

**Université des Sciences et Technologies de Lille 1**

UFR de Chimie

**THESE**

Pour l'obtention du grade de Docteur en chimie

Spécialité: Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée et Soutenue devant la commission d'examen par

**Youssef BAKKOUR**

Le 11 juillet 2005



**Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées**

Directeurs de thèse: Gaston Vermeersch et Nathalie Azaroual

**Jury**

M <sup>me</sup> M. Bacquet, Professeur, Université de Lille 1	Présidente
Mr. E. Monflier, Professeur, Université d'Artois	Rapporteur
Mr. B. Perly, Directeur de Recherche, CEA	Rapporteur
Mr. B. Martel, Professeur, Université de Lille 1	Examineur
M <sup>me</sup> N. Azaroual, Professeur, Université de Lille 2	Examineur
Mr. G. Vermeersch, Professeur, Université de Lille 2	Examineur

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I .....</b>	<b>4</b>
<b>    GÉNÉRALITÉS SUR LES CYCLODEXTRINES ET LES MÉTHODES UTILISÉES     POUR ÉTUDIER CES MOLÉCULES.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>1. STRUCTURE DES CYCLODEXTRINES.....</b>	<b>5</b>
<b>2. PROPRIÉTÉS COMPLEXANTES DES CDS.....</b>	<b>8</b>
2. 1. Structure du complexe.....	9
2. 2. Effets du complexe.....	10
<b>3. APPLICATIONS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Domaine pharmaceutique .....	11
3. 2. Environnement.....	12
3. 3. Catalyse .....	13
3. 4. Analyse .....	13
3. 5. Domaine alimentaire .....	14
3. 6. Cosmétologie .....	14
3. 7. Textile .....	14
<b>4. ETUDE DES COMPLEXES D'INCLUSION .....</b>	<b>15</b>
4. 1. Détermination de stœchiométrie (méthode de Job).....	15
4. 2. Détermination de la constante d'association.....	18
4. 2. 1. Les différentes approches de Benesi – Hildebrand .....	18
4. 2. 2. Mesure de la solubilité (diagramme de solubilité).....	22
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>25</b>
<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>28</b>
<b>OUTILS RMN NÉCESSAIRES À L'ÉTUDE DES COMPLEXES D'INCLUSION.....</b>	<b>28</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>29</b>
<b>1. LES PARAMÈTRES DE BASE DE LA RMN EN UNE DIMENSION .....</b>	<b>29</b>
1.1. Le déplacement chimique .....	29
1.2. Intégration .....	30
1.3. Couplage scalaire .....	30
<b>2. LA RMN BIDIMENSIONNELLE (2D).....</b>	<b>31</b>
2.1. RMN homonucléaire .....	31
2.2. RMN hétéronucléaire.....	32
<b>3. DOSY (DIFFUSION ORDERED SPECTROSCOPY).....</b>	<b>34</b>
3. 1. Principe.....	34
3.2. Mise au point de la séquence.....	36
<b>4. LA HAUTE RÉOLUTION EN ROTATION À L'ANGLE MAGIQUE (HR-MAS).37</b>	
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE III.....</b>	<b>40</b>
<b>ETUDES STRUCTURALES ET CAPACITÉ D'INCLUSION DES CYCLODEXTRINES .....</b>	<b>40</b>
<b>1.ETUDES STRUCTURALES DES DIFFÉRENTES CYCLODEXTRINES:.....</b>	<b>41</b>

1. 1. Etude des CD natives :.....	41
1.2. Etude d'une cyclodextrine modifiée : le CRYSMEB .....	42
<b>2. COMPLEXATION DE LA DOXYCYCLINE HYDROCHLORATE AVEC LES <math>\beta</math>- ET <math>\gamma</math>-CYCLODEXTRINES ET LE CRYSMEB :.....</b>	<b>44</b>
2.1. Etudes structurales de la doxycycline :.....	45
2. 2. Détermination de la stœchiométrie du complexe (méthode de Job).....	46
2. 3. Détermination de la constante d'association ( $K_a$ ) :.....	49
2. 3. 1. Méthode de Scott :.....	49
2. 3. 2. Mesure des coefficients de diffusion (DOSY).....	51
2. 4. Etude de la géométrie du complexe par ROESY :.....	54
<b>3. COMPLEXATION DE LA JASMONE ET DU CITRONELLOL DANS LES <math>\alpha</math> ET <math>\beta</math>- CYCLODEXTRINES NATIVES :.....</b>	<b>56</b>
3. 1. Etude RMN des produits purs :.....	56
3.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe .....	57
3. 3. Détermination de la constante d'association ( $K_a$ ).....	60
3. 3. 1. Méthode de Scott.....	60
3. 3. 1. 1. Inclusion de la jasmone avec les $\alpha$ et $\beta$ CD.....	60
3. 3. 1. 2. Inclusion du citronellol avec les $\alpha$ et $\beta$ CD.....	62
3. 3. 2. Mesure des coefficients de diffusion (DOSY):.....	64
3.4. Etude de la géométrie des complexes par ROESY.....	65
<b>4. COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS :.....</b>	<b>69</b>
<b>5. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA STABILITÉ DU COMPLEXE D'INCLUSION:.....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSION.....</b>	<b>71</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>72</b>
<b>CHAPITRE IV.....</b>	<b>73</b>
<b>ETUDES DES POLYMÈRES DE CYCLODEXTRINES SOLUBLES.....</b>	<b>73</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>73</b>
<b>1. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DES POLYMÈRES DE CYCLODEXTRINE:.....</b>	<b>75</b>
<b>2. ETUDES RMN DE DIFFÉRENTS POLYMÈRES DE CYCLODEXTRINES .....</b>	<b>76</b>
2. 1. Détermination de la structure des polymères par RMN (1D et 2D) .....	76
2. 2. Détermination du taux de réticulation (Tr) du polymère et de la quantité de CD dans le polymère.....	80
<b>3. ETUDES DES COMPLEXES D'INCLUSION AVEC LES POLYMÈRES DE CYCLODEXTRINES.....</b>	<b>81</b>
3. 1. Mise en évidence des complexes d'inclusion par ROESY.....	82
3.2. Détermination de la constante d'association par DOSY.....	83
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>86</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>87</b>
<b>CHAPITRE V .....</b>	<b>88</b>
<b>ETUDE RMN DES TEXTILES IMPRÉGNÉS .....</b>	<b>88</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>88</b>
<b>1. ETUDE DES POLYMÈRES DE CYCLODEXTRINES INSOLUBLES (POLYCDINS) :.....</b>	<b>90</b>
<b>2. ETUDES DES CYCLODEXTRINES GREFFÉES SUR LES TEXTILES.....</b>	<b>93</b>

<b>3. CONCLUSION :</b> .....	<b>97</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>99</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>102</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>107</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>110</b>
<b>.....</b>	<b>112</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>112</b>
1. Attribution des spectres RMN des différentes molécules étudiées.....	113
1. 1. Doxycycline hyclate (DOX) (dans D <sub>2</sub> O):.....	113
1. 2. Jasmone (dans l'acétone – d <sub>6</sub> ):.....	115
1. 3. Citronellol (dans l'acétone – d <sub>6</sub> ):.....	115
1.4. $\alpha$ CD native (dans D <sub>2</sub> O):.....	116
1. 5. $\gamma$ CD native (dans D <sub>2</sub> O):.....	116
2. Méthode de Job.....	117
2. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :.....	117
2. 2. Complexe CRYSMEB – DOX : .....	117
2. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :.....	118
2.4. Complexe $\alpha$ CD – Citronellol :.....	119
2. 5. Complexe $\beta$ CD – Citronellol : .....	120
3. Méthode de Scott.....	121
3. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :.....	121
3. 2. Complexe CRYSMEB – DOX :.....	122
3. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :.....	123
3. 4. Complexe $\alpha$ CD – citronellol :.....	123
4. Méthode DOSY.....	124
4. 1. Complexe CRYSMEB – DOX :.....	124
4. 2. Complexe $\alpha$ CD – jasmone : .....	124
4. 3. Complexe $\alpha$ CD – citronellol :.....	124
4. 4. Complexe $\beta$ CD – citronellol :.....	125
4. 5. Complexe poly $\alpha$ CD – citronellol :.....	125
4. 6. Complexe poly $\alpha$ CD – jasmone:.....	125
4. 7. Complexe PolyCRYSMEB – DOX :.....	125
5. ROESY 2D :.....	126
5. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :.....	126
5. 2. Complexe CRYSMEB – DOX :.....	127
5. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :.....	127
5. 4. Complexe $\alpha$ CD – citronellol :.....	127
5. 5. Complexe polyCRYSMEB – DOX :.....	128
5. 6. Complexe Poly $\alpha$ CD – citronellol .....	128

# **Introduction générale**

Les cyclodextrines (CDs) sont très utilisées pour leur capacité de complexation d'une très large gamme de composés organiques. Ainsi, on trouve dans la littérature une multitude d'applications industrielles utilisant les propriétés des complexes d'inclusion telles que : solubilisation, protection physique et chimique, réduction de la volatilité etc.....

La réversibilité des complexes hôte – invité offre aussi la possibilité d'exploiter la notion de libération contrôlée du substrat : d'où le phénomène d'effet retard exploité entre autres, dans le domaine pharmaceutique. Ce concept peut aussi être appliqué à partir de matériaux fonctionnalisés par des cyclodextrines par exemples des textiles, basé sur le principe de greffage de CD sur un support solide, destiné à jouer un rôle dans la libération contrôlée, homogène et prolongée d'antibiotiques initialement immobilisés par complexation dans des cyclodextrines.

Mais, les CDs natives ont des solubilités très limitées, ce qui pose un problème pour leur utilisation dans l'industrie. Les chimistes ont essayé de résoudre ce problème en polymérisant la cyclodextrine native en présence d'un agent réticulant afin d'obtenir des polymères plus solubles que les CDs natives.

Le Laboratoire du Professeur Morcellet (Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire « USTL ») possède une vaste expérience dans le domaine de la synthèse des cyclodextrines polymérisées et du greffage des CDs sur fibres textiles naturelles et synthétiques. L'objectif est de mettre en évidence que ces cyclodextrines polymérisées et greffées sur des textiles possèdent toujours la capacité d'inclure des molécules dans leur cavité, ceci en utilisant la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et les larges possibilités qu'elle offre pour étudier ces différentes formes de cyclodextrines. Notre approche de ce problème a été progressive : lors d'une première étude, nous avons travaillé à partir de CD native et de différents modèles de molécules à inclure (Doxycycline, jasmone, et citronellol) pour identifier le type de complexe et leur stabilité. L'étude de ces complexes a été réalisée par deux méthodes RMN différentes, l'une classique basée sur les variations de déplacements chimiques et la deuxième basée sur la mesure des coefficients de diffusion. Les résultats obtenus par ces deux approches ont été comparés et discutés.

Ensuite, nous avons étudié ces mêmes molécules mais en présence de CD polymérisée, par la mesure des coefficients de diffusion. Cette méthode est plus adaptée dans le cas des polymères où les raies RMN sont élargies.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux cyclodextrines polymérisées sur des textiles. Etant en milieu hétérogène, nous n'avons pas pu travailler en RMN du liquide et nous avons essayé d'étudier ces nouveaux supports de CD greffées sur textiles par la technique HR-MAS.

Ce travail se décomposera en cinq chapitres :

Dans le premier chapitre, nous présentons les cyclodextrines, leurs domaines d'applications et les différentes méthodes décrites dans la littérature pour étudier leur capacité d'inclusion.

Pour nos études, nous nous sommes intéressés à la Résonance Magnétique Nucléaire, dont les paramètres de bases et les principales expériences sont décrits dans le chapitre 2, avec deux développements plus récents de la RMN, le DOSY et la HR-MAS.

Les trois derniers chapitres correspondent aux travaux personnels. Dans le troisième chapitre, nous avons abordé l'étude structurale par RMN des cyclodextrines natives et de leur capacité à inclure des molécules (Doxycycline, jasmone et citronellol). Les constantes d'association des différents complexes d'inclusion ont été déterminées par deux méthodes RMN différentes : la méthode de Scott qui repose sur les variations de déplacement chimique et celle du DOSY qui repose sur la détermination de coefficient de diffusion.

Le quatrième chapitre est consacré aux polymères de cyclodextrines et à leurs complexes d'inclusion étudiés par RMN.

Après avoir étudié par RMN du liquide les polymères de cyclodextrines solubles en milieu aqueux, nous nous sommes intéressés aux polymères de cyclodextrines greffées sur des textiles en utilisant la technique HR-MAS. Le but général de ce travail est de montrer comment, par ses multiples aspects, la RMN permet de mieux appréhender les caractéristiques aussi bien structurales que dynamiques (coefficient de diffusion) de molécules complexées et leurs interactions. La comparaison des diverses méthodes RMN mises en œuvre, aussi bien en une que deux dimensions, permet de définir des stratégies efficaces pour traiter les problèmes rencontrés dans le vaste domaine des cyclodextrines et leurs complexes d'inclusion.

# **Chapitre I**

## **Généralités sur les cyclodextrines et les méthodes utilisées pour étudier ces molécules**



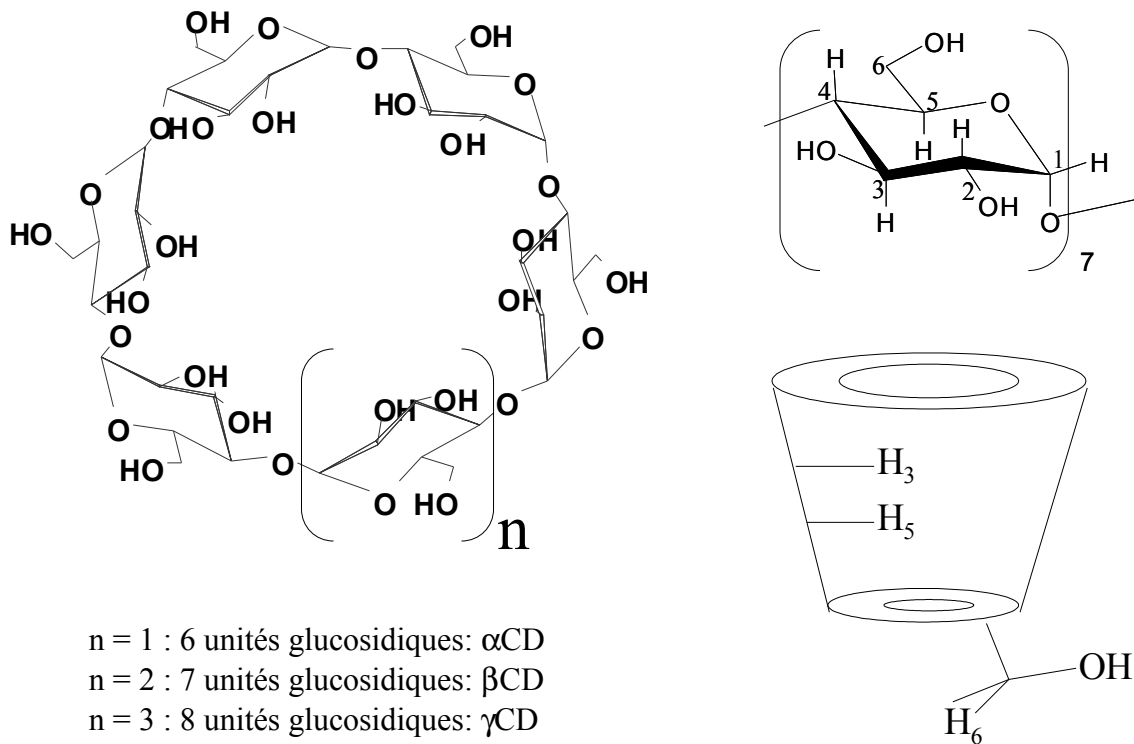
## Introduction

Du Big bang à l'homme, des particules élémentaires au vivant, l'univers tel que nous le percevons est sous – tendu dans son ensemble par les lois qui régissent la matière. Particules subatomiques s'agrégeant en atomes, atomes formant des molécules, molécules se rassemblant en constructions supramoléculaires, puis en cellules, et enfin en organismes vivants : telle est la longue chaîne de l'élémentaire au complexe que nous découvrons peu à peu.

La chimie moléculaire a commencé avec la synthèse de l'urée par Woehler en 1828. Cette chimie repose en quelque sorte sur les liaisons fortes, appelées "covalentes", qui connectent entre eux les atomes formant des molécules. Ainsi, au-delà de la chimie moléculaire, existe-t-il un domaine appelé chimie supramoléculaire<sup>1</sup> avec des associations de deux ou plusieurs espèces chimiques, des complexes et des liaisons intermoléculaires. Ces molécules sont capables de former des complexes moléculaires. Parmi les molécules qui peuvent jouer ces rôles, on peut citer les éthers couronnes, les clathrates, les zéolithes, les porphyrines, les cryptates, les cyclophanes et enfin, celles qui feront l'objet de notre étude les cyclodextrines.

### 1. Structure des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques, issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, constitués par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Ces molécules ont une forme torique tronconique<sup>2</sup>. De façon très schématique, on peut représenter ces composés sous forme de godet, d'abat-jour (figure 1). Grâce à la conformation  $C_1$  de l'unité glucopyranose, tous les groupes hydroxyles secondaires sont situés sur un des deux bords du godet, tandis que tous les hydroxyles primaires sont sur l'autre bord. En réalité, le godet est un cylindre ou plus exactement un cylindre conique.



**Figure 1 : Représentation schématique des CDs.**

Les paires d'électrons non liés des ponts glucosidiques de l'oxygène sont orientées sur l'intérieur de la cavité, produisant une densité électronique élevée ce qui permet aux cyclodextrines d'avoir des propriétés basiques (selon Lewis). Dans la molécule cyclodextrine, une ceinture secondaire complète est constituée par ces liaisons d'hydrogène, de sorte que la  $\beta$ CD aura une structure plutôt rigide et ceci explique probablement que la  $\beta$ CD a la plus basse solubilité de toutes les CDs.

Les protons  $H_3$  et  $H_5$  sont situés à l'intérieur du cône, alors que les protons  $H_1$ ,  $H_2$ , et  $H_4$  sont dirigés vers l'extérieur. Grâce à cette structure amphiphile, la cyclodextrine est soluble dans l'eau et possède une cavité interne hydrophobe<sup>3</sup>. Le tableau 1 donne les dimensions et quelques caractéristiques des cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>4</sup>.

Caractéristiques	$\alpha$ CD	$\beta$ CD	$\gamma$ CD
------------------	-------------	------------	-------------

Nombre d'unités glucose	6	7	8
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	4,7 – 5,2	6,0 – 6,4	7,5 – 8,3
Hauteur du tore (Å)	7,9 – 8,0	7,9 – 8,0	7,9 – 8,0
Diamètre de la périphérie (Å)	14,2 – 15,0	15,0 – 15,8	17,1 – 17,9
Volume approximatif de la cavité (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Solubilité dans l'eau à 25 °C (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité	6 – 7,6	11 - 12	13,3 - 17

**Tableau 1** : Caractéristiques des 3 principales CDs.

Les cyclodextrines ne sont pas toxiques, elles s'hydrolysent lentement dans l'organisme pour libérer des unités glucoses. L'administration orale de cyclodextrine à des rats ou à des chiens n'est pas toxique si elle ne dépasse pas 3 % de la ration alimentaire journalière. Chez l'homme, la prise journalière ne doit pas excéder 2 g. La propriété la plus remarquable des cyclodextrines découlant de la structure macrocyclique et de la distribution spécifique des différents groupements fonctionnels le long des surfaces interne (hydrophobe) et externe (hydrophile), est qu'elles peuvent se combiner avec des molécules très diverses, pour donner des complexes d'inclusion de type hôte – invité "host-guest".

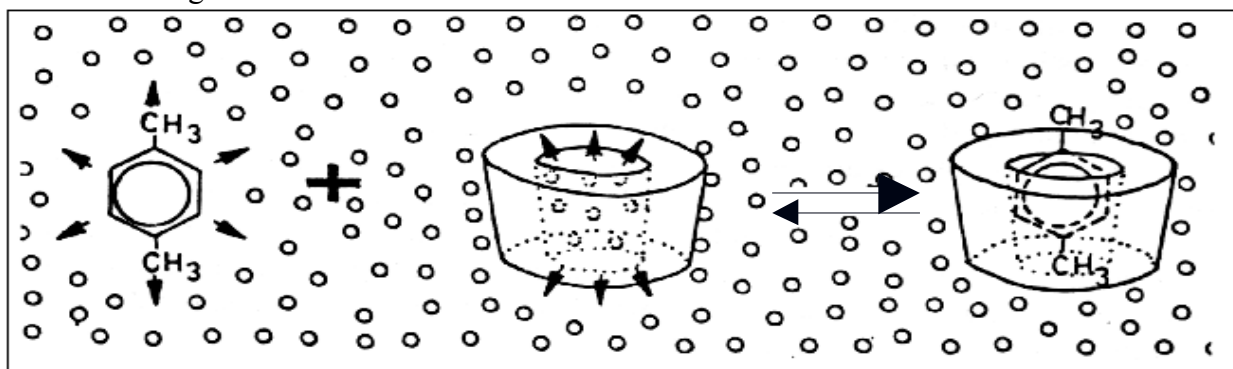
## 2. Propriétés complexantes des CDs

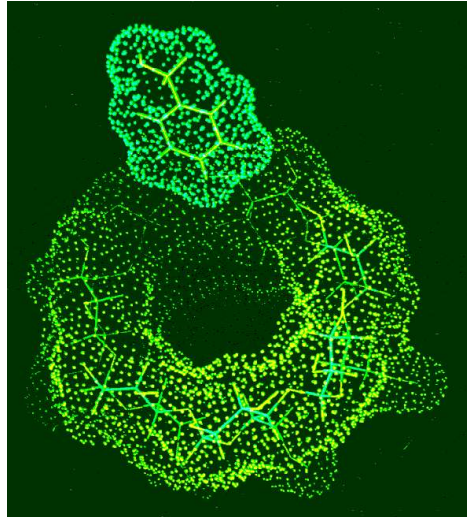
Les cyclodextrines peuvent être considérées comme des capsules vides de taille variable (tableau 1) pouvant accueillir des molécules. Le terme "composé d'inclusion" a été présenté en 1950<sup>5</sup>, il y a encore quelques autres noms utilisés dans la littérature, telles que l'additif, le clathrate, le cryptate. Lors de la formation du complexe d'inclusion, il n'y a aucune liaison covalente qui se forme.

L'équilibre entre les constituants du complexe en solution est caractérisé par la constante d'équilibre (entre les deux phénomènes association – dissociation). La détermination de cette constante d'équilibre fait l'objet de nombreuses publications dans la littérature car elle donne une idée sur la stabilité du complexe.

Les interactions mises en œuvre entre l'hôte et l'invité peuvent être de différentes natures, comme des interactions coulombiennes, dipolaires, de Van der Waals ou de liaison hydrogène<sup>6</sup>. Par contre si l'invité interagit avec l'hôte à l'extérieur de la cavité, on parle plutôt de complexe d'association. Les cyclodextrines sont des molécules hôtes, appelées aussi molécules "cages" ou molécules "refuges", elles peuvent accueillir partiellement ou entièrement un très grand nombre de substrats.

Les molécules complexées sont très variées, allant des réactifs polaires comme les acides ou les amines, jusqu'aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, en passant par les ions et les halogénures.



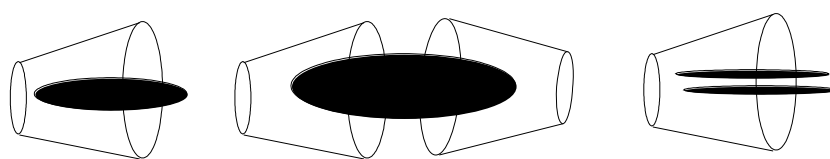


**Figure 2** : Schéma de l'inclusion d'une molécule dans la cavité hydrophobe de cyclodextrine (Frömming and Szejtli: Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer Acad. Press, Dordrecht, 1994).

## 2. 1. Structure du complexe

Le mécanisme de formation du complexe n'est régi essentiellement que par un facteur géométrique : le substrat doit avoir une taille compatible avec la cavité de la cyclodextrine. En effet, des molécules trop grosses pour pénétrer même partiellement, dans la cavité de cyclodextrine ne pourront pas former de complexes stables. Il en est de même pour des molécules trop petites, qui pourront pénétrer dans la cavité, mais les interactions entre ces dernières et la cavité seront trop faibles pour les maintenir à l'intérieur et par conséquent elles en sortiront très rapidement. Meier et al<sup>7</sup> ont étudié l'influence de la taille de la cavité des CDs ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) sur l'inclusion de l'anion decanoate ( $C_{10}$ ), et ils ont constaté que la constante d'association du complexe  $C_{10}$ - $\beta$ CD est 10 fois plus grande que celle de  $C_{10}$ - $\gamma$ CD. Il faut donc une certaine proximité de la molécule invitée pour former un complexe d'inclusion stable avec la cavité de la molécule hôte.

A titre d'exemple, le naphtalène est trop volumineux pour l' $\alpha$ -cyclodextrine, mais forme un complexe stable avec la  $\beta$ -cyclodextrine. L'anthracène ne peut pénétrer que dans la  $\gamma$ -cyclodextrine. Les complexes d'inclusion les plus fréquents sont de type 1:1. C'est à dire qu'à une molécule de cyclodextrine correspond une molécule invitée. Si une molécule est trop volumineuse pour s'infiltrer entièrement au sein de la cavité, son autre extrémité laissée libre, peut alors à son tour être encapsulée par une autre molécule de cyclodextrine. On aboutit dans ce cas à la formation d'un complexe de type 2:1<sup>8</sup>. La littérature est riche en exemples de complexes de type 2:2<sup>9</sup>, 3:1<sup>10</sup>, 3:2<sup>11</sup> ou 4:5<sup>12</sup>. Il est également possible que ce soit une même molécule de cyclodextrine qui interagisse avec plusieurs molécules pour former des complexes 1:2<sup>13</sup> ou 1:3<sup>14</sup>.



**Figure 3** : Schéma de complexe 1 : 1 ; 2 : 1 ; 1 : 2.

## 2. 2. Effets du complexe

La complexation d'une molécule peut influencer sur ses propriétés. Tout d'abord au niveau de sa solubilité, la formation d'un complexe permet de solubiliser certaines molécules en milieu aqueux. Pour des molécules instables, la complexation de la molécule invitée permet de la protéger et la stabiliser. Mais, on peut observer aussi le phénomène inverse où la CD se comporte comme une enzyme et va accélérer diverses réactions avec la molécule complexée. Les changements des propriétés de la molécule complexée vont avoir pour conséquence de modifier le comportement de celle-ci lors des différentes études analytiques : maximum d'absorption en spectre UV, mobilité en chromatographie, déplacement chimique en RMN, etc..... Ces différences de comportement permettront de mettre en évidence ces complexes et de les étudier. L'invité initialement hydrophobe (libre : sans complexation), devient hydrophile (sous la forme complexée), donc sa mobilité chromatographique est également modifiée. Ces changements résultent de la modification de l'environnement de la molécule incluse. En effet, la molécule invitée passe d'un environnement polaire (eau, DMSO, DMF...) à un environnement hydrophobe (intérieur de la cavité).

### **3. Applications**

Grâce à leurs propriétés, les cyclodextrines sont impliquées dans différents domaines tels que les domaines pharmaceutique, agrochimique, analytique, catalytique et alimentaire.

#### **3.1. Domaine pharmaceutique**

C'est en 1953, que l'on découvre le potentiel des cyclodextrines dans le domaine pharmaceutique. Les méthodes classiques d'amélioration de la solubilité des médicaments faisaient appel à l'emploi de co-solvants organiques (éthanol, propylène glycol) et de surfactants non ioniques (Tween 80, Cremophor), malheureusement ces produits induisent des irritations locales lors de l'administration par voie intraveineuse et de plus ils peuvent être toxiques. Une nouvelle approche par l'utilisation d'émulsions et de liposomes s'est révélée concluante, mais les problèmes techniques liés à la préparation de ces microparticules, à grande échelle, ont mis un frein. Pour surmonter ces obstacles, les recherches se sont tournées vers les cyclodextrines<sup>15-18</sup> et plus particulièrement vers les dérivés ou les polymères, de meilleure solubilité que les CD natives.

Les cyclodextrines agissent en tant que système de transport des médicaments en raison de leur capacité de changer les propriétés des molécules invitées par la formation des complexes d'inclusion. Les cyclodextrines ont également un rôle essentiel à jouer dans la formulation des médicaments utilisés pour traiter le cancer. Bekers<sup>19</sup> a étudié l'effet des cyclodextrines sur la stabilité chimique du mitomycine C, un médicament anticancéreux qui pose des problèmes dermatologiques graves lors de l'injection. Afin d'essayer de réduire la nécrose de peau, la complexation du mitomycine C avec des cyclodextrines a été rapportée par Bhardwaj et al en 2000<sup>20</sup>. Les cyclodextrines peuvent intervenir, encore, dans le stockage, la protection de dégradation et l'absorption du médicament. Elles peuvent encore éliminer ou diminuer l'odeur ou le goût désagréable.

### **3. 2. Environnement**

Les cyclodextrines peuvent jouer un rôle important dans la science environnementale en termes de solubilisation des contaminants organiques, de l'enrichissement et du déplacement des polluants organiques et des métaux lourds du sol, de l'eau et de l'atmosphère<sup>21</sup>. Les cyclodextrines sont également utilisées dans le traitement de l'eau afin d'éliminer les agents contaminant<sup>22</sup>. Les eaux usagées contenant des composés aromatiques inacceptables tels que le phénol, le p-chlorophénol et le benzène, peuvent être débarrassées de ces produits par le traitement avec la  $\beta$ CD<sup>23</sup>. Un rôle important des CDs dans la protection de l'environnement est son utilisation dans la formulation d'insecticide.



### 3. 3. Catalyse

Les cyclodextrines et leurs dérivés sont utilisés dans le domaine de la chimie catalytique. Par exemple, Atwood<sup>24</sup> a expliqué l'utilisation de l' $\alpha$ CD modifiée dans la réduction de porphyrine de Mn (III). Ye et al<sup>25</sup> ont constaté que l'utilisation d'un dérivé de  $\beta$ CD comme catalyseur fait augmenter le taux de conversion d'alcool benzylique en aldéhyde. En raison de leurs effets stériques, les CDs jouent un rôle significatif dans des processus biocatalytiques en augmentant l'énantiosélectivité. Leventis et Silvius<sup>26</sup> ont démontré que les  $\beta$ ,  $\gamma$  – cyclodextrines accélèrent le taux de transfert de cholestérol entre les vésicules de lipide.

### 3. 4. Analyse

En chromatographie, les cyclodextrines sont utilisées intensivement dans les séparations en raison de leur capacité de distinguer entre les isomères de position, les groupes fonctionnels, les homologues et les énantiomères<sup>27</sup>. Cette propriété en fait un des agents les plus utiles pour une large gamme de séparation. Elles sont encore utilisées en tant que ligands chimiquement collés ou absorbés dans la phase stationnaire ou dans la phase mobile<sup>28</sup>. Actuellement, les séparations chirales sont un des domaines les plus importants de l'application de CDs et leurs dérivés<sup>29</sup>.

