüdos F, Szejtli J, Journal of Chromatography A, 1981, 208, p. 109-112.
- [39]Guillaume P, Thèse de doctorat, 2012.Ecole Doctorale Chimie et Physico-chimie Moléculaires . Université de Lorraine.
- [40]Saenger W, 1980. Angew, Chem. Int. Ed. Engl , 19,p.344-362.
- [41]Jacob J, Ge ler K, Hoffmann D, Sanbe H, Koizumi K, Smith S M, Takaha T, Saenger W, 1998.Angew. Chem. Int. Ed., 37,p.605-609.
- [42]Saenger W, Jacob J, Geoler K , Steiner T, Hoffmann D, Sanbe H, Koizumi K, Smith S M , Takaha T , 1998.Chem. Rev., 98,p.1787-1802.
- [43]Naidoo K J, Chen J, Jansson J L M, Wildmalm G, Maliiak A, 2004.J.Phys.Chem B ,108,p.4236-4238.
- [44]Gelb R I, Schwartz L M, Bradshaw J J, Laufer D A, 1980. Bio org. Chem., 9,p. 299-304.
- [45]Gelb R I, Schwartz L M, Laufer D A , 1982. Bio org. Chem., 11,p. 274-280.
- [46]Szejtli J, 2004. Chem., 76 (10),p.1825-1845.
- [47]Szetjli J, 1988. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [48]Uekama K , Irie T , Sunada M , Otagiri M , Iwasaki K , Okano Y , Miyata T , Kasa Y , 1981. J.Pharm. Pharmacol., 33,p.707-710.
- [49]Miyajima K , Sawada M , Nakagaki M , 1985.Chem. Pharm. Bull., 33,p. 2587.

- [50] Tabushi I, 1982. *Acc. Chem. Res.* , 15, p.66-72.
- [51] Van Etten R L, Sebastian J F, Glowes G A, Bender M L, 1967. *J. Am. Chem. Soc.*, 89, p. 3242-3253.
- [52] Szente L, Szejtli J, 1999. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36,p.17-28.
- [53] Duchêne D, Wouessi djewe D, Ponchel G, 1999. *J. controlled Release*, 62,p.263-268.
- [54] Canceill J, Jullien L, Lacombe L, Lehn J-M, 1992. *Chim. Acta*, 75,p.791-812.
- [55] Khan A R, Forgo P, Stine K J, D'Souza V T, 1998. *Chem. Rev.*, 98,p.1977-1996.
- [56] Brewster M E, Loftson T, 2002. *Pharmazie*. 57,p. 94-101.
- [57] Peri C M, Wandt R W, Cleary A H, Jones A B, 2003. *drug Development and Industrial Pharmacy*, 20,p.1404 -1410.
- [58] Brewster M E, Loftson T, 1996. *J. Pharm. Sci.* , 85 ,10,p.1017-1025.
- [59] Loftson T, *cyclodextrin News*, 2001. 15,p. 23-24.
- [60] Redenti E, Szente L, Szejtli J, 2000. *J. Pharm. Sci.*, 89,p.1-8.
- [61] Szejtli J, 1994. *Med. Res. Rev.*, 14(3) ,p. 353-86.
- [62] Changqiao Z, chenfu Z, Xiuli L, Feng G, Yunhe W, 2002. *The Japan Societefor Analytical Chemistry*, p.595-597.
- [63] Qinying D, Shunzhen K, Quanhong Z, Zunle X, 1999. *American Laboratory*, p.43-47.
- [64] Eskandani Z, Thèse de doctorat, 2011. Université Evry Val d'Essonne.
- [65] Bonnet P, Thèse de doctorat, 2001. Université d'Orléans.
- [66] Estrada E, Perdomo L I, Torres L J, 2001. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, p.1561.
- [67] Patrigeon J, Thèse de doctorat, 2010. Université D'Artois.

- [68] Alkaro S, Scipione L, Ortuso F, Posca S, Rispoli V, Rotiroti D, 2002. *Bioorg. Med.Chem. Lett*, 12, p.2899.
- [69] Varady J, Wang X, 2002. *J. Phys. Chem. B*, 106, p.4863-4872.
- [70] CTD, Inc, Cyclodextrin Ressources, Natural Cyclodextrines, p.1-4.
- [71] Francesca D'A, Liria T L M, Renato N, 1991. *Arkivoc*, p.187-197.
- [72] Rodriguez-Bonilla P, López-Nicols J M, Carmona F G, 2010. *J. Chromatogr. B*, 878, p.1569.
- [73] Valero M, 2003. *Int.J.Pharm.* 253, p.97-110.
- [74] Fujita K, Matsunga A, Imoto T, 1984. *Tetrahedron Lett*, 25, 48, p.5533-5536
- [75] Aki H, Niiya T, Iwase Y, Yamamoto M, 1998. *Thermochimica Acta* 308, p.115- 121.
- [76] De Melo N F, Grillo R, Rosa A H, Fraceto L F, 2008. *J.Pharm Biomed Anal* 47, p.865-869.
- [77] Uekama K, Hirayama F, Nasu S, Matsuo N, Irie T, 1978. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 26, p.3477-3484.
- [78] Loftsson T, Brewster M E, 1996. *J Pharm Sci* 85, p.1017-1025.
- [79] Bielejewska A, Duszczak K, Kwarczak A, Sybilska D, 2002. *J Chromatogr A* 977, p. 225-237.
- [80] Wedig M, Holzgrade W, 1999. *Electrophoresis*, 20, p.2698-2704.
- [81] Rodríguez-Bonilla P, López-Nicolás J M, Carmona FG, 2010. *J. Chromatogr. B* 878 ,p.1569.
- [82] Dodziuk H, Jurczak J, Kozminski W, Lukin O, Sitkowski J, Stefaniak L, 2000. *J. Mol. Struct*, 519, p.33-36.

- [83] Dodziuk H, Kozminski W, Lukin O, Sybilska D, 2000. *J. Mol. Struct.*, 523, p. 205.
- [84] Dodziuk, Ejchart A, Lukin O, 1999. *J. Org. Chem.*, 64, p. 1503.
- [85] Duclairoir C, 2000. *L'Actualité Chimique.*, 6, p. 24.
- [86] Breslow, Ronald, 1991. *Acc. Chem. Res.*, p. 24, 11.
- [87] Seo, Toshihiro, Kajihara, Taketoshi, Lijima T M, 1991. *Mol. Chem.*, 192, p. 2357-2367.
- [88] Veiga F, 1999. *Program and Abstracts of the 9th International Symposium on Cyclodextrins*, p. 3.
- [89] Uekama K, 2004. *Chem. Pharm. Bull.* 52, p. 900.
- [90] Dhaoui N, Abdaoui M, 2009. *Letters in Organic Chemistry*, vol. 6, p. 37-40.
- [91] Bensouilah N, Dhaoui N, Abdaoui M, 2012. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Volume 73, Issue 1-4, p. 369-376.

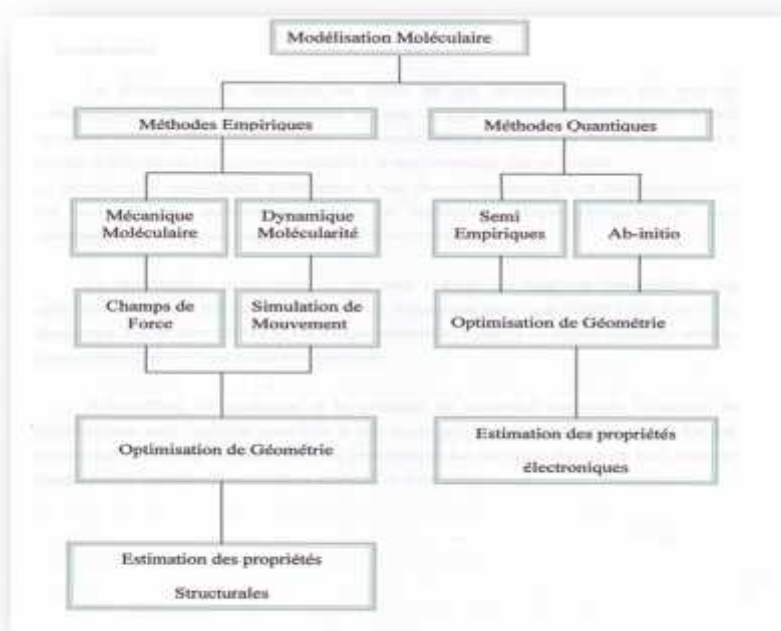


# CHAPITRE II

# MÉTHODES THÉORIQUES

## II. Introduction

Le développement important des moyens informatiques (mémoire plus importante, performance des processeurs, infographie, ...) au cours de ces dernières années a permis à la chimie de s'enrichir d'outils informatiques spécialement dédiés à la représentation des molécules. Ainsi une nouvelle discipline est apparue permettant à tout chimiste de mieux appréhender les problèmes liés au domaine moléculaire: *la Modélisation Moléculaire* (Figure(II.1)).



**Figure (II.1)** : Organigramme de la modélisation moléculaire [1].

Elle est devenue maintenant un ingrédient presque obligatoire à tout développement en chimie, en chimie médicinale ou en biologie structurale. La modélisation moléculaire implique l'utilisation de méthodes de calcul théoriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique ab-initio ou semi-empirique, ...) afin de déterminer la représentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes d'une molécule et d'évaluer ces propriétés physico-chimiques [1].

Les principaux objectifs de la modélisation moléculaire sont :

- Visualisation infographique et dessin des molécules à partir de données structurales.
- Obtention d'informations sur les mouvements des molécules et sur leurs énergies.
- Détermination des géométries moléculaires.
- Reproduction et prédiction qualitative des propriétés des molécules et des macromolécules.
- Corrélation entre les propriétés et les structures.

Pour atteindre ces objectifs, différentes techniques de visualisation, manipulation, modification, construction, analyse ou calcul des structures moléculaires sont utilisées. Ainsi la construction complète d'une structure moléculaire peut se faire à partir des éléments (atomes, groupements fonctionnels, molécules simples ou complexes...) fournis par:

## II.1 Méthodes de Mécaniques Quantiques :

Nous décrivons ici les principes de base des méthodes de la chimie quantique. Un rappel des approximations couramment utilisées permet de comparer les méthodes entre elles et de mieux comprendre leurs limitations.

### II.1.1 Généralités :

La chimie quantique concerne le développement et l'utilisation de méthodes basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger [2], décrivant le mouvement des électrons et des noyaux constitutifs de tout système moléculaire. En résolvant l'équation (indépendante du temps):

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Où  $\hat{H}$  est l'Hamiltonien, c'est la somme des opérateurs des énergies cinétique et potentielle.

On obtiendra l'énergie totale  $E$  et la fonction d'onde  $\psi$  du système, à partir de laquelle il sera possible de déterminer toutes les informations sur le système étudié. Il n'est cependant pas possible de résoudre exactement une telle équation, et des approximations ont donc dû être introduites dans la théorie quantique proposée, dès les années 1920, afin de pouvoir résoudre l'équation de Schrödinger de façon approchée.

L'Hamiltonien, pour un système de  $N$  noyaux et  $n$  électrons, s'écrit:

$$\hat{H} = - \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \Delta_i - \sum_{k=1}^N \frac{1}{2M_k} \Delta_k - \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^N \frac{Z_k}{r_{ki}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{k=1}^N \sum_{l=1}^N \frac{Z_k Z_l}{R_{kl}} \quad (2)$$

$\Delta_i$ ,  $\Delta_k$  : sont les opérateurs Laplacien relatifs à l'électron  $i$  et au noyau  $k$ , respectivement.

$Z_k$  : la charge du noyau  $k$ .

$r_{ij}$  : la distance entre les électrons  $i$ ,  $j$ .

$R_{kl}$  : la distance entre les noyaux  $k$ ,  $l$ .

$r_{ki}$  : la distance entre l'électron  $i$  et le noyau  $k$ .

$-1/2 \Delta_i$  : est l'énergie cinétique de l'électron  $i$ .

$-1/2M_k \Delta_k$  : l'énergie cinétique des noyaux  $k$ .

$-Z_k/r_{ki}$  : le potentiel électrostatique entre l'électron et le noyau

$1/r_{ij}$  : Potentiel électrostatique entre les électrons  $i$  et  $j$ .

$Z_k Z_l / R_{kl}$  : le potentiel électrostatique de répulsion entre les noyaux  $k$  et  $l$ .

Pour résoudre l'équation (1), on se base sur deux approximations:

- a- L'hypothèse de Born-Oppenheimer [3]: On considère que l'on peut séparer le mouvement des électrons de celui des noyaux, en estimant que le mouvement des noyaux est beaucoup plus lent que celui des électrons que l'on considère fixes, dans l'étude du mouvement des électrons de la molécule.
- b- L'approximation non relativiste: Les effets relativistes sont complètement négligés, l'opérateur quantique de mouvement est



supposé être complètement classique: c'est-à-dire, en négligeant la variation de masse des particules avec leurs vitesses, de même que les termes de couplage dus aux spins.

La mécanique quantique n'admettant pas de solutions analytiques exactes pour l'équation de Schrödinger pour un nombre de particules supérieur à deux, il est donc nécessaire de faire appel aux méthodes d'approximation pour résoudre l'équation de Schrödinger d'une manière approchée, pour les systèmes poly-électroniques.

### II.1.2 Les méthodes semi-empiriques :

Dans un calcul *ab initio* la plus grande proportion du temps de calcul est invariablement prise par l'évaluation des intégrales. Le nombre d'intégrales à évaluer augmente rapidement d'environ  $N^4$ , où  $N$  est le nombre de fonctions de base des orbitales atomiques. Certains de ces intégrales sont faciles à calculer, telle que les intégrales mono électroniques, tandis que d'autres sont beaucoup plus difficiles, en particulier les intégrales biélectroniques à trois et quatre centres qui apparaissent au cours du processus de résolution. La voie la plus évidente pour réduire ce temps de calcul est de négliger un certain nombre de ces intégrales à évaluer ou encore de les approximer d'une manière efficace, c'est la principale motivation des méthodes semi-empiriques. Les particularités des méthodes semi-empiriques sont :

- ✧ Seuls les électrons de valence sont traités de manière explicite dans les calculs (cette approximation se base sur le fait que ce sont les électrons de valence qui interviennent dans les liaisons chimiques et définissent donc les propriétés du système).
- ✧ Un grand nombre d'intégrales biélectroniques sont négligées (celles à 3 et 4 centres dont la valeur est souvent voisine de zéro). Cette réduction du nombre d'intégrales à calculer permet d'utiliser des fonctions de base de Slater pour développer les orbitales atomiques. En outre, seules les orbitales atomiques de la couche de valence sont utilisées.
- ✧ Les intégrales restantes sont remplacées par des paramètres empiriques.

Les méthodes semi-empiriques sont fondées sur deux types d'approximations qui portent essentiellement sur l'évaluation des intégrales biélectroniques [4]. Ainsi on distingue :

- l'approximation **ZDO** (Zéro Differential Overlap) qui consiste à négliger le recouvrement différentiel entre les paires d'orbitales différentes.
- Une deuxième approximation nommée **NDDO** (Neglect Diatomic Differential Overlap) dans laquelle les interactions électron-électron ne sont prises en compte que si les orbitales atomiques sont situées sur des atomes différents.

Basées sur ces types d'approximations, plusieurs méthodes semi-empiriques ont été développées telles que CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap), MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), ...etc. Les méthodes les plus connues sont AM1 (*Austin Model 1*) [5] et PM3 (*Parametrization Model 3*) [6] qui offrent des avantages réellement significatifs concernant la rapidité du calcul et une plus grande flexibilité dans la dimension du système à étudier (les biomolécules).

La méthode CNDO a été la première méthode quantique, de type semi empirique, à être appliquée aux complexes d'inclusion. En effet, une étude [1], a utilisée pour déterminer les moments dipolaires de complexe d'inclusion à base de cyclodextrine et de molécules aromatiques.

Puis, avec l'apparition des méthodes AM1 et PM3, mieux paramétrées et qui devraient donner des résultats plus performants et des géométries plus fiables, les travaux utilisant ces deux méthodes pour les complexes d'inclusion ont pris de l'ampleur [2], en 1995, ont pu démontrer les performances de la méthode AM1 dans la détermination des géométries des  $\alpha$ - et  $\beta$ -CDs alkylés et natives. Avakyan et al. [3] ont obtenu de structures optimisées de CDs comparables à la structure cristallographique, au moyen de la méthode PM3. Plus tard, Lui et Guo [4] ont pu démontrer que la méthode PM3 reproduit mieux les structures cristallines et prédit plus efficacement les interactions des liaisons hydrogène de divers complexes d'inclusion que la méthode AM1.

Généralement les paramètres utilisés dans un calcul basé sur les méthodes semi-empiriques peuvent être obtenus, par exemple, à partir des caractéristiques spectrales des atomes, de calculs *ab initio* de haut niveau ou d'autres méthodes expérimentales [7].

### II.1.2.1 La méthode AM1 :

La méthode AM1 (Austin Model-1) est la seconde théorie semi empirique présentée par le groupe de Dewar (1985), elle a été développée pour éliminer les problèmes inhérents à la méthode MNDO qui conduisait à des énergies de répulsion trop élevées. Le terme répulsif a alors été modifié par l'introduction de fonctions gaussiennes de forme mathématique [8]. La stratégie adoptée à cet effet, était la modification des termes cœur-cœur en utilisant les fonctions gaussiennes pour la répulsion et l'attraction.

Les gaussiennes attractives sont conçues pour estimer la répulsion directe centrée dans la région où les répulsions sont centrées sur les petites séparations internucléaires avec cette modification, l'expression du terme cœur-cœur ont été reliées à l'expression MNDO avec,

$$E_{AB} = E_{MNDO} + \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \left[ K_{A_i} \exp - L_{A_i} R_{AB} - M_{A_i}^2 + \sum_j K_{B_j} \exp - L_{B_j} R_{AB} - M_{B_j}^2 \right] \quad (3)$$

$$E_{AB} = E_{MNDO} + \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \left[ K_{A_i} \exp - L_{A_i} R_{AB} - M_{A_i}^2 + \sum_j K_{B_j} \exp - L_{B_j} R_{AB} - M_{B_j}^2 \right] \quad (4)$$

Les termes additionnels sont les fonctions gaussiennes sphériques avec une largeur représentée par le paramètre L. les paramètres M et K sont optimisés pour chaque atome, ensemble avec les paramètres a dans le terme exponentiel. Dans la par métrisation originale de AM1 il y a quatre termes gaussiens pour exprimer le carbone, trois pour l'hydrogène, deux pour

l'oxygène (les gaussiennes répulsives et attractives ont été utilisés pour le C, H et N mais pour l'oxygène, ce ne sont que les gaussiennes répulsives qui sont utilisées).

L'inclusion de ces gaussiennes augmenteraient considérablement le nombre de paramètres par atome. Ceci va engendrer un processus de paramétrisation plus difficile. Globalement on peut dire que l'AM1 est une amélioration significative par rapport à MNDO et plusieurs déficiences liées aux répulsions du cœur ont été corrigées.

- Amélioration : liaison H, meilleures barrières d'activation, chaleur de formation 40% mieux.
- Faiblesse : valence s et p seulement, composés hypervalents, enthalpie d'activation élevée, liaison o - o trop courte.
- précisions typiques :  $\Delta H_f \pm 8$  Kcal/mol, dipôle  $\pm 0.5$  D, liaison  $\pm 0.06 \text{ \AA}$ , Angle  $\pm 4 \text{ A}^\circ$ .

### II.1.2.2 La méthode PM3:

Le modèle PM3 développée par Stewart(1989), est basée sur la méthode MNDO (3, signifie, c'est la para méterisation N°3 après MNDO et AM1). L'Hamiltonien PM3 est constitué essentiellement des mêmes éléments que ceux de l'AM1. En revanche, plusieurs paramètres AM1 sont obtenus à travers des connaissances de chimie appliquée et de l'intuition. Ceci a pour conséquence de trouver des valeurs différentes entre les calculs par AM1 et PM3, malgré l'utilisation d'une même forme de fonction. Le degré de précision des prédictions des propriétés thermodynamiques et structurales est presque le même pour les deux méthodes. L'un des inconvénients majeur de la PM3 est la barrière de rotation de la liaison amide qui est très faible et carrément inexistante dans quelques cas. Ceci peut être corrigé avec l'utilisation de potentiels de torsion empirique [9].

- ✓ précision typiques :  $\Delta H_f \pm 8$  Kcal/mol, dipôle  $\pm 0.5$ D, liaison  $\pm 0.06 \text{ \AA}$ , angle  $\pm 4 \text{ A}^\circ$ .

- ✓ Elle s'appuie sur un très grand nombre de données expérimentales.
- ✓ Elle donne en général de meilleures énergies et de meilleures géométries, mais des problèmes d'analyse conformationnelle persistent (e. g. éthanol, hydrazine).
- ✓ Les liaisons hydrogène sont trop courtes (environ 0.1Å).
- ✓ Les liaisons de van der Waals sont mal décrites.
- ✓ Les liaisons Si-X (X=Cl, Br, I) sont sous-estimées.
- ✓ Rotation peptidique (rotation autour de la liaison C-N dans les amides) sous-estimée (parfois de 15 kcal/mol).

En 1999, Avakyan et al. [10] ont obtenu des structures de CDs optimisées à l'aide de la méthode PM3 comparables aux structures cristallographiques.

Dans les années 2000, Lui et Guo [11] ont pu démontrer, lors de différents travaux sur les complexes d'inclusion, que la méthode PM3 reproduit mieux les structures cristallines et prédit plus efficacement les interactions des liaisons hydrogène que la méthode AM1.

### II.1.2.3 La méthode PM6:

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

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

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

## Références Bibliographiques

- [1] Gould H, Tobochnik J, 1988. Addison-Wesley, Reading, Mass.
- [2] Schrodinger, 1926. E. Ann. Phys. Leipzig, 76, p. 361.
- [3] Born M, Oppenheimer R, 1927. Annal en der Physik, 84, p.457- 484.
- [4] Rivail J L, 1998. Eléments de chimie quantique à l'usage des chimistes, 2<sup>ème</sup> édition.
- [5] Dewar M J S, Zoebisch E G, Healy E F, Stewart J J P, 1993. J. Am. Chem. Soc, 107, p.3902-3909.
- [6] Stewart J P P, 1989. J.Comput. Chem, 10, p.209-264.
- [7] Young DC, 2001. Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems.
- [8] Bouzitouna A, Thèse de Magistère, 2009. Université de Badji Mokhtar, Annaba.
- [9] Stewart J J P, 1989. J. Comp. Chem., 10, p. 221-264,.
- [10](a).Avakyan V G, Nazarov V B, Alfimov M V, Bagatur'syants A A, 1999. Russ. Chem. Bull, 48, p.1833. (b) Avakyan V G, Nazarov V B, Alfimov M V, Bagatur'yants A A, Voronezhcheva N I, 2001. Russ, Chem. Bull , 50, p. 206.
- [11] li X S, Liu L, Mu T W, Guo Q X, Manatsh, 2000. Chem , 131, p.849.