Des travaux menés en CLHP, à l'aide de phase stationnaire chirale constituée de cyclodextrines (PSC cyclodextrines), concernant la séparation chirale de divers composés azotés, ont été rapportés. Kim<sup>30</sup> a réalisé l'énantioséparation de composés tétrazoles à activité antifongique à l'aide d'une PSC  $\beta$ CD. Les travaux de Furfuta<sup>31</sup> ont montré que la PSC  $\beta$ CD possède un fort pouvoir énantiosélectif envers le diniconazole (tétrazole) et ses dérivés imidazolés (composés à propriétés antifongiques). La littérature rapporte davantage de travaux portant sur la séparation énantiomérique de dérivés imidazolés à l'aide de cyclodextrines en électrophorèse capillaire de zone (CZE). Penn<sup>32</sup> a réalisé l'énantioséparation du tioconazole (antifongique) à l'aide des cyclodextrines hydroxypropylées. Différents composés à activité antiépileptique ou antifongique ont été séparés énantiomériquement par les cyclodextrines natives, hydroxypropylées, diméthylées ou sulfobutyl-éthérées. Les CDs ont été fréquemment utilisées dans l'électrophorèse capillaire<sup>33</sup> et l'électrophorèse sur gel<sup>34</sup>, la chromatographie en phase gazeuse<sup>35</sup>, la chromatographie d'échange ions la chromatographie d'affinité<sup>36</sup> et la séparation sur des membranes<sup>37</sup>.

### **3. 5. Domaine alimentaire**

Les cyclodextrines ont trouvé de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire. Elles forment des complexes d'inclusion avec une variété de molécules comprenant des graisses, des arômes et des colorants. Elles sont utilisées pour supprimer et masquer les composants indésirables et pour relarguer avec le temps les constituants désirés<sup>38</sup>. Les cyclodextrines sont également utilisées pour protéger et faire relarguer les arômes. Les arômes naturels et artificiels sont des huiles ou des liquides volatils, et leur complexation avec des cyclodextrines fournit une alternative prometteuse aux technologies conventionnelles d'encapsulation pour la protection des arômes. Par exemple, la complexation des édulcorants tels que l'aspartame avec la cyclodextrine stabilise et améliore son goût. Elle élimine également le goût amer d'autres édulcorants tels que le stevioside et le rubusoside. Les flavonoïdes et les terpénoïdes sont bons pour la santé en raison de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes mais ils ne peuvent pas être utilisés comme des produits alimentaires à cause de leur faible solubilité et leur goût amer. Sumiyoshi<sup>39</sup> a discuté l'amélioration des propriétés de ces composés par la complexation avec la cyclodextrine.

### **3. 6. Cosmétologie**

Les cyclodextrines sont encore employées dans les industries cosmétiques et parfumeries. Elles sont utilisées pour diminuer la volatilité des parfums et les relarguer instantanément en se reposant sur le phénomène de relargage contrôlé (controlled release). Les principaux avantages des cyclodextrines dans ce secteur sont la stabilisation, le relargage, la protection et la livraison des arômes<sup>40</sup>.

### **3. 7. Textile**

Le finissage de textile est un autre secteur dans lequel les cyclodextrines attirent de plus en plus l'attention. Wacker – Chemie a greffé un dérivé de CD substitué par le monochlorotriazinyl (MCT) sur les textiles. Les cyclodextrines greffées sur les textiles ont pour but d'éliminer ou de masquer les odeurs indésirables par exemple la fumée de cigarette et la sueur. Les cyclodextrines sont également utilisées pour renforcer la prise des colorants par le tissu et par suite de réduire la quantité de colorant perdue lors de lavage<sup>41</sup>.

#### 4. Etude des complexes d'inclusion

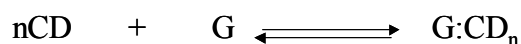
L'étude des propriétés physico-chimiques du complexe d'inclusion constitue une large partie de la chimie organique moderne. La première étape consiste à déterminer la stœchiométrie du complexe formé.

Après avoir déterminé la stœchiométrie du complexe, il faut évaluer la constante d'association qui reflète la force d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule invitée – molécule cage) et permet de connaître la proportion de la molécule complexée. Un certain nombre d'études physico-chimiques décrites dans la littérature pour déterminer la constante d'association reposent sur les techniques suivantes: RMN, spectroscopie UV-visible, électrophorèse capillaire, potentiométrie, fluorimétrie, solubilité, ..etc.

La troisième étape qui consiste à étudier la géométrie du complexe, n'est possible que par RMN et sera développée dans le chapitre 3.

##### 4. 1. Détermination de stœchiométrie (méthode de Job)

La méthode des variations continues ou méthode de Job<sup>42, 43</sup> est utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines. La formation d'un complexe d'inclusion impliquant une molécule du composé à inclure (G) et n cyclodextrines (CD) sera décrite par :



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

$$K_a = \frac{[\text{G : CD}_n]}{[\text{G}][\text{CD}]^n} \quad (1)$$

Avec :  $[\text{G : CD}_n]$  = concentration en complexe

[G] et [CD] concentrations en G et CD libre dans le mélange.

Soient  $[G]_t$  et  $[CD]_t$  les concentrations totales en G et CD dans l'échantillon, on peut écrire les relations suivantes :

$$[G] = [G]_t - [G:CD_n] \quad (2)$$

$$[CD] = [CD]_t - n[G:CD_n] \quad (3)$$

La méthode des variations continues, ou méthode de Job impose 2 conditions :

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

Ceci se traduit par :

$$[G]_t + [CD]_t = M \quad (4)$$

Avec M = la concentration totale de mélange.

$$r = [G]_t / [G]_t + [CD]_t \quad (5)$$

avec r = la proportion molaire de la molécule invitée ( $0 < r < 1$ )

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

$$[G] = rM - [G : CD_n] \quad (6)$$

$$[CD] = M(1 - r) - n [G:CD_n] \quad (7)$$

La concentration en complexe  $[G:CD_n]$  est donc une fonction de r et elle passe par un maximum lorsque la dérivée  $d[G:CD_n]/dr$  est nulle. La dérivation des équations (1), (6) et (7) par rapport à r conduit aux relations suivantes :

$$[CD].d[G]/dr + n.[G].d[CD]/dr = 0 \quad (8)$$

$$d[G]/dr = M \quad (9)$$

$$d[CD] = - M \quad (10)$$

Ces trois équations peuvent être combinées en une seule:

$$[CD] = n[G] \quad (11)$$

En utilisant les équations (6), (7) et (11), on parvient à une solution unique et la concentration maximale en complexe est obtenue pour  $r = 1/(1 + n)$ .

Cette relation ne dépend ni de la constante d'association  $K_a$ , ni de la valeur de la concentration M.

Pour l'étude des complexes d'inclusion, on est en échange rapide par rapport au temps d'observation. On peut écrire la relation suivante :

$$P_{(G)obs.}[G]_t = P_{(G)c.}[G : CD_n] + P_{(G)f.}[G] \quad (12)$$

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

$$\Delta P_{obs} = P_{obs} - P_f$$

$$\Delta P_c = P_c - P_f$$

L'équation (12) devient :

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

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

Cette méthode est appliquée en UV, en fluorescence, en RMN, où le paramètre  $P$  est respectivement l'absorbance, l'intensité de fluorescence ou la variation de déplacement chimique. En RMN, la détermination de  $n$  se fait par l'enregistrement d'une série des spectres  $^1H$  en 1D puis on suit les variations des déplacements chimiques des protons de CD ou de la molécule invitée qui doivent se déplacer avec le changement des concentrations de CD et de G.

Soient :

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

$\delta_c$  = le déplacement chimique de ce même proton dans le mélange G :CD.

$$\Delta \delta_{obs} = \delta_l - \delta_c$$

Alors, en rapportant  $\Delta \delta_{obs} \times [G]_0$  (ou  $[CD]_0$ ) en fonction de  $r$ , on obtient une courbe en forme de cloche centrée sur une valeur  $r_{max}$ .

Avec :

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

$[CD]_0$  = Concentration initiale de la cyclodextrine.

D'après  $r_{max}$ , on peut déterminer  $n$ .

Par exemple, si  $r_{max} = 0.5$

$$r_{\max} = 1/(1+n) = 0.5$$

donc  $n = 1$ .

Donc, on peut dire qu'il y a formation d'un complexe d'inclusion de type 1 :1.

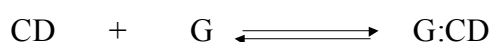
## 4. 2. Détermination de la constante d'association

### 4. 2. 1. Les différentes approches de Benesi – Hildebrand

Dans la littérature, la constante d'association du complexe d'inclusion a été déterminée par différentes méthodes. Dans ce chapitre, nous allons présenter les méthodes les plus utilisées telles que : la mesure de la solubilité, la spectroscopie d'absorption, la fluorimétrie, l'électrophorèse capillaire et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

La plupart des déterminations de constante d'association ( $K_a$ ) sont des méthodes graphiques permettant d'avoir une relation linéaire entre  $P_{\text{obs}}$  et  $K_a$ . Différentes représentations graphiques existent, provenant de la même équation initiale qui a été proposée pour la première fois par Benesi et Hildebrand<sup>44</sup>. Cette approche permet de déterminer graphiquement  $K_a$  dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 :1 et à condition que l'un des deux composés soit en très large excès par rapport à l'autre, c'est-à-dire par exemple  $[G]_t \ll [CD]_t$ , si G est observé.

On peut écrire :



$$K_a = \frac{[G : CD]}{[G][CD]}$$

$$[G] = [G]_t - [G:CD]$$

$$[CD] = [CD]_t - [G:CD]$$

$$[G : CD] = \frac{\Delta P_{(G)\text{obs}}}{\Delta P_{(G)\text{c}}} \cdot [G]_t$$

En combinant ces équations on obtient :

$$\Delta P_{(G)\text{obs}} = \frac{K_a [CD]_t \Delta P_{(G)\text{c}}}{1 + K_a [CD]_t}$$

qui peut aussi s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{\Delta P} = \frac{1}{\Delta P_{(G)c} \cdot K_a \cdot [CD]_t} + \frac{1}{\Delta P_{(G)c}}$$

Si on trace la courbe  $1/\Delta P_{(G)obs}$  en fonction de  $1/[CD]_t$  (souvent appelée courbe double réciproque), on doit obtenir une droite de pente  $1/K_a \cdot \Delta P_{(G)c}$  et d'ordonnée à l'origine  $1/\Delta P_{(G)c}$ .

Il existe aussi d'autres représentations graphiques (y-réciproque et x-réciproque) utilisant les mêmes équations et permettant à partir d'une représentation linéaire d'obtenir  $K_a$  et  $\Delta P_{(G)c}$ . Ces équations sont présentées dans le tableau 2.

Equation	Graphique
<p>Double réciproque :</p> $\frac{1}{\Delta P_{obs}} = \frac{1}{\Delta P_c \cdot K_a \cdot [CD]_t} + \frac{1}{\Delta P_c} = f\left(\frac{1}{[CD]_t}\right)$	
<p>y-réciproque :</p> $\frac{[CD]_t}{\Delta P_{obs}} = \frac{[CD]_t}{\Delta P_c \cdot K_a \cdot [CD]_t} + \frac{[CD]_t}{\Delta P_c} = f\left(\frac{1}{\Delta P_{obs}}\right)$	
<p>x-réciproque :</p> $\frac{\Delta P_{obs}}{[CD]_t} = -K_a \cdot \frac{\Delta P_{obs}}{\Delta P_c} + K_a = f(\Delta P_{obs})$	

**Tableau 2** : Méthodes graphiques, correspondant aux trois équations, permettant l'obtention de la constante d'association  $K_a$ .

Cette détermination de la constante d'association par représentation graphique est appliquée avec différentes techniques. La plus ancienne, utilisée par Benesi-Hildebrand, est la spectroscopie UV-visible. Par cette méthode, le paramètre mesuré est l'absorbance de la molécule invitée seule et en présence de différentes concentrations en CD. La représentation graphique la plus utilisée est la double réciproque avec pour équation :

$$\frac{1}{\Delta A_{obs}} = \frac{1}{\Delta A_c \cdot K_a \cdot [CD]_t} + \frac{1}{\Delta A_c}$$

La spectroscopie UV-visible étant une technique assez sensible, elle permet de travailler dans des gammes de concentrations faibles, ce qui peut être intéressant pour des produits peu solubles. Mais, il faut que la molécule étudiée absorbe à des longueurs d'ondes différentes de

celle des CDs. De plus cette technique ne permet pas de distinguer clairement entre un phénomène d'inclusion ou un autre type d'interaction.

La Fluorimétrie est utilisée pour déterminer la  $K_a$  en se basant sur la mesure de l'intensité de fluorescence de la molécule invitée, sachant que les cyclodextrines ne sont pas fluorescentes. Le traitement double réciproque de l'équation Benesi-Hildebrand<sup>45</sup> est appliqué à la fluorescence pour déterminer la  $K_a$  (le paramètre P est la fluorescence):

$$\frac{1}{\Delta F_{\text{obs}}} = \frac{1}{\Delta F_c \cdot K_a \cdot [\text{CD}]_t} + \frac{1}{\Delta F_c}$$

La Fluorimétrie n'est pas une méthode universelle pour étudier le phénomène de complexation parce que certaines molécules ne sont pas fluorescentes.

Par RMN, on peut s'intéresser à trois types de paramètres différents : le déplacement chimique, le temps de relaxation et le coefficient de diffusion. La plupart des déterminations de constante d'association d'un complexe d'inclusion se font à partir de la mesure des variations de déplacement chimique.

Mathur et al<sup>46</sup>, Hanna et Ashbaugh<sup>47</sup> ont indépendamment appliqué l'équation de Benesi – Hildebrand au paramètre RMN pour obtenir l'équation :

$$\frac{1}{\Delta \delta_{\text{obs}}} = \frac{1}{K_a \Delta \delta_c \cdot [\text{CD}]_t} + \frac{1}{\Delta \delta_c}$$

Foster et Fyfe<sup>48</sup> ont proposé l'équation correspondante à la courbe x-réciproque, plus communément appelé courbe de Scatchard :

$$\frac{\Delta \delta_{\text{obs}}}{[\text{CD}]_t} = -K_a \Delta \delta_{\text{obs}} + K_a \Delta \delta_c$$

Et la troisième approche linéaire y-réciproque appliquée aux déplacements chimiques a été introduite par Scott<sup>49</sup> :

$$\frac{[\text{CD}]_t}{\Delta \delta_{\text{obs}}} = \frac{[\text{CD}]_t}{\Delta \delta_c} + \frac{1}{K_a \Delta \delta_c}$$

Les études RMN pour déterminer la constante d'association s'effectuent le plus souvent à partir des déplacements chimiques. En effet, l'obtention de ce paramètre à partir d'un spectre RMN proton en une dimension est rapide et précise. Dans le cas de complexe, où l'on peut suivre les déplacements chimiques des différents protons, et où ces variations sont importantes, la représentation graphique avec la courbe de Scott est la plus utilisée. Un autre paramètre RMN peut être utilisé pour déterminer la constante d'association, c'est le temps de



relaxation longitudinale ( $T_1$ ). Plusieurs études ont été publiées concernant la détermination de  $K_a$  en se reposant sur les mesures de temps de relaxation. Behr et Lehn<sup>50</sup> ont étudié l'effet de l'encapsulation de m et p-méthylcinammates avec l' $\alpha$ CD sur le temps de relaxation. En se basant sur l'équation de Benesi –Hildebrand, dans ce cas, le paramètre P est la vitesse de relaxation R (avec  $R = 1/T_1$ ) :

$$\frac{1}{\Delta R_{(G)obs}} = \frac{1}{\Delta R_{(G)c} \cdot K_a \cdot [CD]_t} + \frac{1}{\Delta R_{(G)c}}$$

Mais cette méthode présente certains inconvénients du point de vue expérimentale, parce qu'il faut dégazer le tube RMN avant la détermination de  $T_1$  car l'existence de dioxygène dans le milieu influence le temps de relaxation. De plus, si le temps de relaxation est très faible, on ne peut pas l'utiliser pour déterminer la constante d'association du complexe d'inclusion (cas de polymères de cyclodextrines).

Le troisième paramètre auquel on peut s'intéresser pour évaluer l'affinité d'une molécule pour la cavité de la cyclodextrine est le coefficient de diffusion (D) déterminé à partir de la séquence RMN DOSY. L'utilisation beaucoup plus récente du DOSY pour déterminer la  $K_a$  a été rapportée pour le micelle – peptide<sup>51</sup>, où une grande différence entre les coefficients de diffusion des molécules liées et non-liées a été observée. Dans le cas des cyclodextrines et des molécules invitées, cette différence n'est pas aussi importante, mais cette méthode peut néanmoins être appliquée<sup>52 - 54</sup>. Le coefficient de diffusion observé de la molécule incluse dans la cyclodextrine est alors donné par l'équation suivante :

$$D_{obs} = \rho D_{complexe} + (1 - \rho) D_{libre}$$

Avec :

$\rho$  = la proportion de la molécule complexée.

$D_{obs}$  = le coefficient de diffusion observé de la molécule invitée dans le mélange.

$D_{libre}$  = le coefficient de diffusion de la molécule invitée libre.

$D_{complexe}$  = le coefficient de diffusion de la molécule totalement complexée.

L'avantage de mesurer D par rapport à  $\delta$  est que le coefficient de diffusion du complexe pur n'est pas considéré comme une inconnue. En effet, on peut faire l'approximation que le coefficient de diffusion de la molécule totalement complexée dans la CD sera égal à celui de la CD. La proportion de la molécule complexée peut être calculée à partir des coefficients de diffusion.

$$\rho = \frac{(D_{\text{libre}} - D_{\text{obs}})}{(D_{\text{libre}} - D_{\text{complexe}})}$$

Cette fraction de molécule complexée est définie comme:

$$\rho = \frac{[G : CD]}{[G] + [G : CD]}$$

On peut exprimer  $\rho$  en fonction du  $K_a$  avec:

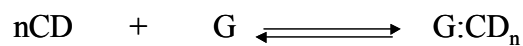
$$\rho = \frac{K_a[G].[CD]}{[G] + [G]K_a[CD]}$$

Ou calculer  $K_a$  en fonction de  $\rho$  :

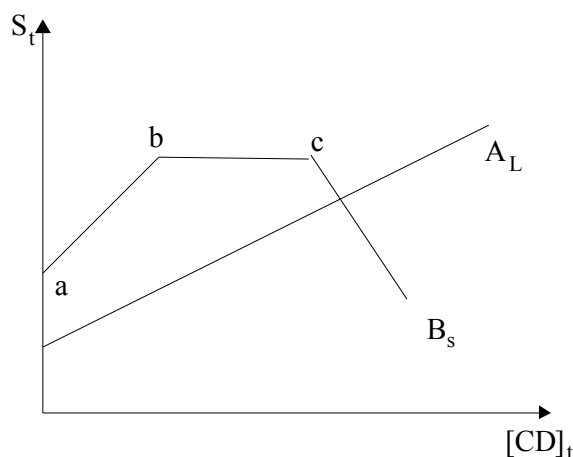
$$K_a = \frac{\rho}{(1 - \rho)([CD]_0 - \rho[G]_0)}$$

#### 4. 2. 2. Mesure de la solubilité (diagramme de solubilité)

La formation de complexe avec la cyclodextrine fait augmenter la solubilité de la molécule incluse (invitée). Ce phénomène peut apporter des informations sur la constante d'association. Le protocole expérimental donne la détermination de la solubilité apparente ( $S_t$ ) de la molécule incluse en fonction de la concentration molaire totale de la cyclodextrine <sup>55</sup>.



Du point de vue expérimental, il faut préparer 10 à 15 ampoules ou fioles dans lesquelles on met des quantités égales de substrat, un volume fixe de solvant et des quantités croissantes de cyclodextrine, la molécule à inclure doit être en excès par rapport à la cyclodextrine. Les solutions sont agitées pendant 24 à 48 heures. Après la séparation de la phase solide de la solution, celle-ci est analysée par HPLC pour déterminer la solubilité  $S_t$ . La plupart des diagrammes de solubilité avec les CD ont les formes représentées sur la figure 4:



**Figure 4:** Diagramme de la solubilité

La ligne marquée  $A_L$  décrit une variation linéaire de  $S_t$  en fonction de  $[CD]_t$ . Le diagramme  $B_s$  se divise en trois parties, la première partie (ab) représente une variation linéaire de  $S_t$  en fonction de  $[CD]_t$ , c'est-à-dire, la solubilité augmente avec l'augmentation de la concentration de cyclodextrine, suivie d'un plateau où  $S_t$  est constante, puis une troisième partie dans laquelle  $S_t$  diminue et l'addition de cyclodextrine entraîne la formation de précipité. On ne peut déterminer la constante d'association du complexe par cette méthode que si la courbe est linéaire. La constante d'association est donnée par l'équation suivante :

$$K_a = \frac{[G : CD_n]}{[G][CD]^n} \quad (4)$$

Avec :

$K_a$  = Constante d'association.

$[G : CD_n]$  = Concentration du complexe à l'équilibre.

$[G]$  = Concentration de substrat à l'équilibre.

$[CD]$  = Concentration du ligand à l'équilibre.

$n$  = Coefficient de stœchiométrie.

Dans le cas où  $n = 1$  (complexe type 1 :1), la constante d'association est déterminée par la combinaison entre ces équations :

$$S_t = [G] + [G:CD] \quad (5)$$

$$[CD]_t = [CD] + [G:CD] \quad (6)$$

$$\text{Avec } [G] = S_0$$

Soit :

$S_t$  = la solubilité totale de la molécule invitée G en présence de cyclodextrine.

$[CD]_t$  = la concentration totale de cyclodextrine.

$S_0$  = la solubilité initiale de la molécule invitée G.

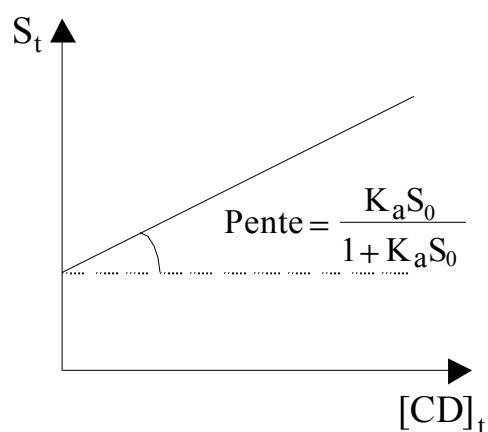
L'équation (5) devient :  $S_t = S_0 + [G : CD]$  (7)

La combinaison entre (4), (5), (7) donne :

$$S_t = S_0 + \frac{K_a S_0 [CD]_t}{1 + K_a S_0} \quad (8)$$

Si on trace  $S_t$  en fonction  $[CD]_t$ , on obtient une droite de pente  $\frac{K_a S_0}{1 + K_a S_0}$  et d'ordonnée

à l'origine  $S_0$  (figure 5) :



**Figure 5:** Courbe de la solubilité  $S_t$  en fonction de la concentration cyclodextrine  $[CD]_t$ .

D'après la pente, on peut déterminer la constante d'association  $K_a$ .

Piel et al<sup>56</sup> ont utilisé cette méthode pour étudier la complexation du miconazole et de la betamethazone avec des cyclodextrines, ils ont obtenu des valeurs comparables à celles qui sont obtenues par RMN.

## Références

1. A- Lehn J-M. *"La chimie supramoléculaire : concepts et perspectives"*, traductions françaises, Ed. Deboeck université, 1997.  
B- Lehn J-M, conférence à Reims 2001, [www.uicchampagne-ardenne.fr](http://www.uicchampagne-ardenne.fr) / conférences/conférence-J-M-Lehn.
2. Szejtli. J, Cyclodextrin Technology, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 1988.
3. Szejtli. J, Cyclodextrins in biotechnology, *Die Stärke*, 38 (11), 388-390, 1986.
4. Szejtli. J, *comprehensive supramolecular chemistry*, volume 3, 1996.
5. Cramer. F, *"Einchlussverbindungen"*, Springer, Berlin, 1954.
6. Cramer. F, et Henglein. F. M, *Chern. Ber.*, 98, 2561-2575, 1957.
7. Meier. M. M, Luiz. M, Farmer. P and Szpoganicz. B, *J. Incl. Phenom.* 40, 291-295, 2001.
8. Kikuchi. M, Uemura. Y, Hirayama. F, Otagiri. M, Uekama. K., *J. Incl. Phenom.*, 2, 623, 1984.
9. Schiller. R. L, Lincoln. S. F, Coates J. H, *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, 83 (11), 3237-3248, 1987.
10. Andersen. F. M, Bundgaard. H, *Arch. Pharm. Chem.*, 11, 7, 1983.
11. Chow. D. D, Karara. A. H, *Int. J. Pharm.*, 28, 95, 1986.
12. Nakai. Y, Yamamoto. K, terada. K, Watanabe. D, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4609, 1987.
13. Briggner. L. E, Ni. X. R, Tempest. F, Wadsö. I, *Thermochim. Acta*, 109, 139, 1986.
14. Kano. K, Hashimoto. S, Imai. A, Ogawa. T, *J. Incl. Phenom.*, 2, 737, 1984.
15. Loftson. T, *Nordic Industrial Fond*, 1-40, 1998.
16. Irie. T, Uekama. K, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (2), 147-162, 1997.
17. Uekama. K, Hirayama. F, Irie. T, *Chem. Rev*, 98, 2045-2076, 1998.
18. Duchêne. D, vautier. C, *Les entretiens de Carla tome VIII*, 109-119, 1986.
19. Bekers. O, Beijnen. JH, Tank. MJ, Bult. A, Underberg. WJ, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 9, 1055-1060, 1991.
20. Bhardwaj. R, Dorr. RT, Blanchard J, *J. Pharm. Sci. Technol*, 54, 233-239, 2000.
21. Wu. C, Fan. J, *Shuichuli Jishu*, 24, 67-70, 1998.
22. Parrish. MA, cyclodextrins – *a review available from sterling organics. Newcastle – upon – Tyne NE3 3TT*. England 1988.
23. Kamiya . M, Kameyama. K, Ishiwata. S, *Chemosphere*, 42,251-255,2001
24. Atwood JL, *Inclusion phenomenon and recognition. New York : Plenum* ; 1990.
25. Ye. H, Tong. W, Dsouza. VT, *J. Am. Chem. Soc*, 114, 5470-5472, 1992.

26. Leventis. R, Silvius. JR, *Biophys. J*, 81, 2257-2267, 2001.
27. Hun. SH, *Biomed Chromatography*, 11, 259-271, 1997.
28. Schnederman. E, Stalcup. AM, *J. Chromatography. B*, 745, 83-102, 2000.
29. Lu. X, Chen. Y, *J. Chromatography A*, 955, 133-140, 2002.
30. Kim. M. Kirkland, *J. Chromatography A*, 718, 9-26, 1995
31. Furfuta. R, Nakazawa. H, *J. Chromatography*, 625, 231-235, 1992.
32. Penn. S. G, Goodall. D. M, Loran. J. S, *Journal of Chromatography A*, 875, 163-178, 1993
33. Fanali. S, *J. Chromatography*, 875, 89-122, 2000.
34. Stalcup. AM, Gahm. KH, Gratz. SR, Sutton. RM, *Anal. Chem*, 70, P.144 -148, 1998.
35. Nie. MY, Zhou. LM, Wang. QH, Zhu. DQ, *Anal. Sci*, 17, 1183-1187, 2001.
36. Uekama. K, Hirayama. F, Ikeda. K, Inaba. K, *J. Pharm. Sci*, 66, 706-710, 1977.
37. Hayden. BM, Engel. PC, *Eur. J. Biochem*, 268, 1173-1180, 2001.
38. Prasad. N, Strauss. D, Reichart. G, *European Patent*1, 84, 625, 1999.
39. Sumioshi. H, *Nippon Shokuhin Shinsozai Kenkyukaishi*, 2, 109-114, 1999.
40. Bushmann. HJ, Schollmeyer. E, *J. Cosmet. Sci*, 53, 185-191, 2002.
41. Hedges. RA. *Chem. Rev*, 98, 2035-2044, 1998.
42. Job. P, *Ann. Chim*, 9, 113-203, 1928.
43. Bratu. I, Gavira-Vallejo, Hernanz. A, Bogdan. M, Bora. Gh, *Biopolymers*, 73, 451-456, 2004.
44. Hildebrand J. A., Benesi H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2703 – 2710, 1949.
45. Lipkowitz. K. B, Ragothana. S, Yang. J, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1554, 1992.
46. Mathur. R, Becker. E. D, Bradley. R. B, Li. N. C., *J. Phys. Chem*, 67, 2190, 1963.
47. Hanna M. W., Ashbaugh A.L., *J. Phys. Chem.*, 4, 811 – 816, 1964.
48. Foster R., Fyfe C. A., *Trans. Faraday. Soc.*, 61, 1626 – 1631, 1965.
49. Scott. R. L, *Rec. Trav. Chem. Pays – Bas*, 75, 787 – 789, 1956.
50. Behr. J. P, Lehn. J.M, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 1743 – 1747, 1976.
51. Deaton. K, Feyen. E, Nkulabi. H, Morris. K, *Magn. Reson. Chem*, 39, 276-282, 2001.
52. Wimmer. R, Aachmann. F. L, Larsen. K. L, Petersen. S. B, *Carbohydrate Research*, 2002, 337, 841-849, 2002.
53. Lin. M, Jayawickrama. D. A, Rose. R. A, Delviscio. J. A, Larive. C. K, *Analytica Chimica Acta*, 307, 449-457, 1995.
54. Cameron. K. S, Fielding. L, *Magn. Reson. Chem*, 40, 106-109, 2002.
55. T. Higuchi, K. A. Connors , *Anal. Chem. Instrum.*, 117, 1965.

56. Piel. G, Moutard. S, Perly. B, Henry de Hassonville. S, Bertholet,. P, Barillaro. V, Piette. M, Delattre. L, Evrard. B., *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 14, 1, 87 – 91, 2004.

## **Chapitre II**

### **Outils RMN nécessaires à l'étude des complexes d'inclusion**



## Introduction

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) fut découverte dans la matière condensée à la fin de 1945 par deux équipes américaines : Purcell, Torrey et Pound à Harvard, et Bloch, Hansen et Packard à Stanford. Au début des années cinquante la méthode fut appliquée pour la première fois dans le domaine de la chimie. Depuis lors, son importance n'a fait que croître et nombreuses sont les publications traitant de résonance magnétique nucléaire et de ses applications dans différents domaines de la chimie, de la physique et de la biologie<sup>1</sup>.

Depuis la découverte de la RMN jusqu'à aujourd'hui, ce domaine ne cesse de s'élargir. La RMN et ses développements ont fait l'objet de plusieurs prix Nobel (Bloch et Purcell : prix Nobel de chimie en 1952, Ernst : Prix Nobel de chimie en 1991, Wüthrich : Prix Nobel de chimie en 2002, P.C. Lauterbur et P. Mansfield : Prix Nobel de médecine en 2003).

La RMN apporte des informations primordiales qui dépassent le simple aspect analytique, pour la détermination des structures, et se révèlent indispensables à la chimie en tant que science des molécules.