### III. Techniques de Séparation :

#### III.1 Conditions générales :

##### Solvant :

Tous les solvants que nous avons utilisés en chromatographie analytique étaient de grade HPLC. Ceux utilisés pour la chromatographie préparative et pour l'extraction étaient d'une pureté > 99%. L'eau est distillée et filtrée. Les solvants deutérés utilisés pour l'RMN étaient le D<sub>2</sub>O, DMSO-d<sub>6</sub> et méthanol; acétone; l'acétonitrile *d*-3.

##### ❖ Réactifs:

- La bêta-cyclodextrine native ( $\beta$ -CD), l'hydroxypropyl-  $\beta$ -Cyclodextrine (HP- $\beta$ -CD), et le sulfate de cuivre ont été achetés chez Sigma Aldrich (Sigma, Allemagne) et utilisés tels qu'ils étaient reçus.

##### ❖ La chromatographie sur couche mince (CCM) :

Elle a été utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince avec indicateur de fluorescence UV<sub>254</sub> permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silica gel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant constitué d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Les conditions d'analyses sur CCM sont les suivantes :

- support : silice 60 F254, épaisseur 0.2 mm à fond d'aluminium.
- solvant de migration : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (v/v/v = 85/15/3)
- solvant de révélation : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH/anisaldéhyde (v/v/v = 5/90/5)
- La révélation s'effectue par pulvérisation suivi du chauffage de la plaque à 300°C.



- La migration (verticale) est fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire
  - Les phases suivantes (éther de pétrole; éther di-éthylique et l'acétate d'éthyle) ont été purifiés par la technique de chromatographie sur couche mince préparative [1].
- ❖ **Les points de fusion :** Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un banc-kofler.
- ❖ Évaporateur sous pression réduite.
- ❖ Centrifugeuse.
- ❖ **Le modèle moléculaire :**

Les calculs ont été réalisés en utilisant les logiciels Mopac (versions 2007 et 2009) [2] et Gaussian versions 03 puis 09 [3]. Le logiciel Cambridge Chem Bio 3D Ultra (version 11.0) [4], a été utilisé pour la schématisation de la structure de départ du picéatannol. L'optimisation de la structure ainsi que la construction de tout le processus de formation des deux complexes d'inclusion a ensuite été réalisée par la méthode PM3. La  $\beta$ -CD a été extraite de la base de données du logiciel Gaussian 09.

### III.2 Techniques spectroscopiques et spectrométriques :

❖ **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :**

Les spectres RMN du proton,  $^1\text{H}$  RMN et du carbone 13,  $^{13}\text{C}$  RMN pour le picéatannol et le resvératrol ont été obtenus à 303 K dans le mode transformée de Fourier à 300 MHz sur un spectromètre du type Bruker AMX 300 (université de Bordeaux 2, Espagne). Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm par rapport aux solvants deutérés (méthanol signal à  $\delta=3.31$  ppm ou acétone à  $\delta=2$  ppm, acétonitrile signal à  $\delta=1.94$  ppm).

Les spectres de RMN du proton,  $^1\text{H}$  RMN et du carbone 13,  $^{13}\text{C}$  RMN des complexes formés à l'état solide ont été réalisés sur un appareil du type Varian® Mercury 400 (université de Barcelone, Espagne) équipé d'une sonde

de détection inverse de 5 mm. Les spectres du  $^1\text{H}$  RMN ont été enregistrés à 400 MHz et les spectres du  $^{13}\text{C}$  RMN à 100,6 MHz. Pour les deux complexes de PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD.

Dans les descriptions des spectres RMN, La multiplicité des signaux est indiquée par une ou plusieurs lettres minuscules: (s) signifie singulier, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (dd) doublet dédoublé, (m) multiplet. Les constantes de couplages J sont exprimées en Hertz (Hz) et les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm en prenant comme référence le déplacement chimique du tétra méthyl silane TMS comme étalon interne ( $\delta = 0,00$ ) ou DMSO- $d_6$  fixée à 2.49 ppm.

#### ❖ Spectres UV :

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectrophotomètre du type Hitachi U-2000 (Université de Bordeaux 2, France).

#### ❖ Spectrométrie de masse :

Les spectres MALDI-MS ont été obtenus par un spectromètre de masse du type ToF Spec <sup>TM</sup> MALDI - ToF de Micromass <sup>TM</sup> (Manchester, UK) à l'université de Bordeaux 2 en France. Les spectres ont été enregistrés dans le mode positif pour le picéatannol.

Les spectres de masse des deux complexes PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD ont été enregistrés sur un appareil QTOF Trio-1000 Thermo Quest (université de Barcelone, Espagne) à haute résolution (ESI-HRMS) fonctionnant par la technique d'ionisation par Electro Spray, en mode positif (+) ou négatif (-).

### III.3 Extraction du matériel végétal:

#### III.3.1.1 Broyage et Macération :

La matière végétale utilisée dans cette partie provient d'un travail antérieur [1], en résumé, elle a été préparée en suivant le protocole ci-dessous :

Les sarments de vigne, du cépage Merlot ont été récoltés à Villenave d'Ornon, région Bordelaise (Ouest de la France). Ils ont été découpés en petits morceaux et laissés sécher à l'air libre après quoi, ils ont été broyés en

poudre semi fine afin d'assurer une extraction efficace des composés.

Environ 700 g de poudre ont été introduites dans une colonne d'extraction de 8cm de diamètre et de 1 mètre de longueur. Un mélange de solvants acétone/eau (80/20) a été rajouté. La macération a duré environ 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter la dégradation de certaines molécules photosensibles. L'extrait obtenu est filtré. L'opération est répétée 3-4 fois, les extraits sont regroupés, concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, en vue d'éliminer l'acétone.

#### **a - Extraction liquide-liquide :**

L'extrait aqueux ainsi obtenu est soumis à une délipidation à l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter, en vue d'éliminer les lipides, la chlorophylle et les xanthophylles...etc. La phase supérieure est écartée et la phase aqueuse est soumise à plusieurs étapes d'extraction à l'acétate d'éthyle. Ce dernier a été éliminé par évaporation sous- vide. Le résidu obtenu est dissout dans l'eau et lyophilisé.

Des études chromatographiques ont montré la richesse de cette phase en polyphénols. C'est la raison pour laquelle elle a été fractionnée par chromatographie de partage centrifuge [1], et la fraction 22-29 a été sujette à la purification par CCM préparatives en utilisant un éluant composé d'un mélange de solvants MeOH/acétate d'éthyle/ Acide acétique % [3].

Deux composés appartenant à la famille des stilbènes, le resvératrol et le picéatannol ont été purifiés.

### **III.4 Etude physico-chimique du complexe d'inclusion :**

#### **III.4.1Préparation des complexes d'inclusion (RES / $\beta$ -CD, PIC / $\beta$ -CD, RES / HP- $\beta$ -CD et PIC /HP- $\beta$ -CD), en solution :**

##### **III.4.1.1Mode Opérateur général :**

Les solutions de chaque stilbène (resvératrol, picéatannol) ont été préparées à une concentration de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> dans le méthanol. Vingt microlitres (20  $\mu$ L) de cette solution ont été injectés pour l'analyse par HPLC. Le débit de la phase mobile a été établi à 1,00 mL min<sup>-1</sup> et la détection a été effectuée à

306 nm.

#### III.4.1.2 Préparation de la phase mobile :

Les phases mobiles ont été préparées en ajoutant une quantité pesée avec précision de  $\beta$ -CD et de HP- $\beta$ -CD [4,5] à la phase mobile constituée d'un mélange méthanol-eau (250 mL) dans un bécher de 500 mL. La phase mobile ainsi préparée est laissée sous agitation le temps suffisant (jusqu'à une heure) pour que la dissolution totale des CDs soit obtenue à température ambiante. On ramène ensuite le volume de la phase mobile à 500 mL par ajout du mélange méthanol-eau.

Les concentrations de  $\beta$ -CD et de HP- $\beta$ -CD utilisées étaient 0; 0,5; 2; 3 et 4 mM à chaque fois qu'on fait changer la concentration de la solution de la phase mobile, nous laissons au moins 1 heure pour la colonne pour qu'elle soit bien équilibrée et conditionnée avec la nouvelle solution.

Le volume mort de la colonne  $V_0$  a été déterminé à l'aide d'une solution de sulfate de cuivre (0,01 mg mL<sup>-1</sup>) [6].  $V_0$  a été soigneusement contrôlé au cours de la procédure expérimentale.

Un volume de 20  $\mu$ L de la solution de la molécule invitée est injecté à chaque fois et les temps de rétention sont mesurés. Les injections ont été répétées 3 fois.

- Le principe de l'HPLC est basé sur les interactions du composé à étudier, notamment de sa partie hydrophobe, avec les chaînes octadécyles greffées sur la silice de la phase stationnaire inverse C18 lors de son élution avec une phase mobile polaire MeOH/H<sub>2</sub>O.

Cette méthode s'appuie sur le temps de rétention ( $t_r$ ) du composé ainsi que de son facteur de rétention apparent ( $k$ ), obtenu avec différents mélanges d'élution MeOH/H<sub>2</sub>O et déterminé en utilisant la relation suivante :

$$K = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Où  $t_0$  : temps mort (le temps que met la phase mobile pour traverser la colonne).  $t_r$  : Le temps de rétention du composé.

### III.4.1.3 Détermination des constantes de stabilité des complexes d'inclusions ( $K_C$ ) :

La détermination des constantes de complexation du RES et du PIC avec la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD est réalisée par HPLC. Les expériences sont réalisées en utilisant un chromatographe liquide équipé d'une colonne C18 à 25°C. La détection a été réalisée à 306 nm avec un détecteur UV-vis.

La phase mobile est constituée d'un mélange binaire (MeOH/eau), auquel on ajoute des concentrations croissantes de  $\beta$ -CD et HP- $\beta$ -CD (0; 0,5; 2; 3 et 4 mM) tout en fixant celles des deux stilbènes (RES, PIC), Le débit est fixé à 1 mL/ minute.

La phase stationnaire est équilibrée par passage de la phase mobile jusqu'à l'obtention d'un temps de rétention reproductible.

#### III.4.1.3.1 Détermination du temps mort:

Pour cette étude, nous avons utilisé le  $\text{CuSO}_4$  anhydre vue son inertie vis-à-vis des deux phases, mobile et stationnaire.

On ajoute une masse de 0,01g de  $\text{CuSO}_4$  dans un volume de 1L d'eau distillée puis on agite jusqu'à la solubilité complète du sulfate de cuivre. On injecte 10  $\mu\text{L}$  de cette solution dans l'appareil HPLC pour déterminer la valeur exacte de  $t_0$ . Le temps mort est lu sur le chromatogramme issu de cette injection.

Ce volume est systématiquement contrôlé tout au long du processus expérimental.

Les temps de rétention des deux stilbènes étudiés (RES, PIC) à une concentration fixe finale de  $15 \times 10^{-6}$  Mol, sont mesurés en absence et en présence de CD dans la phase mobile. Chaque composé est injecté 3 fois sur la colonne. La valeur du temps de rétention est la moyenne des 3 temps de rétention obtenus.

Les constantes de complexation ( $K_F$ ) sont déterminées par l'équation (2) [7] :

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_0} + \frac{K_F}{K_0} [CD]_m \quad (2)$$

$K$ : facteur de capacité de l'invité

$K_0$  : facteur de capacité de l'invité en l'absence de  $\beta$ -CD.

$K_F$  : constante de formation apparente du complexe d'inclusion.

$[CD]_m$  : concentration effective de la molécule hôte dans la phase mobile.

Avec une stœchiométrie a été supposée 1:1 et l'interaction entre les complexes avec la phase stationnaire a été négligée.

#### III.4.1.4 Etude de l'effet de la Température :

L'effet de la température sur le processus de complexation des deux stilbènes (Resvératrol, Picéatannol) avec  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD a été étudié. Nous avons fait varier la température de  $20 \pm 0,1$  à  $35,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . L'équation (3) a été utilisée pour la détermination de l'enthalpie standard et l'entropie du transfert des stilbènes de la phase mobile vers la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD [8] :

$$\ln K_F = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (3)$$

Où

$K_F$  : Constante de formation apparente du complexe d'inclusion.

$T$ : Température.

$R$  : Constante des gaz parfaits.

$\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  sont respectivement, les changements d'enthalpie et d'entropie standards du complexe formé dans la phase mobile.  $-\Delta H^\circ/R$  et  $\Delta S^\circ/R$  sont la pente et l'intercepte, respectivement, du tracé linéaire de  $\ln(K_F)$  contre  $1/T$ .

Pour déterminer la variation d'énergie libre de Gibbs pour les interactions a ayant lieu au cours de processus d'inclusion, l'équation suivante a été utilisée:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} \quad (4)$$

### III.5 Evaluation et analyse statistique :

L'élution du picéatannol et du resvératrol a été réalisés en triplicata et les facteurs de capacité qui résultent de chaque injection ont été calculés et testés systématiquement dans différentes conditions expérimentales de linéarité et de non-linéarité.

Les données ont été exprimées comme étant la moyenne des résultats de trois expériences distinctes réalisées  $\pm$  l'erreur standard (écart type). Les différences entre les groupes ont été évaluées par une analyse unidirectionnelle de variance (ANOVA) au moyen de Microsoft Excel 2010.

### III.6. Préparation des complexes à l'état solide :

Les complexes d'inclusion PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD ont été préparés par la méthode de Co-précipitation [9].

A une solution de CD dissoute dans l'eau distillée ( $v = 20$  mL), on ajoute à température ambiante et sous agitation magnétique, une solution de PIC (1eq) dans un mélange méthanol: eau (10:90 v/v) selon un rapport molaire : (PIC: CD) (1 :2 eq). L'agitation continue jusqu'à l'apparition d'un précipité, le temps nécessaire pour compléter la complexation est de 72 heures, à l'air libre.

Le précipité obtenu était sous forme des cristaux blancs fins, il a été filtré, rincé par une petite quantité de MeOH, fait sécher à l'air libre et conservé au frigo jusqu'à l'analyse.

**Référence Bibliographique**

- [1] Amira-Guebailia H, Thèse de doctorat, 2007. Université de Badji Mokhtar Annaba.
- [2] Djemil R, Thèse de doctorat, 2012. Université de 08 Mai 1945 Guelma.
- [3] Zga N, Thèse de doctorat, 2010. Université de Badji Mokhtar Annaba.
- [4] Taghvaei M, Stewart G H, 1991. *Anal. Chem.* 63, p. 1902.
- [5] Chatjigakis A K, Donzé C, Coleman A W, 1992. *Anal. Chem.* 64, p. 632.
- [6] Clarot I, Clédat D, Battu S, Cardot P J P, 2000. *J. Chromatogr. A* 903, p. 67.
- [7] Hai-Shu L, Wei Z, Mei LG, Qiu-Yi C, Paul C H, 2010. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, p. 693.
- [8] Lopez-Nicols J M, Rodriguez-Bonilla P, Garca-Carmona F, 2009. *J. Agric. Food Chem.* 57, p. 10175.
- [9] Lopez-Nicols J M, Rodriguez-Bonilla P, Snchez-Ferrer A, Garca-Carmona F, 1995. *Biochem. J.* 308, p. 151.





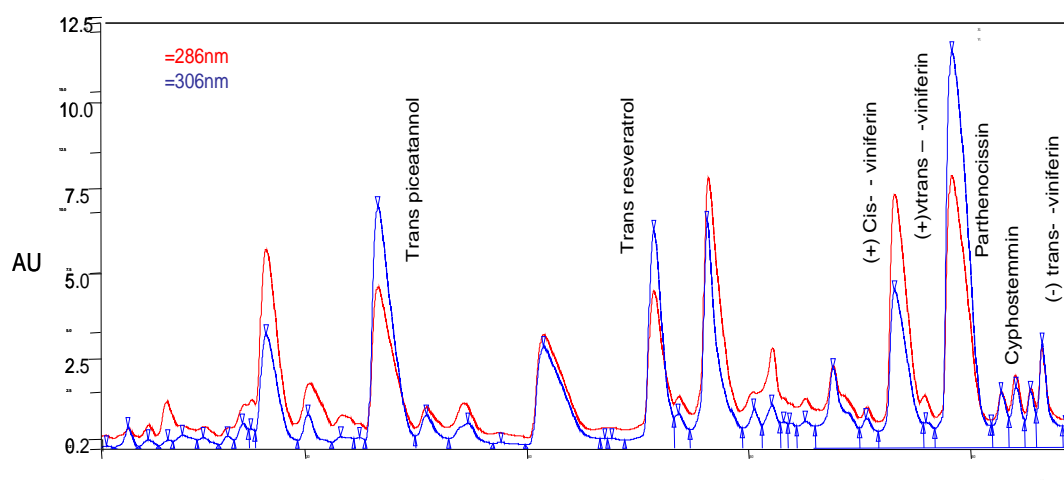
**CHAPITRE IV**  
**RÉSULTATS ET**  
**DISCUSSIONS**

Vitis vinifera L.

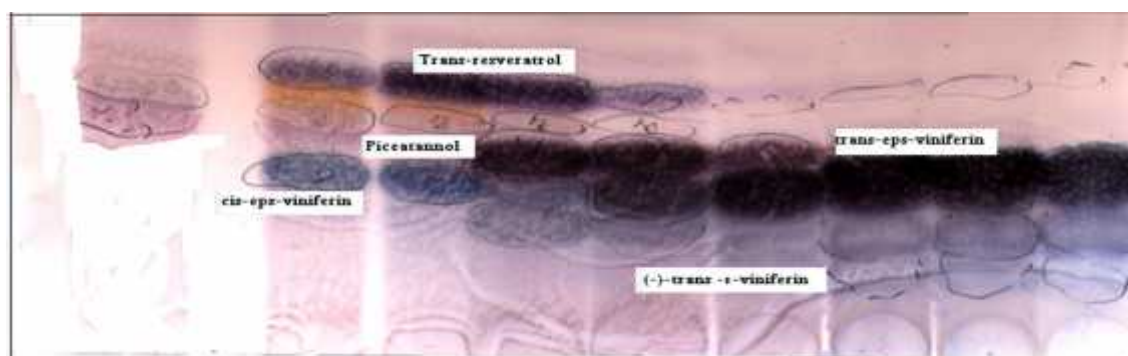
## IV. Résultats et Discussions

### IV.1 Caractéristiques des molécules invitées :

A partir des sarments de vigne cépage Merlot, nous avons isolé deux molécules; le resvératrol et le picéatannol en vue d'étudier leurs complexes d'inclusion par les bêta-cyclodextrines native et modifier. La structure chimique de ces composés a été déterminée en utilisant les méthodes spectroscopiques classiques, UV, RMN du proton et du carbone 13. Les données spectrales seront ensuite comparées aux résultats publiés [1].

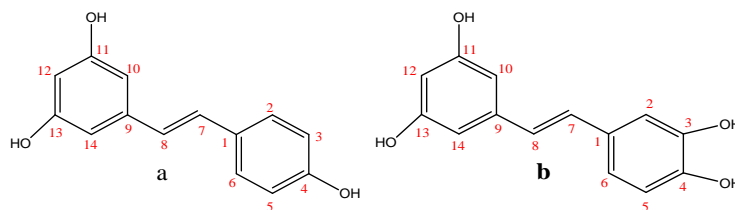


**Figure (IV.1):** Chromatogramme HPLC de la fraction contenant le resvératrol et le picéatannol (appareil : HPLC -DAD, Varian, France).



**Figure (IV.2):** Plaque CCM montrant le resvératrol et le picéatannol, CCM en mode normal, éluant :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (v/v/v = 85/15/3), réactif de révélation  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}/\text{anisaldéhyde}$  (v/v/v = 5/90/5).

➤ Nous donnons ci-dessous, certaines propriétés physico-chimiques ainsi que les caractéristiques spectrales des deux composés :

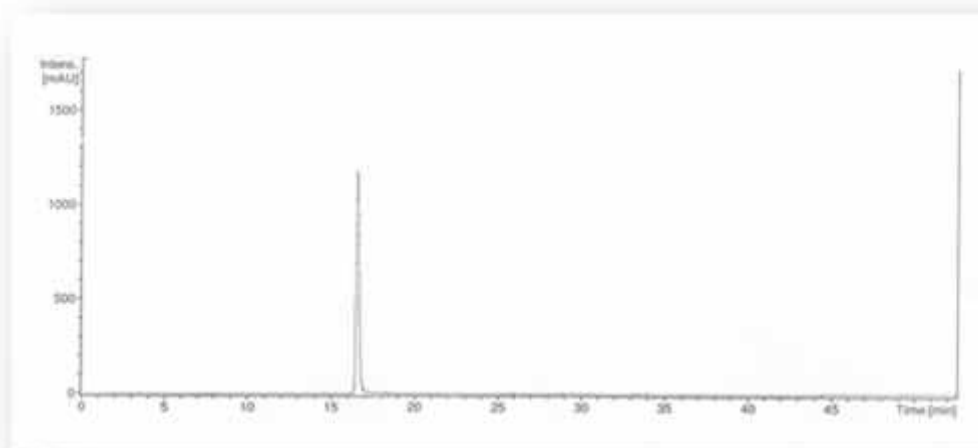


|                            | (a)  | (b)  |
|----------------------------|--|--|
| <b>Nom</b>                 | <b>Resvératrol : Trans-3, 5, 4' - trihydroxystilbène</b> | <b>Picéatannol : Trans 3, 4, 3', 5' -tétra hydroxystilbène</b> |
| <b>Formule moléculaire</b> | $C_{14}H_{12}O_2$  | $C_{14}H_{12}O_3$  |
| <b>M (g/mol)</b>           | 228.24   | 244.24   |
| <b>P<sub>f</sub> (°C)</b>  | 223-226  | 223-227  |

**Figure(IV.3) :** Certaines propriétés des Picéatannol et Resvératrol utilisées.

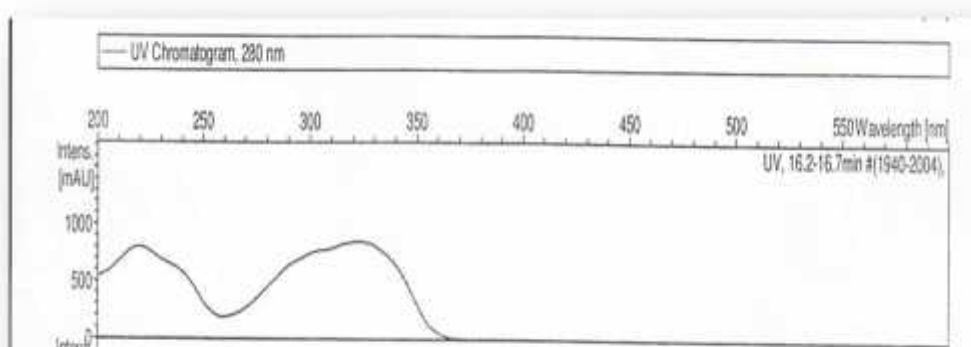
**Solubilité :** le picéatannol est soluble dans le DMSO (10 mg / mL), le DMF, l'éthanol (10 mg/mL), le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et l'eau (0,5mg/mL) [2].

Le picéatannol isolé est analysé par HPLC analytique (Varian, France). Le chromatogramme ci-dessous montre un pic Gaussien avec une faible largeur du pic à la base, ce qui prouve un degré de pureté très élevé pour ce composé.



**Figure (IV.4) :** Chromatogramme HPLC du picéatannol pur utilisé  
(Appareil : HPLC -DAD, Varian, France).

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet UV, montre un maxima à 336 nm avec un épaulement à 290 nm.



**Figure (IV.5) :** Spectre UV du picéatannol dans le méthanol.

#### IV.1.1 Interprétation des spectres RMN du picéatannol :

Le tableau ci-dessous donne les données RMN du picéatannol montrant un système aromatique complexe entre 6,23 et 7,02 ppm, correspondant à 8 protons, dont deux appartiennent à un système oléfinique.

- Les deux signaux apparaissant sous forme de doublets à 6,83 et à 6,97 ppm, respectivement possèdent tous deux une constante de couplage de 14,5 Hz,

on peut déduire la présence d'une double liaison trans, ces signaux correspondent aux protons H7 et H8.

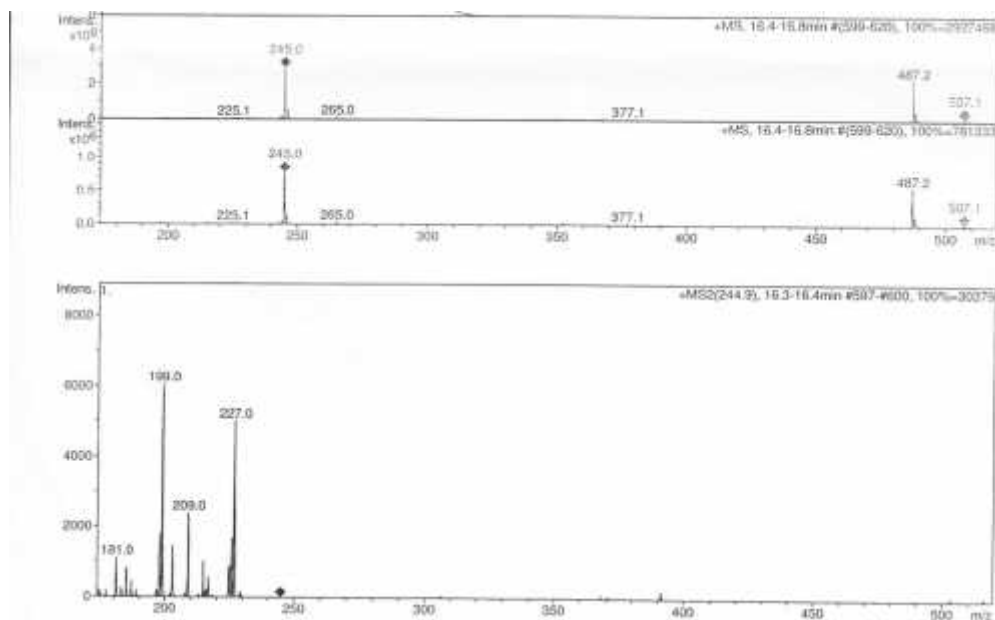
- Le signal sous forme de doublet à 6,92 ppm correspond au proton H6.
- Le signal sous forme de doublet à 6,80 ppm correspond au proton H5.
- Le signal sous forme d'un singlets à 6,73 ppm correspond au proton H2.
- Le signal sous forme de doublet de doublet à 6.52 ppm correspond au proton H10 ayant deux couplages  $J=2,0$  Hz (avec le proton H12) et 7.5 Hz (proton H14)
- Le signal sous forme d'un singlets à 7.02 ppm correspond au proton H12 ayant une constante de couplages  $J=2,0$  Hz (avec le proton H10) et 7.5 Hz (proton H14)
- Le signal sous forme de doublet à 6.78 ppm correspond au proton H14 ayant une constante de couplages  $J= 7.5$  Hz (proton H10).

**Tableau (IV.1)** : Données RMN  $^1\text{H}$  du trans-picéatannol dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

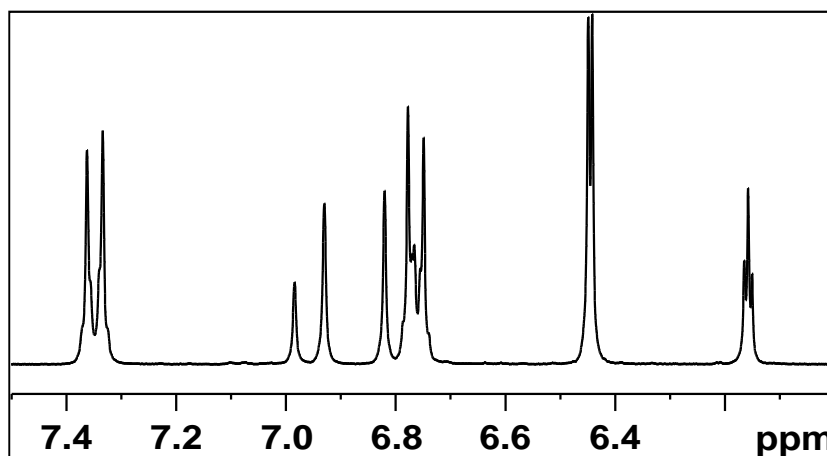
| Proton N° | $\delta_{\text{H}}$ (int, mult., J en Hz) |
|-----------|---|
| 2         | 6.73 (1H, s)                              |
| 5         | 6.80 (1H, d, 9.0)                         |
| 6         | 6.92 (1H, d, 9.0)                         |
| 7         | 6.83 (1H, d, 14.5)                        |
| 8         | 6.97 (1H, d, 14.5)                        |
| 10        | 6.52 (2H, d, 2.0)                         |
| 14        | 6.78 (2H, d, 7.5)                         |
| 12        | 7.02 (1H, s, 2.0)                         |

Les données de RMN sont comparables à celles décrites dans la littérature (Kanchanapoom et al. 2002; Yamada et al. 2004; Young Han et al. 2009) [3-5].

Le spectre de masse **Figure (IV.6)** montre un pic à  $m/z = 245,08$  g/mol  $[M+H]^+$  correspondant à la masse moléculaire du picéatannol. Le spectre MS2 montre un pic à 227 correspondant à la perte d'un OH.



**Figure(IV.6)**: Spectre de masse du picéatannol.

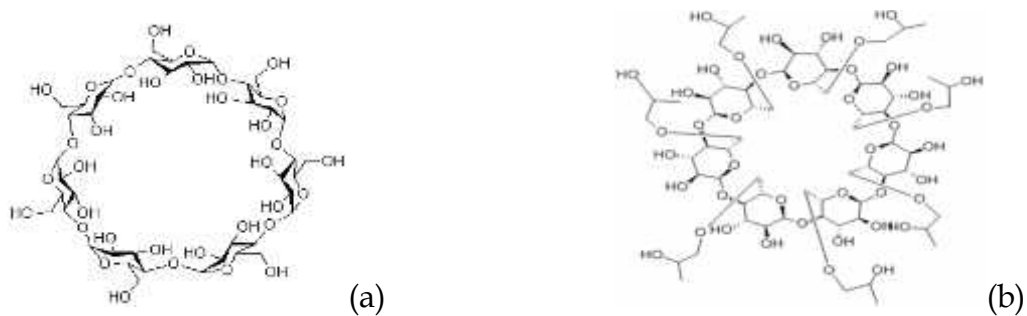


**Figure(IV.7)**: Spectre  $^1\text{H}$  RMN du resvératrol dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Tableau(IV.2): Données RMN 1H du *trans*-resvératrol dans le CD<sub>3</sub>OD .

| Proton N° | $\delta_H$ (int, mult, J en Hz) |
|-----------|---------------------------------|
| 2, 6      | 7.39 (2H, d, 8.5)               |
| 3, 5      | 6.79 (2H, d, 8.5)               |
| 7         | 6.85 (1H, d, 16.4)              |
| 8         | 7.00 (1H, d, 16.4)              |
| 10,14     | 6.47 (2H, d, 1.8)               |
| 12        | 6.16 (1H, s, 1.8)               |

Les propriétés des cyclodextrines utilisées sont résumées sur la Figure (IV.8) ci-dessous:



|                            | (a)   | (b)   |
|----------------------------|---|---|
| <b>Nom</b>                 | $\beta$ -Cyclodextrine<br>( $\beta$ -CD)        | Hydroxypropyl-<br>$\beta$ -Cyclodextrine<br>(HP- $\beta$ -CD) |
| <b>Formule moléculaire</b> | C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub> | C <sub>63</sub> H <sub>112</sub> O <sub>42</sub>              |
| <b>M (g/mol)</b>           | 1135  | 1541,54   |
| <b>P<sub>f</sub> (°C)</b>  | 280   | 305   |

Figure(IV.8): Certaines propriétés des cyclodextrines utilisées.

## IV.2 Etude des complexes d'inclusion en solution:

### IV.2.1 Détection de la formation des complexes d'inclusion en solution :

Des nombreuses méthodes physico-chimiques ont été utilisées pour l'étude de la complexation des cyclodextrines avec diverses molécules invitées, parmi ces méthodes, on cite, la spectroscopie UV-VIS, la spectrofluorométrie, la chromatographie liquide à haute performance etc...

Pour l'étude de la complexation par HPLC, la formation du complexe est confirmée par les modifications des propriétés de rétention des molécules invitées en présence des concentrations croissantes de différentes CDs, la variation de la composition des phases mobiles, et sous différentes conditions physico-chimiques de pH et de température [6-7].

### IV.2.2 Paramètres de performance :

#### IV. 2.2.1 Facteur de capacité :

Le facteur de capacité (ou de rétention) est un indicateur mesurant le degré de rétention du composé dans la colonne par rapport au temps mort  $t_0$  relatif au solvant non retenu. Ce facteur est calculé en appliquant la formule :

$$K' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Où  $t_r$ : est le temps de rétention du soluté (invité) et  $t_0$ : est le temps de rétention du solvant (le temps mort).

#### IV.2.2.1.1 Calcul du temps mort $t_0$ ( $t_m$ ) :

Les notions de volume et de temps morts,  $V_m$  et  $t_0$ , sont indispensables en chromatographie pour la détermination du facteur de rétention  $k$  (voir l'équation (1)). Cette grandeur est caractéristique de la rétention d'un composé pour une phase stationnaire et une phase mobile données; son utilisation est quasi-systématique pour toute approche fondamentale ou pour le développement d'applications.



Pour cette étude, nous avons utilisé le CuSO<sub>4</sub> anhydre pour déterminer le temps mort.

- On trouve  $t_0 = t_m = 1,55$  min.

Il est systématiquement contrôlé 3 fois après l'équilibre de la colonne.

#### IV.2.2.3 Mécanisme de complexation du RES/ $\beta$ -CD, RES/HP- $\beta$ -CD, PIC/ $\beta$ -CD, PIC/HP- $\beta$ -CD:

Des nombreuses études ont fait état de la concurrence entre solvants (phase mobile) et soluté (invité) pour l'entrée dans la cavité des molécules hôtes (CDs) [8].

Le mécanisme d'élution des deux molécules PIC et RES dans la colonne HPLC en présence de  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD dans différentes conditions chromatographiques a été étudié.

Les équilibres présentés dans les schémas 1 et 2 ont été obtenus pour les quatre complexes RES/  $\beta$ -CD, RES/HP- $\beta$ -CD, PIC/  $\beta$ -CD, PIC/HP- $\beta$ -CD de stoechiométrie 1:1 et 1:2, respectivement. On peut voir que, lorsque la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD a été ajoutée à la phase mobile, le temps de rétention de l'invité (picéatannol, resvératrol) est influencé non seulement par son complexation avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD mais aussi par son partage entre les phases mobile et stationnaire. L'équation (2) relie la concentration de la molécule hôte à la concentration en méthanol de la phase mobile.

$$CD_m = \frac{CD_T}{1 + K_m M} \quad 2$$

[CD]<sub>m</sub> : concentration effective de la molécule hôte dans la phase mobile

[CD]<sub>T</sub> : concentration totale de la molécule hôte

**K<sub>m</sub>** : décrit l'affinité du solvant organique utilisé comme phase stationnaire pour la cavité de la molécule hôte, elle est égale à 0,32 M<sup>-1</sup> pour le méthanol dans la  $\beta$ -CD.

[M] : concentration en méthanol de la phase mobile.

L'éq. (3) a été utilisée pour déterminer les valeurs de  $K_F$  pour les quatre complexes. Dans cette équation, le facteur de capacité  $k$  est lié à la concentration  $[CD]_m$  [8-10].

Une stœchiométrie 1:1 a été supposée et l'interaction entre les complexes avec la phase stationnaire a été négligée.

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_0} + \frac{K_F}{K_0} [CD]_m \quad (3)$$

$K$ : facteur de capacité de l'invité

$K_0$ : facteur de capacité de l'invité en l'absence de  $\beta$ -CD.

$K_F$ : constante apparente de formation du complexe d'inclusion.

$[CD]_m$ : concentration effective de la molécule hôte dans la phase mobile.

Nicolás López-et al. [6] ont démontré que la stœchiométrie de complexation RES/ HP- $\beta$ -CD peut-être 1:2. Pour cette raison, nous avons étudié la formation éventuelle des complexes invités/hôtes avec une stœchiométrie 1:2 à travers des complexes précurseurs 1:1 [Schéma (IV.1.A) et (IV.1.B)].

L'éq. (3) a été étendue à l'équation (4) contenant un terme de second ordre qui tient en compte une éventuelle formation de complexes 1:2 [Schéma(IV.2.A) et (IV.2.B)].

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_0} + \frac{K_{F1}}{K_0} CD_m + \frac{K_{F1}K_{F2}}{K_0} CD_m^2 \quad 4$$

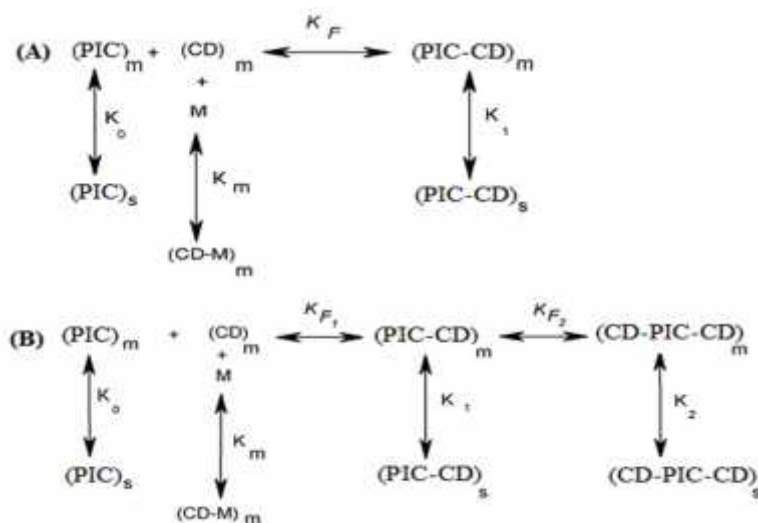
Où  $K_0$  est le facteur de capacité de l'invité en l'absence de CDs,  $K_{F1}$  est la constante de formation apparente du complexe invité/ CD de stœchiométrie 1:1 et  $K_{F2}$  est la constante de formation apparente du complexe invité/CD de stœchiométrie 1:2

La représentation des résultats expérimentaux obtenus pour  $1/K$  en fonction de  $[CD]_m$  en utilisant l'équation (3) ont donné des droites avec des coefficients de régression toujours supérieurs à ceux obtenus avec l'équation (4). Nous donnons comme exemple ceux du complexe PIC/  $\beta$ -CD dans le **Tableau (IV.3)**.

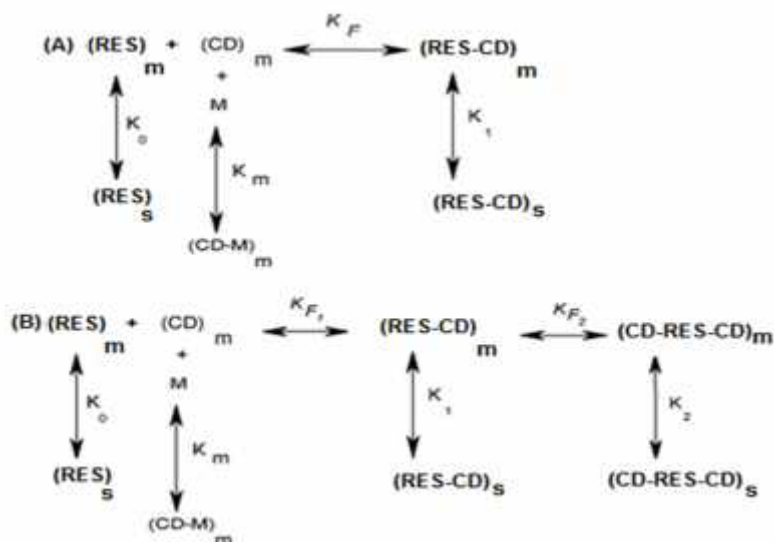
**Tableau (IV.3):** Coefficients de corrélation pour les complexes PIC /  $\beta$ -CD pour des stœchiométries 1:1 et 1:2 pour différents mélanges MeOH- eau.

| MeOH : eau<br>(% v/v) | coefficients de corrélation, $R^2$ |                  |
|-----------------------|------------------------------------|------------------|
|                       | 1:1 de l'éq. (3)                   | 1:2 de l'éq. (4) |
| 30:70                 | 0.999                              | 0.900            |
| 35:65                 | 0.998                              | 0.899            |
| 40:60                 | 0.994                              | 0.890            |
| 45:55                 | 0.910                              | 0.760            |
| 50:50                 | 0.900                              | 0.790            |

Ce qui indique que les complexes invités/ CDs de stœchiométrie 1:1 ont été formés quelque soit la phase mobile utilisée. Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus antérieurement pour des complexes 1:1 entre les CD et plusieurs composés avec des structures similaires à ceux étudiés dans ce travail, tel que l'oxyresvératrol [6-7].



**Schéma (IV.1):** Equilibres proposés pour un complexe d'inclusion de picéatannol /CDs ( $\beta$ -CD et HP-  $\beta$ -CD) avec une stœchiométrie 1:1 (A) et 1:2 (B).



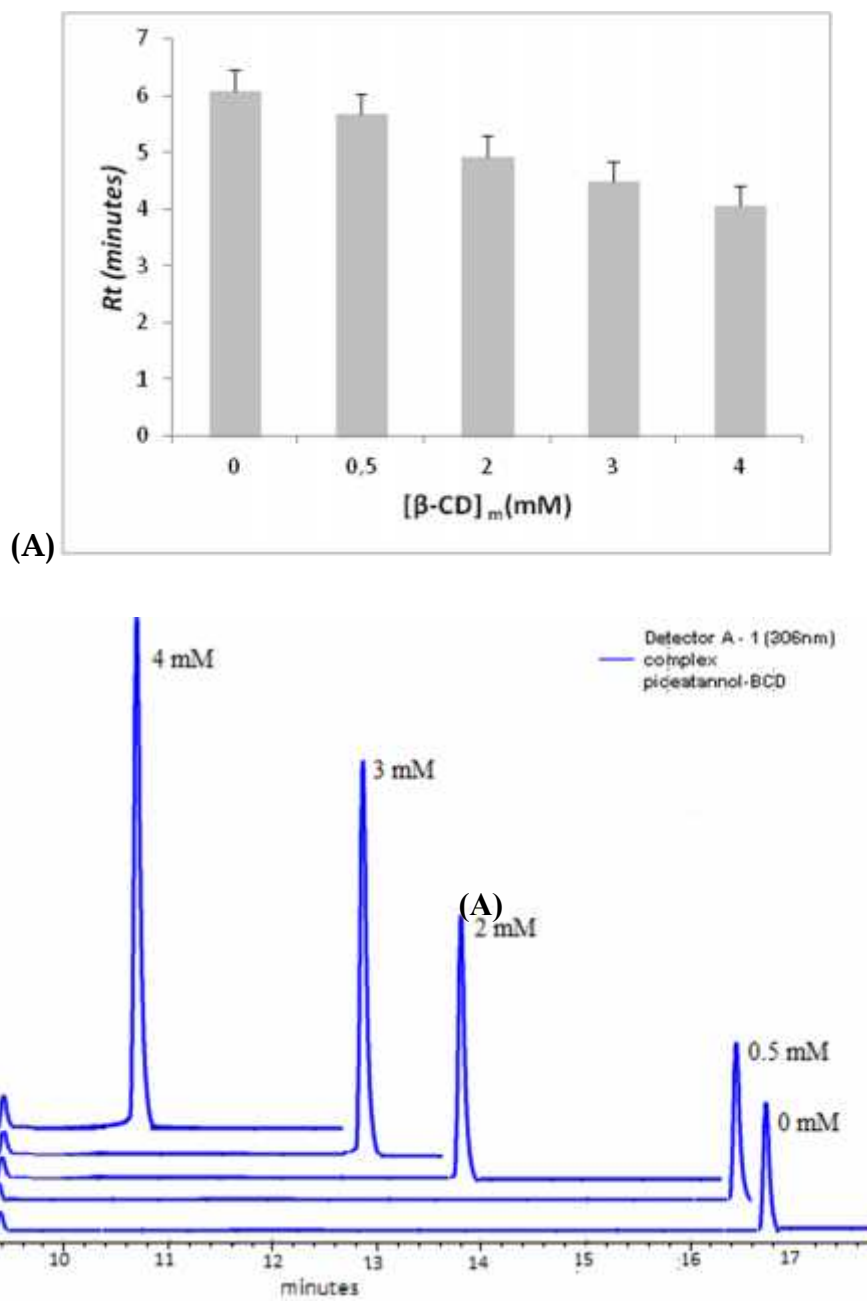
**Schéma (IV.2):** Équilibres proposés pour un complexe d'inclusion de resvératrol / CDs ( $\beta$ -CD et HP- $\beta$ -CD) avec une stœchiométrie 1:1 (A) et 1:2 (B).

#### IV.2.2.4 Détermination chromatographique de la constante d'association apparente:

Lorsque les cyclodextrines (native et modifiée) sont ajoutées à la phase mobile, le temps de rétention de l'invité est régi par son partage entre les deux phases mobile et stationnaire et la complexation de l'invité avec les cyclodextrines. En utilisant le temps de rétention ( $t_r$ ) des deux invités et le temps mort, les facteurs de capacité des deux invités en présence de concentrations croissantes de  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD sont calculés. Comme prévu, le temps de rétention des deux invités diminue lorsque l'on augmente la concentration des deux CDs dans la phase mobile [Figure(IV.09.A), (IV.09.B), (IV.10.A), (IV.10.B), (IV.11.A), (IV.11.'A) et (IV.12)]. Ceci est dû à la formation des complexes invités/cyclodextrines, ce qui améliore la solubilité de l'invité (picéatannol, resvératrol) dans la phase mobile et réduit le temps de rétention dans la colonne (Figure(IV.09.A)). La phase stationnaire est équilibrée par passage de la phase mobile jusqu'à l'obtention de temps de rétention reproductibles, soit environ 1 heure pour une phase mobile additionnée d'une nouvelle concentration de CDs.

Le coefficient de variation dans le temps de rétention par réplication a toujours été inférieure à 5%.