### 1. Les paramètres de base de la RMN en une dimension

#### 1.1. Le déplacement chimique

Les noyaux observables en RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P...), sont soumis à un champ magnétique B<sub>0</sub>. Mais toutes les particules d'un même type ne perçoivent pas exactement le même champ. Les électrons propres d'un noyau ou appartenant à d'autres créent leur propre champ très faible opposé à B<sub>0</sub>. Ce nuage électronique spécifique d'un noyau d'une molécule permet de différencier des spins de même nature selon la fréquence de Larmor modifiée à laquelle ils résonnent :

$$\nu = \frac{\gamma B_0 (1 - \sigma)}{2\pi} = \nu_0 (1 - \sigma)$$

Où  $\sigma$  est la constante d'écran représentant les modifications de champ subies par le noyau. La fréquence  $\nu$  caractérise un noyau avec un environnement propre. Mais  $\nu$  dépend du champ magnétique B<sub>0</sub> de l'expérience. Alors pour caractériser un noyau en RMN, quelque soit le champ magnétique, on a défini la notion de déplacement chimique  $\delta$  avec :

$$\delta_{(\text{ppm})} = \frac{\nu - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_0} \cdot 10^6$$

Avec :

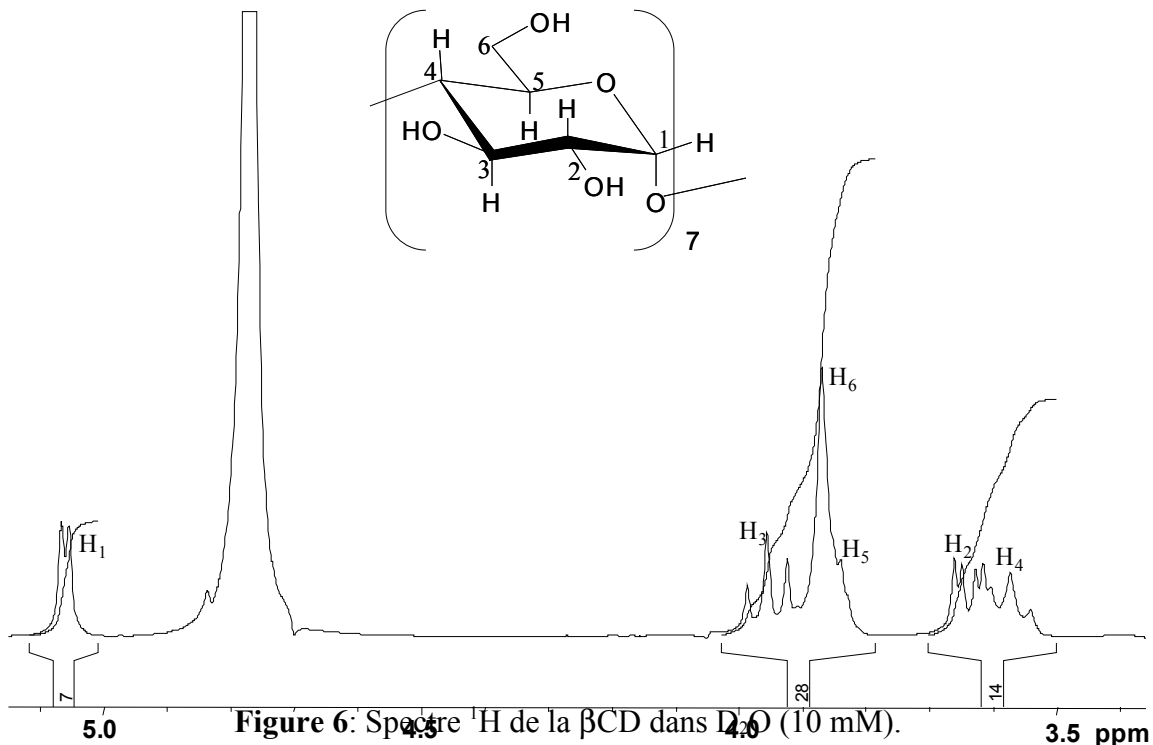
$\nu - \nu_{\text{TMS}}$  = fréquence du signal par rapport à une fréquence de référence (TMS, tétraméthylsilane "Si(Me)<sub>4</sub>" pour <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C)

$\nu_0$  = fréquence de Larmor de l'appareil pour le noyau considéré.

Les gammes de déplacement chimique varient entre 0 et 15 ppm pour le proton et 0 à 250 ppm pour le carbone.

## 1.2. Intégration

C'est la surface du pic d'absorption qui est proportionnelle au nombre de protons. Cette surface se mesure grâce à la courbe d'intégration. Celle-ci permet d'avoir l'information sur le nombre de protons correspondant à un signal. Par exemple dans le cas du spectre de la βCD, en calibrant le signal des protons anomériques à 7, on retrouve l'intégration correspondante aux autres protons de la molécule.



## 1.3. Couplage scalaire

Le couplage scalaire (ou couplage spin – spin) traduit l'effet du champ magnétique créé par le spin d'un noyau X et transmis par les électrons de liaisons sur un noyau A. Le noyau A peut percevoir deux champs locaux ( $B + B_X$ ) ou ( $B - B_X$ ) suivant l'orientation du spin du noyau X. Prenons l'exemple de la  $\beta$ CD (figure 7), le proton anomérique  $H_1$  a un couplage identique au petit couplage du proton  $H_2$  (3,75 Hz), on en déduit que le proton  $H_1$  est couplé scalairement avec  $H_2$ . Par contre, le grand couplage du proton  $H_2$  (9,8 Hz) est identique à celui des protons  $H_3$  et  $H_4$  ce qui ne nous permet pas de savoir lequel de ces deux protons est lié à  $H_2$ . Les autres protons ayant des déplacements chimiques voisins, on ne peut pas voir leur couplage. Pour attribuer le spectre, on va utiliser d'autres méthodes.

## **2. La RMN bidimensionnelle (2D)**

### **2.1. RMN homonucléaire**

#### **- L'expérience COSY**

L'expérience COSY (Correlated SpectroscopY)<sup>2</sup> permet d'identifier les protons  $^1H$  couplés scalairement. A l'aide de cette expérience, il est possible de mettre en évidence l'existence de couplage scalaire  $^2J$  (entre deux protons portés par le même atome de carbone)  $^3J$  (entre deux protons portés par des atomes de carbone en  $\alpha$ ) et  $^4J$  (protons séparés par quatre liaisons).

A partir de la carte COSY (figure 7), nous avons attribué les protons de l'unité glucosidique de la  $\beta$ CD.

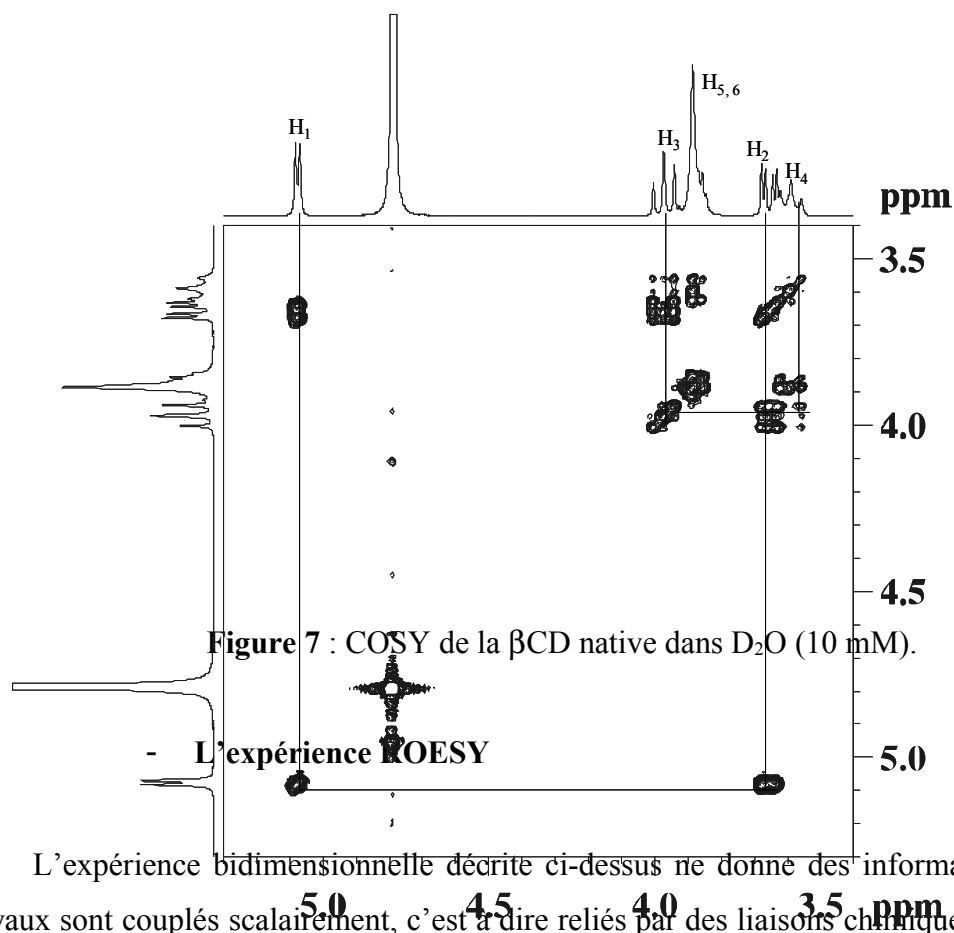


Figure 7 : COSY de la  $\beta$ CD native dans  $D_2O$  (10 mM).

L'expérience bidimensionnelle décrite ci-dessus ne donne des informations que si les noyaux sont couplés scalairement, c'est à dire reliés par des liaisons chimiques. Mais il existe d'autres types d'interactions entre deux noyaux possédant chacun un moment magnétique nucléaire ; ce sont les interactions dipolaires. L'expérience ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY)<sup>3</sup> permet d'identifier les protons qui sont proches entre eux dans l'espace (interactions dipolaires).

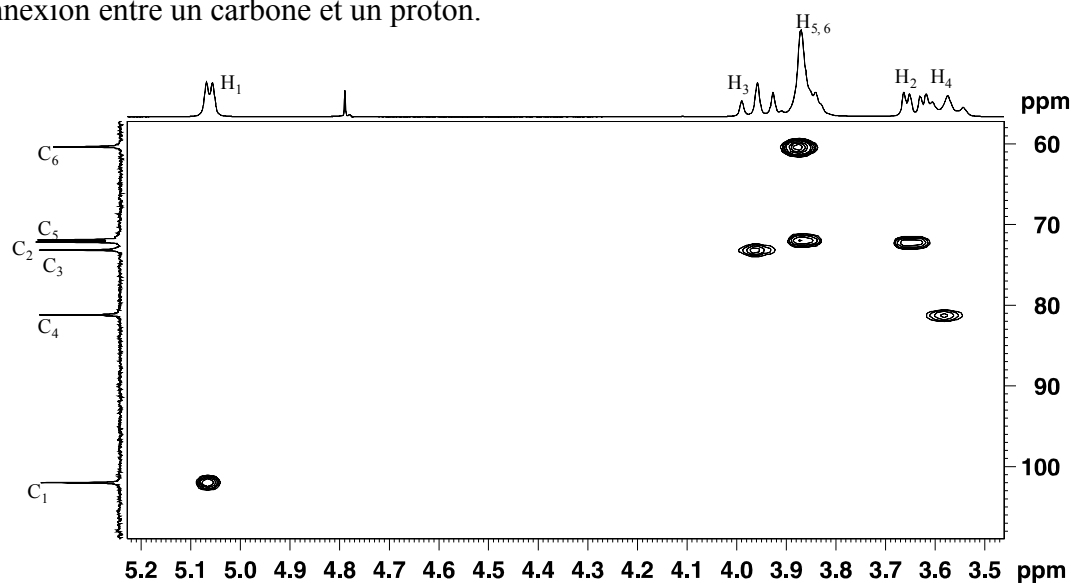
Donc, cette expérience nous permet de détecter les interactions dipolaires intra et intermoléculaires entre les protons de la cyclodextrine et de la molécule incluse. Nous l'avons utilisée pour mettre en évidence l'inclusion de molécules dans la cavité des différentes cyclodextrines (voir chapitre 3, 4).

## 2.2. RMN hétéronucléaire

### - L'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Cette expérience RMN<sup>4</sup> en deux dimensions permet de détecter les carbones directement liés à un proton. Sur la carte HSQC 2D, les déplacements chimiques des protons sont obtenus dans la première dimension (axe horizontal) et les déplacements chimiques des

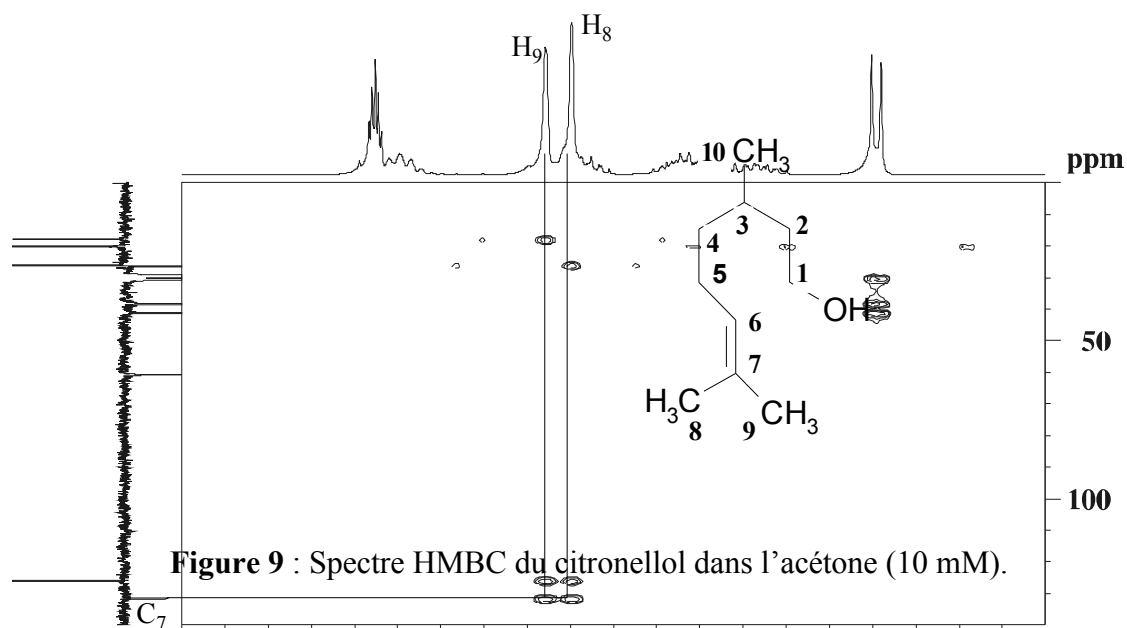
carbones dans la deuxième dimension (axe vertical). Chaque tache de corrélation indique une connexion entre un carbone et un proton.



**Figure 8:** Spectre HSQC de la βCD native (10 mM).

#### - L'expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Cette expérience permet d'identifier les couplages à longue distance<sup>5</sup> (c'est-à-dire à travers deux ou trois liaisons  $^2J$  ou  $^3J$ ) entre les protons et les carbones. Comme l'HSQC, la première dimension (axe horizontal) correspond aux déplacements chimiques des protons et la deuxième dimension (axe vertical) à ceux des carbones. Chaque tache de corrélation indique une connexion entre un carbone et un proton à travers 2 ou 3 liaisons chimiques. Cette expérience est surtout utilisée pour attribuer les carbones quaternaires comme l'illustre l'exemple suivant :



D'après la figure 9 on observe que le carbone 7 de citronellol possède deux liaisons de corrélation sur la carte HMBC avec les protons 8 et 9.

### 3. DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

#### 3. 1. Principe

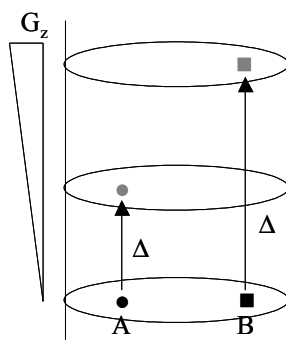
L'expérience DOSY<sup>6, 7</sup> a été développée afin de faciliter l'analyse d'un mélange en s'appuyant sur la mesure du coefficient de diffusion. Les molécules qui se trouvent dans une solution sont toujours en mouvement permanent. Ce mouvement de translation, contrairement au mouvement de rotation, est connu sous le nom "mouvement moléculaire Brownien" et s'appelle souvent diffusion ou auto-diffusion. Il dépend des paramètres physiques comme la taille, la forme de la molécule, la température et la viscosité du milieu. En supposant que la molécule a une forme sphérique de rayon  $r_s$ , le coefficient de diffusion est donné par l'équation de Stokes - Einstein :

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_s}$$

Avec :

- K, constante de Boltzmann (J.K<sup>-1</sup>)
- T, la température absolue (K)
- $\eta$ , la viscosité du milieu (Pa.s)
- r, le rayon de la molécule (m)

La mesure du coefficient de diffusion basée sur l'expérience DOSY nécessite l'utilisation de gradients pulsés. Soient deux molécules de taille différente A et B au même endroit dans l'échantillon, on les laisse diffuser pendant un temps  $\Delta$  (temps de diffusion). Après ce délai, ces deux molécules se trouvent en deux endroits différents dans le tube RMN. Si on applique un gradient de champ magnétique ( $G_z$ ), ces deux molécules A et B ne vont pas ressentir le même champ magnétique et par suite elles vont avoir deux intensités de signaux différentes<sup>8</sup> (figure 10).



**Figure 10** : Principe HR-MAS

L'intensité du signal va varier selon l'équation :

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)}$$

Avec :  $I$  = Intensité observée.

$I_0$  = Intensité de référence (en absence de gradient).

$D$  = Coefficient de diffusion.

$\gamma$  = Rapport gyromagnétique.

$g$  = Intensité de gradient.

$\delta$  = Temps de gradient.

$\Delta$  = Temps de diffusion.

En reportant l'intensité du signal en fonction du gradient ( $G$ ), on va pouvoir en déduire le coefficient de diffusion  $D$ .

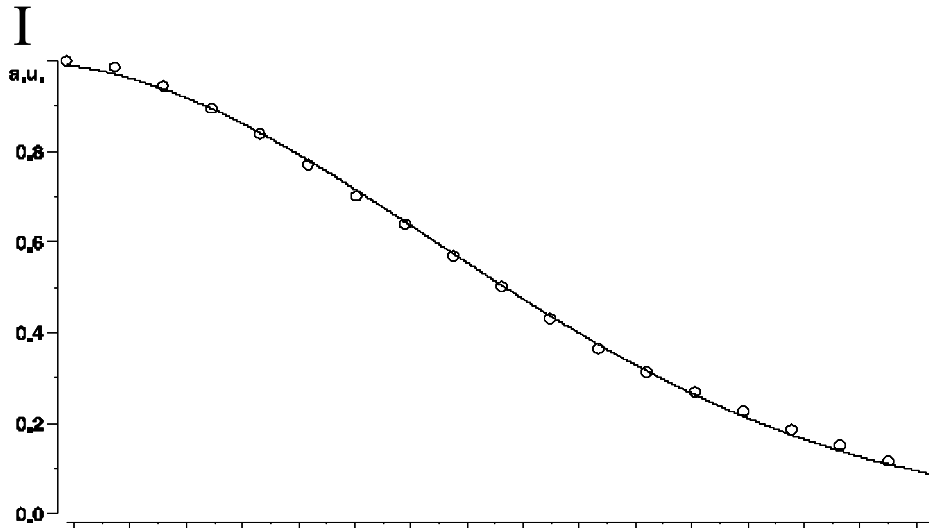
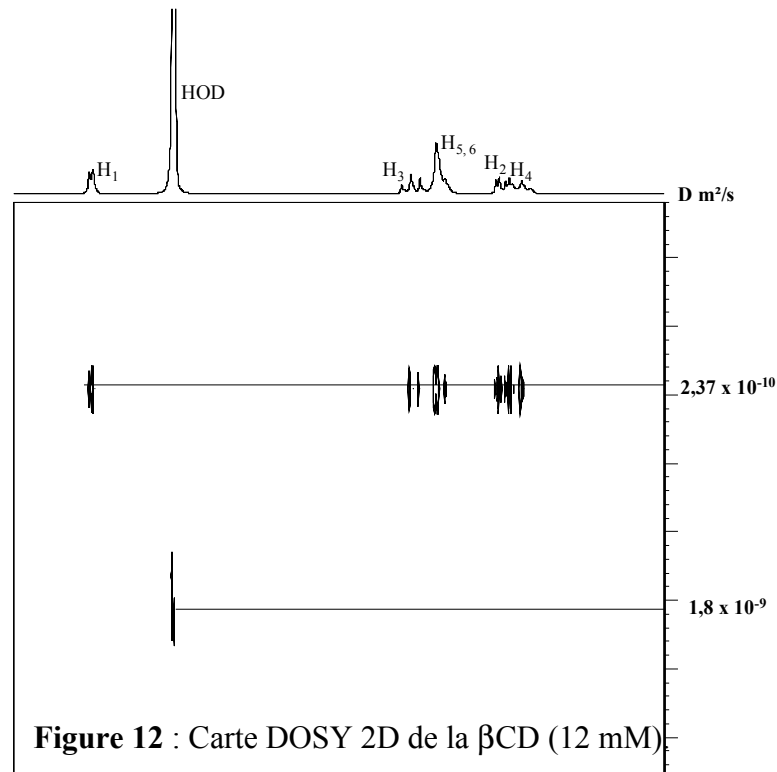


Figure 11: La courbe de l'intensité du signal en fonction du gradient  $g$  (cm f).

### 3.2. Mise au point de la séquence

Afin d'optimiser la mesure des coefficients de diffusion, nous avons réalisé une étude en faisant varier différents paramètres tels que le délai de relaxation  $D_1$ , la durée des gradients  $\delta$  et le temps de diffusion  $\Delta$ . Dans chaque cas, nous avons enregistré deux expériences DOSY 1D avec un pourcentage de gradient de 5 et 95 %, puis nous avons mesuré l'intensité d'un même signal dans chacune de ces expériences. Plus le pourcentage en gradient est important, plus l'intensité du signal est faible. Pour avoir la meilleure précision pour la mesure de  $D$ , le rapport d'intensité entre ces deux expériences doit être compris entre 5 et 10 %. Après avoir déterminé les meilleures valeurs pour  $\delta$  et  $\Delta$ , on réalise l'expérience DOSY 2D qui consiste en une série d'acquisition 1D DOSY où le pourcentage de gradient varie linéairement entre 5 et 95 %. Sur la carte DOSY 2D (figure 12) la première dimension (axe horizontal) donne les déplacements chimiques et à partir de la deuxième dimension (axe vertical), on détermine le coefficient de diffusion. Deux molécules de taille et de mobilité différentes, seront séparées sur la carte DOSY selon leur coefficient de diffusion  $D$ .





**Figure 12** : Carte DOSY 2D de la  $\beta$ CD (12 mM)

Ainsi sur la carte DOSY de la  $\beta$ CD, on différencie nettement le coefficient de diffusion de la  $\beta$ CD ( $2,37 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) de celui de l'eau ( $1,8 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Une molécule d'eau étant beaucoup plus petite qu'une molécule de cyclodextrine, l'eau diffuse plus rapidement.

#### 4. La haute résolution en rotation à l'angle magique (HR-MAS)

La difficulté majeure rencontrée lorsqu'on veut étudier des polymères insolubles est l'importance de la largeur des raies. Dans le cas d'un échantillon purement solide, la largeur de la raie peut dépasser 10 kHz. Cet élargissement des raies provient notamment de l'interaction dipôle – dipôle (interaction dipolaire). Cette interaction dipolaire est donnée par l'équation suivante :

$$D \propto r^{-3} (3\cos^2\theta - 1)$$

Avec :

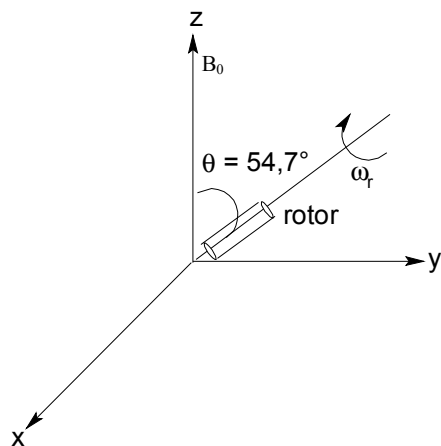
D : est le couplage dipolaire

r : la distance internucléaire

$\theta$  : l'angle entre le champ à l'équilibre et le vecteur internucléaire

Pour minimiser cette interaction dipolaire, il est nécessaire que l'échantillon soit orienté avec un angle de  $54,7^\circ$  (angle magique) par rapport au champ magnétique de l'aimant (figure

13). Cela est possible avec la technique HR-MAS, où l'échantillon RMN présent dans un rotor, est basculé à l'angle magique et soumis à une rotation rapide (3000 tours/s). Cela permet de minimiser les interactions dipolaires et d'obtenir des spectres de produits non solubles avec des largeurs de raies proches de celles de la RMN du liquide.



**Figure 13:** Angle de rotation magique (Magic Angle Spining)

Le fait de travailler à l'angle magique va moyenniser certaines interactions présentes à l'intérieur de l'échantillon (interactions dipôle - dipôle homonucléaire, anisotropie de déplacements chimiques)<sup>9 - 11</sup>. La HR-MAS est applicable à une large gamme d'échantillons possédant une mobilité réduite comme les gels. En 1996, Cheng et al. ont utilisé cette technique pour identifier des métabolites de nodules lymphatiques malins et des tumeurs du cerveau<sup>12</sup>. En 1997, Nicholson, en collaboration avec Bruker a utilisé la HR-MAS pour étudier des tissus reinaux<sup>13</sup>. L'obtention de spectres ayant une résolution proche de celle obtenue en solution, on peut réaliser des expériences 2D classiques (COSY, HSQC, ROESY).

## Références

1. Munfred Hesse, Herbert Meier, Bernd Zeeh, « *Méthodes Spectroscopiques pour la Chimie Organique* », version française, édition Masson, Paris 1997.
2. J. Jeener, *Ampere International Summer School* Basko Polje Yugoslavia, 1971.
3. A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 811-813, 1984
4. G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett*, 69, 185-188, 1980.
5. A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 4285-4294, 1986.
6. P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 19, 1-45, 1987.
7. Claridge. D. W. T, "*High – Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*" *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Volume 19, 1999.
8. Cohen. Y, Avram. L, Frish. L, *Angew. Chem. Int. Ed*, 44, 520 – 554, 2005.
9. Fitch. W. L, Dtre. G , Holmes. C. P, Shoorely. J. N, Keifer. P. A, *J. Org. Chem*, 59, 7955-7956, 1994.
10. Anderson. R. C, Stokes. J. P, Shapiro. M. J, *Tetrahedron Lett*, 36, 5311-5314, 1995.
11. Berger. S, Braun. S, "*200 and More NMR Experiments*"., Wiley – VCH, Edition 2004..
12. Cheng. L. L, Lean. C, Bogdanova. A, Wright. J, Ackerman. J, Brady. T, Garrido. L, *Magn. Reson. Med*, 36, 653 – 658, 1996.
13. Lynch. M, Nicholson. J, *Prostate*, 30, 248 – 255, 1997.

## **Chapitre III**

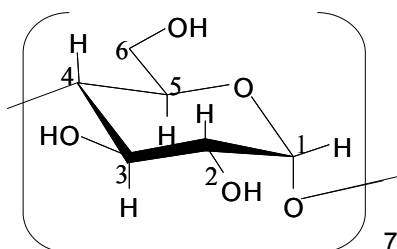
### **Etudes structurales et capacité d'inclusion des cyclodextrines**

La résonance magnétique nucléaire constitue une des techniques d'analyse moderne parmi les plus efficaces pour la détermination de la structure à partir des méthodes monodimensionnelles classiques mais surtout par l'utilisation judicieuse d'expériences RMN bidimensionnelles homo et hétéronucléaires. Nous avons étudié la structure des cyclodextrines natives et polymérisées et celles des molécules organiques utilisées comme modèles à inclure, la doxycycline hydrochlorate, le citronellol et la jasmone.

## 1. Etudes structurales des différentes cyclodextrines:

### 1. 1. Etude des CD natives :

La  $\beta$ -cyclodextrine possède 7 unités glucosidiques identiques. Le premier pas dans l'étude structurale d'un composé organique par RMN est d'enregistrer un spectre proton de ce produit.



D'après le spectre  $^1\text{H}$  (figure 6), on peut attribuer les protons anomériques  $\text{H}_1$  qui sont les plus déblindés. A partir des corrélations scalaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (expériences COSY et HSQC) et du spectre  $^{13}\text{C}$  (figure 14), l'attribution des protons et des carbones de la  $\beta$ -cyclodextrine a été réalisée.

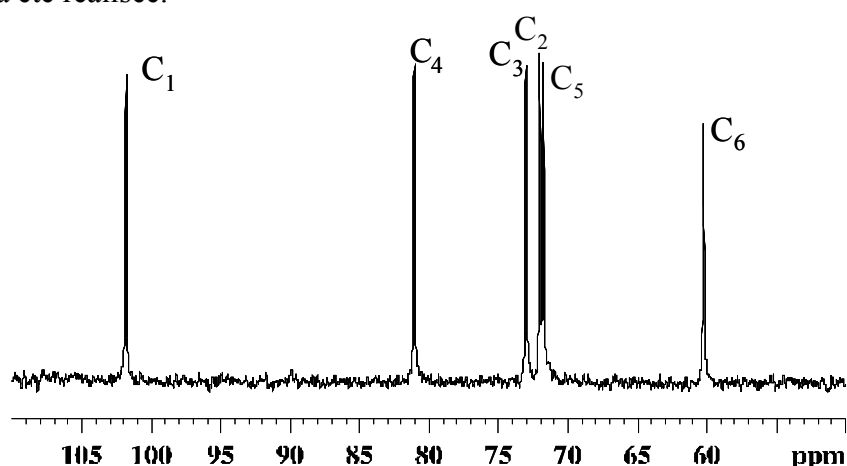


Figure 14: Spectre  $^{13}\text{C}$  de la  $\beta\text{CD}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  (10 mM).

L'attribution des protons et des carbones de la  $\beta$ CD est présentée dans le tableau 3.

$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	J (Hz)	$^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm)
1	5,06	$J_{1,2} = 3,5$	1	101,8
2	3,64	$J_{2,1} = 3,5 ; J_{2,3} = 9,4$	2	72,0
3	3,96	$J_{3,2} = 9,4 ; J_{3,4} = 9,4$	3	73,0
4	3,57	$J_{4,3} = 9,4$	4	81,1
5	3,84	-----	5	71,7
6,6'	3,86	-----	6	60,2

**Tableau 3:** Attribution de  $^1\text{H}$  et de  $^{13}\text{C}$  de la  $\beta$ CD dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

Les spectres de  $\alpha$  et  $\gamma$ CD sont comparables à ceux de  $\beta$ CD avec des petites variations au niveau des déplacements chimiques (voir annexe V).

En se reposant sur l'équation de Stokes-Einstein (cf. chapitre 2), nous avons déterminé les rayons des cyclodextrines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). En rappelant que :

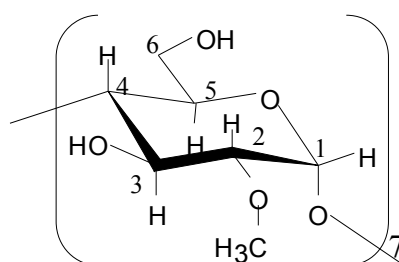
$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_s}$$

Composé	D en $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (i)	D en $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$r_s$ en $\text{Å}$ (i)
$\alpha$ CD	3,53	3,5 a	6,94
$\beta$ CD	3,32	3,30 b	7,38
$\gamma$ CD	3,13	3,14 b	7,83

**Tableau 4:** Détermination des rayons des cyclodextrines (i : notre travail "dans  $\text{D}_2\text{O}$ "; a, b sont respectivement les valeurs déterminées dans les références 1, 2)

## 1. 2. Etude d'une cyclodextrine modifiée : le CRYSMEB

Le CRYSMEB est la forme méthylée en position 2 de la  $\beta$ -cyclodextrine, sa nomenclature est 2-O-methyl  $\beta$ -cyclodextrine et sa masse molaire est de l'ordre de 1191 g/mol. Il est commercialisé sous le nom KLEPTOSE® CRYSMEB EXP.

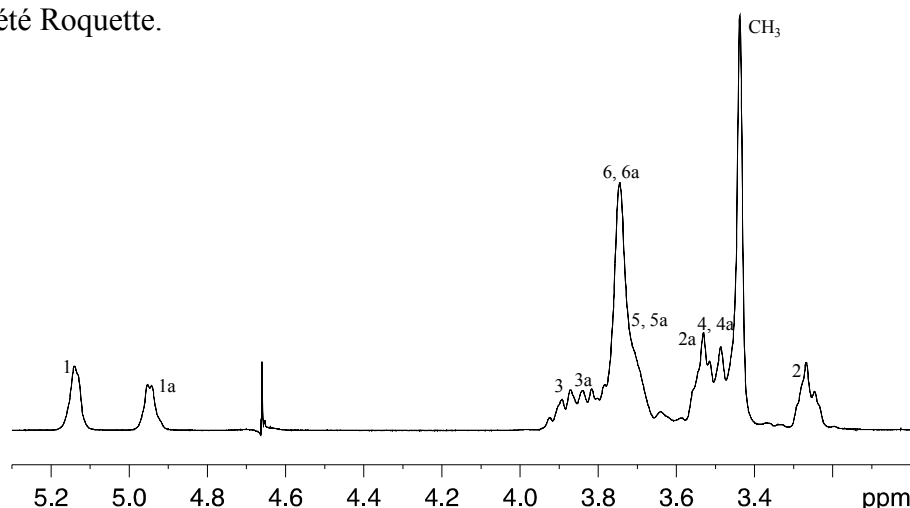


Il est très soluble dans l'eau et stable en solution neutre et basique. En milieu acide, il est faiblement hydrolysable mais il reste beaucoup plus stable que la  $\beta$ -cyclodextrine et ses dérivés. Le CRYSMEB est capable d'augmenter la solubilité de certains médicaments plus que les autres dérivés de  $\beta$ -cyclodextrines<sup>3</sup> (voir tableau 5).

Dérivé de cyclodextrine	Solubilité de l'hydrocortisone (mg / ml)
-	0,28
CRYSMEB	10,5
HP $\beta$ CD	5,1
RAMEB	7,1
DIMEB	8,8

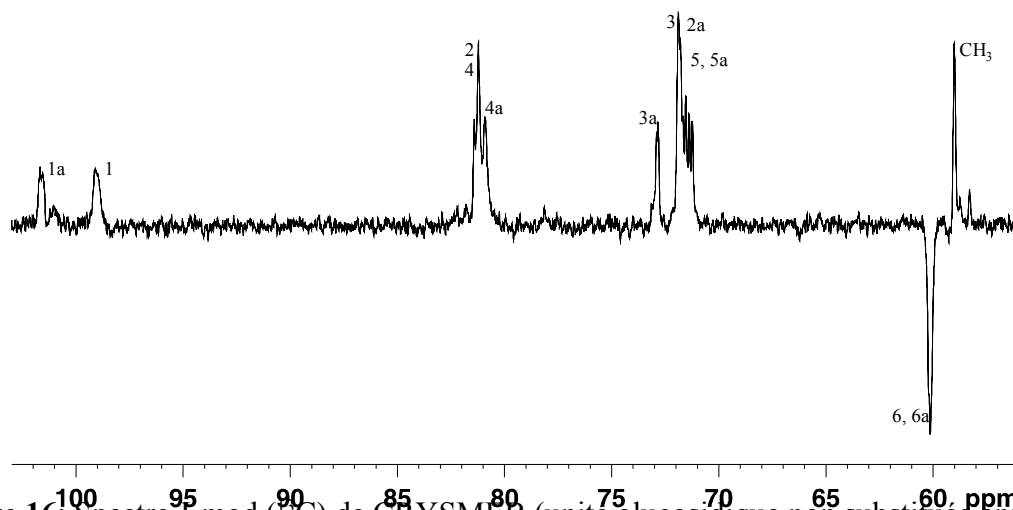
**Tableau 5:** Influence de la cyclodextrine sur la solubilité de l'hydrocortisone (HP $\beta$ CD: hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine, RAMEB: randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrine, DIMEB : dimethylated  $\beta$ -cyclodextrine).

A partir du spectre proton (figure 15), deux formes de sous unités glucosidiques sont observées pour le CRYSMEB: une substituée par le groupement méthoxy et l'autre non substituée. Les deux protons anomériques sont bien séparés sous l'effet du groupe méthoxy en position 2. Le proton anomérique de l'unité glucosidique substituée est plus déblindé que celui de l'unité non substituée. Par intégration des protons anomériques sur le spectre  $^1\text{H}$ , on a déterminé le degré de substitution qui est de l'ordre de 51 % en accord avec la valeur donnée par la société Roquette.



**Figure 15:** Spectre  $^1\text{H}$  de CRYSMEB {unité glucosidique non substituée annotée de 1a – 6a} (10 mM dans  $\text{D}_2\text{O}$ ).

A partir de ces protons anomériques et des expériences COSY et TOCSY, on a attribué les protons de chacune des unités glucosidiques substituées ou non. Et avec la RMN 2D (HSQC) et le  $^{13}\text{C}$  (figure 16), nous avons attribué les carbones du CRYSMEB.



**Figure 16:** Spectre J-mod ( $^{13}\text{C}$ ) de CRYSMEB (unité glucosidique non substituée annotée de 1a – 6a) (10 mM dans  $\text{D}_2\text{O}$ ).

L'attribution de  $^1\text{H}$  et de  $^{13}\text{C}$  est présentée dans le tableau suivant :

$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm)
1	5,14	1	99,00
2	3,27	2	81,26
3	3,90	3	71,92
4	3,49	4	81,26
5	3,74	5	71,51
6	3,75	6	60,17
$\text{CH}_3$	3,44	$\text{CH}_3$	59,00
1a	5,95	1a	101,62
2a	3,54	2a	71,84
3a	3,83	3a	72,91
4a	3,47	4a	81,09
5a	3,74	5a	71,51
6a	3,75	6a	60,17

**Tableau 6:** Attribution de  $^1\text{H}$  et de  $^{13}\text{C}$  de CRYSMEB dans  $\text{D}_2\text{O}$  (unité glucosidique non substituée annotée de 1a – 6a).

Après l'étude structurale de ces cyclodextrines, nous nous sommes intéressés à leur capacité d'inclure des molécules organiques dans leurs cavités hydrophobes.

## 2. Complexation de la doxycycline hydrochlorate avec les $\beta$ - et $\gamma$ -cyclodextrines et le CRYSMEB :

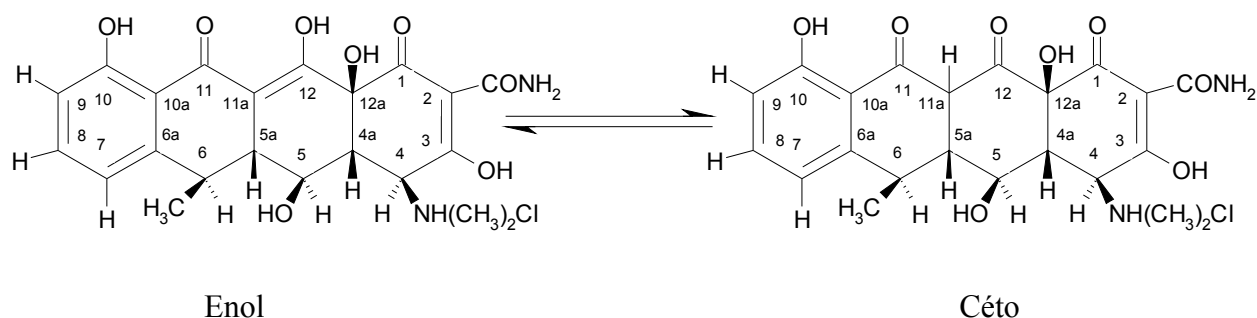


La doxycycline hydrochlorate (DOX) est un antibiotique qui se dégrade sous l'action de la température, l'humidité et la lumière. L'objectif est d'une part, de protéger cette molécule vis-à-vis des différentes dégradations en formant un complexe d'inclusion avec une cyclodextrine et d'autre part, d'avoir un relargage contrôlé de cette molécule.

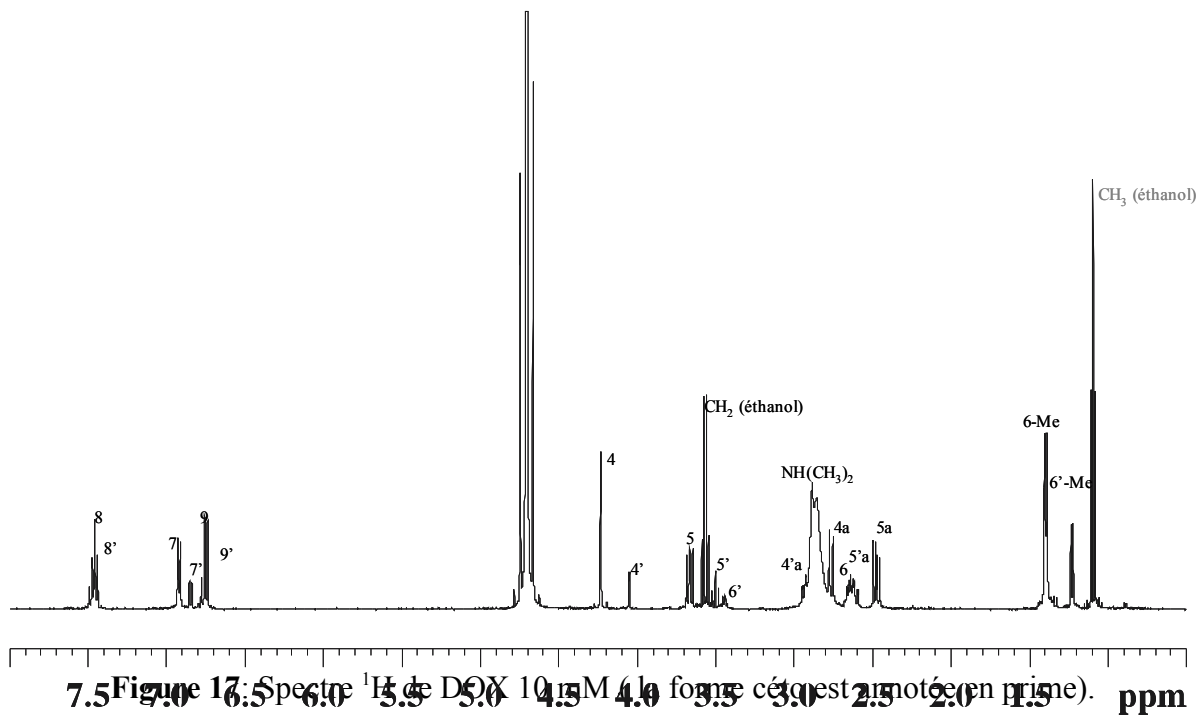
Avant de présenter les complexes avec les différentes cyclodextrines, nous avons étudié la molécule libre.

## 2.1. Etudes structurales de la doxycycline :

La doxycycline est un antibiotique appartenant à la famille des tétracyclines. Elle est connue sous le nom de doxycycline hydrochlorate. Son nom chimique est : diméthylamino-4 pentahydroxy-3,5,10,12,12a methyl-6 dioxo-1,11 octahydro-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a naphthacèncarboxamide-2chlorhydrate. Ce médicament est couramment utilisé pour combattre les microbes pathogènes parodontaux. En solution ce médicament existe sous deux formes tautomères : la forme énol et la forme céto<sup>4</sup>.



L'attribution des différents protons (figure 17) des deux formes tautomères de la doxycycline a été réalisée à partir des expériences RMN 1D et 2D. De plus, on observe les résonances de l'éthanol (triplet à 1,1 ppm et quadruplet à 3,6 ppm) provenant de l'antibiotique.



Ces deux formes de la doxycycline sont en équilibre en milieu aqueux. Par RMN  $^1\text{H}$ , nous avons déterminé la proportion de chaque tautomère selon la température du milieu et nous avons constaté que l'augmentation de la température fait déplacer l'équilibre dans le sens de formation de la forme céto (tableau 7).

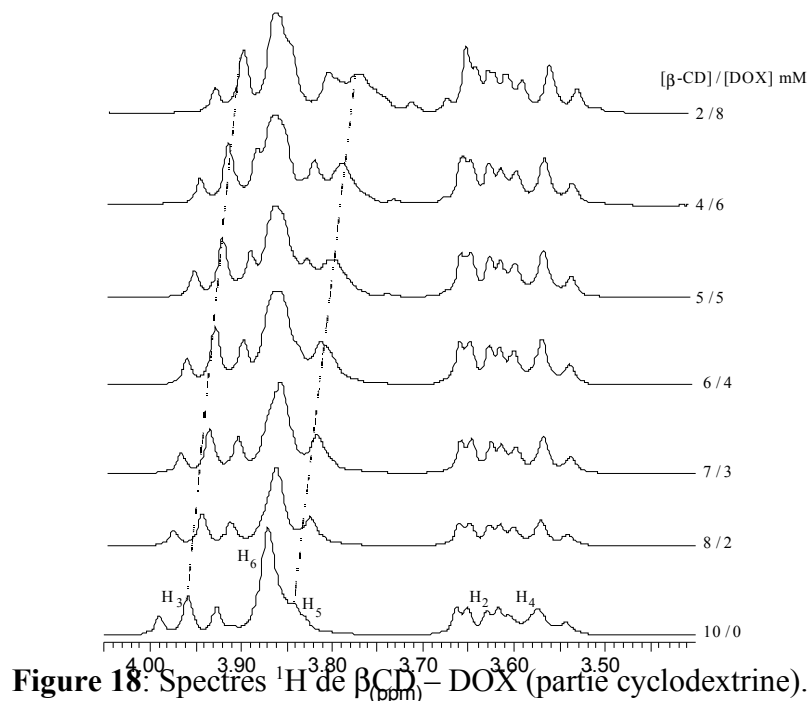
Température (°C)	% forme énol	% forme céto
25	77	23
30	73	27
40	66	34
50	55	45
60	48	52

**Tableau 7:** Variation de la proportion de la forme énol / céto en fonction de la température.

## 2. 2. Détermination de la stœchiométrie du complexe (méthode de Job)

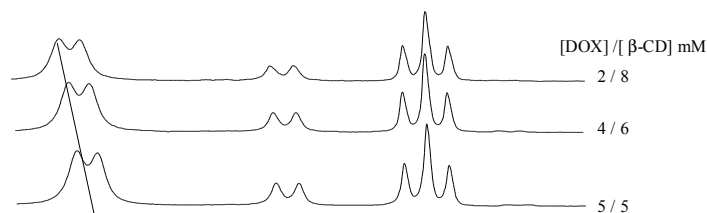
Nous avons préparé deux solutions équimolaires de  $\beta\text{CD}$  (10 mM) et de DOX (10 mM) dans une solution tampon de phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH = 7,24). Les solutions des tubes RMN ont été préparées en mélangeant la  $\beta\text{CD}$  et la DOX en différentes proportions

avec un volume total constant de 500  $\mu\text{l}$  et donc une concentration totale constante de 10 mM. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de ces différents échantillons ont été enregistrés (figure 18). On mesure les variations de déplacements chimiques des protons de la cyclodextrine et de la DOX.



**Figure 18:** Spectres  $^1\text{H}$  de  $\beta\text{CD}$  – DOX (partie cyclodextrine).

On observe une variation des déplacements chimiques des protons  $\text{H}_3$  et  $\text{H}_5$  de la  $\beta$ -cyclodextrine dirigée vers l'intérieur de la cavité de la CD, alors que les autres protons de la partie CD ne varient pas. Ces variations de déplacement chimique résultent de l'inclusion de la doxycycline hydrochlorate dans la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine. On voit également sur la figure 20 que le proton 6-Me de DOX se déplace avec la variation de la concentration (tableau 8).

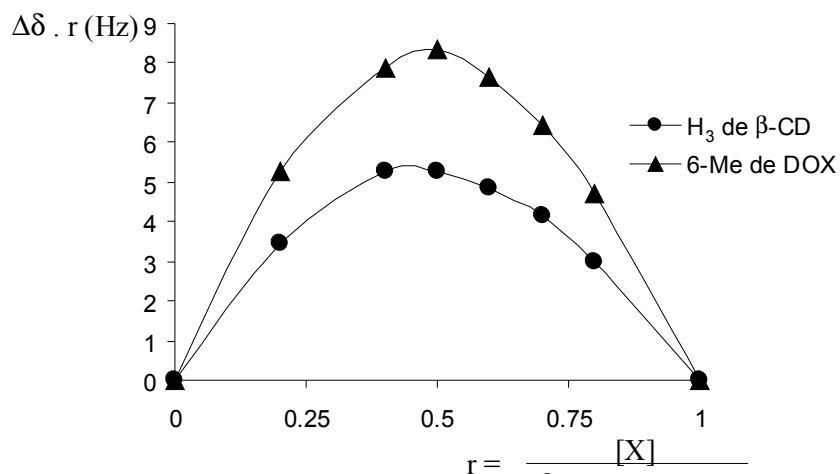


**Figure 19:** Spectres  $^1\text{H}$  de  $\beta\text{CD}$  - DOX (partie DOX).

[ $\beta\text{CD}$ ] mM	$V_{\beta\text{CD}}$ $\mu\text{l}$	[DOX] mM	$V_{\text{DOX}}$ $\mu\text{l}$	$ \Delta\delta $ (Hz) $\text{H}_3$ ( $\beta\text{CD}$ )	$ \Delta\delta $ (Hz) 6-Me (DOX)
10	500	0	0	----	----
8	400	2	100	3,73	23,46
7	350	3	150	5,92	21,48
6	300	4	200	8,11	19,07
5	250	5	250	10,52	16,66
4	200	6	300	13,16	13,15
2	100	8	400	17,32	6,58
0	0	10	500	----	----

**Tableau 8:** Variations des déplacements chimiques en fonction de la proportion des molécules ( $|\Delta\delta| = |\delta_{\text{libre}} - \delta_{\text{complexé}}|$ ).

On a étudié les protons dont les variations de déplacement chimique sont les plus importantes : les protons du méthyl 6 de la DOX et de  $\text{H}_3$  de  $\beta\text{CD}$  (tableau 8). En rapportant  $\Delta\delta.r$  en fonction de  $r$  ( $X = \text{DOX}$  ou  $\beta\text{CD}$ ), on obtient une courbe en forme de cloche centrée sur une valeur de 0,5 ce qui signifie qu'il y a un complexe d'inclusion de type 1:1 (figure 20).



**Figure 20:** Courbe de Job de  $\beta$ CD – DOX ( $r = \frac{[X]}{[\beta\text{-CD}] + [\text{DOX}]}$  ou  $[\text{DOX}]$ ).

On a obtenu les mêmes résultats pour les complexes  $\gamma$ CD – DOX (1:1) et CRYSMEB – DOX (1:1) (voir annexe).

### 2. 3. Détermination de la constante d'association ( $K_a$ ) :

L'affinité de la DOX pour la cavité des différentes cyclodextrines est étudiée à partir de la mesure des constantes d'association. Cette détermination a été réalisée par RMN par deux méthodes différentes : soit variation de déplacement chimique (méthode de Scott), soit mesure des coefficients de diffusion (DOSY).

#### 2. 3. 1. Méthode de Scott :

Nous avons préparé une série de mélange DOX –  $\beta$ CD en gardant la concentration de DOX faible et constante (0,5 mM) et on a fait varier la concentration de  $\beta$ CD (2 – 10 mM), puis on a mesuré les variations de déplacement chimique des différents protons de la DOX (tableau 9).

$[\beta\text{CD}]$ mM	$\Delta\delta$ H <sub>7</sub> de DOX (Hz)	$\Delta\delta$ H <sub>8</sub> de DOX (Hz)	$\Delta\delta$ H <sub>9</sub> de DOX (Hz)	$\Delta\delta$ 6-Me de DOX (Hz)
0	-----	-----	-----	-----

2	2,01	0,55	0,91	9,33
4	2,74	0,55	1,28	14,46
5	3,29	0,92	0,91	16,65
6	3,29	0,55	1,28	18,48
8	2,93	0,73	1,46	21,04
10	3,29	0,73	1,28	21,78

**Tableau 9:** Variations des déplacements chimiques de protons de DOX en fonction de la concentration de  $\beta$ CD.

Nous avons ensuite utilisé le traitement de Scott de l'équation de Benesi – Hildebrand (chapitre 1) :

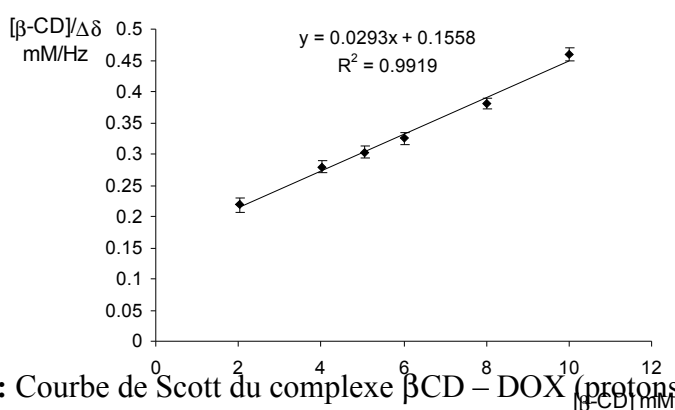
$$\frac{[\beta\text{CD}]_0}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{[\beta\text{CD}]_0}{\Delta\delta_{\text{max}}} + \frac{1}{K_a \cdot \Delta\delta_{\text{max}}}$$

Avec

$\Delta\delta_{\text{obs}}$  = Variation de déplacement chimique des protons de DOX dans le mélange.

$\Delta\delta_{\text{max}}$  = Variation de déplacement chimique des protons de DOX dans le complexe pur.

En rapportant  $[\beta\text{CD}]_0/\Delta\delta_{\text{obs}}$  en fonction de  $[\beta\text{CD}]_0$ , on obtient une droite (figure 21). La pente de cette droite correspond à l'inverse de la variation de déplacement chimique maximum  $(\Delta\delta_{\text{max}})^{-1}$  et l'ordonnée à l'origine est égale à  $1/K_a \cdot \Delta\delta_{\text{max}}$ . La constante d'association du complexe peut être déduite à partir de ces deux valeurs (pente et ordonnée à l'origine).



**Figure 21:** Courbe de Scott du complexe  $\beta$ CD – DOX (protons 6-Me de DOX).

En considérant que l'on mesure les variations de fréquence avec une erreur de 0,5 Hz, on peut déterminer et tracer les barres d'erreurs pour la courbe de Scott. Et à partir de l'incertitude sur la pente et l'ordonnée à l'origine, on obtiendra une incertitude sur la

détermination de la constante d'association ( $K_a$ ). Ainsi pour le complexe  $\beta$ CD – DOX, nous avons obtenu une constante d'association de l'ordre de  $188 \pm 12 \text{ M}^{-1}$ . La méthode de Scott a été aussi utilisée pour déterminer la constante d'association de DOX incluse dans d'autres cyclodextrines (tableau 10).

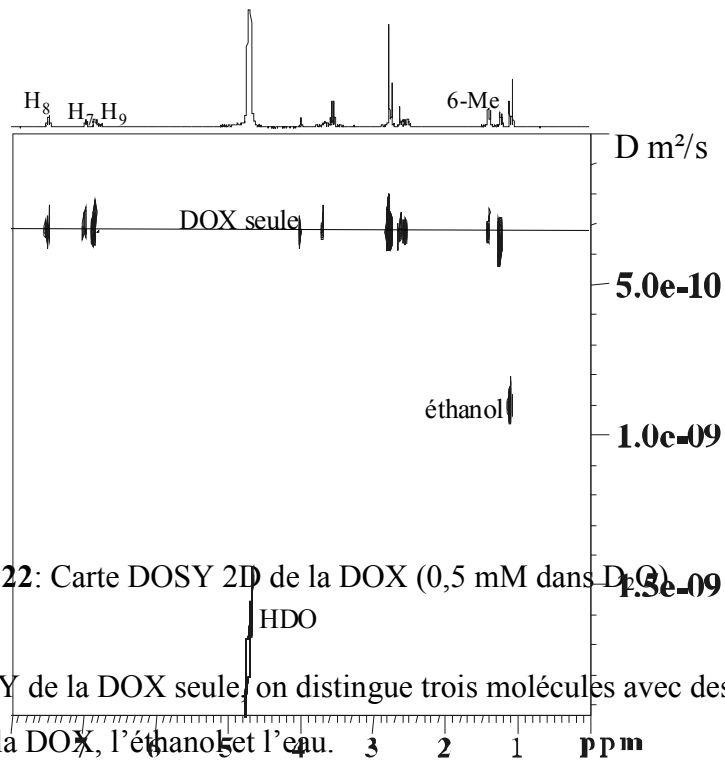
Complexe	$K_a \text{ M}^{-1}$
$\beta$ CD – DOX	$188 \pm 12$
$\gamma$ CD – DOX	$1820 \pm n$
CRYSMEB - DOX	$150 \pm 10$

**Tableau 10:** Constantes d'associations du complexe DOX avec différentes cyclodextrines (n = négligeable).

D'après le tableau ci-dessus, on observe que les incertitudes sur les constantes d'association de différents complexes d'inclusion varient. Plus les variations de déplacement chimique sont importantes, plus les incertitudes sont faibles. La constante d'association de complexe  $\gamma$ CD – DOX est à peu près 10 fois plus grande que celles de  $\beta$ CD – DOX et de CRYSMEB – DOX. Cette différence de stabilité est due à la taille de la cavité de la cyclodextrine qui est plus importante dans la  $\gamma$ CD ( $d = 8 \text{ \AA}$ ) que dans la  $\beta$ CD et le CRYSMEB ( $d = 5 \text{ \AA}$ ). La  $\gamma$ CD forme des complexes plus stables que la  $\beta$ CD et le CRYSMEB avec des molécules assez volumineuses.

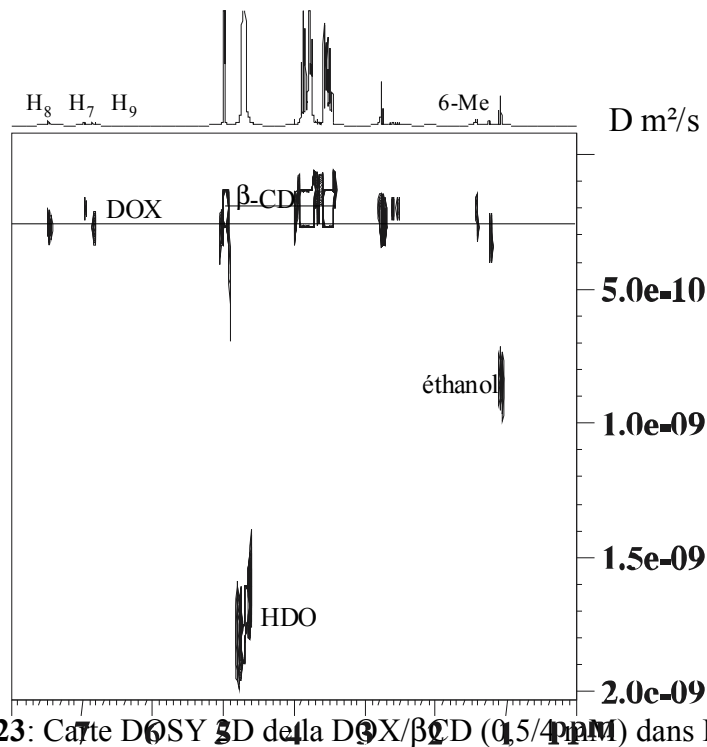
### 2. 3. 2. Mesure des coefficients de diffusion (DOSY)

La mesure du coefficient de diffusion des molécules en solution a été obtenue en utilisant la technique RMN DOSY. Cette mesure du coefficient de diffusion a été réalisée pour la DOX seule (figure 22), la  $\beta$ CD seule et le mélange des deux molécules (figure 23).



**Figure 22:** Carte DOSY 2D de la DOX (0,5 mM dans D<sub>2</sub>O).

Sur la carte DOSY de la DOX seule, on distingue trois molécules avec des coefficients de diffusion différents : la DOX, l'éthanol et l'eau.



**Figure 23:** Carte DOSY 2D de la DOX/β-CD (0,5/4 mM) dans D<sub>2</sub>O.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le coefficient de diffusion  $D$  dépend de la taille de la molécule donc de son rayon en assimilant la molécule à une sphère, mais aussi de la viscosité de la solution selon l'équation<sup>5</sup>:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_s}$$



Le coefficient de diffusion de la DOX en présence de CD peut donc être modifié suite au changement de viscosité de la solution dû à la présence de CD. Pour faire une correction du coefficient de diffusion selon la viscosité de la solution, nous avons mesuré pour chaque expérience le coefficient de diffusion du solvant, l'eau (HOD) et nous avons appliqué la correction suivante<sup>6</sup>:

$$D_{\text{cor}} = D_{\text{app}} \cdot$$

Où:  $D_{\text{app}}$  coefficient de diffusion mesuré pour CD ou DOX

$D_{\text{cor}}$  coefficient de diffusion corrigé pour CD ou DOX

$D_{\text{HOD(ref)}}$  coefficient de diffusion de l'eau pour la solution tampon pure

$D_{\text{HOD(app)}}$  coefficient de diffusion de l'eau en présence des molécules.

A partir des coefficients de diffusion corrigés, on détermine la proportion des molécules complexées selon l'équation :

$$\rho = \frac{(D_{\text{libre}} - D_{\text{obs}})}{(D_{\text{libre}} - D_{\text{complexe}})}$$

Différentes mesures de D ont été réalisées sur la DOX à 0,5 mM en présence de différentes concentrations en  $\beta$ -CD. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

[DOX] mM	[ $\beta$ CD] mM	$D_{\text{app}}$ ( $\beta$ CD)	$D_{\text{app}}$ (DOX)	$D_{\text{corr}}$ ( $\beta$ CD)	$D_{\text{corr}}$ (DOX)	$\rho$
0.5	0	---	3,78	----	3,57	—
0	12	2,37	----	2,28	----	
0,5	2	2.31	3.25	2.34	3.30	0.22
0,5	4	2.31	3.07	2.33	3.09	0.38
0,5	5	2.31	3.00	2.33	3.03	0.43
0,5	6	2.36	2.92	2.35	2.91	0.54
0,5	7	2.33	2.93	2.30	2.90	0.53
0,5	8	2.27	2.98	2.29	3.02	0.43
0,5	10	2.32	2.84	2.34	2.86	0.57

**Tableau 11:** Coefficients de diffusion des constituants de complexe  $\beta$ CD – DOX

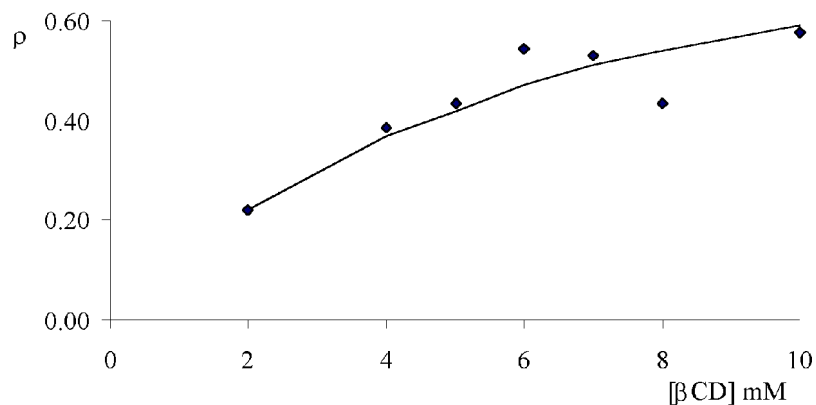
([DOX] = 0,5 mM, D en  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s,  $D_{\beta\text{CD seul}} = D_{\text{complexe}} = 2,28 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s) .