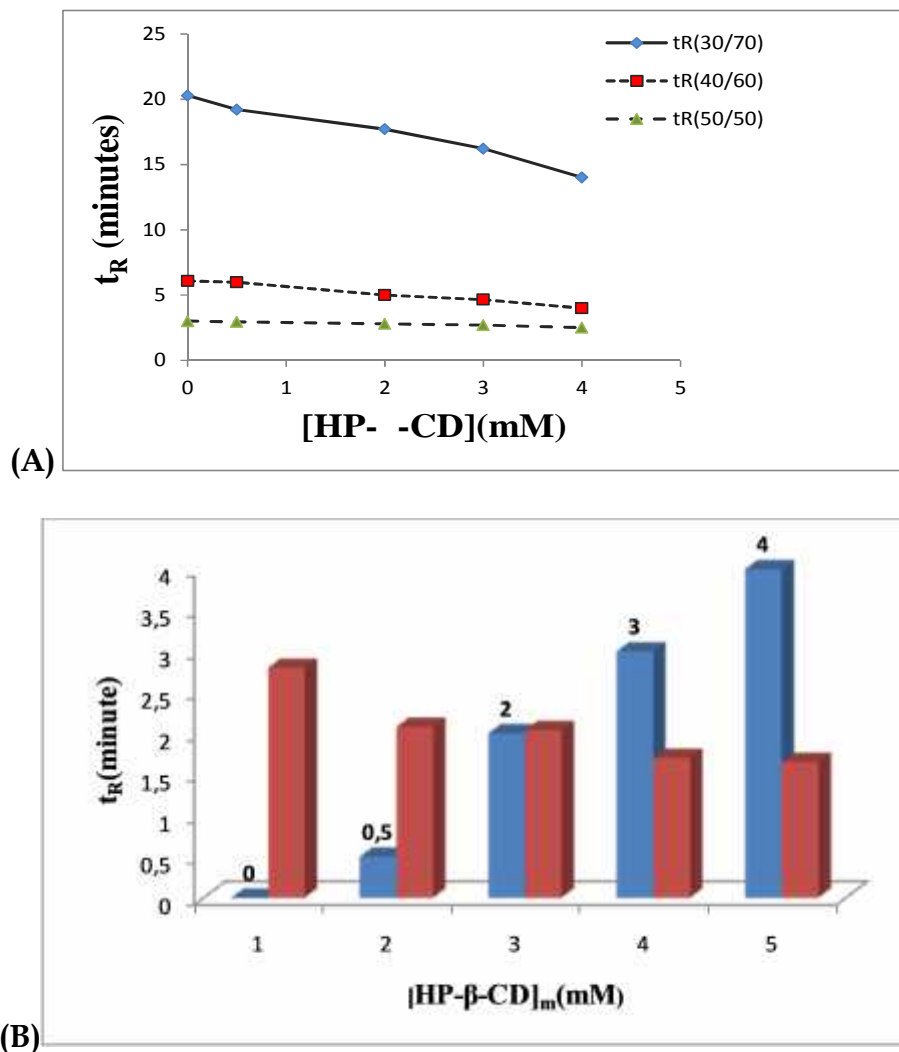
A titre illustratif, La Figure (IV.09.B) représente les chromatogrammes du picéatannol en présence des concentrations croissantes de  $\beta$ -CD dans la phase mobile (avec l'ajout progressif de  $\beta$ -CD dans la phase mobile).



**Figure(IV.09) :**

(A) Diminution du temps de rétention du picéatannol en présence de concentrations croissantes de  $\beta$ -CD (0; 0,5; 2; 3 et 4 mM) dans la phase mobile ( $n = 3$ ).

(B) les chromatogrammes HPLC du picéatannol en présence de concentrations croissantes de  $\beta$ -CD dans la phase mobile MeOH-eau (30/70, v/v).



Figure(IV.10) :

- (A) Diminution du temps de rétention du picéatannol en présence des concentrations croissantes de HP- $\beta$ -CD (0; 0,5; 2; 3 et 4 mM) dans la phase mobile, (n = 3).
- (B) Histogrammes rapportant une diminution de temps de rétention du picéatannol en présence des concentrations croissantes de HP- $\beta$ -CD dans la phase mobile (MeOH-eau) (30/70, v/v).

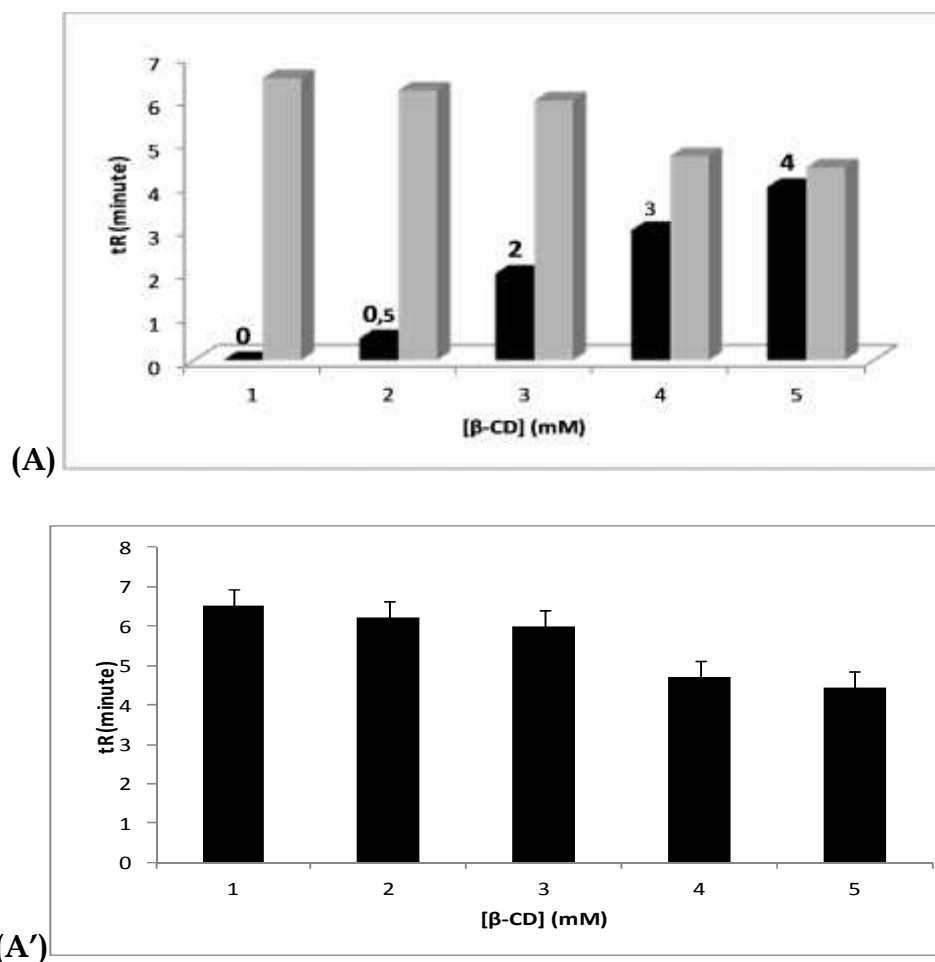


Figure (IV.11) : (A, A') Histogrammes rapportant une diminution du temps de rétention du resvératrol en présence des concentrations croissantes de  $\beta$ -CD (0 ; 0,5 ; 2 ; 3 et 4 mM) dans la phase mobile à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

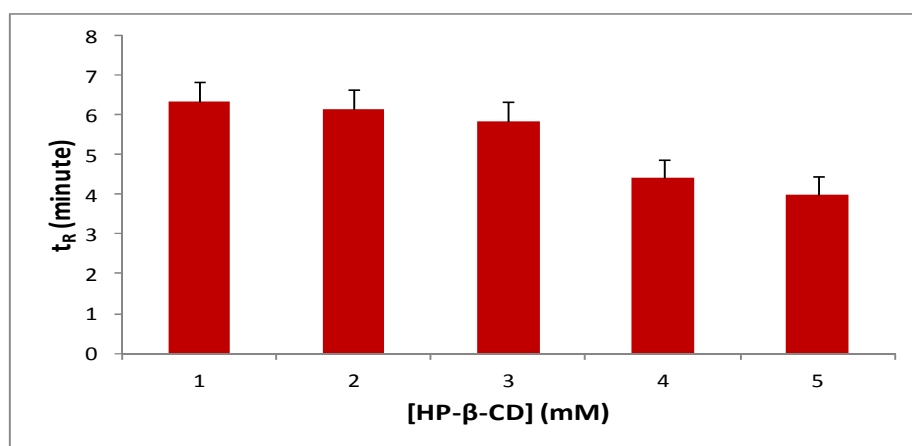


Figure (IV.12) : Histogrammes rapportant une Diminution du temps de rétention de resvératrol en présence des concentrations croissantes de HP- $\beta$ -CD (0 ; 0,5 ; 2 ; 3 et 4 mM) dans la phase mobile à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

D'un point de vue théorique, les principales forces motrices dans le processus de complexation sont les interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes et interactions dipôle/dipôle et/ou coulombiennes.

**IV.2.2.5 Sélection d'un solvant organique de la phase mobile :** L'utilisation d'un mélange de solvant (organique /aqueux) comme une phase mobile est essentielle, car la formation de complexe d'inclusion dans la phase liquide se fait plus facilement dans une solution aqueuse. Plusieurs auteurs ont utilisé un mélange de méthanol et d'eau pour identifier les complexes RES/CDs par RP-HPLC [6-8]. Compte tenu de la similarité entre les structures du PIC et du RES, un mélange méthanol-eau a été utilisé dans notre étude.

**IV.2.2.6 L'effet des additifs dans la phase mobile sur la rétention de l'invité :**

Trois concentrations de D-glucose (3,5; 7 et 14 mM), correspondant à 0,5; 1 et 2mM de la  $\beta$ -CD (même nombre d'unités de glucose), respectivement, ont été ajoutées à différents mélanges binaires méthanol-eau. Comme le montrent les **tableaux (IV.4) et (IV.5)**, l'addition de glucose à la phase mobile n'influe pas sur le temps de rétention et donc sur les valeurs de facteur de capacité (K) du picéatannol et du resvératrol, ce qui signifie qu'il n'y a aucune interaction entre le glucose et ces deux invités. Toutefois, en présence de la  $\beta$ -CD à 0,5; 1 et 2 mM, les valeurs de K ont diminué, ce qui indique que les complexes PIC /  $\beta$ -CD et RES/  $\beta$ -CD ont été formés et que les modifications observées en présence de  $\beta$ -CD ne sont pas dues à des modifications dans la force du solvant. Ces résultats confirment ceux rapportés par [11-12].

Les temps de rétention du PIC et du RES, ont été mesurés en absence et en présence de CDs dans la phase mobile. Pour chaque concentration de méthanol dans la phase mobile, chacun des composés est injecté 3 fois et la moyenne des 3 temps de rétention obtenus est calculée et prise pour le reste des calculs.



**Tableau (IV.4).** Effet des additifs dans la phase mobile sur le facteur de capacité du picéatannol (K) ; (n = 3).

| Mobile phase (%MeOH) | K             |                  |                |                 |                           |           |              |
|----------------------|---------------|------------------|----------------|-----------------|---------------------------|-----------|--------------|
|                      | Sans addition | 0.5mM $\beta$ CD | 1mM $\beta$ CD | 2 mM $\beta$ CD | 3.5mM D- Glc <sup>a</sup> | 7mM D-Glc | 14 mM D- Glc |
| 40                   | 2.92±0.02     | 2.65±0.02        | 2.35±0.02      | 2.16±0.02       | 2.90±0.02                 | 2.91±0.02 | 2.93±0.02    |
| 50                   | 0.92±0.02     | 0.80±0.02        | 0.78±0.02      | 0.74±0.02       | 0.92±0.02                 | 0.93±0.02 | 0.94±0.02    |

<sup>a</sup>:Glc= Glucose

**Tableau(IV.5).** Effet des additifs dans la phase mobile sur le facteur de capacité du resvératrol (K) ; (n = 3).

| Mobile phase (%MeOH) | K             |                  |                |                 |                           |           |              |
|----------------------|---------------|------------------|----------------|-----------------|---------------------------|-----------|--------------|
|                      | Sans addition | 0.5mM $\beta$ CD | 1mM $\beta$ CD | 2 mM $\beta$ CD | 3.5mM D- Glc <sup>a</sup> | 7mM D-Glc | 14 mM D- Glc |
| 40                   | 3.20±0.05     | 3.02±0.02        | 2.95±0.02      | 2.87±0.02       | 3.18±0.05                 | 3.19±0.05 | 3.20±0.05    |
| 50                   | 0.96±0.02     | 0.83±0.02        | 0.78±0.02      | 0.76±0.03       | 0.95±0.02                 | 0.95±0.02 | 0.96±0.02    |

<sup>a</sup>:Glc= Glucose

#### IV.2.2.7 Effet de la concentration et le pourcentage du méthanol sur la rétention de l'invité :

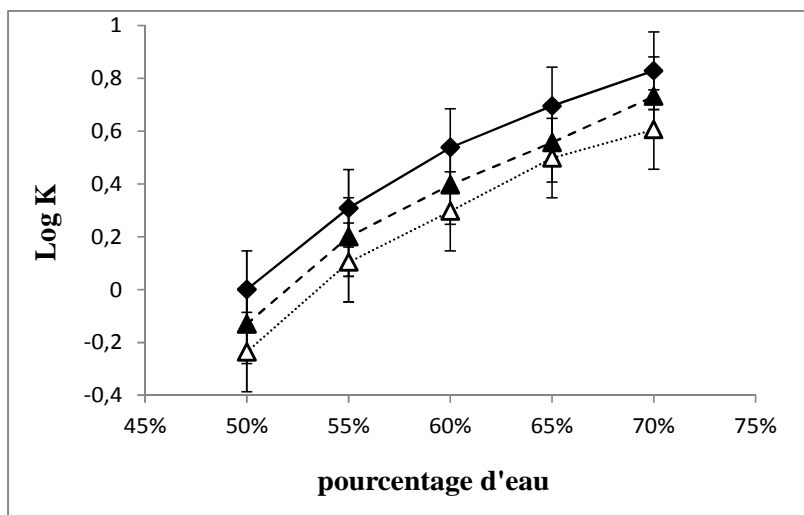
La composition de la phase mobile a également une grande influence sur le facteur de capacité. Les résultats de calculs montrent une corrélation importante entre le logarithme du facteur de capacité (log K) de l'invité et le pourcentage d'eau de la phase mobile. Le facteur de capacité diminue régulièrement avec l'augmentation du pourcentage de méthanol dans la phase mobile en présence et en absence de  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD, la **Figure (IV.13)** illustre graphiquement certains de ces résultats.

Suivant la méthodologie précédemment décrite, nous avons tracé pour chaque composé, les droites  $\text{Log } k = f(\% \text{ en H}_2\text{O du mélange d'élution})$  via les coefficients de capacité (k) calculés à différentes proportions volumiques du mélange d'élution MeOH/H<sub>2</sub>O.

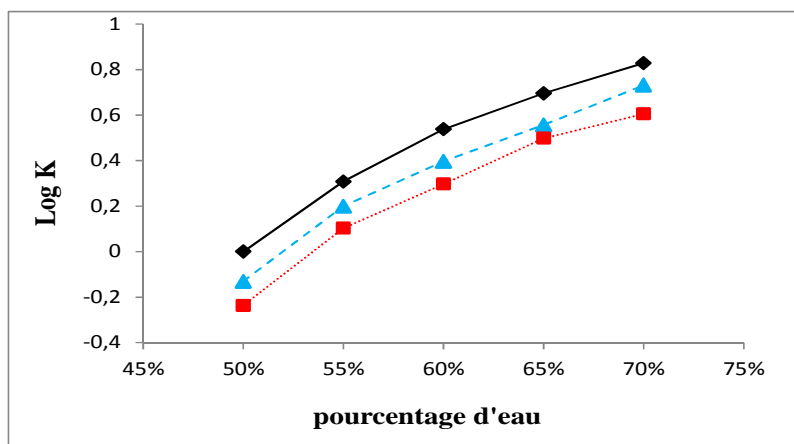
Cette méthode nous permet d'obtenir une droite d'équation du type  $y = A x + B$  dont

L'ordonnée à l'origine B correspond au coefficient de partition Log k (Figure (IV.13-IV.16)).

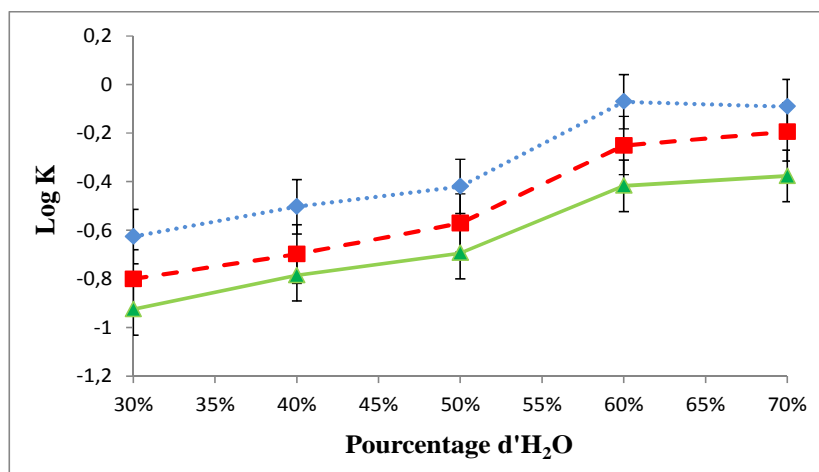
La corrélation linéaire obtenue entre le facteur de capacité (K) et le pourcentage d'eau dans une gamme de compositions de solvant étudiée (30 à 70% (v/v) MeOH-eau) est raisonnablement bonne ( $R^2 > 0,99$ ).



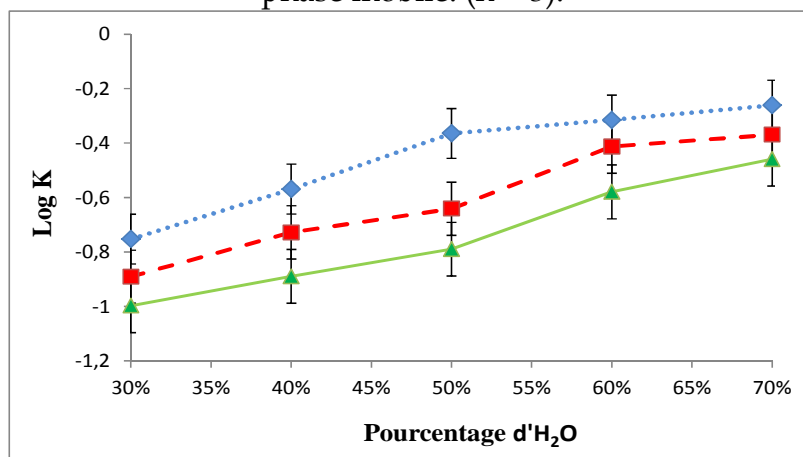
**Figure(IV.13) :** Corrélation entre Log K du picéatannol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau) . (◆) sans  $\beta$ -CD dans la phase mobile; (▲) avec 2mM  $\beta$ -CD dans la phase mobile;(Δ) avec 4mM  $\beta$ -CD dans la phase mobile. (n = 3).



**Figure(IV.14) :** Corrélation entre Log K du picéatannol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau). (◆) Sans HP- $\beta$ -CD dans la phase mobile; (▲) avec 2mM HP- $\beta$ -CD dans la phase mobile;(■) avec 4mM HP- $\beta$ -CD dans la phase mobile. (n = 3).



**Figure(IV.15) :** Corrélation entre Log K du resvératrol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau). (♦) Sans β-CD dans la phase mobile; (■) avec 2mM β-CD dans la phase mobile;(▲) avec 4mM β-CD dans la phase mobile. (n = 3).



**Figure(IV.16) :** Corrélation entre Log K du resvératrol avec une fraction volumétrique d'eau dans la phase mobile (méthanol-eau). (♦) Sans HP-β-CD dans la phase mobile; (■) avec 2mM HP-β-CD dans la phase mobile;(▲) avec 4mM HP-β-CD dans la phase mobile. (n = 3).

En effet, Nous pouvons remarquer que le procédé d'inclusion pour la β-CD et l'HP-β-CD dans la phase mobile est plus facile à étudier dans une solution aqueuse que dans un mélange de solvant (organique /aqueux). Toutefois, l'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique en tant que phase mobile est essentielle pour la plupart des applications HPLC. Tout d'abord, dans nos expériences préliminaires, une phase mobile aqueuse 100% (β-CD, HP-β-CD) a donné lieu à un temps de rétention très long (> 20 min) pour le resvératrol et le picéatannol. Lors de l'addition d'un solvant organique comme le MeOH à la phase mobile, le temps de rétention peut être réduit

à moins de 10 min. Il est courant d'utiliser une phase mobile constituée d'un mélange MeOH-eau pour le système HPLC en phase inverse pour obtenir des temps de rétention raisonnables pour les solutés. Deuxièmement, l'interaction entre les CDs et le MeOH est si faible que la complexation des invités est à peine retardée par le MeOH [13]. En troisième lieu, la solubilité des CDs ( $\beta$ -CD et HP- $\beta$ -CD) dans le MeOH est la plus grande parmi d'autres alcools à chaîne droite. L'effet du % du H<sub>2</sub>O ajouté à la phase mobile sur le facteur de rétention du PIC est représenté sur les Figures (IV.13-IV.16). La valeur de  $k$  diminue avec l'augmentation du pourcentage de MeOH dans la phase mobile. Ce résultat est cohérent avec la plupart des séparations par HPLC en phase inverse. Les complexes d'inclusions CDs/PIC et CDs/RES sont élués plus rapidement à des pourcentages plus élevés de MeOH. Cependant, à des teneurs trop élevée de MeOH dans la phase mobile, une concurrence entre le MeOH et les deux invités étudiés à pénétrer dans la cavité des cyclodextrines n'est pas à exclure. La teneur optimale de MeOH est de 30% et elle a ensuite été choisie pour notre étude.

#### **IV.2.2.8 Effet de la concentration de la $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD sur la rétention de l'invité :**

L'ajout de la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD à la phase mobile a entraîné une réduction dans le temps de rétention de l'invité. Dans cette section, nous allons étudier l'effet de la concentration de la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD sur le changement de temps de rétention. Les facteurs de capacité des invités en présence de concentrations croissantes de CDs et avec différentes proportions du méthanol de la phase mobile ont été calculés en utilisant le temps de rétention et le temps mort et les facteurs de capacités sont présentés dans les Tableaux (IV.6-IV.9).

Le temps de rétention des deux invités (picéatannol, resvératrol) diminue avec l'augmentation de la concentration des CDs dans la phase mobile, car le complexe d'inclusion formé améliore la solubilité de la molécule invitée et réduit son temps de séjour dans la colonne. Comme le montre le Tableau (IV.6), lorsque les CDs sont ajoutés à différentes concentrations (0,5 - 4 mM) à la solution de la phase mobile, le

facteur de capacité de l'invité diminue, quel que soit le pourcentage du méthanol dans la phase mobile utilisée.

D'autre part, nous pouvons observer que le facteur de capacité le plus grande a été obtenu pour la plus faible concentration du méthanol dans la phase mobile (30%, v/v). Cela peut être dû à la polarité de la phase mobile ou à l'interaction entre les CDs et le solvant organique qui n'est importante qu'à des pourcentages élevés de MeOH dans la phase mobile.

Pareillement, lorsque la concentration du méthanol augmente de 30 à 50%, la phase mobile devient moins polaire, le soluté apolaire devient plus soluble et son affinité pour la cavité hydrophobe des CDs diminue, par conséquent, le processus de complexation diminue [12]. En outre, lorsque la quantité de méthanol augmente dans la colonne, la compétition entre le méthanol et l'invité pour l'entrée dans la cavité hydrophobe des CDs est possible; la constante d'association du méthanol avec la  $\beta$ -CD par exemple, est de  $0,32 \text{ M}^{-1}$ [13].

En outre, l'invité à l'état libre (sans complexation) initialement hydrophobe, devient hydrophile, sous la forme complexée, donc sa mobilité dans le système chromatographique est également modifiée. Ces changements résultent de la modification de l'environnement de la molécule incluse, en effet, cette dernière passe d'un environnement polaire (eau-MeOH) à un environnement hydrophobe apolaire; cavité intérieure de la CD.

**Tableau(IV.6).** Détermination des facteurs de capacité du picéatannol pour trois différents pourcentages méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4 mM de  $\beta$ -CD. (n = 3).

| Phase mobile<br>(% MeOH) | K          |                      |                    |                    |                    |
|--------------------------|------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                          | Sans<br>CD | 0,5mM<br>$\beta$ -CD | 2Mm<br>$\beta$ -CD | 3mM<br>$\beta$ -CD | 4mM<br>$\beta$ -CD |
| 30                       | 10.00±0.02 | 9.98±0.02            | 8.00±0.02          | 7.65±0.02          | 5.98±0.02          |
| 40                       | 2.92±0.02  | 2.65±0.02            | 2.16±0.02          | 1.88±0.02          | 1.60±0.02          |
| 50                       | 0.92±0.02  | 0.80±0.02            | 0.74±0.02          | 0.61±0.02          | 0.58±0.02          |

**Tableau (IV.7).** Détermination des facteurs de capacité du picéatannol pour trois compositions différentes méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4mM de HP- $\beta$ -CD. (n = 3).

| K                        |            |                          |                        |                        |                        |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Phase mobile<br>(% MeOH) | Sans<br>CD | 0,5mM<br>HP- $\beta$ -CD | 2mM<br>HP- $\beta$ -CD | 3mM<br>HP- $\beta$ -CD | 4mM<br>HP- $\beta$ -CD |
| 30                       | 5.45±0.03  | 5.38±0,04                | 4.741±0,02             | 4.148±0,01             | 3.387±0,02             |
| 40                       | 0.823±0.03 | 0,593±0,36               | 0.348±0,006            | 0.113±0,02             | 0,860±0,02             |
| 50                       | 0.789±0.05 | 0.690± 0,03              | 0.154 ±0,08            | 0.086±0,01             | 0.010 ±0,02            |

**Tableau(IV.8).** Détermination des facteurs de capacité du resvératrol pour trois différents pourcentages méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4 mM de  $\beta$ -CD.(n = 3).

| K                        |            |                      |                    |                    |                    |
|--------------------------|------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Phase mobile<br>(% MeOH) | Sans<br>CD | 0,5Mm<br>$\beta$ -CD | 2Mm<br>$\beta$ -CD | 3mM<br>$\beta$ -CD | 4mM<br>$\beta$ -CD |
| 30                       | 14.15±0.02 | 11.55±0.02           | 6.80±0.02          | 6.25±0.02          | 5.98±0.02          |
| 40                       | 3.20±0.05  | 3.02±0.02            | 2.87±0.02          | 2.04±0.02          | 1.87±0.02          |
| 50                       | 0.96±0.02  | 0.83±0.02            | 0.76±0.02          | 0.61±0.02          | 0.58±0.02          |

**Tableau (IV.9).** Détermination des facteurs de capacité du resvératrol pour trois différents pourcentages méthanol-eau (v/v) de la phase mobile contenant des concentrations de 0 à 4 mM de HP- $\beta$ -CD . (n = 3).

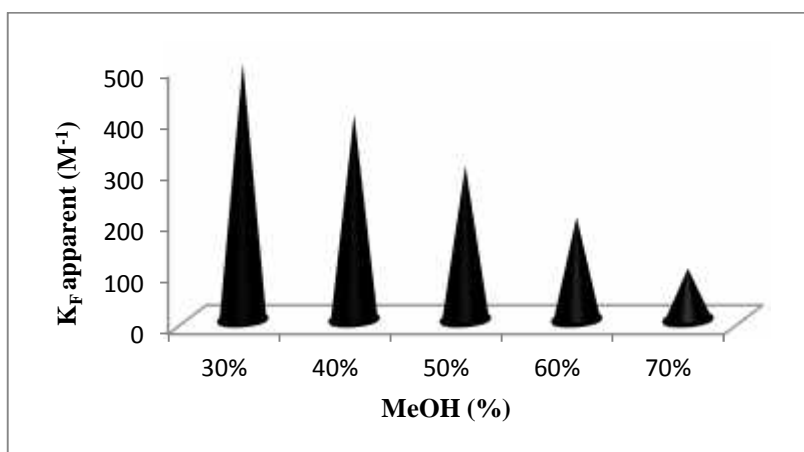
| K                        |            |                          |                        |                        |                        |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Phase mobile<br>(% MeOH) | Sans<br>CD | 0,5mM<br>HP- $\beta$ -CD | 2mM<br>HP- $\beta$ -CD | 3mM<br>HP- $\beta$ -CD | 4mM<br>HP- $\beta$ -CD |
| 30                       | 13.10±0.02 | 10.40±0.02               | 5.80±0.01              | 5.20±0.02              | 4.88±0.01              |
| 40                       | 3.10±0.05  | 2.97±0.02                | 2.77±0.02              | 1.84±0.02              | 1.57±0.03              |
| 50                       | 0.88±0.02  | 0.73±0.03                | 0.66±0.02              | 0.50±0.02              | 0.45±0.05              |

#### IV.2.2.9 Effet du pourcentage du méthanol sur les constantes de formation apparentes :

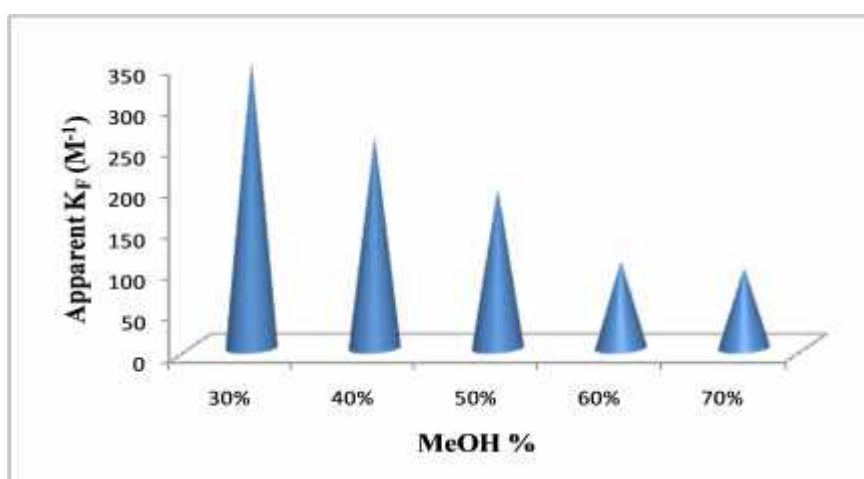
La détermination des constantes de formation permet de connaître la quantité de l'invité complexé en équilibre avec l'invité libre. En outre, ces valeurs indiquent la stabilité du complexe dans un ensemble donné de conditions telles que la température, le pH et la présence de modificateurs.

En utilisant les données présentées dans la Figure (IV.17), les valeurs de la pente et de l'intercepte de la régression linéaire, nous avons calculé les valeurs des constantes de formation apparentes ( $K_F$ ) pour les complexes d'inclusion formés entre les deux invités (PIC, RES) avec la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD à différentes concentrations de méthanol dans la phase mobile.

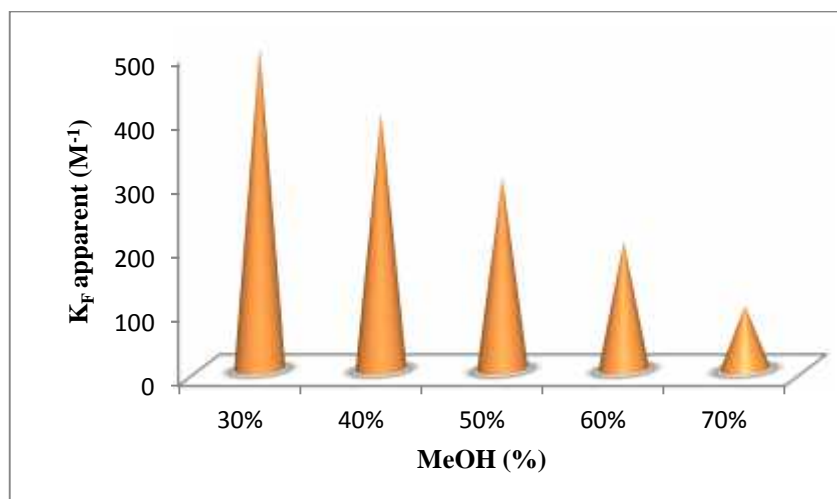
La Figure (IV.17) montre la grande dépendance des valeurs de  $K_F$  de la concentration de méthanol dans la phase mobile. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés pour les autres stilbènes dans la littérature comme le resvératrol [6] et l'oxyresveratrol [7].



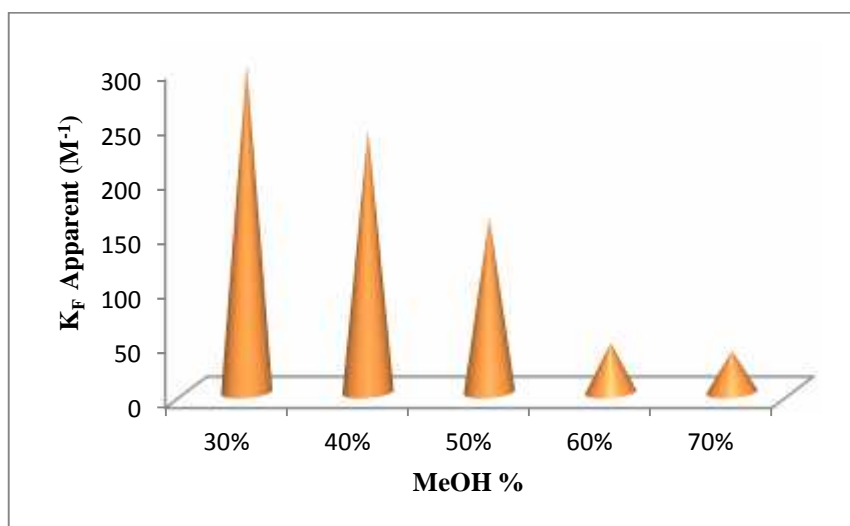
Figure(IV.17) : Constante de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe picéatannol/ $\beta$ -CD en fonction du pourcentage de méthanol.



Figure(IV.18) : Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe picéatannol / HP- $\beta$ -CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile .



**Figure(IV.19) :** Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe resvératrol/  $\beta$ -CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile.



**Figure (IV.20) :** Constantes de formation apparente ( $K_F$ ) du complexe resvératrol /HP- $\beta$ -CD en fonction du pourcentage de méthanol dans la phase mobile.

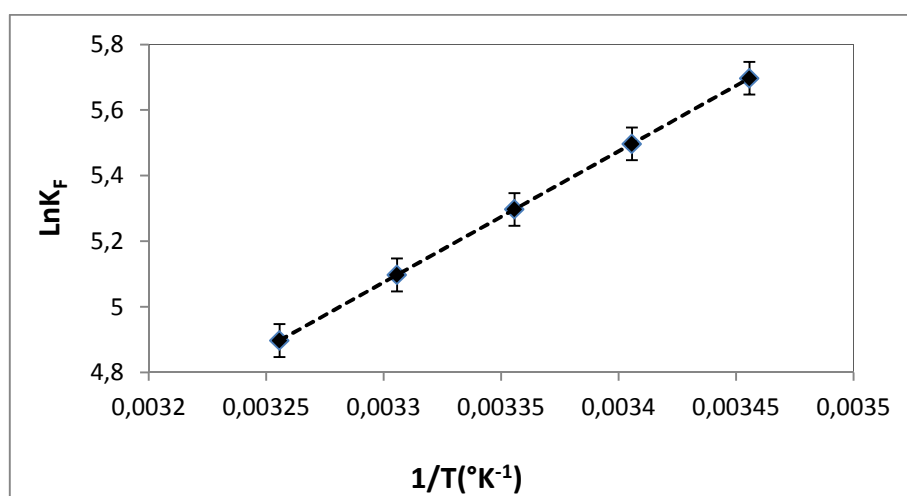
#### IV.2.2.10 Effet de la température sur les constantes de formation apparentes:

Un des paramètres les plus importants qui doit être étudié concernant l'utilisation des complexes invités/CDs en tant qu'ingrédient dans les industries alimentaire et pharmaceutique est l'effet de la température sur le mécanisme de complexation et la stabilité des complexes formés. En effet, plusieurs chercheurs ont étudié les changements qui se produisent sur l'équilibre entre les CDs et les différents composés invités, quand la température du milieu est modifiée. En général, la stabilité des complexes des  $\beta$ -CD ou HP- $\beta$ -CD diminue avec l'augmentation de la

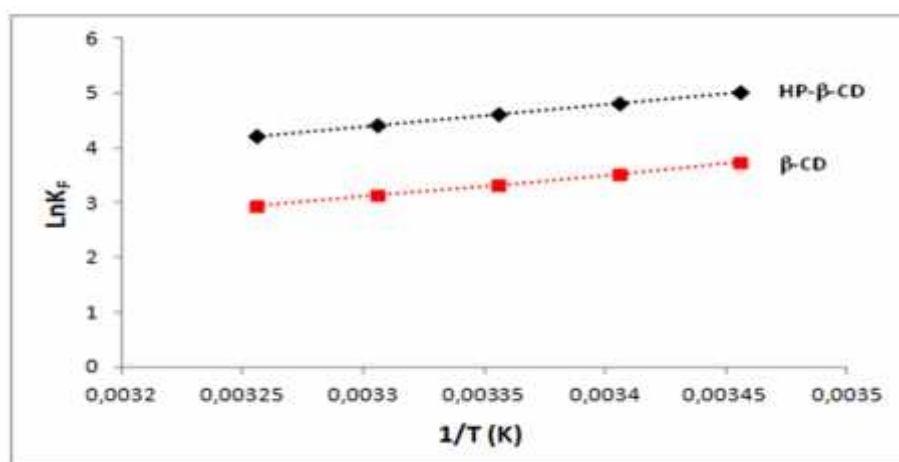


température [10]. Cependant, certains auteurs ont constaté qu'il existe une corrélation positive entre les valeurs des constantes de formation ( $K_F$ ) et les valeurs de la température, comme c'est le cas des complexes d'acides gras / CDs [14].

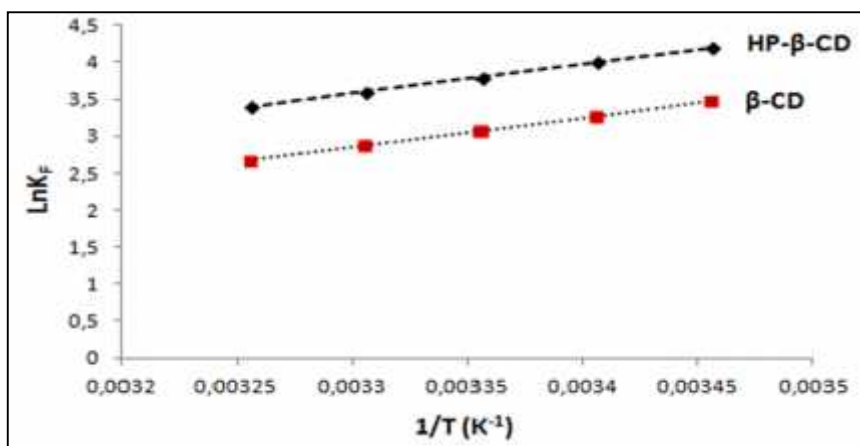
Dans notre étude, l'effet de la température sur le facteur de capacité ( $K$ ) a été étudié à 20, 25, 30 et 35 °C. Comme le montre la Figure (IV.21), la rétention de l'invité diminue avec la diminution de la température car elle s'accompagne d'un degré plus élevé de complexation. Par conséquent, la quantité de l'invité libre qui peut être adsorbé sur la phase stationnaire diminue.



Figure(IV.21) : L'équation de Van't Hoff ( $\ln(K_F)$  vs  $1/T$ ) pour le complexe picéatannol/ $\beta$ -CD avec un mélange méthanol-eau (30-70%, v/v).



Figure(IV.22) : Equation de Van't Hoff ( $\ln(K_F)$  vs  $1/T$ ) pour le complexe PIC/ $\beta$ -CD et PIC /HP- $\beta$ -CD, phase mobile : 30-70%, v/v.



**Figure(IV.23)** : Equation de Van't Hoff ( $\ln(K_F)$  vs  $1/T$ ) pour le complexe RES/ $\beta$ -CD et RES /HP- $\beta$ -CD, phase mobile : 30-70%, v/v.

On a observé d'après ces graphes, (Figures (IV.21-23)) une diminution des constantes de stabilité avec l'augmentation de la température indiquant que les interactions invités/hôtes sont de nature exothermique et que la formation des complexes d'inclusion est plus favorable aux basses températures.

Les valeurs des constantes de stabilité des complexes d'inclusions sont regroupées dans le tableau (IV.10) suivant :

**Tableau(IV.10):** Les valeurs des constantes de formation apparentes ( $K_F$ ) pour les quatre complexes PIC/ $\beta$ -CD , PIC/HP- $\beta$ -CD, RES/ $\beta$ -CD et RES/HP- $\beta$ -CD à 25°C dans un mélange méthanol- eau (30-70%, v/v).

| Complexe            | $K_F$ (M <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|--------------------------|
| PIC/ $\beta$ -CD    | 199,70±0,00              |
| PIC/HP- $\beta$ -CD | 106,00±31,06             |
| RES/ $\beta$ -CD    | 1008,35 ± 35             |
| RES/HP- $\beta$ -CD | 5008 ± 723               |

Et par comparaison les résultats montrent que les constantes de complexation ( $K_F$ ) étaient plus élevées pour la CD naturelle  $\beta$ -CD, que pour la CD modifier HP-  $\beta$ -CD pour le RES et PIC. La constante de formation ( $k_F$ ) la plus élevé étant déterminée pour le complexe RES/ $\beta$ -CD [21].

#### IV.2.2.11 Détermination des paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusions :

Les paramètres thermodynamiques ( $\Delta H^0$ ,  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$ ) liés à la formation des complexes d'inclusions PIC/ $\beta$ -CD, PIC/HP- $\beta$ -CD, RES/ $\beta$ -CD et RES/HP- $\beta$ -CD ont été évalués à partir de l'équation de Van't Hoff à  $25 \pm 0,2^\circ \text{C}$ .

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_F \quad (5)$$

$$\ln K_F = -\frac{\Delta G^0}{RT} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (6)$$

Les résultats expérimentaux obtenus après lissage de la courbe de l'équation (6)  $\ln K_F = f(1/T)$  (Figure (IV.21-22)), de pente =  $-\Delta H^0/R$  et d'ordonnée à l'origine =  $\Delta S^0/R$  étaient linéaires avec un coefficient de régression  $R^2=0,99$ .

Les valeurs de l'enthalpie libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) des complexes sont calculées par l'équation de Van't Hoff :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_F \quad (7)$$

Où :  $\Delta G^0$ : est L'enthalpie libre des complexe de TC.

**R** : constante des gaz ( $R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )

**T**: Température en degré Kelvin.

**K<sub>F</sub>**: constante de stabilité des complexes d'inclusion.

Les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des complexes d'inclusion entre les deux invités et les deux molécules Hôte ( $\beta$ -CD native et  $\beta$ -CD modifiée), sont illustrées dans les deux tableaux suivants.

**Tableau (IV.11):** Paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusion  
PIC/CDs à  $25 \pm 0,2^\circ \text{C}$ .

|                       | $\Delta H^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta S^0$ (J mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta G^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| PIC / $\beta$ -CD     | $-33,256 \pm 1$                      | $-67,559 \pm 1$                     | $-13,123 \pm 1,0$                    |
| PIC / HP- $\beta$ -CD | $-56,435 \pm 1,0$                    | $-78,447 \pm 1$                     | $-22,928 \pm 1$                      |

**Tableau (IV.12):** Paramètres thermodynamiques des complexes d'inclusion  
RES/CDs à 25 ° ± 0,2° C.

|                       | $\Delta H^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta S^0$ (J mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta G^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Res / $\beta$ -CD     | -31.62±1                             | -46.68±2                            | -18.01±1                             |
| Res / HP- $\beta$ -CD | -45.77±1                             | -67,55±1                            | -19 ,83±1                            |

Une interaction hôte-invité spontanée correspond d'une part, à une valeur négative de  $\Delta G^0$ , ce qui implique une valeur négative de  $\Delta H^0$  et une valeur positive /négative de  $T\Delta S^0$  et d'autre part, à une constante (K) élevée. Les valeurs de  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  et de K présentées dans les tableaux (IV.11-12) montrent que ces complexations sont exothermiques et très favorables.

Grâce à ces résultats expérimentaux, il est possible de préciser les forces contribuant à la formation des complexes.

Nous pouvons remarquer aussi que les valeurs de l'enthalpie ( $\Delta H^0$ ) pour les deux types des complexes d'inclusions sont du même ordre de grandeur ce qui suggère que les processus d'interaction de ces deux invités sont comparables, et que les complexes sont de structures similaires.

L'enthalpie est liée à la structure du complexe et du solvant tandis que l'entropie est reliée à l'ordre. Nous retrouvons une forte contribution exothermique enthalpique ( $\Delta H^0$  négatif) et une très faible contribution entropique avec la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD. Ce phénomène a été observé pour la majorité des complexes de type hôte-invité à base de  $\beta$ -CD [9].

Ainsi, L'analyse de ces données thermodynamiques montre que les variations des enthalpies ( $\Delta H^0$ ) sont plus faibles au sein d'un même invité que celles des entropies ( $\Delta S^0$ ), celles-ci ont donc un rôle dominant dans la sélectivité et correspondent à la perte de degré de liberté après la formation des complexes par rapport à l'état libre de l'invité [10]. Cela pourrait être dû à des interactions hydrophobes, mouvement des molécules d'eau à partir de la cavité des CDs, l'augmentation des interactions hôte-invité du type Van der Waals entre les molécules, l'établissement et la présence des liaisons hydrogène intermoléculaire et autres interactions [14-15].

En effet, une valeur négative du changement d'entropie a également été obtenue indiquant une diminution des degrés de liberté de translation et de rotation de l'ensemble (invité /  $\beta$ -CD et invité/HP- $\beta$ -CD), par rapport à la molécule invitée libre. Il faut noter que  $\Delta S^0 < 0$  indique habituellement une insertion partielle de l'invité alors que  $\Delta S^0 > 0$  correspond à la pénétration totale de l'invité .

Nous pouvons remarquer aussi que les valeurs négatives de l'enthalpie libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) justifient la nature spontanée du processus d'inclusion.