On observe qu'avec l'augmentation de la concentration de la  $\beta$ CD, le coefficient de diffusion de la doxycycline diminue et la proportion de complexe augmente. La proportion de complexe est fonction de la Ka du complexe selon l'équation :

$$\rho =$$

$$\rho =$$

Pour déterminer la constante d'association, nous avons utilisé l'équation précédente, tracé  $\rho = f([\text{CD}])$  (figure 24) et avec la méthode des moindres carrés, minimisé l'écart entre les valeurs de  $K_a$  théorique et expérimentale.

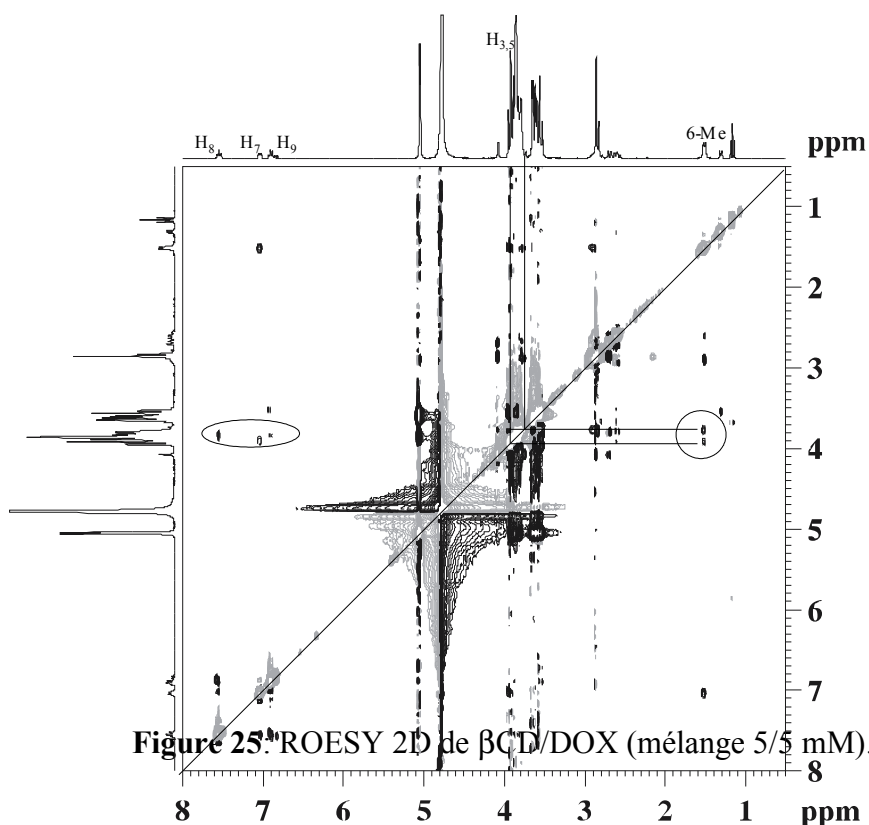


**Figure 24:** Variation de la proportion de la molécule complexée en fonction de la concentration de  $\beta$ CD.

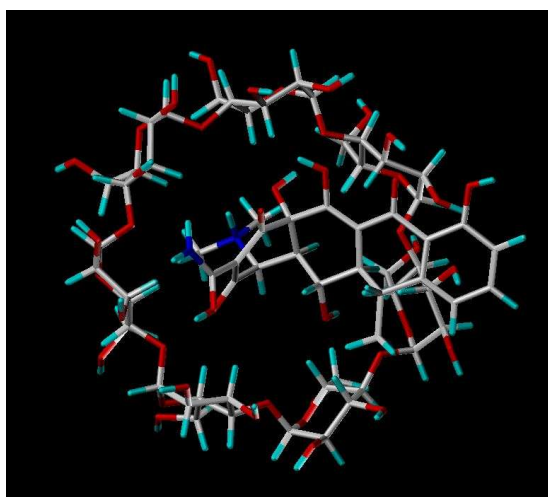
La constante d'association obtenue pour le complexe d'inclusion  $\beta$ CD-DOX est de l'ordre de  $148 \text{ M}^{-1}$ . Les mêmes procédures ont été réalisées pour les complexes  $\gamma$ CD – DOX ( $1540 \text{ M}^{-1}$ ) et CRYSMEB – DOX ( $150 \text{ M}^{-1}$ ) (voir annexe)

#### 2. 4. Etude de la géométrie du complexe par ROESY :

Afin de confirmer l'existence du complexe d'inclusion et que les variations de déplacements chimique ne résultent pas de simples interactions de surface, nous avons effectué l'expérience RMN ROESY 2D (figure 25) en préparant un mélange équimolaire de DOX –  $\beta$ CD.



Sur le ROESY, nous avons observé des interactions dipolaires entre les  $H_{3,5}$  de la  $\beta$ CD et les protons 6-Me, 7, 8, et 9 de la DOX (forme énol). Ces interactions confirment l'inclusion de DOX dans la cavité de  $\beta$ CD du côté du cycle aromatique de l'antibiotique. De plus, l'expérience ROESY nous a permis de proposer une hypothèse sur la forme géométrique du complexe d'inclusion formé (figure 26).



**Figure 26:** La forme géométrique du complexe  $\beta$ CD – DOX.

De plus, le proton 6-Me de la forme céto de DOX ne présente aucune interaction dipolaire (effet NOE) avec les protons  $H_{3,5}$  de  $\beta$ CD. Donc, on peut estimer que la forme céto de DOX ne s'inclut pas dans la cyclodextrine.

De même, cette expérience a été également réalisée pour confirmer l'inclusion de DOX dans la cavité de la  $\gamma$ CD et dans celle du CRYSMEB, et on a obtenu les mêmes tâches d'interactions dipolaires (voir annexe).

### **3. Complexation de la jasmone et du citronellol dans les $\alpha$ et $\beta$ -cyclodextrines natives :**

Les cyclodextrines sont connues pour former des complexes d'inclusion avec des molécules parfumées. La formation de ce type de complexe a pour objectif de réduire la volatilité du substrat et faire prolonger le temps de vie de son dégagement. Ainsi, une application des cyclodextrines dans le domaine du textile peut consister à capturer les odeurs désagréables comme celles induites par la transpiration ou à favoriser le dégagement contrôlé de parfum.

L'équipe du Professeur Morcellet a greffé des cyclodextrines sur des textiles, puis ces différents textiles modifiés et non modifiés (contrôles) ont été imprégnés avec différents parfums (citronellol, camphre, menthol, jasmone, benzyl acetate et geraniol)<sup>7</sup>. L'intensité de l'odeur de ces différents échantillons a été évaluée (test en aveugle). Une augmentation significative de la persistance de l'odeur a été observée sur les textiles greffés avec des cyclodextrines. Par exemple, dans le cas du citronellol, la détection de l'odeur est passée de 31 jours pour les textiles de contrôle à plus de 200 jours pour les textiles greffés CDs.

Pour expliquer cette persistance de l'odeur de citronellol observée en présence de cyclodextrine, on peut supposer que l'on a inclusion de la molécule de parfum dans la cavité de la cyclodextrine. Pour confirmer cette hypothèse et mettre en évidence une relation entre la rétention de l'odeur du parfum par le textile greffé CD et la stabilité du complexe d'inclusion, nous avons étudié l'inclusion de certains parfums (citronellol et jasmone) dans des cyclodextrines natives puis polymérisées. Ces études par RMN, nous ont permis de déterminer tout d'abord la stœchiométrie des complexes, puis leur stabilité par deux méthodes RMN basées sur les variations de déplacements chimique ou les variations de coefficients de diffusion.

#### **3. 1. Etude RMN des produits purs :**

Nous avons d'abord étudié la structure de la cis-jasmone (jas) et celle du citronellol (cit) par RMN dans l'acétone deutéré (figures 27 et 28).

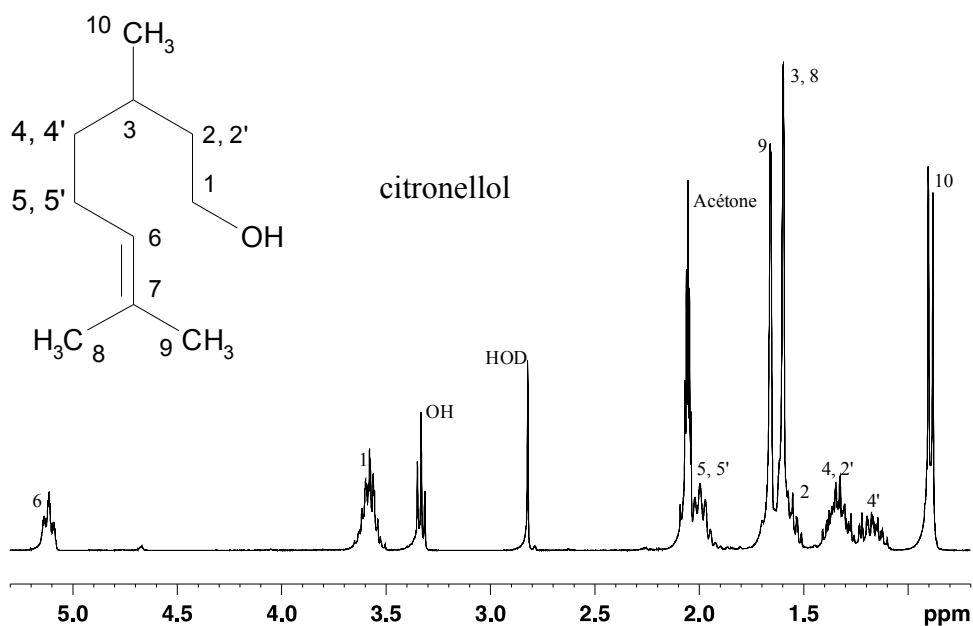


Figure 27: Spectre  $^1\text{H}$  du citronellol dans l'acétone  $\text{d}_6$ .

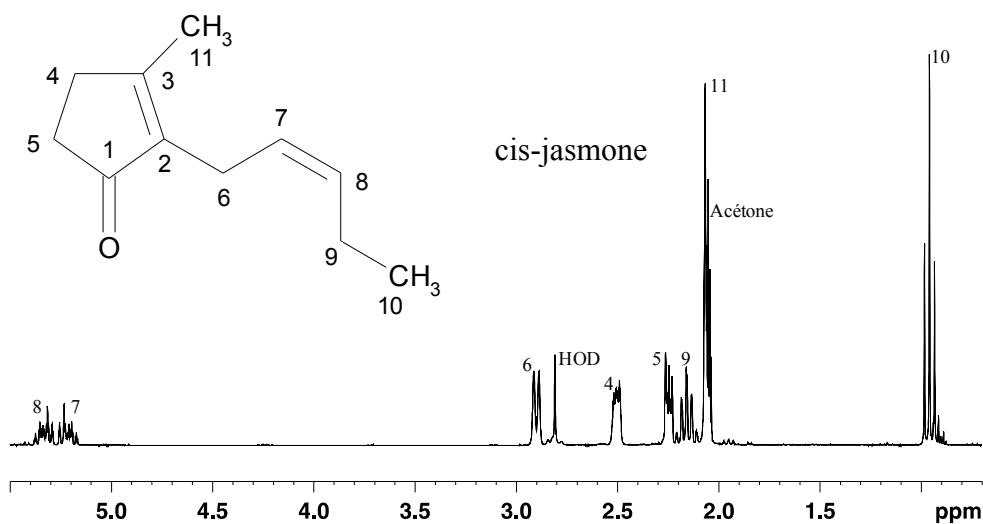
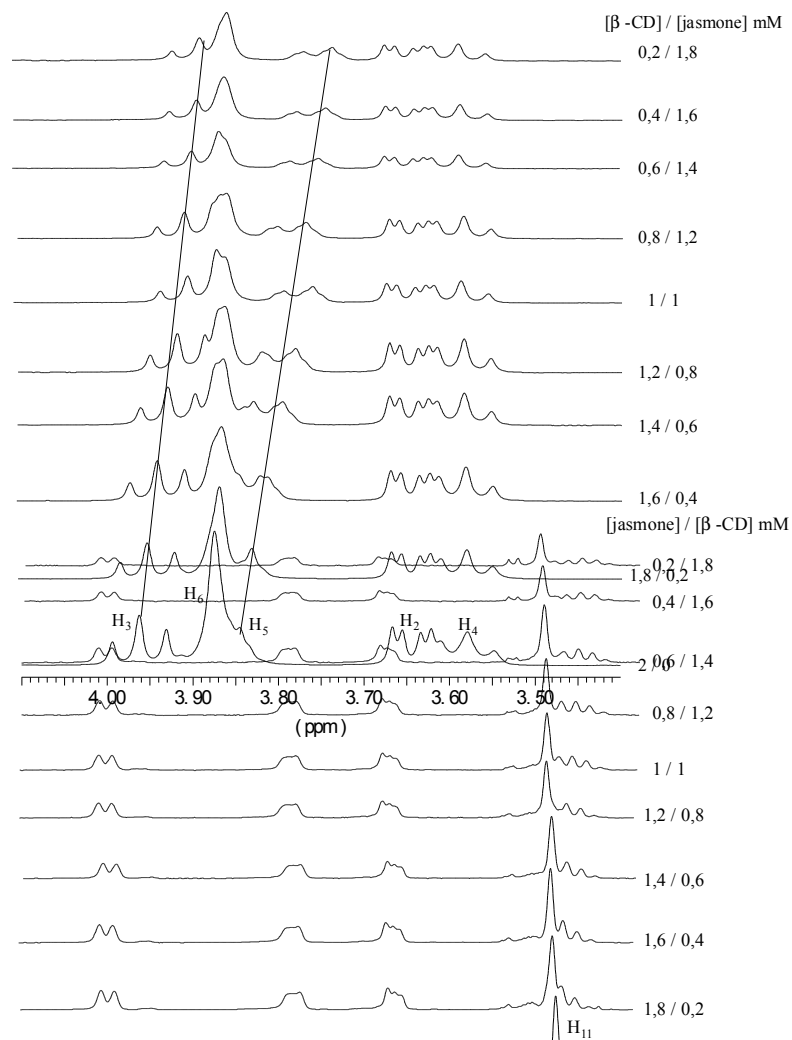


Figure 28: Spectre  $^1\text{H}$  de la cis-jasmone dans l'acétone  $\text{d}_6$ .

### 3.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe

Une série de spectres RMN  $^1\text{H}$  a été enregistrée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe d'inclusion  $\beta\text{CD}$  – jas en faisant varier les proportions des molécules dans le mélange avec une concentration totale de 2 mM (figure 29). Puis, nous avons suivi les variations de déplacement chimique des protons  $\text{H}_3$  de la  $\beta\text{CD}$  et  $\text{H}_{11}$  de la jasmone (tableau 12).

(a)



(b)

Figure 29. Spectres  $^1\text{H}$  du  $\beta\text{-CD}$  - jas en différentes proportions

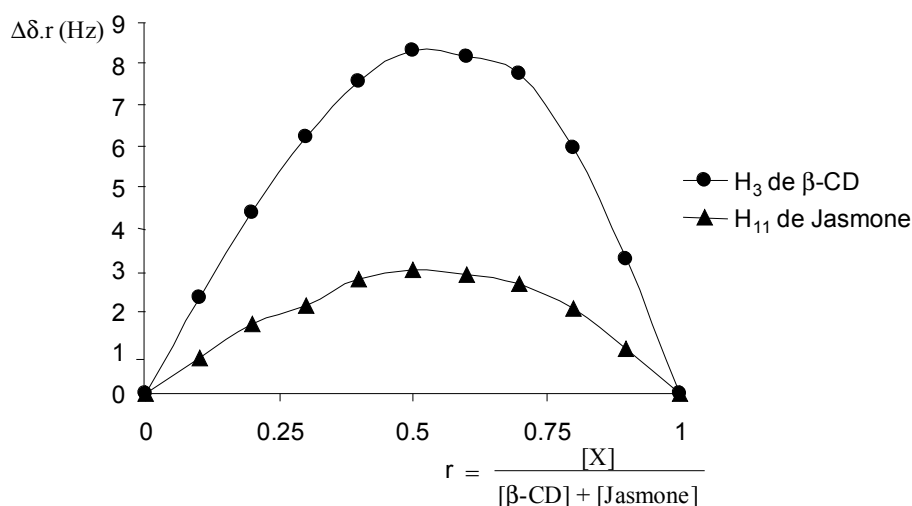
$[\beta\text{CD}]$ mM	$[\text{jas}]$ mM	$\tau$ (ppm)	$\Delta\delta$ (Hz) $\text{H}_3$ ( $\beta\text{CD}$ )	$\Delta\delta$ (Hz) $\text{H}_{11}$ (jas)
0	2	0	---	----
0,2	1,8	0,1	23,33	0,95
0,4	1,6	0,2	21,99	2,1
0,6	1,4	0,3	20,65	3,05
0,8	1,2	0,4	18,93	4,58
1	1	0,50	16,63	5,92
1,2	0,8	0,6	13,65	7,17
1,4	0,6	0,7	11,09	8,79
1,6	0,4	0,8	7,45	10,32
1,8	0,2	0,9	3,63	11,09

2	0	1	---	---
---	---	---	-----	-----

**Tableau 12:** Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration

$$(r = [X]/([\beta\text{CD}] + [\text{jas}]) ; X = \beta\text{CD} \text{ ou } \text{jas}).$$

Puis, on a tracé la courbe de Job pour le mélange  $\beta\text{CD} - \text{jas}$  (figure 30).



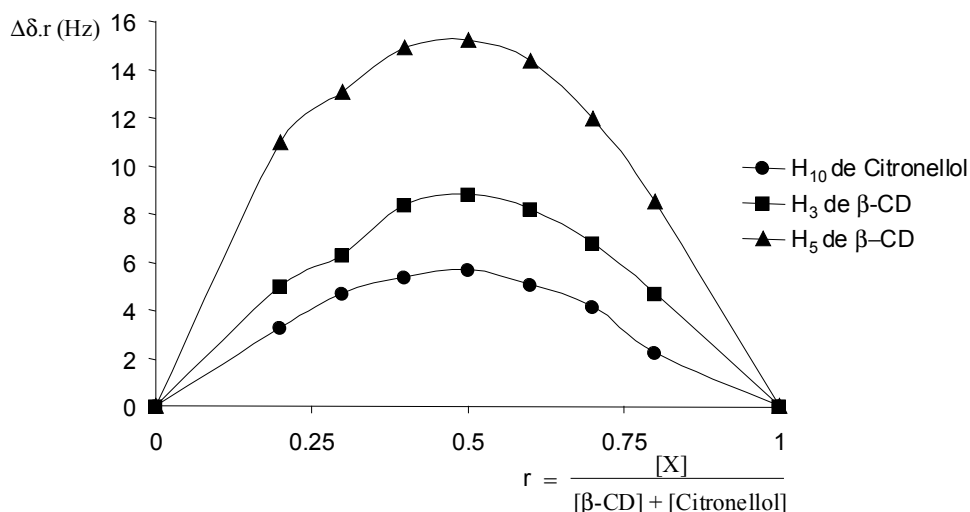
**Figure 30:** Courbe de Job de  $\beta\text{CD} - \text{jas}$  ( $X = \beta\text{CD}$  ou  $\text{jas}$ ).

D'après cette figure, nous avons déterminé le  $r_{\text{max}}$  qui est égal 0,5; cela signifie qu'il y a un complexe de type 1 :1.

On a étudié de la même façon la stœchiométrie du complexe  $\beta\text{CD} - \text{cit}$ . La courbe de Job (figure 31) a été rapportée en se basant sur les variations de déplacement chimique des protons  $\text{H}_{3,5}$  de la  $\beta\text{CD}$  et  $\text{H}_{10}$  du cit (tableau 13).

$[\beta\text{CD}]$ mM	$[\text{cit}]$ mM	r	$\Delta\delta$ (Hz) $\text{H}_5$ ( $\beta\text{CD}$ )	$\Delta\delta$ (Hz) $\text{H}_3$ ( $\beta\text{CD}$ )	$\Delta\delta$ (Hz) $\text{H}_{10}$ (cit)
2	0	0	----	----	----
1,6	0,4	0,2	13,72	6,22	16,28
1,4	0,6	0,3	18,66	8,97	15,55
1,2	0,8	0,4	24,78	13,91	13,36
1	1	0,5	30,37	17,56	11,34
0,8	1,2	0,6	35,86	20,49	8,42
0,6	1,4	0,7	39,7	22,5	5,85
0,4	1,6	0,8	42,44	23,42	2,74
0	2	1	----	----	----

**Tableau 13:** Variations de déplacement chimique pour différentes proportions  $\beta$ CD-cit.



**Figure 31:** Courbe de Job de  $\beta$ CD – cit ( X =  $\beta$ CD ou cit).

La stœchiométrie du complexe  $\beta$ CD – cit est de type 1:1. Le même résultat a été obtenu pour les complexes  $\alpha$ CD – jas et  $\alpha$ CD – cit.

### 3. 3. Détermination de la constante d'association (K<sub>a</sub>)

#### 3. 3. 1. Méthode de Scott

##### 3. 3. 1. 1. Inclusion de la jasmone avec les $\alpha$ et $\beta$ CD

La constante d'association du complexe d'inclusion a été déterminée en appliquant la méthode de Scott (chapitre 1). On a appliqué le traitement de l'équation de Benesi – Hildebrand pour le complexe de type 1:1.

Dans le cas du complexe  $\beta$ CD- jas, les variations de déplacement chimique pour les protons de la jasmone mesurées et reportées dans le tableau 14, ne sont pas très importantes. Cela va apporter une incertitude très importante pour la détermination de K<sub>a</sub> du complexe  $\beta$ CD – jas.

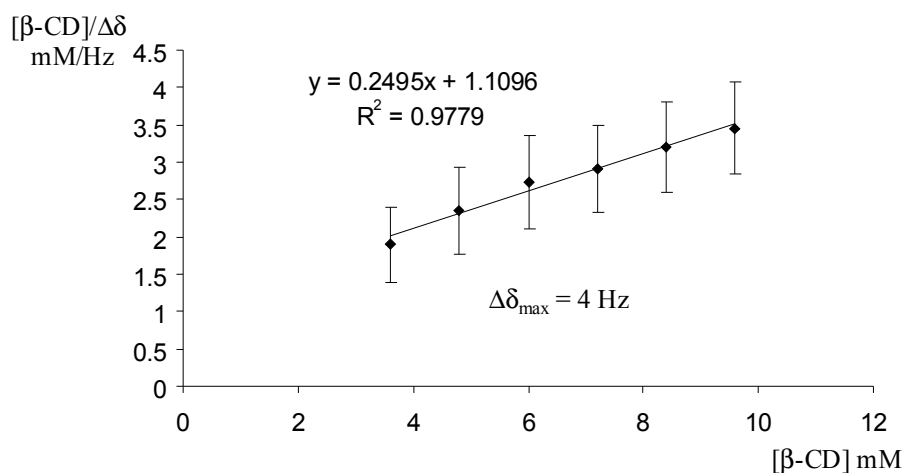
[ $\beta$ CD] mM	[jas] mM	$\delta$ (H <sub>10</sub> jas) (Hz)	$\Delta\delta$ (H <sub>10</sub> jas) (Hz)
------------------	----------	-------------------------------------	---



0	0,4	258,1	0
3,6	0,4	256,2	1,9
4,8	0,4	256,1	2,1
6	0,4	255,9	2,2
7,2	0,4	255,6	2,5
8,4	0,4	255,5	2,6
9,6	0,4	255,3	2,8

**Tableau 14:** Variations de déplacement chimique de H<sub>10</sub> de jas en fonction de la concentration de βCD native.

Selon les mêmes calculs que pour les complexes avec la DOX, en considérant que l'on a une erreur de 0,5 Hz sur la mesure de la variation de fréquence, on trace la courbe de Scott avec les barres d'erreur (figure 32). On obtient une constante d'association pour le complexe βCD – jas de  $224 \pm 102 \text{ M}^{-1}$ .



**Figure 32:** Courbe de Scott pour le complexe βCD – jas.

Pour le complexe αCD – jas, les variations de déplacement chimique de H<sub>11</sub> de la jasmonate libre et complexée sont également faibles (tableau 15), ce qui rend la valeur obtenue

pour la constante d'association peu fiable et avec une incertitude très importante ( $K_a = 180 \pm 34 \text{ M}^{-1}$ ).

$[\alpha\text{CD}]$ mM	$[\text{jas}]$ mM	$\delta (\text{H}_{11} \text{ jas})$ (Hz)	$\Delta\delta (\text{H}_{11} \text{ jas})$ (Hz)
0	0,4	641,2	0
2,4	0,4	644,3	3,2
3,6	0,4	645,0	3,8
4,8	0,4	645,6	4,5
6	0,4	646,3	5,2
7,2	0,4	647,4	6,2
8,4	0,4	647,2	6,0
9,6	0,4	647,4	6,2

**Tableau 15:** Variations de déplacement chimique de  $\text{H}_{11}$  de la jas en fonction de la concentration de  $\alpha\text{CD}$  native.

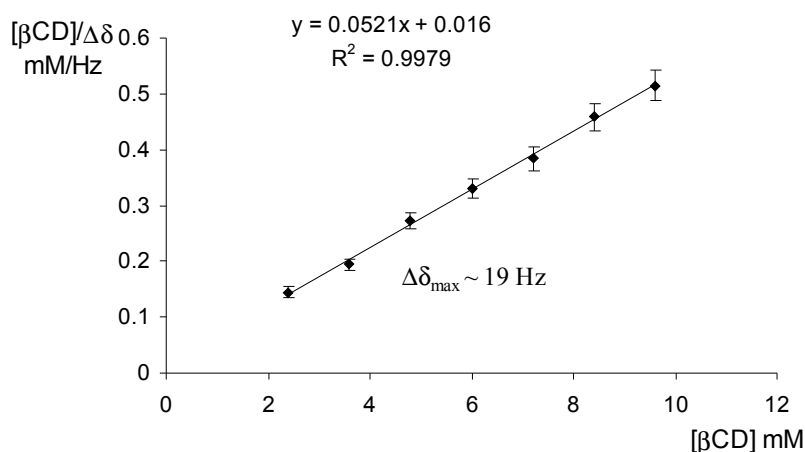
### 3. 3. 1. 2. Inclusion du citronellol avec les $\alpha$ et $\beta\text{CD}$

Dans le cas du complexe  $\beta\text{CD}$  – cit, nous avons étudié les variations de déplacement chimique du proton  $\text{H}_{10}$  du citronellol (tableau 16).

$[\beta\text{CD}]$ mM	$[\text{cit}]$ mM	$\delta (\text{H}_{10} \text{ de cit})$ (Hz)	$\Delta\delta$ (Hz)
0	0,5	241,5	0
2,4	0,5	258,0	16,6
3,6	0,5	260,0	18,5
4,8	0,5	259,1	17,6
6	0,5	259,7	18,2
7,2	0,5	260,3	18,8
8,4	0,5	259,8	18,3
9,6	0,5	260,1	18,6

**Tableau 16:** Variations de déplacement chimique de  $\text{H}_{10}$  du cit en fonction de la concentration de  $\beta\text{CD}$  native.

On observe, une forte variation ( $\Delta\delta$ ) de  $H_{10}$  en présence de  $\beta$ CD (16,6 Hz), puis  $\Delta\delta$  ne varie plus beaucoup en augmentant la concentration en  $\beta$ CD (18,6 Hz). Cette faible variation de fréquence du signal en présence de  $\beta$ CD, ne permet pas d'obtenir un résultat très fiable pour la détermination de la constante d'association malgré une valeur d'incertitude faible ( $K_a = 3246 \pm 187$ ) (figure 33).



**Figure 33:** Courbe de Scott du complexe  $\beta$ CD – cit.

Pour l'étude du complexe d'inclusion de  $\alpha$ CD – cit (tableau 17), on observe le même phénomène que pour la  $\beta$ CD, une forte variation du proton H-10 en présence de 2,4 mM de  $\alpha$ CD (33,5 Hz), puis une variation moins importante en augmentant la concentration en  $\alpha$ CD (jusqu'à 46,4 Hz). Mais pour ce complexe, les variations de déplacement chimique étant plus importantes, la détermination de la constante d'association est plus précise,  $K_a = 713 \text{ M}^{-1}$  avec une incertitude négligeable.

[ $\alpha$ CD] mM	[cit] mM	$\delta$ ( $H_{10}$ de cit) (Hz)	$\Delta\delta$ (Hz)
0	0,5	267,9	0
2,4	0,5	301,4	33,5
3,6	0,5	306,7	38,8
4,8	0,5	309,5	41,6
6	0,5	311,5	43,6
7,2	0,5	313,5	45,6
8,4	0,5	313,5	45,6
9,6	0,5	314,3	46,4

**Tableau 17:** Variations de déplacement chimique de  $H_{10}$  du cit en fonction de la concentration de  $\alpha$ CD native.

On observe que la détermination de la  $K_a$  par la méthode de Scott est très imprécise lorsque les variations de déplacement chimique sont faibles. Cela peut être dû à la structure de la molécule incluse ou à une association faible des deux molécules du complexe.

Si l'inclusion de certaines molécules dans la cavité des CDs perturbe faiblement les déplacements chimiques, l'incidence au niveau de la mobilité de cette molécule complexée devrait toujours être observable. En partant de ce principe, nous nous sommes intéressés aux complexes d'inclusion avec la jasmone et du citronellol à partir des mesures de coefficient de diffusion et du DOSY.

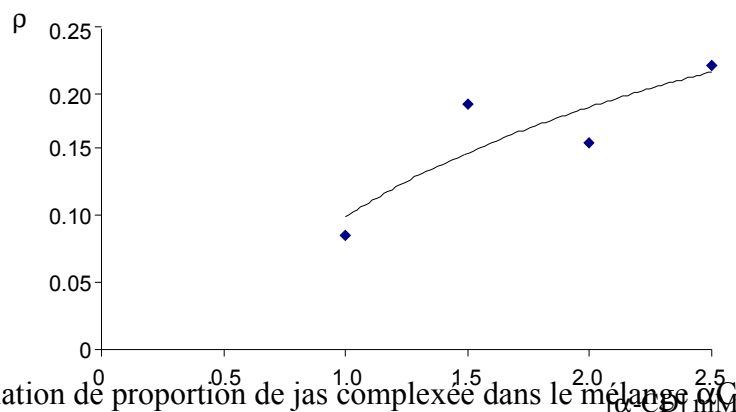
### 3. 3. 2. Mesure des coefficients de diffusion (DOSY):

Selon le même protocole suivi pour les complexes avec la doxycycline hydrochlorate décrit précédemment, à partir des mesures de coefficient de diffusion de la molécule invitée et de la CD en différentes proportions, on calcule la fraction  $\rho$  de molécule complexée.

[jas] mM	[ $\alpha$ CD] mM	$D_{app \alpha CD}$	$D_{corr \alpha CD}$	$D_{app jas}$	$D_{corr jas}$	$\rho$
1	0	-	-	5,67	5,56	-
0	2	2,63	2,57	-	-	-
1	1	2,48	2,62	5,28	5,28	0,09
1	1,5	2,55	2,55	4,98	4,98	0,19
1	2	2,50	2,50	5,07	5,07	0,16
1	2,5	2,59	2,50	4,89	4,89	0,22

**Tableau 18:** Coefficients de diffusion de  $\alpha$ CD et jasmone dans différents mélanges  
(D en  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s)

Pour une même concentration en jasmone, on observe une augmentation de proportion de complexe pour une concentration croissante en cyclodextrine. A partir de la représentation graphique (figure 34) de  $\rho = f([CD])$ , on en déduit une valeur moyenne de constante d'association de l'ordre de  $130 \text{ M}^{-1}$  pour le complexe  $\alpha$ CD – jas.