Nous retrouvons un caractère commun pour les deux types de CDs : une forte contribution exothermique enthalpique ( $\Delta H^0$  négatif) et une très faible contribution entropique. Ce phénomène a été observé pour la majorité des complexes de type hôte-invité à base de CDs [1-4]. Les interactions hydrophobes sont généralement connues pour leur rôle important dans la stabilité des interactions entre deux molécules apolaires en milieu aqueux [16]. L'effet hydrophobe "classique" se traduit par une contribution entropique importante dans l'énergie totale [17-18]. Ceci s'explique par le fait que les molécules d'eau sont plus ordonnées à proximité d'un soluté apolaire. Dans le cas des complexes à base de  $\beta$ -CDs, la forte contribution enthalpique et la faible contribution entropique est appelé "effet hydrophobe non-classique" [19]. Les valeurs importantes de l'enthalpie indiquent que les interactions hydrophobes ne sont pas les seules intervenantes dans le processus de complexation. Les interactions dispersives de van der Waals sont impliquées dans la complexation hôte-invité à base de  $\beta$ -CDs, particulièrement lorsqu'il s'agit des molécules de piceatannol et resveratrol comme molécules invitées. En effet, les forces de Van der Waals, à très faible portée, sont importantes dans le cas des complexes  $\beta$ -CD/PIC,  $\beta$ -CD/RES où la distance  $\beta$ -CD/PIC,  $\beta$ -CD/RES est faible en raison de la qualité de l'inclusion de PIC, Res dans  $\beta$ -CD et HP- $\beta$ -CD. Par ailleurs, étant donné que la partie phénolique de la molécule PIC, RES est à l'extérieur de la cavité de  $\beta$ -CD et la cavité de HP- $\beta$ -CD, nous pouvons penser qu'il se forme des liaisons hydrogène entre le piceatannol et les groupements hydroxyle présents sur la surface de la couronne hydrophile de la  $\beta$ -CD et de HP- $\beta$ -CD. Toutes ces interactions secondaires contribuent aux effets enthalpiques observés.

### IV.3 Détection de la formation des complexes d'inclusion PIC / $\beta$ -CD et PIC /HP- $\beta$ -CD à l'état solide :

Les complexes d'inclusion formés entre la PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD ont été préparés par la méthode de Co-précipitation.

#### IV.3.1 Caractérisation spectrale des complexes d'inclusion à l'état solide :

Le complexe correspondant au PIC/ $\beta$ -CD est désigné par (C<sub>1</sub>).

Le complexe correspondant au PIC/HP- $\beta$ -CD est désigné par (C<sub>2</sub>).

Les propriétés des complexes obtenus sont totalement différentes de celles du picéatannol, de la  $\beta$ -CD et de l'HP- $\beta$ -CD libres.

**Tableau(IV.13)** .Les propriétés des complexes PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD obtenus.

| Nom                        | Complexe<br>PIC/ $\beta$ -CD : C <sub>1</sub>   | Complexe<br>PIC/HP- $\beta$ -CD : C <sub>2</sub> |
|----------------------------|---|--|
| <b>Formule moléculaire</b> | C <sub>56</sub> H <sub>82</sub> O <sub>37</sub> | C <sub>77</sub> H <sub>124</sub> O <sub>44</sub> |
| <b>M (g/mol)</b>           | 1379.24   | 1785.78  |
| <b>P<sub>f</sub> (°C)</b>  | >260  | >260°C   |
| <b>Rd(%)</b>               | 69  | 60   |

Les résultats de caractérisation des complexes solides sont rassemblés dans les Figures suivantes.

#### IV.3.1.1 Etude des complexes d'inclusion par RMN <sup>1</sup>H:

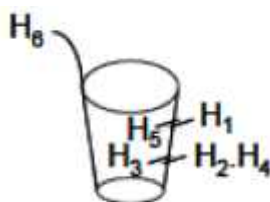
La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est l'une des méthodes physico-chimiques les plus appropriées et la plus largement utilisée dans l'étude de la formation des complexes d'inclusion, car elle a l'avantage de révéler la structure du complexe et d'identifier la partie de la molécule invitée qui est incluse dans la cavité de la molécule hôte et permet de situer avec précision le lieu d'interaction hôte-

invité et permet de déterminer facilement la stœchiométrie d'un complexe d'inclusion solide.

En effet, la RMN, du proton permet notamment d'observer les changements des déplacements chimiques dus à la complexation.

Le but de cette étude consiste à mettre en évidence le phénomène de l'inclusion. Ceci est montré sans ambiguïté par la comparaison des spectres RMN du proton des cyclodextrines et du piceatannol libre avec ceux de leurs complexes correspondants. En effet, de très grandes différences ont été constatées pour tous les cas.

Il existe six protons dans la bêta-CD qui peuvent être utilisés dans l'analyse des spectres de la RMN  $^1\text{H}$ . Trois d'entre eux sont situés sur la surface extérieure ( $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_4$ ), deux dans la cavité ( $\text{H}_3$  et  $\text{H}_5$ ),  $\text{H}_3$  du côté étroit à proximité de la sortie et  $\text{H}_5$  près de la plus large base. Le dernier proton,  $\text{H}_6$ , est plus proche du côté large de la cavité. Cette répartition des protons sur la cyclodextrine peut être schématisée comme montré sur la Figure (IV.24) ci-dessous :



**Figure (IV.24)** : Disposition des protons de la cyclodextrine.

#### ⇒ Le complexe d'inclusion ( $\text{C}_1$ ) :

Le spectre  $^1\text{H}$  RMN de la  $\beta$ -CD pure est montré sur la **Figure (IV.25)**, Le pic apparaissant à 3,4 ppm correspond à l'eau contenu comme impureté dans le DMSO.

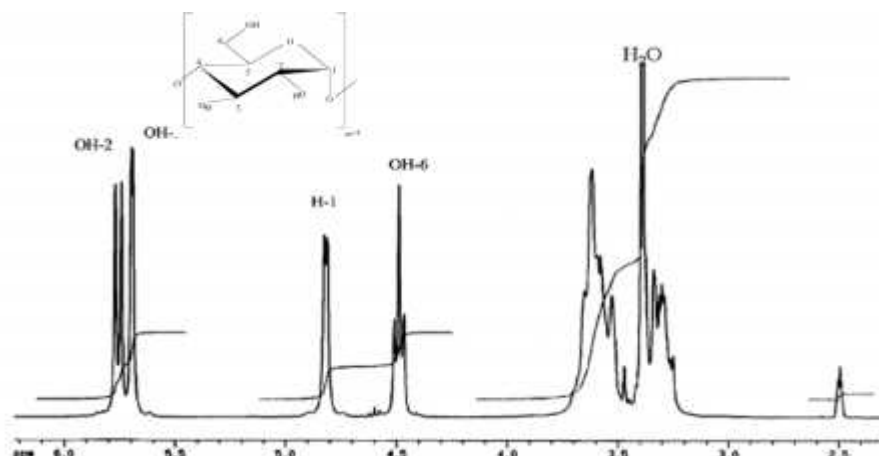


Figure (IV.25) : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la  $\beta$ -CD [20-23]

Après inclusion, les protons situés à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_5$ ) voient leur environnement électronique modifié du fait de la présence d'une molécule invitée dans la cavité, tandis que les protons localisés à l'extérieur ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_4$  et  $\text{H}_6$ ) de la cavité restent pratiquement inchangés.

Les résultats de l'RMN  $^1\text{H}$  sont rassemblés dans le tableau (VI.14) suivant:

**Tableau(IV.14)** : Déplacements chimiques en  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$  en ppm), de la  $\beta$ -CD et du complexe PIC/ $\beta$ -CD dans le DMSO- $d_6$ , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\beta\text{-CD libre}}$ ).

| protons                                       | $\beta$ -CD [20-23] | Complexe (PIC/ $\beta$ -CD) |                |
|---|---------------------|-----------------------------|----------------|
|   | $\delta$ (ppm)      | $\delta$ (PIC/ $\beta$ -CD) | $\Delta\delta$ |
| $\text{H}_1$                                  | 4.84(d)             | 4.80(d)                     | -0.04          |
| $\text{H}_2$                                  | 3.40 (dd)           | 3.39(dd)                    | -0.01          |
| $\text{H}_4$                                  | 3.31(t)             | 3.30(t)                     | -0.01          |
| $\text{H}_3$ , $\text{H}_5$ ,<br>$\text{H}_6$ | 3.58-3.61(m)        | 3.48-3.73(m)<br>(bande)     | -0.1-0.12      |
| $6'(\text{OH})$                               | 4.50(t)             | 4.41(t)                     | -0.09          |

L'analyse du spectre  $^1\text{H}$  RMN du complexe  $\text{C}_1$  montre que tous les protons ont subi un blindage plus ou moins important vers les valeurs inférieures des déplacements chimiques par rapport à ceux de la cyclodextrine pure.



On constate l'apparition d'une bande large à  $\delta = 3.48-3.73$  ppm attribuée au chevauchement des multiplets correspondant aux protons H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub> et aux interactions entre les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> dirigés vers l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine (partie hydrophobe) avec l'invité. Pour le complexe C<sub>1</sub>, des déplacements des protons H<sub>3</sub> (-0.1 ppm), H<sub>5</sub> (-0.12 ppm) et H<sub>6</sub> (-0.09 ppm) vers les champs forts ont été observés. Le blindage des protons H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub> peut être dû à la formation de liaisons hydrogène.

On observe aussi un blindage de l'ensemble des protons du piceatannol sur le spectre du complexe par rapport au picéatannol pur, ce qui indique que là aussi, la complexation est un processus dynamique dans lequel il existe un échange rapide entre le piceatannol libre et complexé [24-25].

Le déplacement de tous les signaux de la cyclodextrine vers les champs forts indique que la force motrice de l'inclusion est principalement du type hydrophobe.

⇒ Le complexe d'inclusion (C<sub>2</sub>) :

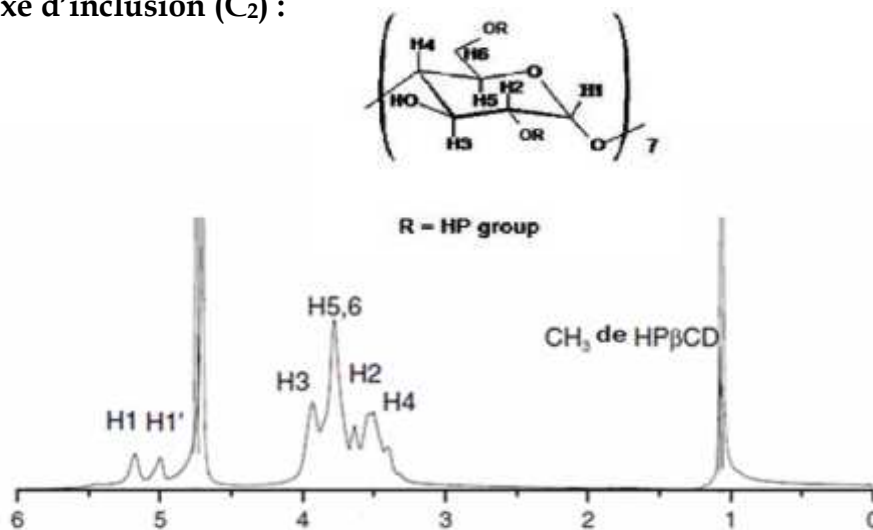


Figure (IV.26) : Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'HP-β-CD dans le DMSO [23-25].

**Tableau(IV.15) :** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$ , ( $\delta$  en ppm), de l'HP- $\beta$ -CD et du complexe d'inclusion PIC/HP- $\beta$ -CD dans le DMSO- $d_6$ ,

$$(\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\text{HP-}\beta\text{-CD libre}}).$$

| Protons  | HP- $\beta$ - CD | Complexe                         |                |
|--|------------------|----------------------------------|----------------|
|  | [23-25]          | (PIC/ HP- $\beta$ -CD)           |                |
|  | $\delta$ (ppm)   | $\delta$ (PIC / HP- $\beta$ -CD) | $\Delta\delta$ |
| H <sub>1</sub>                                   | 5.10(m)          | 4.90-4.77(m)                     | -0.19          |
| H <sub>2</sub>                                   | 3.30(m)          | 3.22 (dd)                        | -0.08          |
| H <sub>4</sub>                                   | 3.34(d)          | 3.74(d)                          | 0.4            |
| H <sub>3</sub> , H <sub>5</sub> , H <sub>6</sub> | 3.55-3.60<br>(m) | 3.36-3.63 (m)<br>(bande)         | -0.19-0.03     |
| CH <sub>2</sub> <sub>HP</sub>                    | 4.46             | 4.48                             | 0.02           |
| H <sub>9</sub>                                   | 3.40             | 4.67                             | 1.27           |
| CH <sub>3</sub> <sub>HP</sub>                    | 1.05(s)          | 0.99(s)                          | -0.06          |

On observe que les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> de l' HP- $\beta$ -CD dirigés vers l'intérieur de la cavité, sont plus blindés après complexation. On observe que la complexation influe faiblement ( $\Delta\delta = -0.06$  ppm) sur les déplacements chimiques des CH<sub>3</sub> hydroxypropyliques en C<sub>6</sub> de l'HP- $\beta$ -CD, car ils sont situés sur le petit cercle du cône de la molécule.

On observe aussi un blindage de l'ensemble des protons du piceatannol sur le spectre du complexe par rapport au piceatannol pur, ce qui indique que là aussi, la complexation est un processus dynamique dans lequel il existe un échange rapide entre le piceatannol libre et complexé [24-26].

Le même comportement a été observé pour le resvératrol dans des études reportées par Lu et al. et Bertacche et al. [21-30].

#### IV.3.1.2 Etude des complexes d'inclusion par la RMN<sup>13</sup>C:

Une autre technique utilisée dans la caractérisation des complexes de CDs est l'RMN du carbone 13. On peut expliquer la probabilité d'inclusion ainsi que

l'orientation des atomes de la molécule invitée à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine. Le mode d'interaction intensif entre la molécule invitée et la paroi de la cavité provoque un déblindage des atomes de carbone de la molécule invitée. Une caractérisation par la  $^{13}\text{C}$  RMN a été menée sur les complexes d'inclusion préparés à l'état solide. Les spectres  $^{13}\text{C}$  RMN pour chaque complexe sont représentés ci-dessous (Figure (IV.27)).

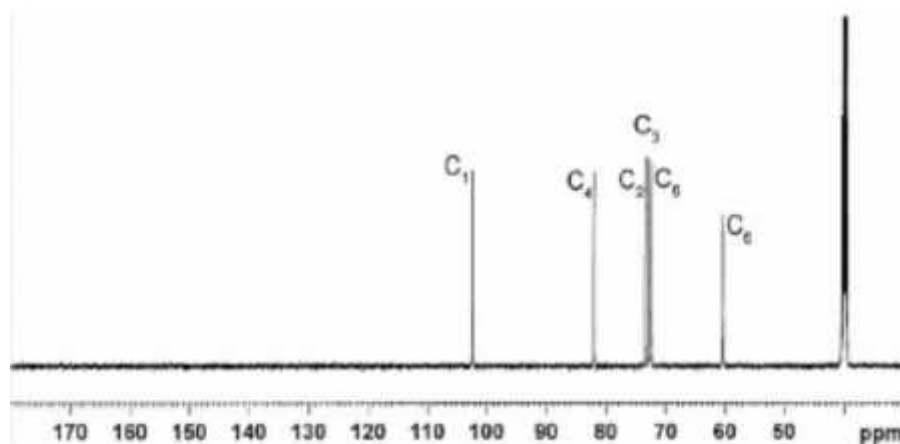


Figure (IV.27) : Spectre  $^{13}\text{C}$ RMN de la  $\beta$ -CD dans DMSO- $d_6$  [20-26].

⇒ Le complexe d'inclusion ( $\text{C}_1$ ) :

Tableau(IV.16): Attribution des signaux du spectre  $^{13}\text{C}$  RMN de la  $\beta$ -CD, ( $\delta$  en ppm), et du complexe d'inclusion PIC/  $\beta$ -CD dans DMSO- $d_6$ , ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\beta\text{-CD libre}}$ ).

| Carbone      | $\beta$ -CD [20-26] | Complexe (PIC/ $\beta$ -CD) |                                    |
|--------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
|              | $\delta$ (ppm)      | $\delta$ (PIC/ $\beta$ -CD) | $\Delta\delta$ (PIC : $\beta$ -CD) |
| $\text{C}_1$ | 102.9               | 102.38                      | 0.52                               |
| $\text{C}_2$ | 75.8                | 73.09                       | 2.70                               |
| $\text{C}_3$ | 71.5                | 75.09                       | -3.59                              |
| $\text{C}_4$ | 81.1                | 81.99                       | -0.89                              |
| $\text{C}_5$ | 74.8                | 73.9                        | 0.89                               |
| $\text{C}_6$ | 62.6                | 60.36                       | 2.24                               |

⇒ Le complexe d'inclusion (C<sub>2</sub>) :

**Tableau(IV.17):** Attribution des signaux du spectre <sup>13</sup>C RMN de l'HP-β-CD, (δ en ppm), et du complexe d'inclusion PIC/ HP-β-CD dans le DMSO-d<sub>6</sub>, (Δδ=δ<sub>complexe</sub> - δ<sub>HP-β-CD libre</sub>).

| Carbone           | HP-β-CD | Complexe (PIC / HP-β-CD) |                    |
|-------------------|---------|--------------------------|--------------------|
|                   | [25-30] | δ (PIC : HP-β-CD)        | Δδ (PIC : HP-β-CD) |
| C <sub>1</sub>    | 102.9   | 82.04                    | 20.04              |
| C <sub>2</sub>    | 73.6    | 72                       | 1.6                |
| C <sub>3</sub>    | 71.5    | 74                       | -2.5               |
| C <sub>4</sub>    | 76.8    | 77.86                    | -1.06              |
| C <sub>5</sub>    | 74.4    | 73                       | 1.4                |
| C <sub>6</sub>    | 70.7    | 60.34                    | 10.36              |
| C <sub>8</sub>    | 80.7    | 79                       | 1.7                |
| C <sub>9</sub>    | 66.4    | 66                       | 0.40               |
| CH <sub>3HP</sub> | 21.3    | 20.28                    | 1.02               |

L'analyse des spectres <sup>13</sup>C RMN des deux complexes montre une diminution des déplacements chimiques des carbones C<sub>5</sub> de ≈ 0.89 ppm pour la β-CD et de ≈ 8.58 ppm pour l'HP-β-CD et une augmentation des déplacements chimiques des carbones C<sub>3</sub> de ≈ 4 ppm pour la β-CD et de ≈ 3 ppm pour l'HP-β-CD justifiant l'effet important de la complexation sur ces deux carbones par rapport aux autres. Les résultats de cette analyse sont en parfait accord avec ceux de la <sup>1</sup>H RMN.

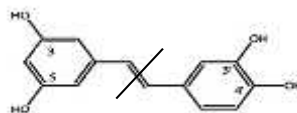
#### IV.3.1.3 Etude des complexes d'inclusion par spectrométrie de masse (ESI -TOF (+) 175V) :

La spectroscopie de masse (ESI-Tof) est complémentaire aux autres méthodes spectrométriques telles que la RMN. Les masses moléculaires des complexes sont directement mesurées en mode Electrospray Ionisation (ESI). Cette méthode a été employée pour caractériser les complexes d'inclusion.

Pour les complexes 1:1, les intensités des signaux correspondant aux formes de complexes ( $[\text{Complexe}+\text{Na}]^+$  ou  $[\text{Complexe}+\text{NH}_4]^+$ ) sont élevées ce qui montre que les complexes d'inclusion entre le piceatannol et la  $\beta$ -CD sont effectivement formés et sont mêmes stables dans les conditions douces de ESI-MS.

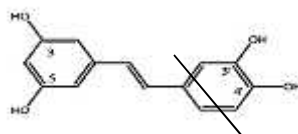
➤ **Le complexe d'inclusion( $C_1$ ) piceatannol/ $\beta$ -CD :**

Le spectre de masse ESI-HRMS+ (**Figure (IV.28)**) montre un pic à  $m/z = 121.0509$  g.mol<sup>-1</sup> correspondant au fragment  $[\frac{1}{2} M+H]^+$  du piceatannol de formule C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (122 g/mol) obtenu selon le processus schématisé ci-dessous et donnons deux fragments de même masse.



Le pic à  $m/z = 169.0867$  g.mol<sup>-1</sup>  $[\frac{1}{2}M+H_2O+ Na]^+$  correspond à la masse moléculaire calculée pour M= 162.0569 g/mol; z = 1).

Le spectre de masse ES-HRMS+ (**Figure (IV.28)**) est en parfait accord avec la structure proposée puisque le pic mesuré ( $m/z = 298.0856$  g.mol<sup>-1</sup>)  $[M+2NH_4]^+$  correspond à la masse moléculaire calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> = 244.24 g/mol-1; z = 1)(M=280.24 g/mol<sup>-1</sup>).



Le spectre de masse ES-HRMS+ (**Figure (IV.28)**) est parfaitement en accord avec la structure proposée puisque le pic mesuré ( $m/z = 469.2115$  g.mol<sup>-1</sup>)  $[2M+H]^+$  correspond à la masse moléculaire calculée pour M = 488.48 g/mol-1; z = 1).

Les autres pics sont résumés sur le Tableau (**IV.18**).

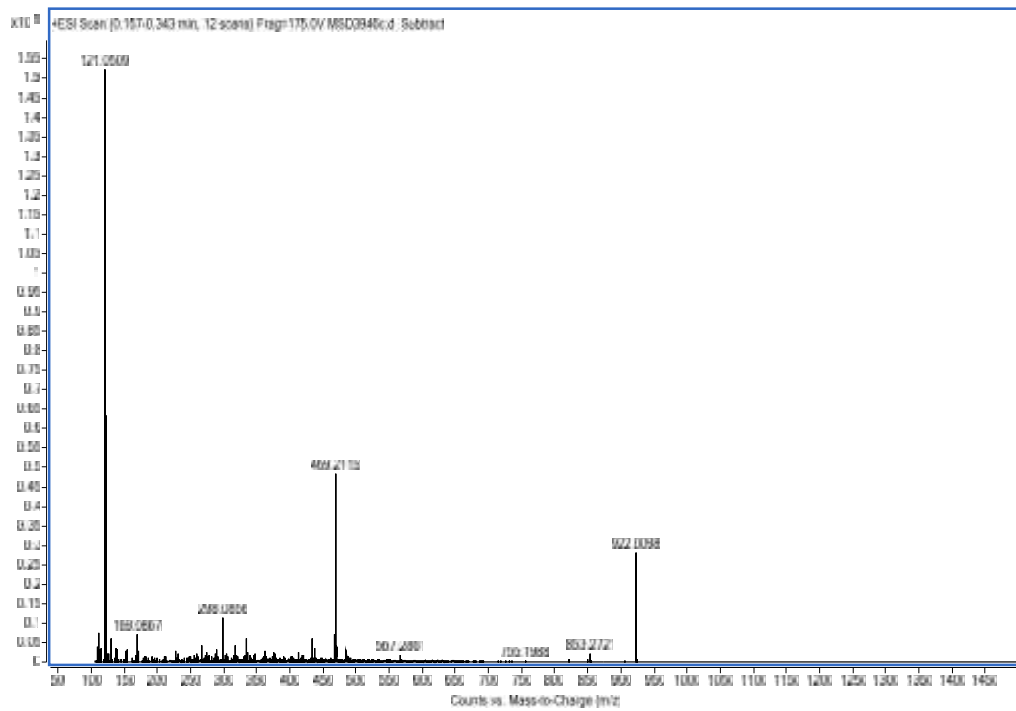


Figure (IV.28) : Spectres ESI TOF (+) du complexe C<sub>1</sub>.