**Figure 34:** Variation de proportion de jas complexée dans le mélange  $\alpha$ CD – jas en fonction de la concentration de  $\alpha$ CD.

Les mêmes études (DOSY) des coefficients de diffusion ont été réalisées pour les différents systèmes étudiés et les résultats sont regroupés dans le tableau 19.

Complexe d'inclusion	$K_a$ $M^{-1}$ (DOSY)	$K_a$ $M^{-1}$ (Scott)	$K_a$ $M^{-1}$ (UV)
$\beta$ CD – jas	1264	360	-
$\alpha$ CD – jas	130	180	-
$\beta$ CD – cit	1170	3246	1137
$\alpha$ CD – cit	792	713	756

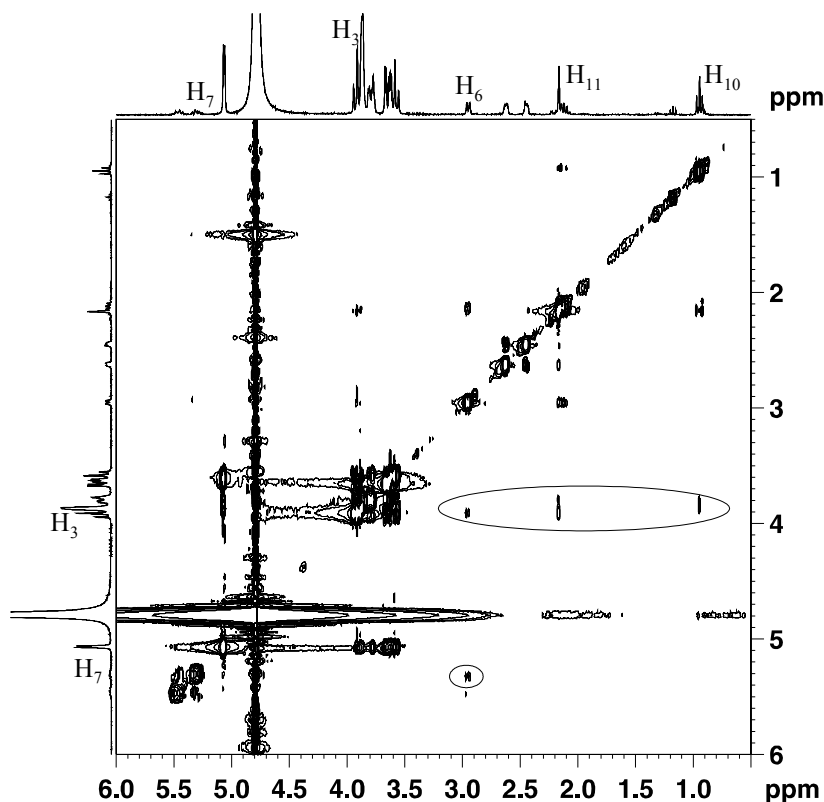
**Tableau 19:** Constantes d'association de différents complexes d'inclusion.

Dans la dernière colonne du tableau 19, les constantes d'association des complexes d'inclusion formés avec le citronellol ont été déterminées par S. Fourmentin (Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement, Université du Littoral - Côte d'Opale) en utilisant l'UV-visible. Elle a obtenu des valeurs très proches de celles déterminées par DOSY. Cela prouve la validité de l'expérience DOSY pour déterminer la constante d'association des complexes d'inclusion des molécules linéaires ayant des variations de déplacement chimique très faibles.

### 3.4. Etude de la géométrie des complexes par ROESY

Pour avoir plus d'informations sur la géométrie des différents complexes, nous avons observé les interactions dipolaires entre la molécules invitée et la partie CD avec l'expérience ROESY. Ainsi pour le complexe  $\beta$ CD – jas, des interactions dipolaires entre les protons H-6, 10, 11 de la jasmone et les protons H-3 de la  $\beta$ CD ont été mis en évidence sur la carte ROESY

(Figure 35). Mais pour avoir un peu plus d'informations sur ce complexe, nous avons déterminé les distances entre les protons de la jasmone et les protons H-3 de la  $\beta$ CD.



**Figure 35:** ROESY 2D de  $\beta$ CD – jas (mélange 1 / 1 mM).

Les corrélations NOEs (Nuclear Overhauser effect) sont des corrélations dipolaires entre deux protons situés à proximité dans l'espace<sup>8</sup>. Plus la distance entre deux noyaux est grande, plus l'intensité de la corrélation NOEs est faible. Pour qu'il y ait corrélation, la distance ne doit pas dépasser 5 Å. L'effet NOE entre deux spins AB est fonction de l'inverse de la distance  $r_{AB}$  à la puissance six et d'autres paramètres inconnus:

$$\eta_{A\{B\}} = K r_{AB}^{-6} \tau$$

Avec :  $\eta_{A\{B\}}$  = effet NOE entre le spin A et B.

$r_{AB}$  = distance entre deux protons A et B

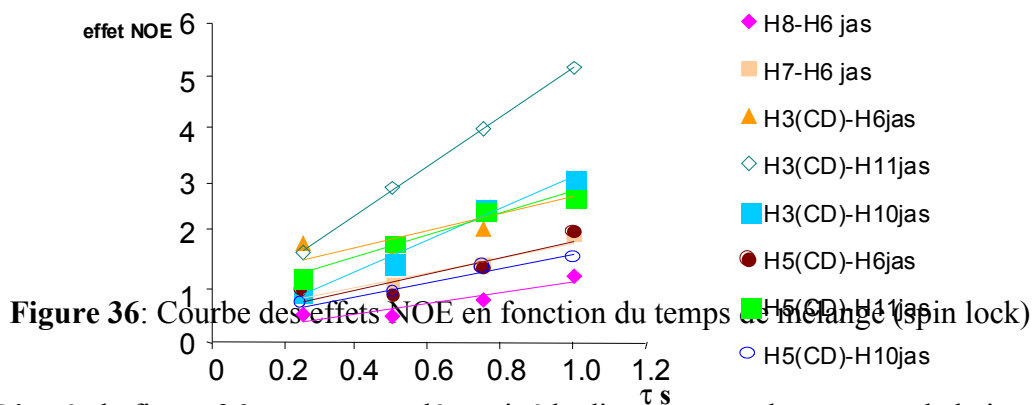
K = constante de proportionnalité.

$\tau$  = temps de corrélation (ou temps de mélange).

Lorsqu'on trace  $\eta_{A\{B\}} = f(\tau)$ , on obtient une droite avec une pente proportionnelle à  $r_{AB}^{-6}$ . Si on mesure l'effet NOE entre deux autres protons X et Y, on obtiendra une autre droite de pente proportionnelle à  $r_{XY}^{-6}$ . Si on connaît la distance AB, on peut déterminer la distance XY.

$$\begin{aligned} \text{Pente AB} &= \frac{K}{r_{AB}^6} \\ \text{Pente XY} &= \frac{K}{r_{XY}^6} \end{aligned} \quad \Longrightarrow \quad r_{XY} = r_{AB} \cdot \left( \frac{\text{Pente AB}}{\text{Pente XY}} \right)^{1/6}$$

Selon ce principe, quatre expériences ROESY ont été réalisées sur le même mélange  $\beta$ CD – jas (1/1 mM) dans les mêmes conditions en faisant varier le temps de mélange (200 ms, 500 ms, 800 ms et 1s). L'intensité des taches des différentes corrélations dipolaires a été mesurée par rapport à la diagonale dans les différentes expériences ROESY en prenant la distance entre les protons H<sub>6</sub> et H<sub>7</sub> de la jasmonate comme référence (2,84 Å). Ces différentes mesures sont présentées sur le graphique figure 36. On observe des droites pour chaque interaction dipolaire avec des pentes différentes<sup>9</sup>.

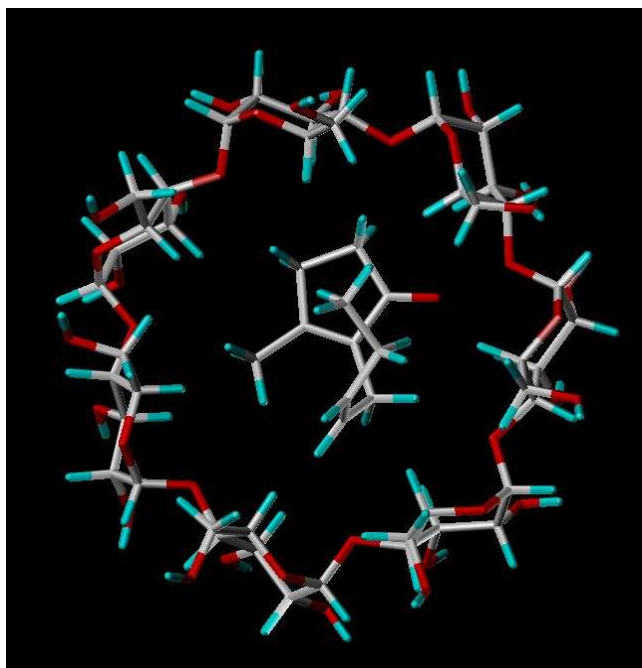


**Figure 36:** Courbe des effets NOE en fonction du temps de mélange (spin lock)

D'après la figure 36, nous avons déterminé la distance entre les protons de la jasmonate et ceux de la cyclodextrine (tableau 20).

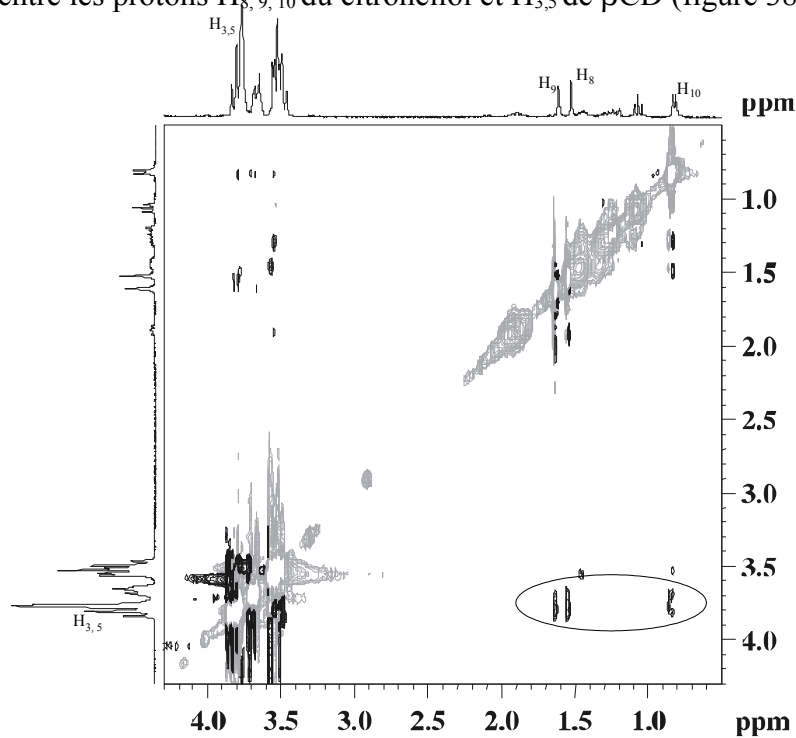
proton x ( $\beta$ CD) – proton y (jas)	$r_{xy}$ (Å)
H <sub>3</sub> – H <sub>6</sub>	2,77
H <sub>3</sub> – H <sub>10</sub>	2,49
H <sub>3</sub> – H <sub>11</sub>	2,32
H <sub>5</sub> – H <sub>6</sub>	2,80
H <sub>5</sub> – H <sub>10</sub>	2,86
H <sub>5</sub> – H <sub>11</sub>	2,66

**Tableau 20:** Distance entre les protons de la Jasmane et ceux de la  $\beta$ CD



**Figure 37:** Forme géométrique du complexe  $\beta$ CD – Jas.

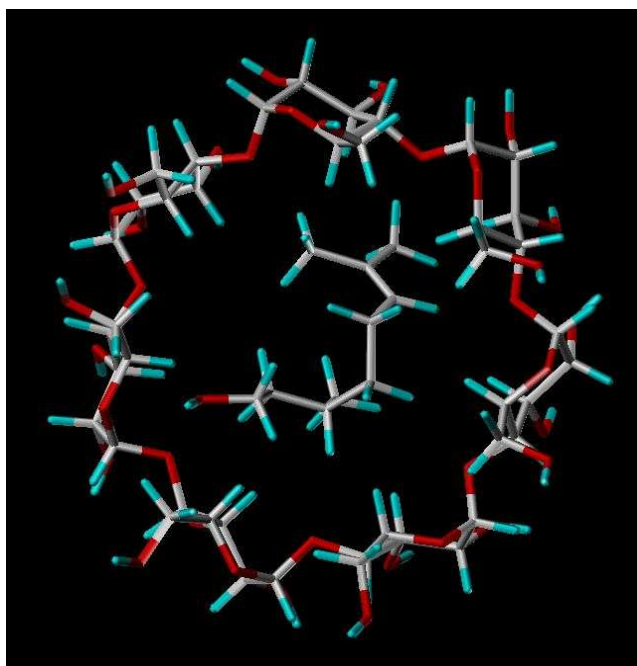
De même, la complexation du citronellol avec la  $\beta$ CD a été confirmée par l'expérience ROESY 2D. D'après cette expérience, nous avons constaté qu'il y a des interactions dipolaires entre les protons  $H_{8, 9, 10}$  du citronellol et  $H_{3,5}$  de  $\beta$ CD (figure 38).



**Figure 38:** ROESY 2D de  $\beta$ CD – cit (mélange 1/1 mM).



D'après ces résultats, on peut proposer la géométrie d'inclusion suivante.



**Figure 39:** Forme géométrique du complexe  $\beta$ CD – cit.

#### 4. Comparaison des résultats obtenus :

Les résultats des mesures de constante d'association pour les différents complexes par les différentes méthodes RMN, sont résumés dans le tableau 21.

Complexe	$K_a \text{ M}^{-1}$ (Scott)	$K_a \text{ M}^{-1}$ (DOSY)
DOX – $\beta$ CD	188	148
DOX – CRYSMEB	150	164
DOX – $\gamma$ CD	1820	1540
jas – $\alpha$ CD	180	128
jas – $\beta$ CD	360	1264
cit – $\alpha$ CD	713	792
cit – $\beta$ CD	3246	1170

**Tableau 21:** Les constantes d'associations déterminées par Scott et DOSY.

Si l'on compare tout d'abord les deux méthodes RMN, on peut constater qu'elles donnent des résultats du même ordre de grandeur dans la plupart des complexes, sauf pour les complexes cit –  $\beta$ CD et jas –  $\beta$ CD. Les variations de déplacement étant très faibles pour ces derniers, la détermination de  $K_a$  par la méthode de Scott est moins fiable que la méthode DOSY.

D'après les résultats obtenus par DOSY pour les différents complexes, on remarque des constantes d'association du même ordre de grandeur (forte affinité) pour les complexes  $\gamma$ CD - DOX,  $\beta$ CD - jas et  $\beta$ CD - cit. On retrouve, pour les affinités plus faibles, les complexes des mêmes molécules dans les cyclodextrines de taille de cavité inférieure,  $\beta$ CD - DOX,  $\alpha$ CD - jas, et  $\alpha$ CD - cit. Ceci met bien en évidence la complémentarité entre la taille des molécules incluses et la taille de la cavité de la CD. Selon Szejtli, on peut avoir des complexes d'inclusion stables avec la  $\beta$ CD, seulement si la masse moléculaire de la molécule incluse est inférieure à 400 g/mol<sup>10</sup>.

Cela montre par conséquent l'importance de bien choisir le type cyclodextrine selon la molécule que l'on veut inclure.

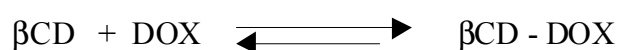
### 5. Influence de la température sur la stabilité du complexe d'inclusion:

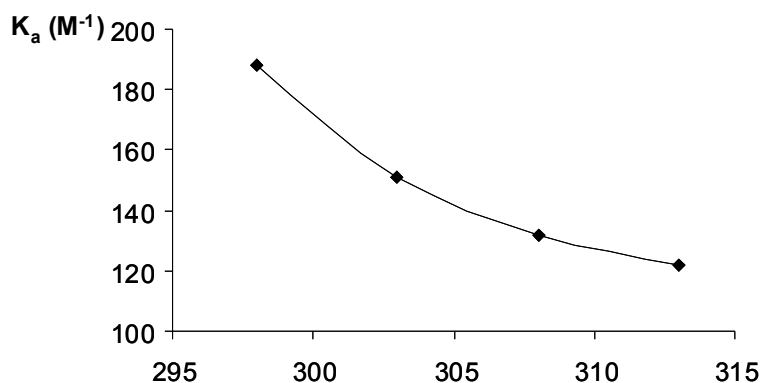
La stabilité du complexe d'inclusion est largement dépendante de la température du milieu. Nous avons étudié l'influence de l'augmentation de cette dernière sur la constante d'association du complexe d'inclusion  $\beta$ CD - DOX, en déterminant la constante d'association ( $K_a$ ) du complexe par la méthode de Scott à différentes températures (tableau 22).

T en K	$K_a$ en M <sup>-1</sup>
298	188
303	151
308	132
313	122

**Tableau 22:** Constantes d'association du complexe  $\beta$ CD - DOX à différentes températures.

Nous avons constaté que l'augmentation de la température fait diminuer la stabilité du complexe et par suite assure la libération de DOX et déplace l'équilibre dans le sens de dissociation du complexe (figure 40).





**Figure 40:** Courbe de variation de  $K_a$  en fonction de la température.

## 6. Conclusion

Après avoir déterminé par RMN la structure des différentes cyclodextrines monomères ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ CD, CRYSMEB), nous avons étudié la capacité d'inclusion de ces cyclodextrines vis-à-vis de la DOX, la jasmone et le citronellol. La stœchiométrie des différents complexes d'inclusion a été déterminée par l'application de la méthode de Job, et on a déduit que ces molécules forment des complexes d'inclusion de type 1:1. Les constantes d'association de différents complexes ont été déterminées soit par la variation de déplacement chimique (méthode de Scott), soit par la mesure des coefficients de diffusion (DOSY). Nous avons montré que l'expérience DOSY est un outil valable pour déterminer la constante d'association du complexe d'inclusion, même lorsque l'interaction est faible (c'est-à-dire si la constante d'association est faible).

Pour déterminer la constante d'association, la méthode DOSY peut être une alternance à la méthode RMN classique basée sur les variations de déplacement chimique (Scott). En effet, cette dernière n'est pas toujours très fiable dans le cas où les variations de déplacements chimiques sont faibles, la détermination graphique de  $K_a$  n'est pas très précise.

Pour la méthode DOSY, les meilleures conditions pour déterminer  $K_a$  sont d'avoir une proportion de molécule complexée entre 0,2 et 0,8.

Enfin, des hypothèses de géométries des complexes d'inclusion ont été proposées sur la base des résultats d'expériences RMN ROESY 2 D.

## Références

1. W. Loh, C. A. Tonegutti, P. L. O. Volpe, *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, 89, 113, 1993.
2. A. C. S. Lino, W. Loh, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 36, 267 – 277, 2000.
3. Fiche de description de CRYSMEB, *Industrie Roquette*.
4. W. Naidong, S. Hua, E. Roets, R. Busson, J. Hoognartens, *International Journal of Pharmaceutics*, 96, 13 – 21, 1993.
5. Leite. R. A, Lino. A C. S, Takahata. Y, *Journal of Molecular Structure*, 644, 49 – 53, 2003.
6. J. Danielson, J. Jarvet, P. Damberg, A Gräslund, *Biochemistry*, 43, 6261 – 6269, 2004.
7. B. Martel, M. Morcellet, D. Ruffin, F. Vinet, M. Weltrowski, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, 439-442, 2002.
8. Cavanagh. J, Fairbrother. W. J, Palmer. A. G, *Protein NMR Spectroscopy principles and practice, Academic Press, New York*, 1996.
9. J. W. Keepers, T. L. James, *J. Magn. Reson*, 57, 404 – 426, 1984.
10. A - J. Szejtli, *Pharm. Technol. Int*, 2, 20 – 22, 1991.  
B - J. Szejtli, *Pharm. Technol. Int*, 3, 16 – 24, 1991.
11. L. Fielding, *Tetrahedron*, 56, 6151 – 6170, 2000.

## **Chapitre IV**

# **Etudes des polymères de cyclodextrines solubles**

### **Introduction**

Le pouvoir complexant des cyclodextrines et leur capacité à solubiliser les composés inclus rendent l'utilisation de ces substances naturelles très intéressante dans de nombreux domaines comme par exemple dans les systèmes à libération retardée. Cependant, l'hydrosolubilité plus ou moins importante des cyclodextrines natives pose problème lorsqu'elles doivent être utilisées en milieu aqueux.

Une solution à ce problème est de polymériser ou d'incorporer ces cyclodextrines dans des structures macromoléculaires. Celles-ci permettent de contrôler la solubilité des cyclodextrines sans nécessairement obstruer l'accès à leur cavité. Dans de telles structures polymères, les propriétés des cyclodextrines peuvent être différentes (constante d'association, etc) de celles des CDs natives.

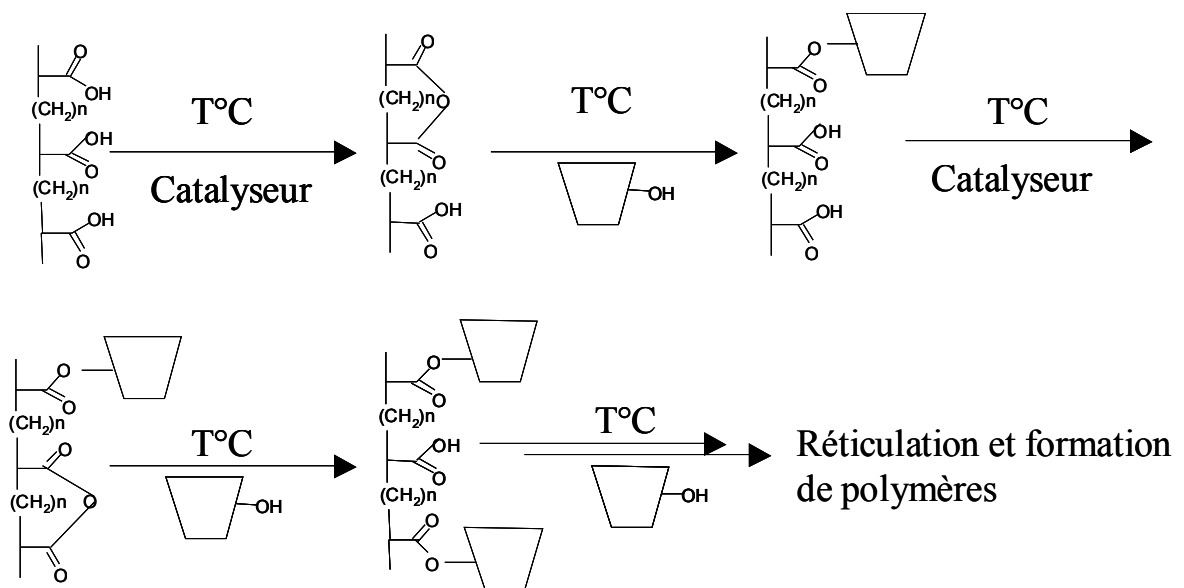
On appelle polymère de cyclodextrine, toute molécule contenant au moins deux unités de cyclodextrine liées de manière covalente. Ces polymères peuvent se présenter selon les conditions de synthèse, soit sous forme de gels, soit sous forme de polymères hydrosolubles. La littérature décrit diverses approches de la synthèse des polymères de cyclodextrines.

Les cyclodextrines peuvent être soit polymérisées par réaction des fonctions hydroxyles avec différentes molécules fonctionnelles<sup>1-4</sup> en présence d'un agent réticulant, ou alors fixées sur un support préexistant<sup>5</sup>. L'enjeu de la synthèse de ces polymères est de ne pas bloquer l'accès à la cavité de la cyclodextrine, afin de conserver ses propriétés de complexation.

## 1. Stratégie de synthèse des polymères de cyclodextrine:

Le LCOM ayant une expérience importante dans ce domaine, Martel et al<sup>6</sup>. ont utilisé l'acide polycarboxylique (PCA) comme agent réticulant pour synthétiser des polymères de cyclodextrines. L'acide polycarboxylique est utilisé comme une chaîne qui relie les groupements de cyclodextrines entre eux.

Une réaction d'estérification se passe entre les fonctions acides de l'agent réticulant et les fonctions hydroxyles des cyclodextrines. Cette réaction se fait à une température de l'ordre de 140 °C dans l'eau comme solvant. Cette réaction se produit selon le schéma suivant :



**Figure 41:** Réaction de polycondensation entre PCA et les CDs pour l'obtention de polymères.

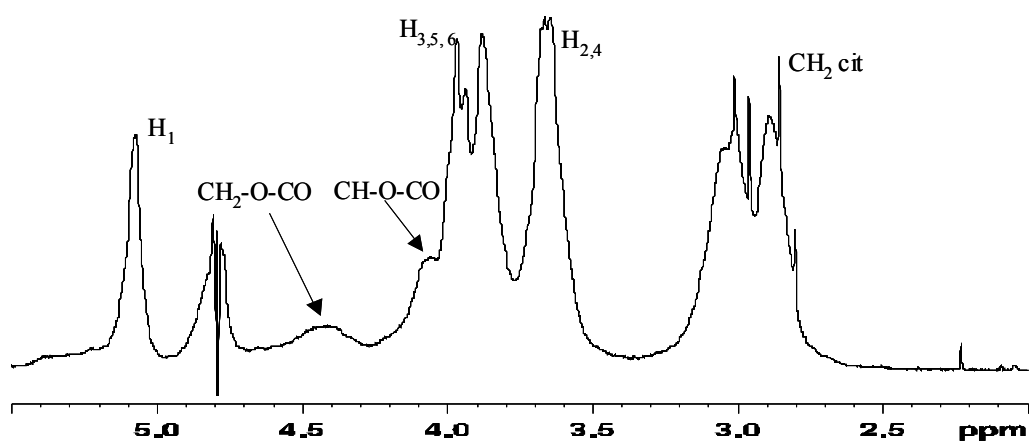
La synthèse du polymère se décompose en quatre parties qui sont exposées dans la partie expérimentale. Le polymère de cyclodextrine que nous l'avons étudié est à base d'acide citrique (agent réticulant). Il faut signaler que le polymère de  $\beta$ -cyclodextrine à base d'acide citrique est très soluble dans l'eau (100 g/ 100 ml).

## 2. Etudes RMN de différents polymères de cyclodextrines

Par RMN, nous avons étudié la structure des différents polymères de cyclodextrines à base d'acide citrique (poly $\beta$ CD, poly $\gamma$ CD, poly $\alpha$ CD, polyCRYSMEB), déterminé le taux de réticulation de ces polymères et estimé la quantité d'unité cyclodextrine dans 10 mg de chacun de ces polymères.

### 2. 1. Détermination de la structure des polymères par RMN (1D et 2D)

La combinaison entre les techniques RMN (1D et 2D) nous a permis de déterminer la structure du poly $\beta$ CD.



**Figure 42:** Spectre  $^1\text{H}$  avec présaturation de poly $\beta$ CD soluble dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

Par comparaison des spectres  $^1\text{H}$  de la  $\beta$ CD native (figure 6) et du poly $\beta$ CD (figure 42), on attribue les protons de l'unité glucosidique de la cyclodextrine peu ou pas perturbée par la réaction de polymérisation. Entre 2,8 et 3,1 ppm, on observe les  $\text{CH}_2$  de la chaîne acide citrique. Sur le spectre  $^{13}\text{C}$  J-mod du poly $\beta$ CD (figure 43), on retrouve les carbones de la partie CD et les carbones correspondants à la partie acide citrique avec les  $\text{CH}_2$  vers 44 ppm et deux familles de carbones quaternaires : fonction ester (vers 170 ppm) et aliphatiques (vers 75 ppm). Sur la carte HSQC\_dept (figure 44), on observe en plus des corrélations scalaires  $^1\text{J}$  pour la citrate et la partie cyclodextrine, deux taches de corrélations supplémentaires pour un  $\text{CH}_2$  (vers 4,5 ppm) et en CH (vers 4,1 ppm). Ces résonances correspondent à des protons de la partie glucosidique ayant subi une forte variation de déplacement chimique due au branchement de la chaîne acide citrique. On observe que ce branchement peut se faire au



niveau d'un carbone secondaire (CH<sub>2</sub> en position 6 du glucose), mais aussi pour des carbones tertiaires (type CH en position 2 ou 3 du glucose). Tous les déplacements chimiques sont regroupés dans le tableau 24.

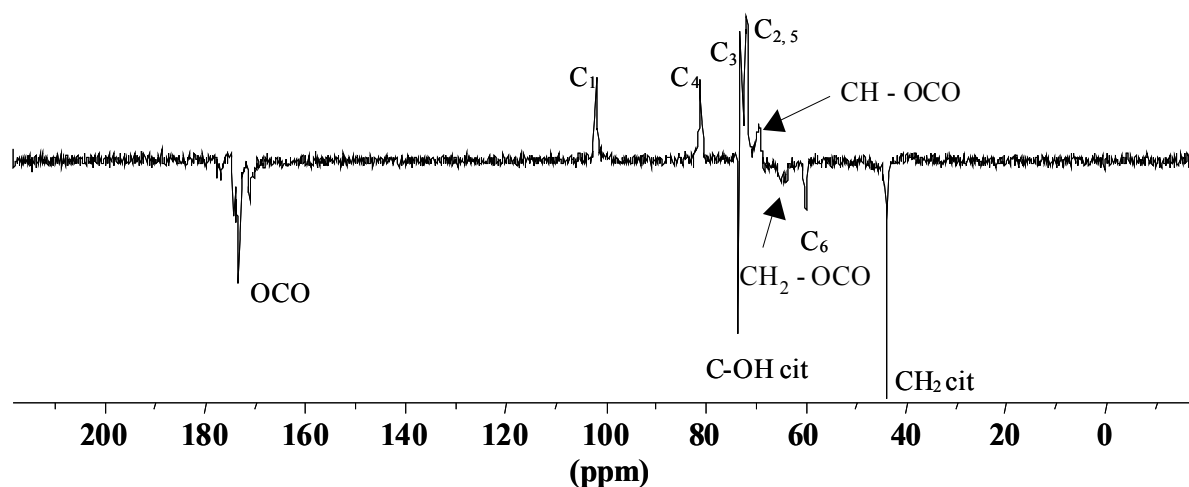


Figure 43: Spectre <sup>13</sup>C J-mod de polyβCD dans D<sub>2</sub>O.

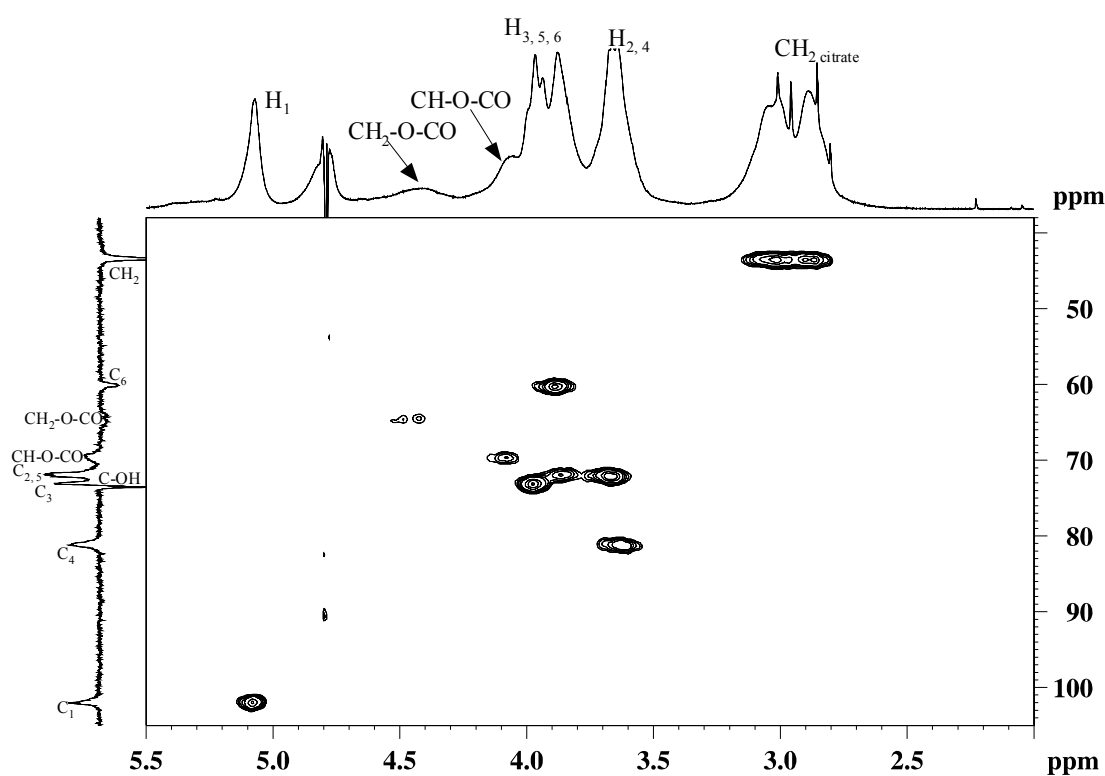


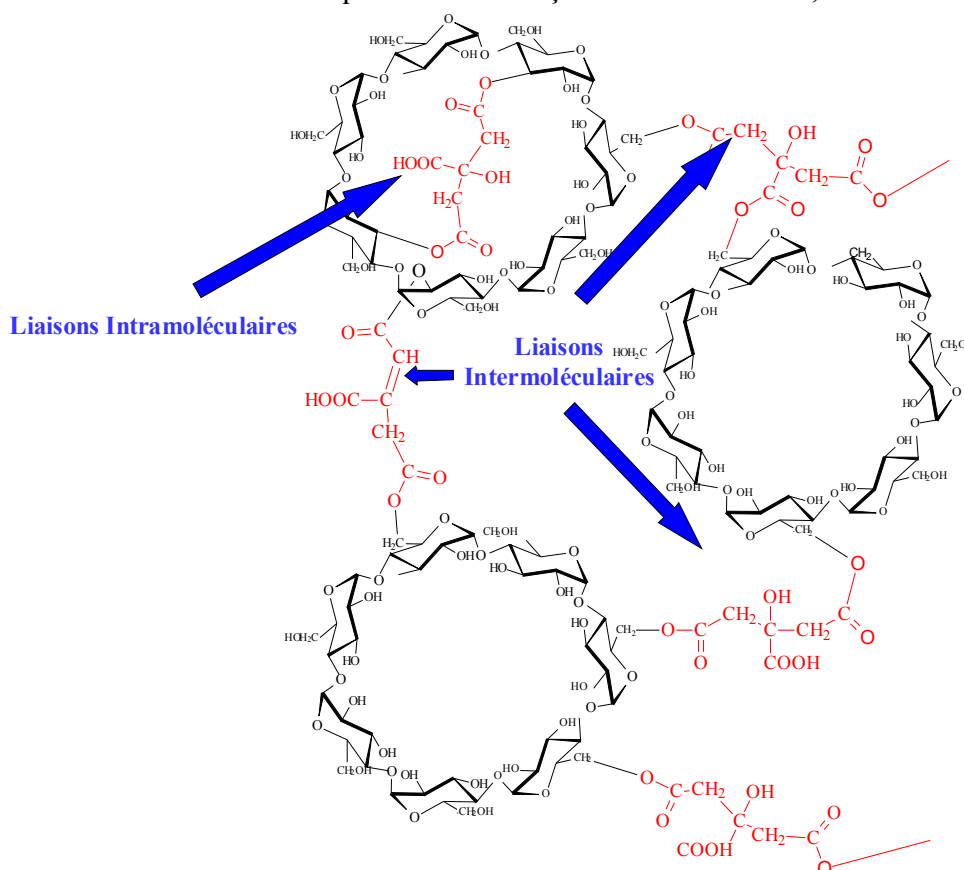
Figure 44: Carte HSQC\_DEPT de polyβCD dans D<sub>2</sub>O.

<sup>1</sup> H	δ ppm	<sup>13</sup> C	δ ppm
1	5,07	1	102,12

2	3,67	2	71,20
3	3,96	3	73,13
4	3,63	4	81,19
5	3,86	5	71,79
6	3,88	6	60,18
CH <sub>2</sub> - O - CO	4,47	CH <sub>2</sub> - O - CO	64,58
CH <sub>2</sub> (citrate)	2,90 et 3.05	CH <sub>2</sub> (citrate)	43,65
CH - O - CO	4,08	CH - O - CO	69,70
		C - OH (citrate)	73,64
		O - CO	173

**Tableau 23:** Attribution proton et carbone de poly $\beta$ CD dans D<sub>2</sub>O.

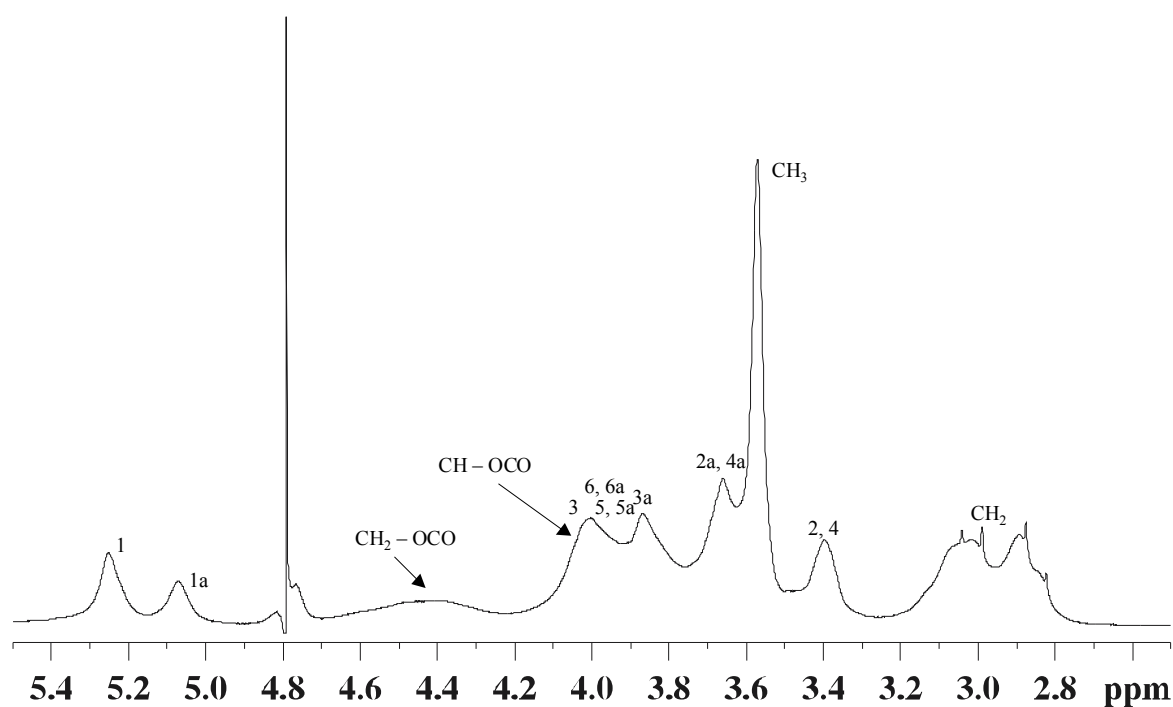
A partir de ces différentes informations, on peut proposer une structure du polymère cyclodextrine à base d'acide citrique (figure 45) : avec des groupes cyclodextrines reliés entre eux par des chaînes d'acide citrique soit d'une façon intermoléculaire, soit intramoléculaire.



**Figure 45:** Schéma représentatif du poly $\beta$ CD.

Tous les signaux correspondants aux polymères sont larges sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , ceci à cause de la faible mobilité de la molécule. Les résonances fines observées à 2,85 et 3,00 ppm correspondent aux résonances caractéristiques de l'acide citrique libre. On peut donc en déduire qu'une partie de l'acide citrique n'a pas réagi avec les unités glucosidiques et/ou n'a pas été éliminée au cours du lavage.

Le polyCRYSMEB est synthétisé par une réaction de polycondensation du CRYSMEB avec l'acide citrique comme agent réticulant. Son schéma de synthèse est comparable à celui du polymère de cyclodextrine à base d'acide citrique. Comme pour le poly $\beta$ CD, sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du polyCRYSMEB (figure 46), on retrouve les résonances correspondantes au CRYSMEB avec les deux types de sous unité glucosidique substituée et non substituée par le méthyl en position 2. De plus, on a identifié les groupements  $\text{CH}_2$  de l'acide citrique lié ainsi que les protons  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_2$  de la CD liés à des fonctions esters.



**Figure 46:** Spectre  $^1\text{H}$  du polyCRYSMEB dans  $\text{D}_2\text{O}$  (unité glucosidique non substituée annotée de 1a – 6a).

Les attributions proton et carbone du polyCRYSMEB sont regroupées dans le tableau 24 :

<sup>1</sup> H	δ ppm	<sup>13</sup> C	δ ppm
1	5,25	1	99,47
2	3,40	2	81,40
3	3,99	3	72,29
4	3,65	4	81,40
5	3,83	5	71,51
6	3,83	6	60,10
CH <sub>3</sub>	3,57	CH <sub>3</sub>	59,31
CH <sub>2</sub> – O – CO	4,44	CH <sub>2</sub> – O – CO	64,35
CH – O – CO	4,05	CH – O – CO	69,33
CH <sub>2</sub> citrate	2,88 et 3,02	CH <sub>2</sub> citrate	43,34
1a	5,07	C – OH	73,49
2a	3,68	O – CO	173,08
3a	3,92	1a	101,87
4a	3,65	2a	71,94
5a	3,83	3a	71,51
6a	3,83	4a	81,40
		5a	71,51
		6a	60,10

**Tableau 24:** Attribution proton et carbone du polyCRYSMEB dans D<sub>2</sub>O.

## 2. 2. Détermination du taux de réticulation (Tr) du polymère et de la quantité de CD dans le polymère

**Définition de Tr :** c'est le nombre substitution d'une cyclodextrine par des chaînes d'acide citrique.

### Méthode et calculs :

Pour déterminer le taux de réticulation des CDs dans le polymère :

- Intégration des protons anomériques à 7 et 8 pour la βCD et la γCD respectivement.
- Mesure de l'intégration des groupements CH<sub>2</sub> de la partie citrate.

Cette valeur de l'intégration précédente divisée par deux (car les deux groupements CH<sub>2</sub> de l'acide citrique relie deux cyclodextrines) donne le taux de réticulation.

Nous avons mesuré le taux de réticulation pour une gamme de polymères synthétisés avec différents temps de réaction (t = temps de polymérisation).

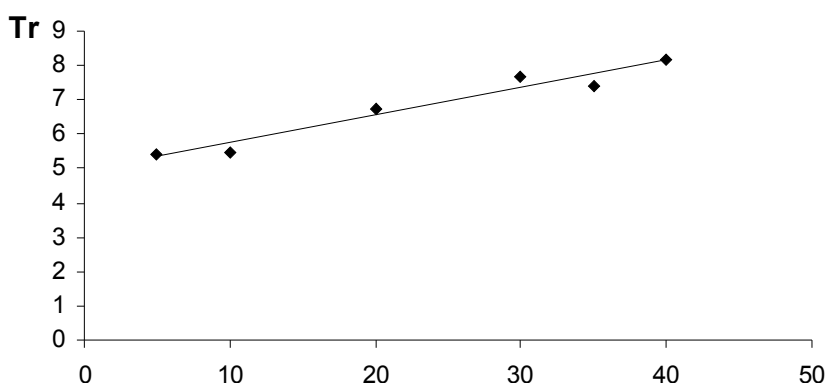
Pour déterminer la quantité de cyclodextrine dans le polymère, on mesure l'intégration des protons anomériques par rapport à une référence externe (tube capillaire de TSPd, préalablement calibré). En divisant la valeur de l'intégration par n (n = nombre d'unités glucosidiques = 7 et 8 pour  $\beta$  et  $\gamma$ CD respectivement) on obtient la concentration de l'unité de CD dans la solution ([unité CD]).

Connaissant la concentration en unités de cyclodextrine, le volume de l'échantillon et la masse molaire d'une unité de CD, on peut déterminer la quantité de cyclodextrine m (en mg) dans 10 mg de polymère. Les résultats pour les différents temps de polymérisation sont présentés dans le tableau 25 pour les polymères de  $\beta$ CD et  $\gamma$ CD.

t min	Tr poly $\beta$ CD	Tr poly $\gamma$ CD	m (mg) poly $\beta$ CD	m (mg) poly $\gamma$ CD
5	5,4	-	5,70	-
10	5,45	-	5,91	-
20	6,75	7,40	5,54	7,09
30	7,7	8,30	5,25	7,89
35	7,4	-	5,33	-
40	8,15	8,50	5,28	8,13
50	-	-	-	-
60	-	8,51	-	7,85

**Tableau 25:** Variation du taux de réticulation (Tr) et de la quantité de l'unité cyclodextrine dans 10 mg de polymère avec le temps de polymérisation (t).

D'après la figure 47, on observe que le taux de réticulation est proportionnel au temps de polymérisation.



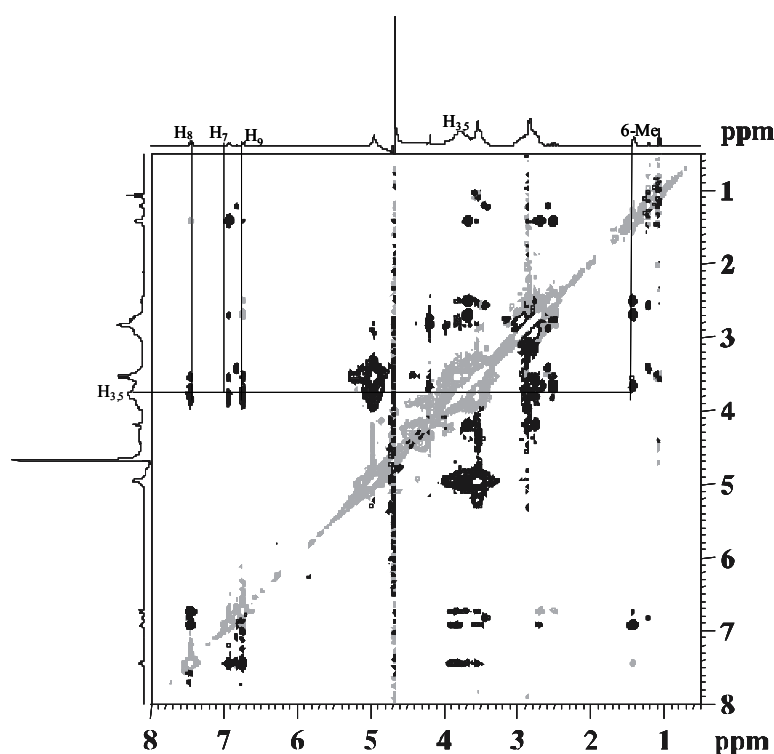
**Figure 47:** Variation de Tr en fonction de temps de polymérisation pour le poly $\beta$ CD.

### 3. Etudes des complexes d'inclusion avec les polymères de cyclodextrines

Après avoir caractérisé ces polymères en solution aqueuse par RMN, nous avons vérifié que les cavités de ces CDs étaient capables d'inclure des molécules comme la doxycycline, la jasmone et le citronnellol. Puis, pour comparer l'affinité de ces molécules avec les CD natives et polymérisées, nous avons déterminé la constante d'association de ces différents complexes par la méthode DOSY.

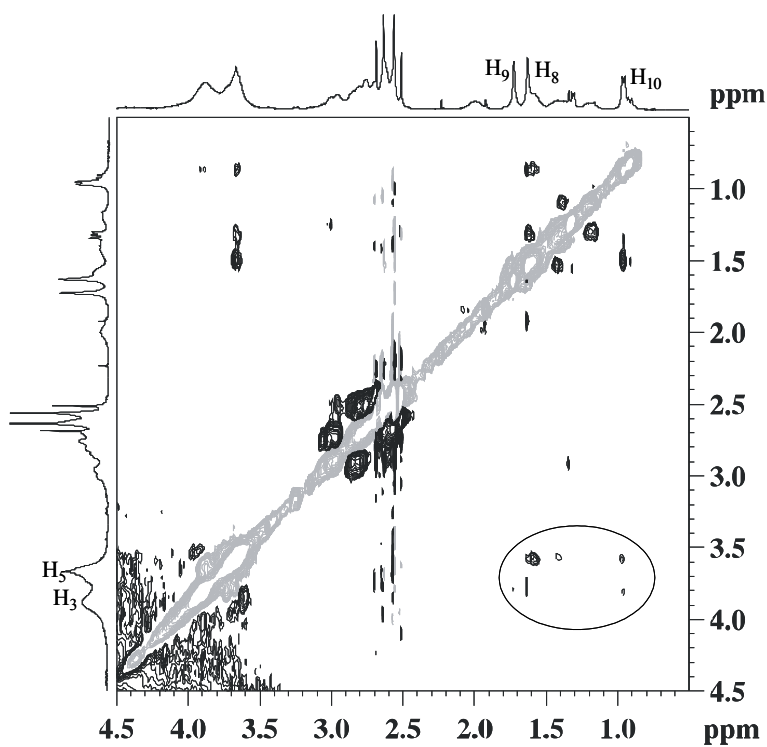
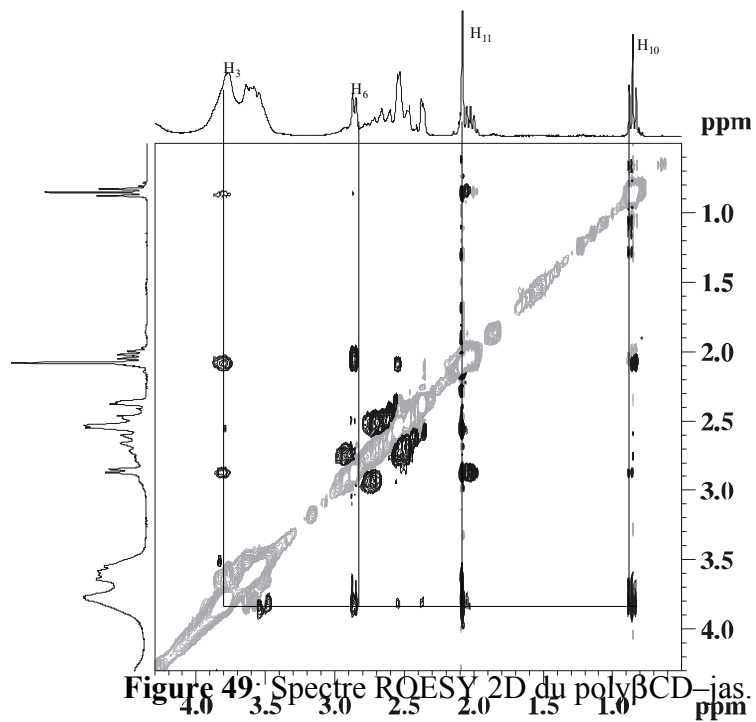
### 3. 1. Mise en évidence des complexes d'inclusion par ROESY

Nous avons vérifié par l'expérience ROESY que les polymères de cyclodextrines sont toujours capables d'inclure des molécules dans leur cavité. La carte ROESY du complexe poly $\beta$ CD – DOX (figure 48) démontre qu'il y a des interactions dipolaires entre la DOX (protons aromatiques et 6-Me) et la CD du poly $\beta$ CD, d'où une inclusion de la DOX dans le polymère comme dans la  $\beta$ CD native.



**Figure 48:** Spectre ROESY 2D du complexe poly $\beta$ CD – DOX.

De même, les cartes ROESY 2D (figure 49, 50) des complexes poly $\beta$ CD–jas et poly $\beta$ CD–cit, démontrent qu'il y a des interactions dipolaires entre la partie CD du poly $\beta$ CD et les protons H<sub>6,10,11</sub> et H<sub>8,9,10</sub> de la jasmone et du citronnellol respectivement.



### 3.2. Détermination de la constante d'association par DOSY

Après avoir observé que les molécules sont toujours capables de s'inclure dans la cavité des CDs, nous avons vérifié si l'affinité de ces molécules pour les CDs polymérisées est du même ordre de grandeur ou différente que celle obtenue pour les CDs non polymérisées.

Nous avons présenté précédemment les différentes méthodes qui peuvent être utilisées pour déterminer la constante d'association. Parmi ces méthodes, il y en a deux qui s'appuient sur les données RMN : Scott (basée sur la suivie des variations de déplacement chimique) et DOSY (basée sur la détermination du coefficient de diffusion).

La présence de polymère de CD élargie les raies des spectres RMN de la partie CD et de la molécule invitée. La mesure des variations de déplacement chimique devient donc difficile et la méthode de Scott n'est plus applicable pour déterminer  $K_a$ . Nous avons donc appliqué la technique DOSY pour la mesure de  $K_a$ .

Nous avons mesuré les coefficients de diffusion de la molécule invitée seule et en présence de polymère de cyclodextrines en faisant varier la concentration en unités de cyclodextrine. Par exemple pour le complexe poly $\beta$ CD – DOX, une série de DOSY 2D a été enregistrée afin de déterminer le coefficient de diffusion de la DOX dans le mélange et calculer la proportion de DOX incluse dans la cavité cyclodextrine. Rappelons que la proportion de la molécule complexée ( $\rho$ ) et la constante d'association ( $K_a$ ) peuvent être calculées par les équations suivantes:

$$\rho = \frac{(D_{\text{libre}} - D_{\text{obs}})}{(D_{\text{libre}} - D_{\text{complexe}})}$$

$$K_a = \frac{\rho}{(1 - \rho)([\text{CD}] - \rho[\text{DOX}])}$$

$$\rho = \frac{K_a[\text{CD}]}{1 + K_a[\text{CD}]}$$

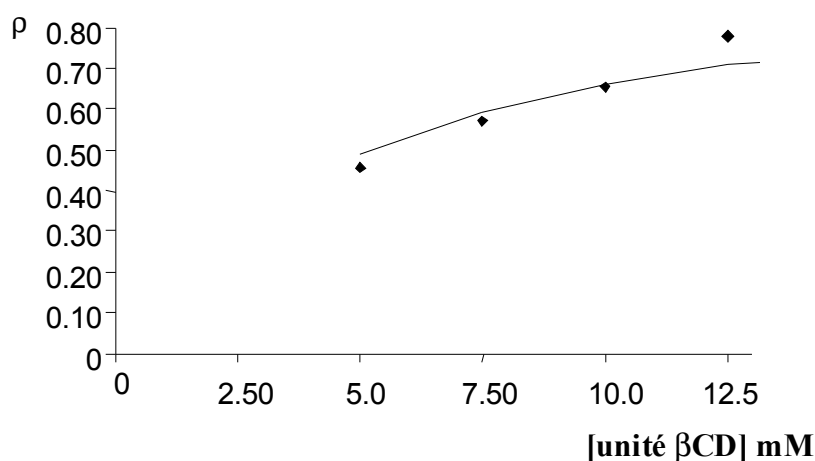
Les valeurs des coefficients de diffusion utilisées pour calculer la proportion de la molécule complexée sont les coefficients de diffusion corrigés par rapport au coefficient de diffusion du signal d'eau. La concentration du polymère est exprimée en unités de CD à partir de la masse de CD présente dans le polymère (chapitre 4, paragraphe 2.2). En faisant l'approximation que le coefficient de diffusion de la DOX complexée correspond à celui du poly $\beta$ CD seul, on peut calculer la proportion de molécule complexée pour différentes concentrations en polymère (tableau 26).



[unité $\beta$ CD] mM	$D_{app}$ ( $\beta$ CD)	$D_{app}$ (DOX)	$D_{corr}$ ( $\beta$ CD)	$D_{corr}$ (DOX)	$\rho$
0		3,78		3,57	-----
5	0,93	2,37	0,93	2,38	0,45
7,5	0,91	2,03	0,92	2,08	0,57
10	0,91	1,80	0,94	1,86	0,65
12,5	0,93	1,49	0,95	1,53	0,78

**Tableau 26:** Coefficients de diffusion D en  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s des constituants du complexe poly $\beta$ CD–DOX ([DOX] = 0,5 mM, avec  $D_{poly-\beta CD\ seul} = D_{complexe} = 0,95 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s).

La proportion de la molécule complexée augmente avec la concentration de poly $\beta$ CD pour une même concentration en DOX. En reportant la proportion de fraction complexée en fonction de la concentration en unités de CD et en minimisant l'écart entre les valeurs théoriques et expérimentales, on a obtenu une valeur de constante d'association de 192 M<sup>-1</sup> pour le complexe DOX-poly $\beta$ CD.



**Figure 51:** Variation de la proportion de la molécule complexée en fonction de la concentration de poly $\beta$ CD.

La même étude a été réalisée sur d'autres complexes, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 27 :

$K_a$ (M <sup>-1</sup> )	DOX	jasmone	citronellol
$\alpha$ CD	-	128	792
$\beta$ CD	148	1264	1170
$\gamma$ CD	1540	-	-
CRYSMEB	164	-	-

poly $\alpha$ CD	-	97	300
poly $\beta$ CD	192	324	2530
poly $\gamma$ CD	1630	-	-
polyCRYSMEB	260	-	-

**Tableau 27:** Les valeurs des constantes d'associations des différents complexes obtenus par DOSY.

Si on compare les valeurs obtenues pour les complexes d'inclusion de DOX, jasmone et citronellol avec les polymères de cyclodextrines et les cyclodextrines natives, on observe des comportements différents. Tout d'abord en ce qui concerne les différents complexes avec la DOX, on retrouve des constantes d'association du même ordre de grandeur pour les CDs sous forme de monomères ou polymères. Cela implique qu'il n'y a pas de phénomène de coopérativité<sup>7,8</sup> qui augmenterait la constante d'association en présence de polymère.

Pour les complexes en présence de jasmone et citronellol, les résultats sont beaucoup moins clairs. On observe une baisse de l'affinité de la jasmone pour la  $\beta$ CD polymère par rapport au monomère, alors qu'on assiste au phénomène inverse pour le citronellol.

Cette différence d'affinité offre aux cyclodextrines natives et à leurs polymères des applications très larges en se basant sur le phénomène de relargage retardée ou rapide. Par exemple pour les textiles parfumés où les molécules de parfum doivent être piégées pour un temps long, on a besoin de former un complexe stable avec les molécules de parfum pour augmenter le temps de relargage.

#### 4. Conclusion

Par utilisation des différentes techniques RMN, nous avons étudié les structures des polymères cyclodextrines, confirmé qu'ils sont toujours capables d'inclure des molécules au sein de leurs cavités hydrophobes, et estimé les constantes d'associations des différents complexes.

## Références

1. Furue. M, Harada. A, Nosakura. S. I, *J. polym. Sci. Polym. Letters Ed*, 13, 357, 1975.
2. Harada. A, Furue. M, Nosakura. S. L, *Macromol*, 9 (5), 701 – 704, 1976.
3. Harada. A, Furue. M, Nosakura. S. L, *Macromol*, 9 (5), 705 – 710, 1976.
4. Saito. R. Okuno. Y, Kobayashi. H, *J. Polym. Sci. Part A : polym. Chem*, 39 (20), 3539 – 3546, 2001.
5. Suh. J, Lee. S. H, Zoh. K. D, *J. Am. Chem. Soc*, 114 (20), 7916 – 7917, 1992.
6. Martel. B, Morcellet. M, Weltrowski. M, *Brevet, FR 9901968*, 2000.
7. Liu Y, Li. L, Zhang. H. Y, Liang. P, Wang. H, *Carbohydrate Research*, 38, 1751 – 1757, 2003.
8. Bakkour. Y, Vermeersch. G, Morcellet. M, Boschin. F, Martel. B, Azaroual. N, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, accepté, 2005.

# **Chapitre V**

## **Etude RMN des textiles imprégnés**

### **Introduction**

Les cyclodextrines peuvent être considérées comme une nouvelle classe de substances auxiliaires dans l'industrie textile. En effet, elles peuvent se fixer sur les textiles par deux voies :

**Voie physique** : On pulvérise une solution de cyclodextrines sur les textiles: il n'y a pas de liaisons covalentes entre la fibre et la cyclodextrine, il y a seulement des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

**Voie chimique** : On met le textile dans une solution de cyclodextrine en présence d'un agent réticulant et d'un catalyseur : il y a formation de liaisons covalentes entre les deux.

Dans ce chapitre, on étudiera les textiles greffés par la voie chimique.

Un certain nombre d'exemples a été donné pour la fixation permanente de divers dérivés de cyclodextrine par l'intermédiaire des groupes fonctionnels sur des surfaces de fibre<sup>1</sup>. Parmi ceux-ci, les acides polycarboxyliques comme l'acide citrique et l'acide polyacrylique, ont été utilisés comme agents réticulants pour le greffage de cyclodextrine sur les textiles.

Une fois les cyclodextrines greffées sur des textiles, elles peuvent être chargées par des molécules organiques comme des médicaments. Lors du contact avec la peau, les textiles greffés par les cyclodextrines assurent le dégagement immédiat du médicament (dégagement contrôlé). Les applications les plus intéressantes dans ce domaine sont les traitements des textiles greffés soit par des parfums, soit par des antibactériens. Ces molécules peuvent être libérées sans interruption pendant une longue période quand on les met en contact avec un milieu humide (ex : la peau). Plus le niveau d'humidité est élevé, plus la substance invitée est libérée<sup>2,3</sup>.

En effet, de nombreuses personnes souffrent de maladies d'origine professionnelle (comme les réactions allergiques sur les mains du coiffeur, les pieds de l'athlète, etc..). L'habillement correspondant (sous-vêtement, gants, chaussettes) peut être chargé avec des agents antifongiques, anti-histaminiques ou anti-inflammatoires<sup>4</sup>.

Ces cyclodextrines greffées sur des textiles ou fortement polymérisées n'étant plus solubles en milieu aqueux, elles ne peuvent plus être étudiées par RMN du liquide. Nous avons essayé d'étudier ces nouveaux supports par la technique HRMAS qui permet d'étudier par RMN avec une résolution proche du liquide les composés en milieu anisotrope s'ils possèdent toujours une certaine mobilité.

Le but de cette étude est de mettre en évidence le greffage des cyclodextrines sur les textiles, d'obtenir des informations sur la structure des polymères de cyclodextrines insolubles (polyCDins) qui ont été synthétisés au Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire de Lille (LCOM), et de vérifier la capacité de ces CDs greffées à inclure des molécules.