➤ Le complexe d'inclusion (C<sub>2</sub>) piceatannol/ HP- -CD :

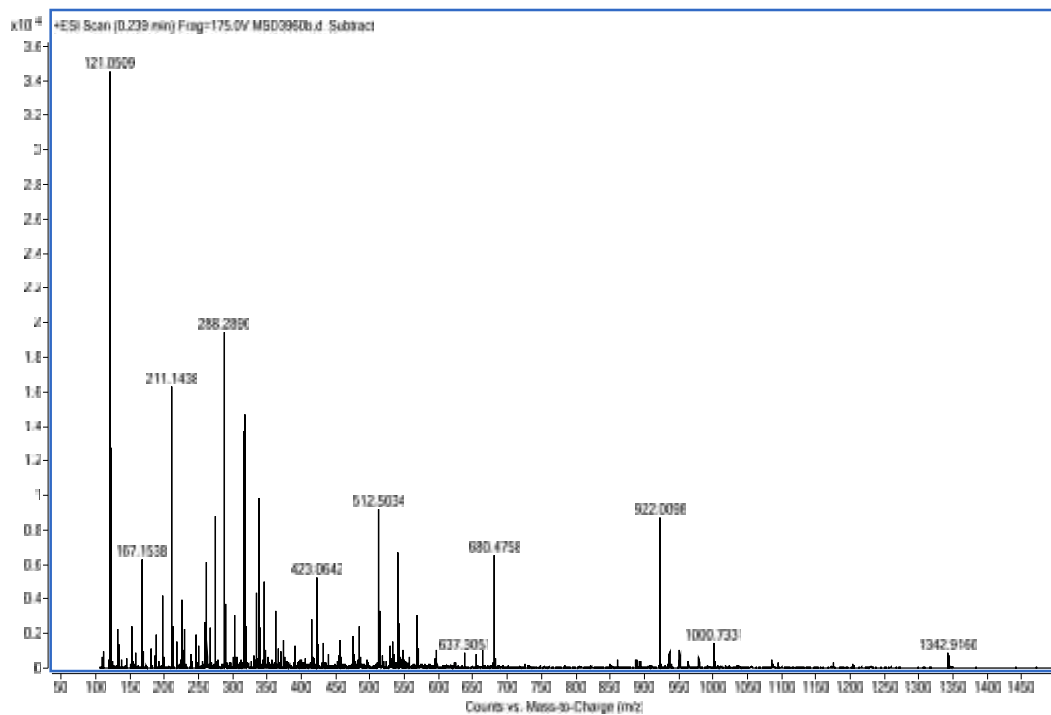
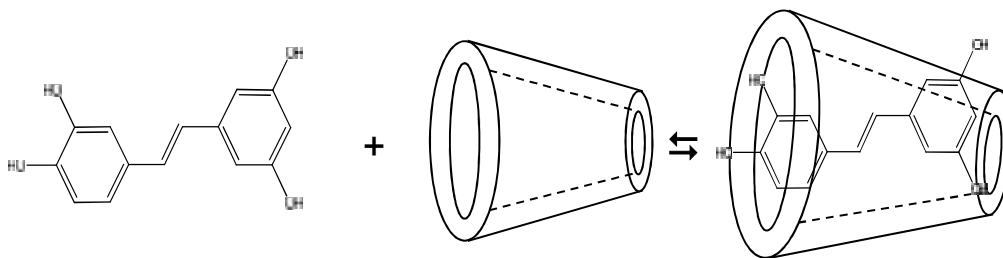


Figure (IV.29) : les spectres ESI TOF (+) du complexe C<sub>2</sub>

**Tableau(IV.18) :** Caractérisation des deux complexes d'inclusion par spectroscopie de masse.

| complexes      | M (g.mol <sup>-1</sup> ) | Principaux pics observés, m/z(%)                                     |
|----------------|--------------------------|--|
| C <sub>1</sub> | 1379,24                  | [M-23H <sub>2</sub> O-Na- NH <sub>4</sub> -2H] <sup>+</sup> 922,0098 |
| C <sub>2</sub> | 1785,78                  | [M-22H <sub>2</sub> O-Na-NH <sub>4</sub> -6H] <sup>+</sup> 1342,9166 |

Nous pouvons proposer d'après les analyses RMN H<sup>1</sup> et RMN C<sup>13</sup>, spectre de masse



**Figure (IV.30) :** Schéma global du complexe d'inclusion du picéatannol en présence de la β-CD.

## Etude par modélisation moléculaire du complexe d'inclusion du picéatannol avec la $\beta$ -cyclodextrine :

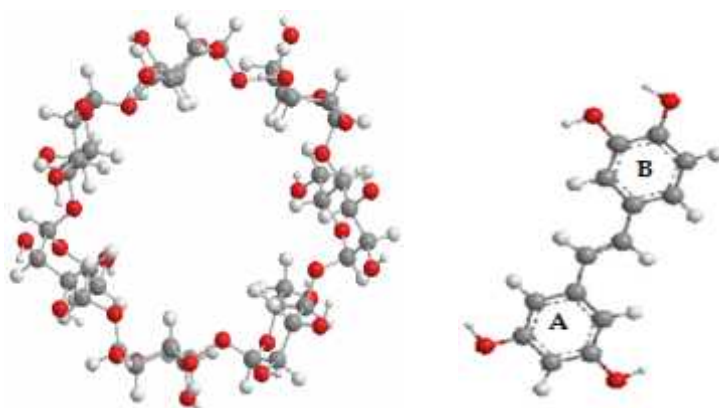
### IV.4 Introduction :

Dans cette partie nous nous sommes intéressées à l'étude par modélisation moléculaire du complexe d'inclusion formé entre la  $\beta$ -CD et le PIC en utilisant la méthode PM3, s'étant avérée adéquate même pour la modélisation des systèmes moléculaires de grandes tailles, comme il a été reporté par des études théoriques sur les complexes d'inclusion avec la  $\beta$ -CD où les résultats obtenus étaient dans la plupart des cas satisfaisants. Par ailleurs, la précision de la méthode PM3 est comparable à celle d'un calcul *ab initio* utilisant une fonction de base moyenne [31-33].

### IV.5 Simulation par la méthode semi-empirique PM3 :

#### IV.5.1 Structures de départ :

La structure initiale du picéatannol a été construite en utilisant l'interface graphique du logiciel ChemBio3D Ultra (version 11, Cambridge Software), puis a été optimisée avec la fonctionnelle hybride B3LYP/6-31G\*. La structure de la  $\beta$ -CD, quant à elle, a été extraite de la base de données implantée dans le même logiciel.



Figure(IV.31) : Structures de la  $\beta$ -cyclodextrine (gauche) et du picéatannol (droite).

#### IV.5.2 Construction du modèle :

Pour localiser le minimum énergétique du complexe d'inclusion PIC/ $\beta$ -CD, nous avons adopté la méthode décrite par Liu [34].



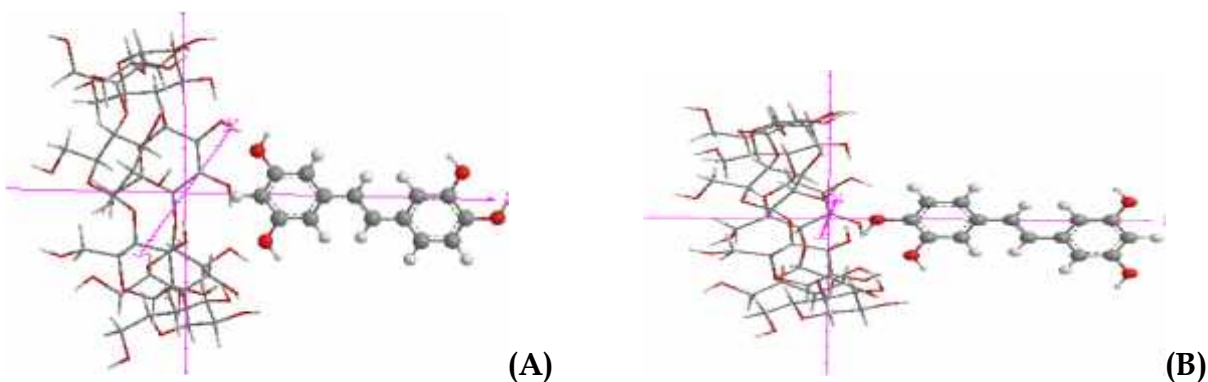
La modélisation a été réalisée par docking de la structure optimisée du PIC dans la cavité de la  $\beta$ -CD. Ainsi, le processus d'inclusion consiste à placer en premier, les atomes d'oxygène glucosidiques de la  $\beta$ -CD sur le plan XY, puis le PIC a été placé sur l'axe Z [35].

Durant Le processus de complexation, les coordonnées de la  $\beta$ -CD sont maintenues fixes et le PIC est déplacé par translation et rotation vers la cavité de la  $\beta$ -CD et se place le long de l'axe Z. Les positions relatives entre le piceatannol et la  $\beta$ -CD sont mesurées par rapport à la distance entre l'atome indiqué dans la molécule invitée et l'origine des coordonnées du plan équatorial de la  $\beta$ -CD.

Lors de la complexation, deux modèles d'inclusion ont été pris en compte et l'invité a été inséré graduellement dans la cavité de la  $\beta$ -CD (**Figure (IV.32)**).

- ⊗ Le cycle **A** du PIC (portant les hydroxyles 3 et 5) est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD ; **orientation A**.
- ⊗ Le cycle **B** du picéatannol (portant les hydroxyles 3' et 4') est pointé vers la face large de la  $\beta$ -CD ; **orientation B**.

Cette nomenclature est utilisée uniquement pour simplifier l'interprétation des résultats.



**Figure(IV.32):** les deux orientations (A et B) du picéatannol vers la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine.

L'inclusion a tout d'abord été imitée en faisant déplacer manuellement le PIC positionné à une distance de 6 Å de l'origine des coordonnées cartésiennes, vers la cavité de la  $\beta$ -CD tout au long de l'axe OZ, par paliers de 1Å, jusqu' à la position de -6Å et ceci est en vue de trouver la structure la plus stable du complexe.

Pour couvrir et explorer le maximum de points de tout l'espace conformationnel et obtenir une première idée de l'orientation, nous faisons tourner le PIC selon les axes x, y et z pour trouver l'angle optimal à chaque pas, par balayage de l'angle  $\theta$  tournant autour de l'axe Z, de 0° à 180°, à un intervalle de 20°.

Pour chaque étape, la géométrie du complexe a été entièrement optimisée par la méthode semi empirique PM3. Le minimum énergétique pour chaque point du segment [-6 Å, +6 Å] est ré-optimisé une deuxième fois sans aucune restriction.

#### IV.6 Analyse des résultats :

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

##### IV.6.1 Résultats des calculs :

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

##### IV.6.1.1 Recherche du minimum :

L'optimisation de la géométrie des complexes de la CD est un problème à multiples minimas. La détermination du minimum est une opération très difficile, sinon impossible, car il existe une infinité de points à l'intérieur de la cavité qu'il faut explorer. Donc, nous pouvons seulement l'approcher. Nous avons contribué au développement d'une procédure de recherche systématique du minimum propre à nos complexes d'inclusion [36].

Lors de cette thèse nous avons utilisé différentes formules permettant de caractériser les complexes d'inclusion.

Ainsi, l'énergie de liaison (binding energy) est définie comme étant la différence d'énergie du complexe Hôte/invité et l'énergie des géométries optimisées des composants individuels à partir de ce complexe [37].

$$E_{binding} = E_{complex}^{opt} - (E_{\beta-CD}^{opt} + E_{PIC}^{opt}) \quad (8)$$

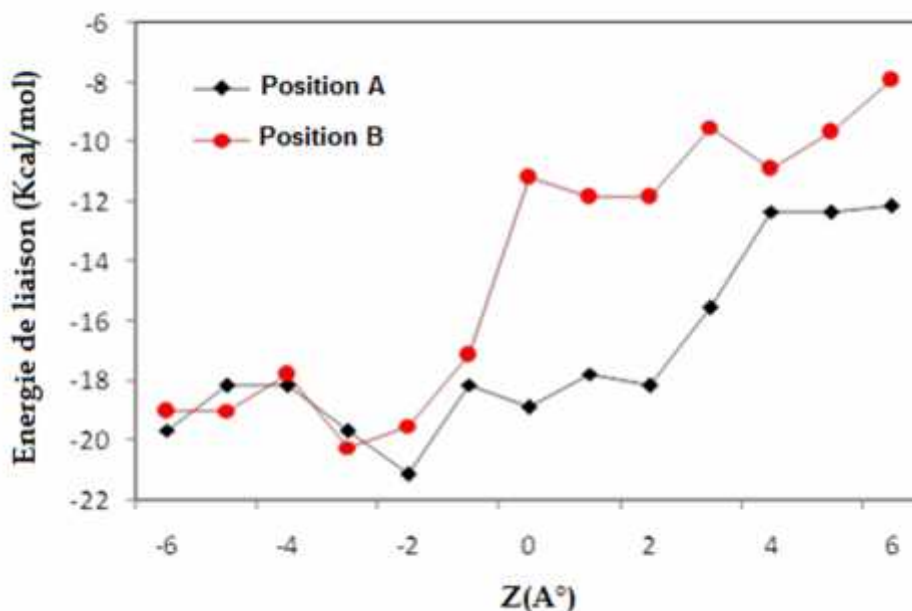
Où :  $E_{complex}^{opt}$ , désigne l'énergie potentielle du complexe après optimisation géométrique et les termes ( $E_{PIC}^{opt}$  et  $E_{\beta-CD}^{opt}$ ) correspondent respectivement aux énergies potentielles des composés PIC et  $\beta$ -CD dans le système.

L'énergie de stabilisation (complexation) entre la molécule invitée et la  $\beta$ -CD a été calculée pour la structure ayant l'énergie minimale comme suit [38].

$$E_{complexation} = E_{complex}^{opt} - (E_{\beta-CD Libre}^{opt} + E_{PIC Libre}^{opt}) \quad (9)$$

Où :  $E_{complex}$ ,  $E_{PIC libre}$ , et  $E_{\beta-CD libre}$  représentent les énergies du complexe, du PIC libre et de la  $\beta$ -CD Libre, respectivement.

Les calculs théoriques génèrent des structures avec des énergies minimales différentes qui sont représentées graphiquement sur la Figure(IV.33).



Figure(IV.33): Energies de liaison du complexe d'inclusion PIC /  $\beta$ -CD en différentes positions Z (Å), pour les deux orientations A et B.

D'après ces courbes (**Figure (IV.33)**), on constate que les valeurs des énergies sont toutes négatives, ce qui prouve que les complexes d'inclusion formés, dans les deux orientations, sont thermodynamiquement stables. Par ailleurs, on remarque la similitude entre les courbes des énergies obtenues pour les deux orientations.

Pour l'orientation **A**, un minimum énergétique a été localisé au début du processus à  $-2 \text{ \AA}$  correspondant à une énergie de liaison équivalente à  $-21.164 \text{ kcal/mol}$  et un angle  $\theta$  de  $180^\circ$ , loin de la cavité de la cyclodextrine [**Figure(IV.33).A**]. Cependant, pour l'orientation **B**, le minimum énergétique est obtenu à  $-3 \text{ \AA}$  avec une énergie de liaison de  $-20.257 \text{ kcal/mol}$  et un angle  $\theta$  de  $180^\circ$  [**Figure(IV.33).B**].

Les valeurs des énergies obtenues ( $E_{\text{compl}}$ ,  $E_{\text{liaison}}$ ) démontrent clairement que la molécule PIC peut former des complexes stables avec la  $\beta$ -CD.

**Tableau (IV.19)** : Energies de liaison ( $E_{\text{binding}}$ ) pour les deux orientations **A** et **B**.

| Z( $\text{\AA}$ ) | $E_{\text{liaison}}$ (Kcal/mol)<br>orientation A | $E_{\text{liaison}}$ (Kcal/mol)<br>orientation B |
|-------------------|--|--|
| 6                 | -12,156  | -7,933   |
| 5                 | -12,374  | -9,709   |
| 4                 | -12,346  | -10,943  |
| 3                 | -15,565  | -9,505   |
| 2                 | -18,170  | -11,888  |
| 1                 | -17,785  | -11,883  |
| 0                 | -18,915  | -11,202  |
| -1                | -18,165  | -17,197  |
| <b>-2</b>         | <b>-21,164</b>                                   | -19,531  |
| <b>-3</b>         | -19,719  | <b>-20,257</b>                                   |
| -4                | -18,190  | -17,825  |
| -5                | -18,174  | -19,035  |
| -6                | -19,685  | -19,043  |

Les résultats récapitulés dans le Tableau (IV.19), montrent que l'énergie de liaison de -21,164 kcal/mole est en faveur de l'orientation A.

D'après la relation (9), l'énergie de complexation est définie comme la différence entre l'énergie du complexe optimisé et la somme des énergies de l'hôte et de l'invité isolés dans leurs conformations optimisées du complexe.

Considérant l'écart énergétique faible entre les deux orientations, il n'est pas évident de déterminer la contribution relative et la nature des forces motrices conduisant à l'orientation favorable.

Afin d'avoir une compréhension approfondie sur la structure 3D du complexe la plus probable, on doit procéder à un calcul par la méthode semi empirique PM3 des chaleurs de formation, des énergies de liaison, des énergies de complexation PIC / $\beta$ -CD, des énergies de déformation de la  $\beta$ -CD ( $DEF_{\beta\text{-CD}}$ ) et du PIC ( $DEF_{\text{PIC}}$ ) pour les deux orientations [Tableau (IV.20)].

**Tableau (IV.20):** Energies optimisées ( $E_{\text{opt}}$ ), énergies de liaison, énergies de complexation PIC / $\beta$ -CD ( $E_{\text{complex}}$ ), énergies de déformation de la  $\beta$ -CD ( $DEF_{\beta\text{-CD}}$ ) et du PIC ( $DEF_{\text{PIC}}$ ), pour les deux orientations.

| Energies<br>(Kcal/mol)    | PIC      | $\beta$ -CD | Orientation A | Orientation B | $\Delta E$ |
|---------------------------|----------|-------------|---------------|---------------|------------|
| $E_{\text{opt}}$          | -117.636 | -1453.78    | -1592.589     | -1591.683     |            |
| $E_{\text{liaison}}$      |          |             | -21.164       | -20.257       | -0.90      |
| $E_{\text{complex}}$      |          |             | -21.173       | -20.267       | -0.90      |
| $E_{DEF,\text{PIC}}$      |          |             | 87.65         | 0.399         |            |
| $E_{DEF,\beta\text{-CD}}$ |          |             | 99.69         | 4.32          |            |

L'examen des résultats du Tableau (IV.20) montre que la stabilité du complexe PIC/ $\beta$ -CD est à nouveau en faveur de l'orientation A avec une différence d'énergie de 5 Kcal/mol. Ces résultats confirment ceux trouvés par le calcul du minimum énergétique où l'écart énergétique était faible et évalué à -0.9 Kcal/mol.

#### IV.6.1.2 Energies de déformation :

L'énergie de déformation des molécules hôte et invitée lors de la formation du complexe a été définie comme la différence entre l'énergie de la composante totalement optimisée et de son énergie dans le complexe [39].

$$DEF \text{ composant} = E(\text{composant})_{sp}^{opt} - E(\text{composant})^{opt} \quad (10)$$

$E_{DEF}(\text{composant})$  : énergie de déformation.

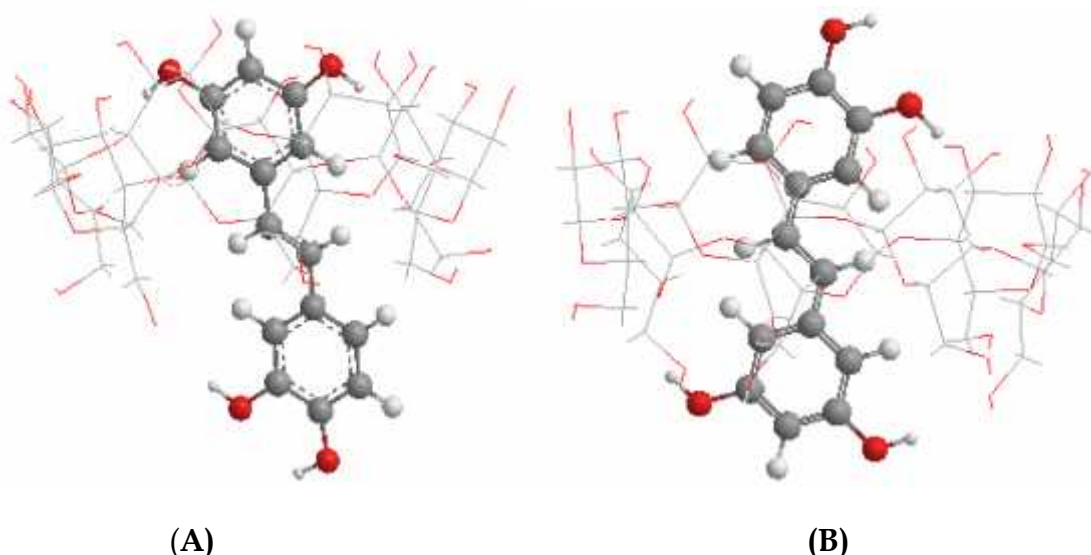
$E(\text{composant})^{opt}$  : énergie du composant libre.

$E(\text{composant})_{sp}^{opt}$  : Énergie de single point du composant pris à partir du complexe optimisé.

La  $\beta$ -CD présente des énergies de déformation assez importantes, ce qui explique sa disponibilité à adapter une conformation plus flexible pour inclure la molécule invitée en exerçant des interactions avec elle.

D'après le calcul des énergies de déformation (Tableau (IV.20)), nous remarquons que le PIC dans l'orientation (A) présente une énergie de déformation de 87.65 Kcal/mol, plus importantes que celle de l'orientation (B). Cette déformation aide à l'adaptation de la conformation du PIC à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -CD, présentant, elle aussi une déformation proportionnelle. Ce résultat révèle bien que l'énergie de déformation est l'un des facteurs gouvernant la formation des complexes d'inclusion.

Les structures optimisées des deux orientations des complexes (A, B) obtenues au moyen de la méthode PM3 sont représentées dans la Figure (IV.34).



**Figure(IV.34)** : Structures des complexes PIC/  $\beta$ -CD obtenu par un calcul PM3 correspondants aux deux orientations **A** et **B** du PIC.

La structure géométrique la plus probable (**A**), montre bien l'inclusion totale du groupement phényle à l'intérieur de la cavité de la molécule hôte.

#### IV.6.1.3 Analyse thermodynamique du processus de complexation de la $\beta$ -CD avec le PIC :

Les calculs des paramètres thermodynamiques du processus d'inclusion ; les variations d'enthalpie ( $\Delta H^\circ$ ), d'entropie ( $\Delta S^\circ$ ) et de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), pour l'association PIC / $\beta$ -CD ont été effectués à pression atmosphérique et à 298,15 K, par la méthode semi- empirique PM3. Les résultats sont illustrés dans le Tableau (IV.21).

**Tableau (IV.21):** Paramètres thermodynamiques des complexes selon les deux orientations.

| Energies (Kcal/mol) | PIC     | $\beta$ -CD | Orientation A | Orientation B |
|---------------------|---------|-------------|---------------|---------------|
| <b>H</b>            | 40.651  | -666.319    | -466.543      | -634.430      |
| $\Delta H$          |         |             | 159,125       | -8,762        |
| <b>G</b>            | 1.392   | -784.919    | -784.916      | -778.335      |
| $\Delta G$          |         |             | -1.389        | 5,192         |
| <b>S</b>            | 131.678 | 397.788     | 268.429       | 392.689       |
| $\Delta S$          |         |             | -261,037      | -136,777      |

D'après le Tableau (IV.21), on peut observer que le PIC se lie à la  $\beta$ -CD avec un terme d'enthalpie favorable ( $\Delta H^\circ < 0$ ).

En outre, pour le complexe, les changements d'enthalpie pour l'orientation **B** sont négatifs indiquant que le processus est exothermique tandis que, pour l'orientation **B**, les changements d'enthalpie sont positifs (la réaction est endothermique). Les valeurs de  $\Delta S^\circ$  pour le complexe PIC/ $\beta$ -CD sont négatives, ce qui indique une diminution du degré de liberté de transition et de rotation du piceatannol complexé par rapport au piceatannol libre. La valeur négative de  $\Delta G$  indique que la réaction de complexation est spontanée.

L'orientation la plus pratique pour les complexes d'inclusion PIC/ $\beta$ -CD était l'orientation **A**, car c'est la structure la plus favorable énergétiquement et cela peut bien être attribué à de fortes interactions de Van Der Waals. Les valeurs de  $\Delta H^\circ$  obtenues pour les processus d'inclusion indiquent que l'inclusion du PIC dans la cavité  $\beta$ -CD est favorisée par l'enthalpie.

L'étude en solution a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques qui ont indiqué que le processus de complexation PIC/ $\beta$ -CD est exothermique, ce qui est en parfait accord avec les résultats des calculs par la méthode PM3 mais selon l'orientation (**B**). Néanmoins, les minimas d'énergie évalués par l'étude théorique montrent que les deux orientations donnent des complexes stables, mais le plus stable des deux est celui formé par l'orientation (**A**) pour laquelle, les calculs ont donné un mécanisme endothermique. Il ne faut surtout pas oublier que les calculs théoriques ont été faits dans le vide, sans l'effet de solvant.

#### IV.6.1.4 Approximation des orbitales frontières:

Cette approximation, introduite par Fukui [40], est basée sur les hypothèses suivantes :

1. L'état de transition est modélisé par un complexe formé par les réactifs.
2. La formation du complexe est représentée par un échange d'électrons entre :  
L'HOMO et la LUMO. L'HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) traduit le caractère électro-donneur (nucléophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est élevée, plus la molécule cédera facilement des électrons.



La **LUMO** (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) traduit le caractère électro-accepteur (électrophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est faible, plus la molécule acceptera facilement des électrons.

3. La réaction la plus probable est celle qui correspond à la plus faible différence d'énergie entre l'HOMO et la LUMO.
4. Les orbitales HOMO et LUMO interagissent par leurs lobes de même signe.
5. Les atomes les plus réactifs dans une molécule sont ceux qui possèdent les plus forts coefficients (en valeur absolue) pour l'OM concernée.

Cette approximation a deux inconvénients :

- ⊗. On néglige l'influence des charges électriques. Dans certains cas, cette influence peut contre balancer celle des OM.
- ⊗. On néglige l'influence des OM autres que l'HOMO et la LUMO. Or la participation de ces OM peut être importante si la molécule est volumineuse, car dans ce cas, les niveaux d'énergie tendent à se rapprocher.

**Tableau (IV.22) :** les énergies de l'HOMO et de la LUMO obtenues par le calcul PM3 du complexe PIC/ $\beta$ -CD.

| Energies<br>(Kcal/mol)                      | PIC     | $\beta$ -CD | Orientation<br>A | Orientation B |
|---|---------|-------------|------------------|---------------|
| $E_{\text{HOMO}}$                           | -11.153 | -10.59      | -10.59           | -10.59        |
| $E_{\text{LUMO}}$                           | -4.440  | 17.704      | -3.914           | -3.906        |
| $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$<br>(eV) | -6.713  | -28.294     | -6.676           | -6.684        |
| $E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}$<br>(eV) | -15.593 | 7.114       | -14.504          | -14.496       |
| $\mu$                                       | -7.7965 | 3.557       | -7.252           | -7.248        |
| $\eta$                                      | -3.356  | -14.147     | -3.338           | -3.342        |
| $S$   | -0.2979 | -0.0706     | -0.2995          | -0.2992       |
| $\omega$                                    | -9.0562 | -0.4472     | -7.8776          | -7.8595       |
| $D$   | 1.8467  | 6.1921      | 5.5095           | 4.3631        |

Dans cette partie, nous avons exposé les résultats de calculs des orbitales frontières du complexe d'inclusion PIC/ $\beta$ -CD. Ces calculs sont réalisés dans le but de savoir si celles-ci sont une force motrice dans le processus de complexation et

aussi un des indices de la réactivité. Les énergies de ces orbitales ainsi que leurs forme nous fournissent des informations très utiles sur le site et la réactivité des molécules. Les différentes valeurs des orbitales frontières HOMO et LUMO ainsi que le gap énergétique entre elles ( $E_{HOMO}-E_{LUMO}$ ) et le facteur de stabilité  $\eta$  des espèces chimiques [41] sont indiqués dans le Tableau(IV.22).

La stabilité des produits chimiques est directement liée au gap énergétique  $E_{HOMO}-E_{LUMO}$ , plus les valeurs du gap énergétique sont élevées plus les composés sont stables. Les résultats des calculs sont représentés sur le Tableau(IV.22). Les gaps énergétiques  $E_{HOMO}-E_{LUMO}$  obtenus pour les deux orientations ont des valeurs proches l'une de l'autre.

Pour les complexes les plus stables, les paramètres physico-chimiques tels que le potentiel chimique électronique ( $\mu$ ), la dureté ( $\eta$ ) et la stabilité ( $S$ ), sont déterminés selon les formules ci-dessous.

$$\mu = \frac{(E_{HOMO} + E_{LUMO})}{2} \quad (11)$$

$$\eta = \frac{(E_{HOMO} - E_{LUMO})}{2} \quad (12)$$

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (13)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (14)$$

Les valeurs du potentiel chimique électronique  $\mu$  des complexes PIC/  $\beta$ -CD, diffèrent de celles des molécules invitée et hôte libres, comme indiqué dans le Tableau(IV.22).

Le PIC a une valeur  $\mu=-7.7965$  eV, inférieure à celle de la  $\beta$ -CD ( $\mu=3.557$ eV), donc le PIC agit comme accepteur d'électrons dans les complexes d'inclusion.

L'électrophilicité des composants a été calculé en utilisant l'équation (14).

La polarité de la cavité des CDs est également pris en considération avant et après la formation des complexes d'inclusion les plus stables. La polarité de la cavité des CDs a changé après l'inclusion de l'invité dans la cavité.

Une recherche bibliographique sur les résultats des études par les méthodes semi-empirique PM3, montre que tous les complexes d'inclusion ont des valeurs du moment dipolaire élevées par rapport à la molécule invitée isolée, mais supérieures à ceux des CDs libres dans certains cas et inférieures dans d'autres cas, ceci indique que la polarité de la cavité des CDs a changé après la complexation. De ces résultats, nous pouvons conclure que les valeurs des moments dipolaires montrent une forte corrélation avec le comportement complexant du PIC.

En conclusion, plus l'écart HOMO-LUMO est élevé plus le complexe hôte-invité est stable.

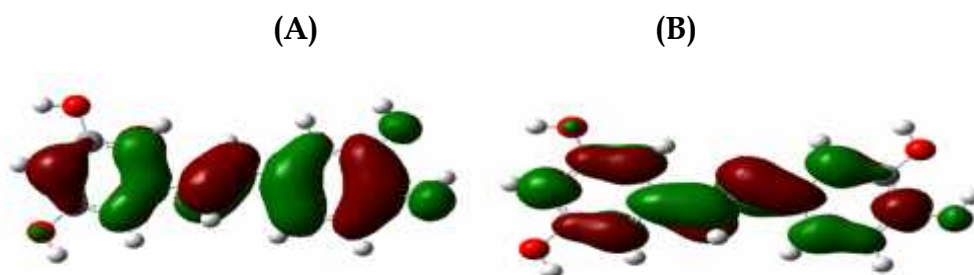


Figure (IV.35): Les orbitales HOMO et LUMO du piceatannol.

#### Conclusion:

On s'est fixé plusieurs objectifs en étudiant la complexation du picéatannol avec la  $\beta$ -cyclodextrine par la méthode PM3. Proposer des modèles géométriques fiables pour les structures des molécules.

Déterminer les interactions intermoléculaires entre la molécule hôte et l'invité.

Nous avons pu, en deux étapes, accéder à une géométrie de basse énergie pour les complexes d'inclusion PIC /  $\beta$ -CD. Une recherche systématique a permis de localiser le minimum préliminaire de la complexation par le biais de la méthode semi-empirique PM3.

**Références Bibliographique**

- [1] Amira-Guibalía H, Thèse de Doctorat, 2007. université de Badji Mokhtar Annaba.
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Piceatannol>.
- [3] Kanchanapoom T, Suga K, Kasai R, Yamasaki K, Kamel M S, Mohamed M H, 2002. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 50, p. 863-865.
- [4] Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, Mukai T, Sakaki Y, Ito T, 2004. Genome Res.
- [5] Young K H, Jaehoon J, Sunghoon Y, Ho CL, 2009. J. Power Sources (communication), 187, p.581-585.
- [6] López-Nicols J M, Delicado E N, Pérez-López A J, Barrachina A C, Cuadra C P, 2006. J. Chromatogr. A, 1135, p.158.
- [7] Hai SL, Wei Z, Mei L G, Qiu Y C, Paul C H, 2010. J. Pharm. Biomed. Anal. 53, p. 693.
- [8] López-Nicols J M, Bru R, Snchez FA, Garca C F, 1995. Biochem. J. 308, p.151.
- [9] Roupe K, Teng X W, Fu X G, Meadows G G, Davies N M, 2004. Biomed. Chromatogr. 18, p.486.
- [10] López-Nicols J M, Garca C F, 2008. Food Chem. 109, p.868.
- [11] Fujimura K, Ueda T, Kitagawa M, Takayanagi H, Ando T, 1986. Anal. Chem. 58, p. 2668.
- [12] Clarot I, Clédat D, Battu S, Cardot P J P, 2000. J. Chromatogr. A 903, p.67.
- [13] López-Nicols JM, Rodrguez B P, Garca C F, 2009. J. Agric. Food Chem. 57, p.10175.
- [14] López-Nicols J M, Rodrguez B P, Méndez C L, Garca C F, 2009. J. Agric. Food Chem. 57, p.5294.
- [15] Chang J K, Hsu YL, Teng I C, Kuo P L, 2006. Eur. J. Pharmacol. 551, p.1.
- [16] Sybilska D, Debowski J, Jurczak J, Zukowski J, 1984. J. Chromatogr. 286, p.163.

- [17] Calabrò M L, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra R, 2004. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35(2), p.349-363.
- [18] Guillaume F, Thèse de Doctorat, 2005. Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- [19] Thorsten D, Thèse de Doctorat, 2006. L'école polytechnique.
- [20] Atanu B, Cheng H N, Selling G W, Willett JL, Kendra DF, 2009. *Carbohydrate Polymers* 77, p.681-685.
- [21] Vittorio B, Natascia L, Donatella N, Elena P, and Chiara S, 2006. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 55, p. 279-287.
- [22] Victor G R, Andrés G L, Ana I O, Carlos M A M, J M, 2011. *Green Chem* 13, p.115.
- [23] Li-Juan Y, Wen C, Shui-Xian M, Yun-Tao G, Rong H, Sheng-Jiao Y, Jun L, 2011. *Carbohydrate Polymers* 85, p.629-637.
- [24] Moyano J R, Arias MJB, Gines JM, Rabasco AM, Perez JIM, Mor M, and Giordano M, 1997. *J. Pharm. Sci.* 86, p.72.
- [25] Djedani F, Perly B, 1991. Editions de Sante, Paris, p. 217-246.
- [26] BAKKOUR Y, Thèse de Doctorat, 2005. Université des science et Technologies de Lille 1.
- [27] Shui-Xian M, Wen C, Xiao-Dong Y, Na Z, Shao-Jie W, Lin L, Li-Juan Y, 2012. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 67-68, p.193- 200.
- [28] Bo Y, Jun L, Yong C, Yu L, 2009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, p. 6311-6317.
- [29] Rui Y, Jing-Bo C, Xiao-Yang D, Rong H, Chuan-Fan X, Zhan-Yong G, Bo Y, Li-Juan Y, Sheng-Jiao Y, Hong-Bin Z, Chen Q, Jun L, 2012. *Carbohydrate Polymers* 89, p.89- 97.
- [30] Zhong L, Rong C, Hui L, Yeli H, Bo C, Guolin Z, 2009. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 63, p. 295-300.
- [31] Ohashi M, Kasatani K, Shinohara H, Sato H J, 1990. *Am. Chem. Soc.*, 112, p. 5824.
- [32] Jimenez V, Alderete J B, 2005. *Tetrahedron*. 61, p. 5449.

- [33]Khalidoun A , Al-Souód, 2006. J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem. 54,p.123-127.
- [34]Djemil R , Thèse de doctorat, 2012. Université 08 Mai 1945 Guelma.
- [35]Peterson Z D, Lee M L, Graves S W, 2004. J. Chromatogr. B, 810, p.101.
- [36]li X S,Liu L, Mu T W, Guo Q X,Manatsh, 2000.Chem. 131,p.849.
- [37]Attoui Yahia O, Khatmi D E, 2009.J. Mol. Struct. THEOCHEM, 912, p.38.
- [38]Madi F, Khatmi D,Dhaoui N,Bouzitouna A,Abdaoui M,Boucekkine A C R , 2009. Chimie. 12,p.1305.
- [39]Syed Mashhood A , Fahmeena A , Mamoru K , 2006.Bull. Korean Chem. Soc. 27, 9, p.1397-1400.
- [40]Mesplè de J, 2004. Chimie organique: PC, Éditeur Rosny-sous-Bois Bréal impr.
- [41]CHEBIL L, Thèse de doctorat, 2006.Université de France .



**CONCLUSIONS  
ET PERSPECTIVES**

*Vitis vinifera* L



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux était l'étude de l'encapsulation dans la cavité des cyclodextrines du resvératrol et du picéatannol isolés à partir des sarments de vigne *Vitis vinifera*, en vue d'améliorer les propriétés de ces molécules, en l'occurrence l'hydrosolubilité et la biodisponibilité, qui sont indispensables pour que ces composés puissent être utilisés comme nutraceutiques ou pharmaceutiques.

Nous avons procédé à l'étude d'abord à l'état de solution, qui a l'avantage de n'exiger que des quantités faibles des molécules hôte et invitée. En solution, la complexation a été suivie par HPLC. Les conclusions suivantes ont pu être tirées :

- Dans l'intervalle des concentrations étudiées (0-4 mM), lorsque la concentration de CDs augmente, le temps de rétention de l'invité diminue, ce qui indique une amélioration de la solubilité en raison de la formation du complexe d'inclusion.
- Les constantes de stabilité et les paramètres thermodynamiques ont été déterminés par HPLC et dépendent de la nature de la molécule invitée.
- Les constantes de formation apparentes ( $K_F$ ) pour le complexe picéatannol/ CDs dépendent fortement de la concentration du méthanol dans la phase mobile et de la température (même remarque concernant le resvératrol).
- L'étude des complexes invités/CDs par RP-HPLC, nécessite une phase moins polaire que l'eau (par exemple des mélanges méthanol-eau) afin d'atteindre un temps de rétention raisonnable.



- Le méthanol devient très compétitif avec l'invité pour l'entrée de la cavité des CDs à partir d'une composition contenant un % élevé de solvant organique (MeOH) et ceci malgré la faible valeur de la constante d'association MeOH/ $\beta$ -CD.
- La stœchiométrie des complexes picéatannol/CDs et resvératrol/CDs est 1:1 pour toutes les conditions expérimentales testées.
- Les paramètres thermodynamiques indiquent que la complexation est un processus exothermique, spontané et accompagné d'une diminution des degrés de liberté du picéatannol complexé par rapport au picéatannol libre (même remarque concernant le resvératrol).

Mise en évidence à l'état de solution, la formation des complexes picéatannol/ $\beta$ -CD et picéatannol/HP- $\beta$ -CD a ensuite été conduite à l'état solide par la méthode de Coprécipitation. Un cristal blanc a été obtenu. L'analyse par les méthodes spectroscopiques usuelles RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et MS-ESI-TOF a quant à elle, permis de tirer les conclusions suivantes:

- En RMN du proton, les signaux correspondants aux protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> positionnés à l'intérieur de la cavité de la CD ont été plus blindés vers les champs forts pour le complexe PIC/ $\beta$ -CD comparés à ceux de la  $\beta$ -CD libre, ceci est dû aux interactions ayant eu lieu entre l'invité et l'hôte, donnant une preuve de la formation du complexe.
- Le blindage de l'ensemble des signaux  $^1\text{H}$  RMN du picéatannol, qui était mieux visualisé pour le complexe PIC/HP- $\beta$ -CD, montre que la complexation

est un processus dynamique dans lequel il existe un échange rapide entre le picéatannol libre et complexé.

- Le déplacement plus ou moins important de tous les signaux de la cyclodextrine vers les champs forts indique que la force motrice de l'inclusion est principalement du type hydrophobe.
- L'analyse des spectres de masse des deux complexes PIC/ $\beta$ -CD et PIC/HP- $\beta$ -CD, montre des pics  $m/z$  caractéristiques du picéatannol et d'autres pics proches de  $[M+\beta\text{-CD}]$  et  $[M+\text{HP-}\beta\text{-CD}]$ , où M est la masse moléculaire du picéatannol.

Comme perspective, nous envisageons de reconduire l'analyse par spectrométrie de masse pour essayer d'obtenir de meilleures fragmentations visualisant exactement les pics moléculaires du complexe et ceci peut être obtenu en opérant à des voltages plus doux ou en adoptant d'autres modes d'ionisation.

Pour étudier le mécanisme de complexation, la stabilité du complexe formée, et prédire les différentes forces motrices impliquées lors de la formation de ces complexes d'inclusion, une étude théorique a été entamée dans le vide. Les deux orientations prenant en compte les deux faces du picéatannol ont été prises en compte et testées séparément et les déductions suivantes ont pu être faites :

- Les calculs par la méthode PM3 pour la structure thermodynamiquement la plus favorable du complexe, ont montré la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire localisée sur le côté le plus large du cône de la  $\beta$ -CD.

- L'influence de différentes propriétés électroniques et stériques du picéatannol et de son complexe d'inclusion sur la stabilité de ce dernier a été examinée par régression linéaire. Une bonne corrélation a été trouvée entre l'énergie de complexation et les énergies des orbitales frontières HOMO et LUMO.
- Les valeurs négatives des énergies de liaison prouvent que les complexes d'inclusion formés, selon les deux orientations, sont thermodynamiquement stables.
- Considérant l'écart énergétique faible (-0.9 Kcal/mol) entre les deux orientations, il n'est pas évident de déterminer la nature des forces motrices conduisant à l'orientation favorable.
- Le calcul des énergies de liaison, de complexation PIC / $\beta$ -CD, de déformation de la  $\beta$ -CD ( $DEF_{\beta\text{-CD}}$ ) et du PIC ( $DEF_{\text{PIC}}$ ) à l'état libre a permis de distinguer entre les deux orientations et a mené à conclure que l'orientation où le picéatannol pénètre la cavité de la CD par le cycle portant les hydroxyles aux deux positions 3 et 5 (cycle A) est la plus stable quoique l'écart énergétique entre les deux positions n'est que de 5 Kcal/mol.

Comme perspective, les calculs pourraient être refaits dans le même mélange de solvants (MeOH/H<sub>2</sub>O) que celui utilisé pour l'étude expérimentale en solution pour parvenir à une corrélation entre les deux études et arriver à une conclusion finale permettant de trancher définitivement sur le mécanisme de complexation du PIC avec la  $\beta$ -CD.

# **Titre : Isolement de polyphénols à partir des sarments de vigne *Vitis vinifera* L. et étude de leur stabilité par complexation avec les beta-cyclodextrines native et modifiée**

**Soutenu le** : 18/12/2013

## **Résumé** :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'extraction, et la purification des polyphénols à partir des sarments de la vigne (*Vitis vinifera* L.) par les techniques usuelles de chromatographie. L'élucidation structurale a été principalement accomplie par Résonance Magnétique Nucléaire du proton et par spectrométrie de masse. Deux polyphénols appartenant à la classe des stilbènes ont été identifiés, ce sont le resvératrol, et le picéatannol.

Ces molécules sont caractérisées par leurs faibles hydrosolubilités, stabilité et biodisponibilité, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de leur complexation par la bêta-cyclodextrine native ( $\beta$ -CD) et l'hydroxypropyl  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD). L'étude de la complexation du picéatannol et du resvératrol en présence de la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD par RP-HPLC, en solution aqueuse a mené à la corrélation négative entre le temps de rétention et la concentration des cyclodextrines. Dans l'intervalle de concentration étudiée (0-4 mM), lorsque la concentration de la  $\beta$ -CD ou de l'HP- $\beta$ -CD augmente, le temps de rétention de l'invité diminue, ce qui indique une amélioration de la solubilité en raison de la formation du complexe d'inclusion. Les constantes de formation (KF) dépendent de la nature de la molécule invitée, et varie considérablement avec et la concentration du méthanol dans la phase mobile et la température. La stœchiométrie des complexes était 1:1 pour tous les complexes étudiée, dans toutes les conditions physico-chimiques établies.

Ensuite, Les complexes d'inclusion à l'état solide PIC/  $\beta$ -CD et PIC/HP-  $\beta$ -CD ont été préparés par la méthode de Co-précipitation. Les méthodes spectroscopiques  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN et ESI-MS ont été mises à profit pour établir les caractéristiques structurales propres à ces complexes d'inclusion.

Enfin, une étude théorique par l'application des techniques de la modélisation moléculaire a été conduite en vue de mieux comprendre le processus d'inclusion du PIC/  $\beta$ -CD. En plus des minimas énergétiques, le calcul des énergies de liaison, de complexation, de déformation de la  $\beta$ -CD et du PIC à l'état libre a permis de distinguer entre les deux orientations et a mené à conclure que l'orientation où le picéatannol pénètre la cavité de la CD par le cycle A est la plus stable.

**Mots clés** : Stilbènes, complexe d'inclusion,  $\beta$ -cyclodextrine, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine, HPLC, RMN, ESI-MS, stabilité, modélisation moléculaire.