### 1. Etude des polymères de cyclodextrines insolubles (polyCDins) :

Les polymères de cyclodextrines insolubles à base d'acide citrique sont synthétisés de la même manière que celle des polymères solubles (chapitre 4). En effet, pendant la réaction, on récupère les deux types de polymères solubles et insolubles. Si on veut obtenir seulement des polymères insolubles, on travaille à une température supérieure à 140 °C. Les polymères insolubles se comportent comme un gel quand on les met en contact avec l'eau. Ils se gonflent par adsorption ou absorption de l'eau. Si on enregistre un spectre RMN  $^1\text{H}$  classique de ce polymère (figure 52), on ne détecte pas les protons de la partie polymérisée, mais seulement les protons correspondant aux molécules mobiles comme l'eau, l'éthanol, le citrate non lié à la cyclodextrine.

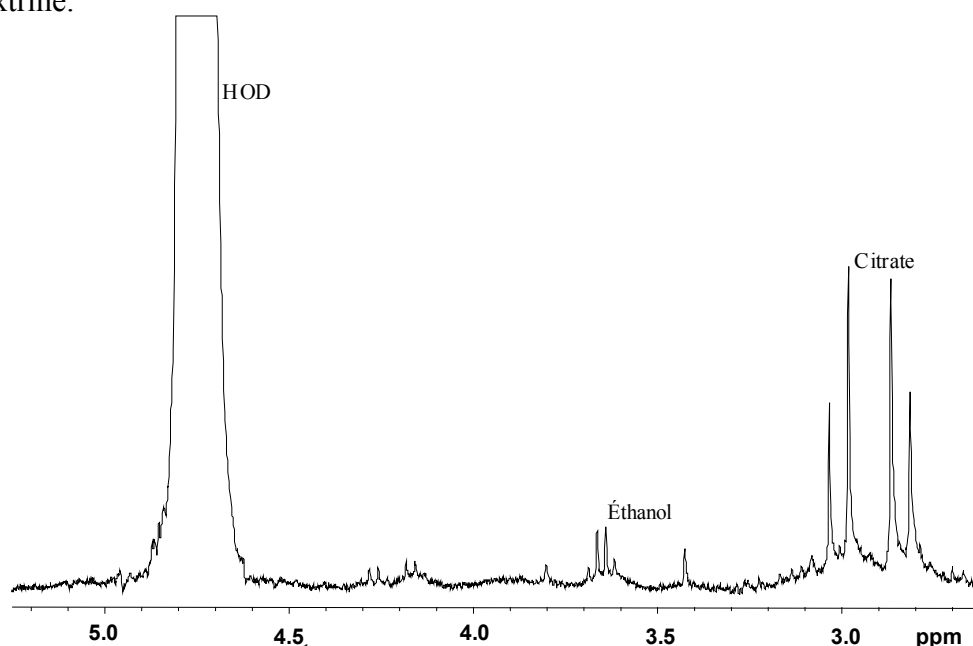
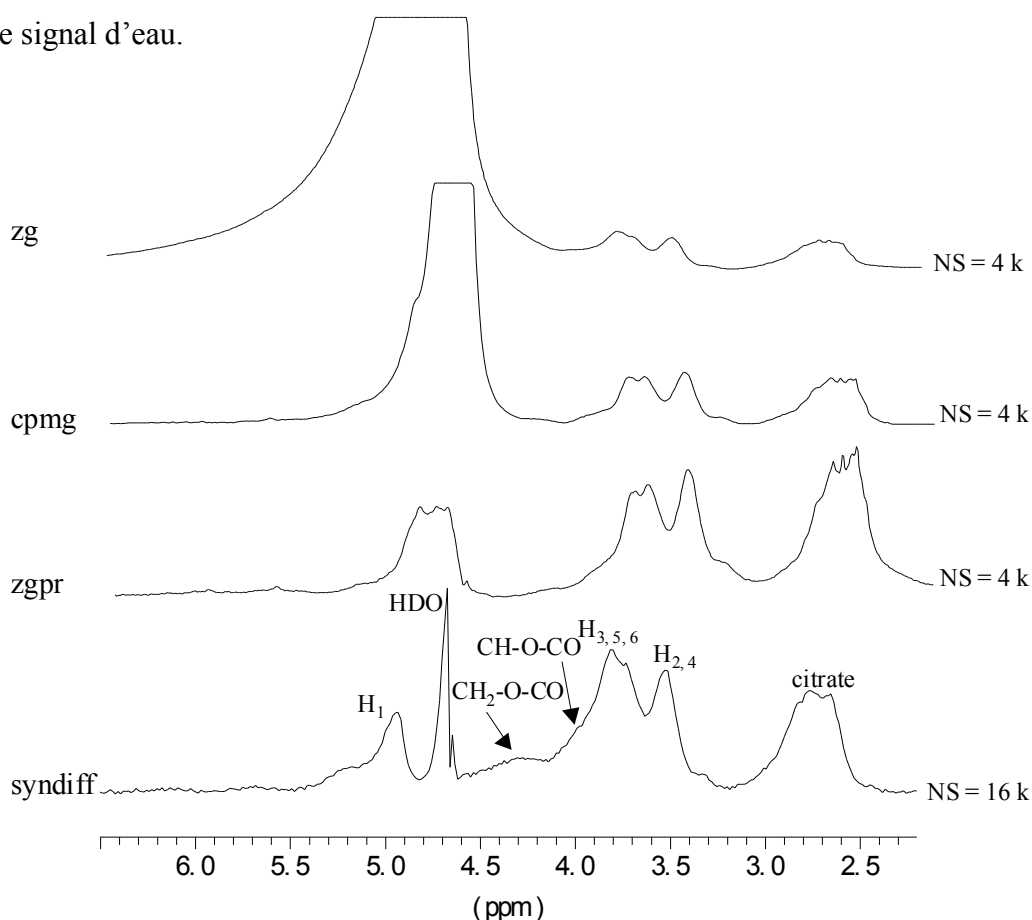


Figure 52: spectre RMN  $^1\text{H}$  en liquide ( 20 mg de polymère dans 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Pour étudier ce polymère, nous avons donc utilisé une autre technique, la HR-MAS qui est une technique adaptée pour étudier les systèmes gels-solides avec la résolution du liquide en basculant l'échantillon à un angle magique égal à  $54,7^\circ$  et en le faisant tourner avec une vitesse de l'ordre de 3000 tours/s.

- Préparation de l'échantillon : 20 mg de poly $\beta$ CDins est laissé gonfler pendant 24 heures dans 500  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O. On transfère ensuite le polymère gonflé dans un rotor (100  $\mu$ l) pour la HR-MAS.
- Etude en HR-MAS : Différentes séquences en une dimension ont été réalisées et comparées par HR-MAS, les spectres sont présentés sur la figure 53. Tout d'abord, une séquence d'impulsion de base (zg) a été réalisée. On visualise un signal d'eau important, et des massifs pouvant correspondre aux protons de la cyclodextrine (H<sub>2, 3, 4, 5, 6</sub>) et à la partie acide citrique. Les protons anomériques H<sub>1</sub> de l'unité cyclodextrine sont masqués par le signal d'eau.



**Figure 53:** Spectres <sup>1</sup>H HR-MAS de poly $\beta$ CDins.

Un autre spectre <sup>1</sup>H a été réalisé en utilisant la séquence CPMG qui permet d'éliminer les signaux des grosses molécules ; cela n'améliore par la visualisation des signaux.

La séquence de présaturation du solvant (zgpr) permet de diminuer fortement le signal d'eau, mais perturbe aussi les résonances des signaux qui sont proches de l'eau, comme les protons anomériques de la CD.

Le meilleur résultat est obtenu avec la séquence syndiff dérivée de la séquence de diffusion, qui permet d'utiliser un filtre de diffusion selon la mobilité des molécules présentes dans l'échantillon. Ainsi on a pu diminuer l'intensité du signal d'eau (très mobile) sans perturber les autres résonances correspondant à la partie polymère. Sur ce spectre, on trouve tous les protons qu'on a déjà observés sur le spectre  $^1\text{H}$  de poly $\beta$ CD soluble en RMN liquide (figure 42).

D'après ces différents spectres, nous avons observé que l'expérience qui repose sur la séquence syndiff donne le meilleur résultat. Enfin, après avoir étudié la structure de poly $\beta$ CDins en HR-MAS  $^1\text{H}$ , nous avons essayé de faire un spectre  $^{13}\text{C}$  pour attribuer le carbone de ce polymère. Mais après 2 jours d'acquisition (NS = 76 K) nous n'avons pas obtenu un spectre carbone exploitable.

## **2. Etude du polymère de cyclodextrine insoluble en présence de DOX**

Pour étudier le phénomène d'inclusion d'une molécule dans la cavité des cyclodextrines polymérisées, nous avons choisi d'utiliser la DOX comme molécule modèle. Elle possède en effet une bonne affinité pour la  $\beta$ CD et elle est plus soluble dans l'eau que le citronellol et la jasmone.

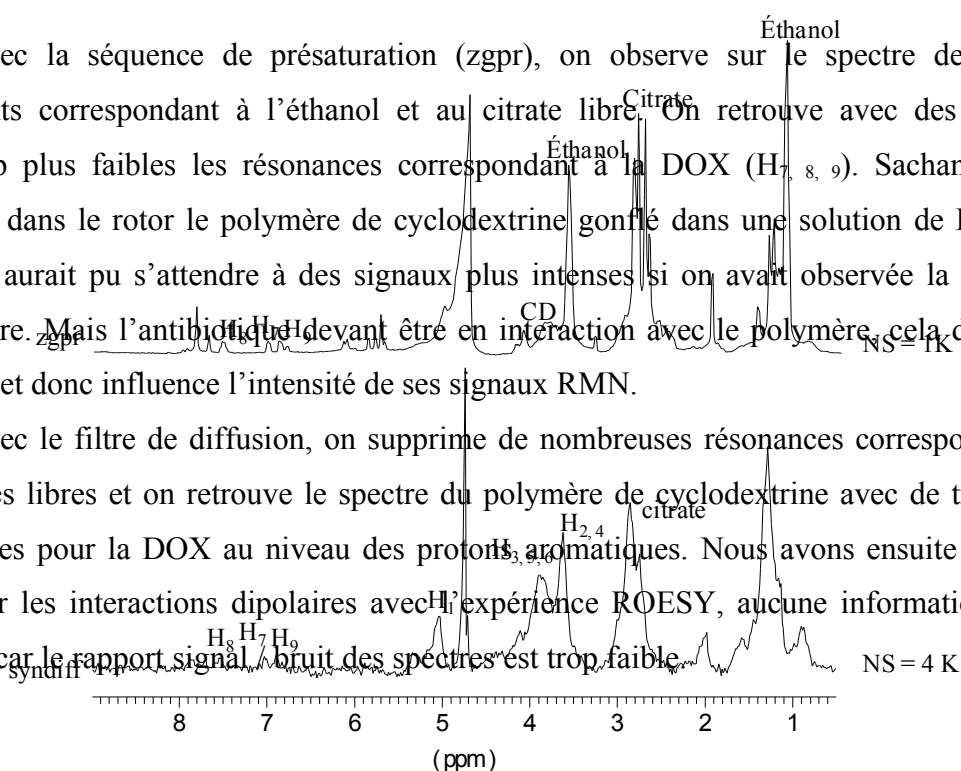
20 mg de polymère de cyclodextrine insoluble ont été gonflés avec 500  $\mu\text{l}$  d'une solution 20 mM de DOX pendant deux jours. Puis différents spectres  $^1\text{H}$  HR-MAS ont été enregistrés (figure 54).



**Figure 54:** spectres  $^1\text{H}$  HR-MAS de poly $\beta$ CDins en présence de DOX (20mM).

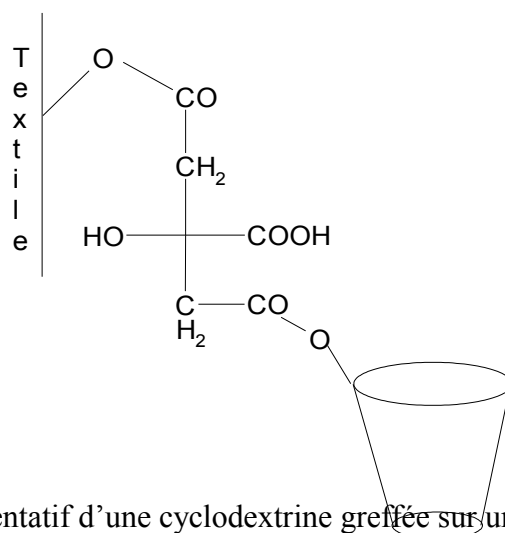
Avec la séquence de présaturation (zgpr), on observe sur le spectre des signaux importants correspondant à l'éthanol et au citrate libre. On retrouve avec des intensités beaucoup plus faibles les résonances correspondant à la DOX ( $\text{H}_{7, 8, 9}$ ). Sachant qu'on a introduit dans le rotor le polymère de cyclodextrine gonflé dans une solution de DOX à 20 mM, on aurait pu s'attendre à des signaux plus intenses si on avait observée la totalité de DOX libre. Mais l'antibiotique devant être en interaction avec le polymère, cela diminue sa mobilité et donc influence l'intensité de ses signaux RMN.

Avec le filtre de diffusion, on supprime de nombreuses résonances correspondant aux molécules libres et on retrouve le spectre du polymère de cyclodextrine avec de très faibles résonances pour la DOX au niveau des protons aromatiques. Nous avons ensuite essayé de visualiser les interactions dipolaires avec l'expérience ROESY, aucune information n'a été obtenue car le rapport signal / bruit des spectres est trop faible.



## 2. Etudes des cyclodextrines greffées sur les textiles

Le greffage de cyclodextrines sur le textile se fait par une réaction de polycondensation en utilisant de l'acide citrique comme un agent réticulant et l'hypophosphite de sodium comme catalyseur.

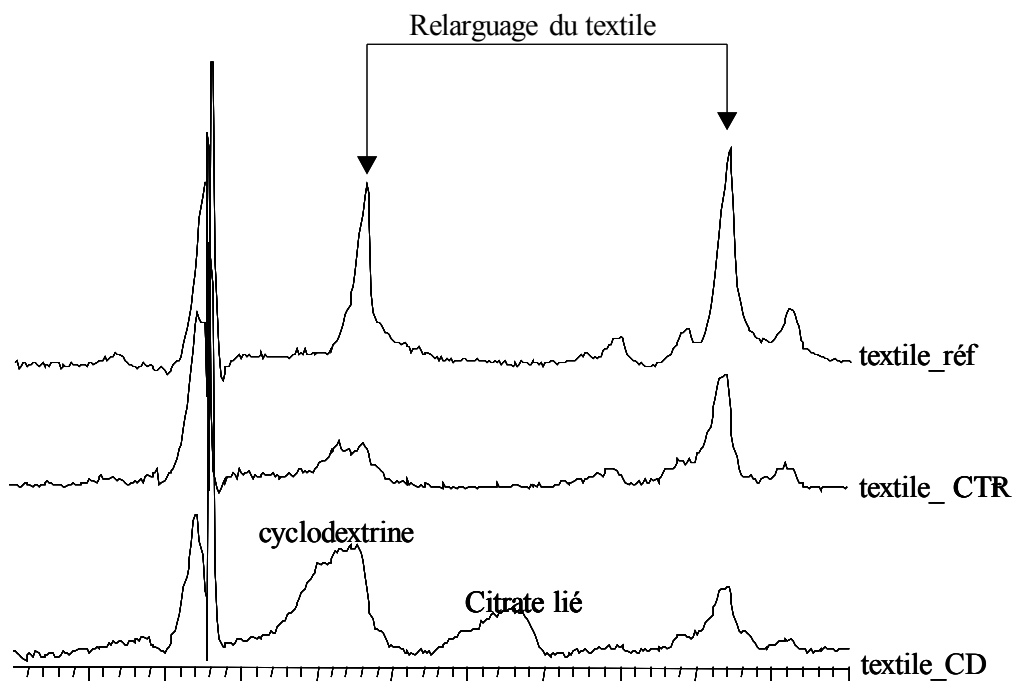


**Figure 55:** Schéma représentatif d'une cyclodextrine greffée sur un textile à l'aide de l'acide citrique.

Nous avons étudié une série de différents textiles :

- Les textiles greffés avec des cyclodextrines (textile\_CD).
- Les textiles non greffés et n'ayant subi aucun traitement (textile\_réf).
- Les textiles ayant subi le même traitement que pour le greffage avec les cyclodextrines, avec agent réticulant et catalyseur, mais sans la présence des cyclodextrines (textile\_CTR).

Pour la préparation des échantillons : les textiles coupés en morceaux de 1 mm (carré) sont imprégnés pendant 2 jours dans 500 µl d'une solution de D<sub>2</sub>O tamponnée à pH = 7. Le textile est transféré dans un rotor. Nous avons ensuite enregistré des spectres <sup>1</sup>H HR-MAS (figure 56).

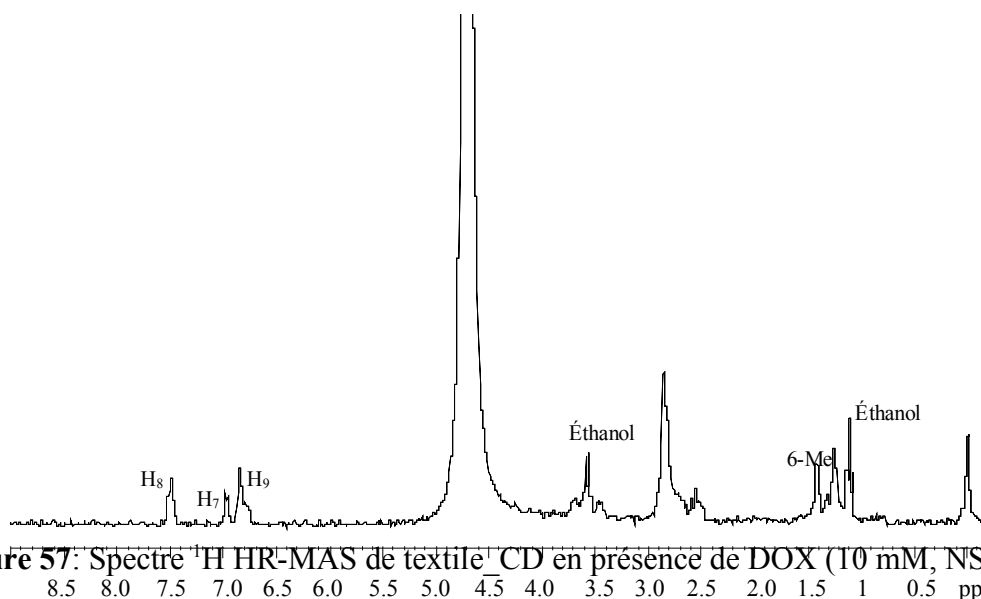


**Figure 56:** Spectres  $^1\text{H}$  HR-MAS des différents textiles dans  $\text{D}_2\text{O}$  (syndiff, NS = 4K) (ppm)

Sur le spectre du textile n'ayant subi aucun traitement (textile\_réf), on observe des signaux assez intenses (1,3 et 3,7 ppm) devant correspondre à un relarguage du textile. On retrouve ces signaux avec des intensités plus faibles dans les textiles ayant subi des traitements (textile-CTR et textile\_CD) car ils ont déjà relargués une partie de leur composé au cours de leur traitement.

Pour le textile\_CD, on observe deux massifs supplémentaires correspondant aux résonances de la partie cyclodextrine (3,8 – 4,1 ppm) et à l'acide citrique (2,5 – 3,2 ppm). Cette observation prouve que la cyclodextrine est bien greffée sur le textile. Mais ces spectres obtenus après un long temps d'acquisition (4 heures 30 minutes) ont un rapport signal / bruit moyen.

Selon le même principe suivi pour les polymères insolubles de CD, nous avons essayé d'observer la DOX en présence de ces différents textiles. Avec le même protocole que précédemment, les différents textiles ont été imprégnés pendant 2 jours avec une solution de DOX à 10 mM. Sur le spectre HR-MAS du textile\_CD (figure 57), nous observons les résonances correspondant à la DOX, mais avec une intensité faible par rapport à sa concentration de 10 mM.



**Figure 57:** Spectre  $^1\text{H}$  HR-MAS de textile\_CD en présence de DOX (10 mM, NS = 512).

Cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'il y a une adsorption de DOX sur le textile ou une inclusion de ce médicament dans la cavité de cyclodextrine greffée. Pour confirmer cette dernière supposition, nous avons fait des analyses quantitatives en RMN liquide, de DOX en présence de différents textiles (textile\_CD, textile\_réf et textile\_CTR) avec :

- 20 mg de textile + 1 ml d'une solution de DOX (~10 mM).
- Après 3 jours : Dosage par RMN liquide de la DOX dans des liquides d'imprégnation des différents textiles avec comme référence extérieure un capillaire de TSPd<sub>4</sub>.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 28.

Echantillons	[DOX] mM	% de diminution de [DOX]
DOX seul	9,58	-----
textile_réf	8,44	11,90 %
textile_CTR	7,10	25,89 %
textile_CD	6,13	36,01 %

**Tableau 28:** Variation de la concentration de DOX selon les textiles.

Les résultats de ce tableau mettent en évidence deux phénomènes: tout d'abord, la baisse de concentration de DOX dans le liquide d'imprégnation en présence de textile non greffé ou ayant subi un traitement avec l'acide citrique prouve qu'il y a un phénomène d'adsorption. Mais, cette diminution de la concentration en DOX étant encore plus importante

en présence de textile greffé avec la  $\beta$ CD, cela montre qu'il y a en plus du phénomène d'adsorption de la DOX par le textile, un phénomène d'inclusion de DOX dans la cavité des cyclodextrines greffées sur le textile.

### **3. Conclusion :**

Les essais pour étudier des milieux anisotropes par HRMAS ont permis dans le cas des polymères de  $\beta$ CD insolubles de vérifier qu'ils possèdent le même type de structure que les polymères solubles. En ce qui concerne leur capacité à inclure des molécules, nous n'avons pas pu mettre en évidence directement le phénomène d'inclusion. Mais à partir de l'observation du comportement de la DOX, nous avons supposé l'existence du phénomène d'inclusion.

En ce qui concerne l'étude des textiles, nous avons observé par HRMAS les protons de la partie CD. Cette détection est peu intense due à la faible mobilité des protons de la partie cyclodextrine. En effet, cette dernière étant greffée sur le textile par l'intermédiaire des chaînes d'acide citrique, les protons n'ont pas une mobilité très importante et donc ils sont difficilement détectables par HRMAS.

L'étude par HRMAS de ces textiles en présence de DOX ne nous a pas permis de mettre directement en évidence la complexation de la DOX dans la cavité des CDs. Mais l'étude par RMN liquide des solutions de DOX en présence des différents textiles nous permet de supposer l'existence d'un phénomène d'adsorption sur le textile et d'inclusion dans les CDs greffées sur les textiles.

## Références

1. Szejtli. J, Zsadan. B, Fenyvesi. E, Otta. K, Tudas. F, *Hung. Pat. 181733* (1980), *US. Pat. 4357468* (1982).
2. Buschmann. H.-J, , Knittel. D, Schollmeyer. E, *Melliond Textilber*, 82 (5), E94 – E96, 368 – 370, 2001.
3. Buschmann. H.-J, , Knittel. D, Schollmeyer. E, *Nachr. Chem*, 49 (5), 620 – 622, 2001.
4. Szejtli. J, *Starch|Stärke*, 55, 191 – 196, 2003.

# **Conclusion générale**

A travers nos différentes études, nous avons montré que la Résonance Magnétique Nucléaire peut être un outil puissant pour étudier des complexes d'inclusion.

Tout d'abord, à partir des séquences RMN traditionnelles en une et deux dimensions, protons et carbone, nous avons étudié la structure de différentes cyclodextrines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ CD, CRYSMEB) et de leurs polymères solubles.

Nous avons ensuite étudié la capacité d'inclusion de ces différentes cyclodextrines, avec, en premier lieu la détermination de la stœchiométrie des différents complexes basée sur les variations de déplacements chimique des molécules libres et complexées (méthode de Job). Puis les constantes d'association des différents complexes ont été déterminées soit par la méthode basée sur la mesure des variations de déplacement chimique (méthode de Scott), soit par la mesure des coefficients de diffusion (DOSY). La première méthode qui est la plus classique, est la plus utilisée car elle est rapide et facile à mettre en œuvre, puisqu'elle nécessite seulement l'acquisition de spectres proton en une dimension. Mais cette méthode, basée sur la mesure des variations de déplacement chimique a des limites : tout d'abord si ces variations sont faibles comme dans le cas d'inclusion de molécules linéaires, ou si les signaux sont larges comme dans le cas de polymère de CD. Nous avons testé en parallèle les deux méthodes sur différents complexes à base de cyclodextrines non polymérisées, nous avons obtenu des résultats comparables et dont certains ont été confirmés par une autre technique, la spectroscopie U.V-visible.

Pour l'étude des complexes avec les cyclodextrines polymérisées, nous avons déterminé la constante d'association à partir des mesures des coefficients de diffusion. Pour les complexes de l'antibiotique doxycycline hydrochlorate, nous avons mesuré une affinité du même ordre de grandeur pour les cyclodextrines polymérisées et non polymérisées. Ces résultats prouvent que la polymérisation des cyclodextrines ne perturbe pas leur capacité à inclure des molécules.

D'autre part, la RMN apporte une information complémentaire concernant la géométrie du complexe. En effet avec l'expérience ROESY qui permet l'étude des interactions dipolaires, on accède à la partie de la molécule qui s'inclue dans la cavité de la CD. Il est important de noter que cette géométrie ne peut être déterminée que par cette technique.



En ce qui concerne l'étude des polymères insolubles, nous avons mis en évidence avec la technique RMN HR-MAS qu'ils avaient le même type de structure que les polymères solubles. Les complexes d'inclusion avec ces cyclodextrines fortement polymérisées n'ont pas pu être directement mis en évidence à partir des interactions dipolaires. Mais les spectres HR-MAS de l'antibiotique en présence du polymère de cyclodextrine tendent à prouver que l'on a toujours ce phénomène d'inclusion.

La dernière partie de la thèse consacrée à l'étude par HR-MAS des différents textiles imprégnés nous a permis d'observer les cyclodextrines greffés sur ceux-ci, cependant, cette observation a été difficile. En effet, la partie cyclodextrine étant branché très proche du textile, elle n'a pas de mobilité très importante pour être facilement observable en HR-MAS. En ce qui concerne la capacité d'inclusion des CDs greffées, nous n'avons pas pu prouver directement la formation d'un complexe d'inclusion entre la DOX et la cavité des CDs. Mais la comparaison du comportement des différents textiles greffés ou non avec des CDs nous a permis indirectement de montrer l'existence d'une interaction entre les CDs greffées et la DOX pouvant correspondre à un complexe d'inclusion.

A partir de ces études préliminaires par HR-MAS, on peut déduire que pour pouvoir observer des cyclodextrines greffées sur des textiles et mettre en évidence un phénomène d'inclusion, il faut que les CDs possèdent une mobilité assez grande. Cela pourrait être envisageable avec des bras espaceurs entre le textile et la partie cyclodextrine plus long que le motif citrate utilisé dans cette étude.

# **Partie Expérimentale**

## 1. Expériences RMN:

Les expériences RMN en liquide ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER de type AVANCE DPX 300 du Laboratoire d'Application RMN de l'Université de Lille 2. Ce spectromètre opérant à une fréquence de 300,09 MHz en proton, est équipé d'une sonde BBI à gradient z, d'une unité de gradient (BGU-2) capable de délivrer un gradient de champ de  $59 \text{ G.cm}^{-1}$  et de la température variable (BVT 3300).

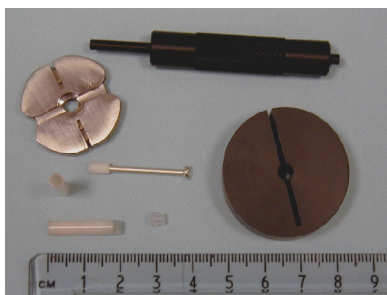
Des tubes RMN standard de 5 mm sont utilisés pour un volume total de 500  $\mu\text{l}$ .

Dans toutes les expériences, la température a été réglée à 298 K.

Les spectres ROESY 2D ont été enregistrés avec un temps de mélange de 500 ms durant le spin-lock.

Les expériences DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) utilisent la séquence de pulse de la librairie Bruker LEDBPGP2S (Longitudinal Eddy-current Delay BiPolaire Gradient Pulse). La calibration des gradients a été réalisée à partir de la mesure du coefficient de diffusion de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $D = 2,299 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ ). Le traitement des DOSY a été réalisé à partir du logiciel Bruker Xwin-NMR version 3.5.

Les expériences HR-MAS ont été réalisées à l'institut Pasteur de Lille sur un spectromètre BRUKER de type AVANCE DPX 300 (300 MHz) équipé d'une sonde HR-MAS 4 mm dual ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ). Les rotors HR-MAS utilisés ont une capacité de 100  $\mu\text{l}$ . Toutes les expériences ont été effectuées en basculant l'échantillon à l'angle magique avec une régulation de température à 298K et une vitesse de rotation du rotor de 3000 tours par seconde.



### Matériels HR-MAS

La séquence syndiff basée sur une séquence de diffusion modifiée par G. Lippens et J.M. Wieruszski. Elle permet de supprimer les résonances correspondantes aux molécules ayant une forte mobilité.

```
;d5=rotor period=333.33u
"d4=d5-p1"
"d14=d4-4u"
"p16=1997u"
"p17=663.67u"
```

```
1 ze
2 d5 BLKGRAD
  d5 p19:f1
  d1 cw:f1 ; d1=1s, 2s, 3s =multiple rotor period
  d5 do:f1
  d4 p11:f1 UNBLKGRAD
  p1 ph1
  d13
  GRADIENT(cnst21)
  d5*2
  d4
  p1 ph2
  d13
  GRADIENT2(cnst22)
  d5*2
  d5*100 ; d5*100(33.333ms = diffusion delay )
  d4
  p1 ph3
  d13
  GRADIENT(cnst21)
  d5*2
  d4
  p1 ph4
  d13
  GRADIENT2(cnst22)
  d5*2
  d5*42
  d14
  p1 ph5
  4u BLKGRAD
  go=2 ph3 1
  d5*200 wr #0
  d5 BLKGRAD
exit
```

```
ph1=0
ph2=0 2
ph3=0
ph4=0 0 2 2
ph5=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
```

ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

## 2. Synthèse de polymère :

- **Pesée et solubilisation des réactifs** : La synthèse consiste dans un premier temps, à préparer une solution aqueuse renfermant une composition ternaire X/Y/Z des trois réactifs, où :

X correspond à x g d'acide polycarboxylique

Y correspond à y g de catalyseur

Z correspond à z g de CD, Ceci pour un volume de 100 mL de solution.

Nous avons utilisé l'hypophosphite de sodium hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) comme catalyseur et l'acide citrique (noté CTR) comme agent réticulant en préparant une solution ternaire 10/3/10.

- **Concentration de la solution** : L'excès d'eau est évaporé par passage à l'évaporateur rotatif pour obtenir un mélange visqueux.

- **Traitement thermique** : La réticulation des cyclodextrines par l'acide citrique se réalise en plaçant le mélange réactionnel sous agitation dans un bain d'huile à température T ( $140^\circ\text{C}$ , sous vide) et pendant un temps déterminé.

- **Récupération et purification** : En fin de réaction, on additionne de l'eau au milieu et on le laisse sous agitation magnétique pendant 10 minutes afin de solubiliser les produits initiaux et la fraction de polymère soluble. La solution est filtrée sur verre fritté (porosité 1), le filtrat est concentré, dialysé (membrane 12-14000 daltons pendant trois jours) et lyophilisé pour aboutir au polymère hydrosoluble. Quant au polymère insoluble, il est lavé deux fois avec 100 ml d'eau et deux fois avec 100 ml d'acétone puis séché à  $70^\circ\text{C}$  pendant 24 heures.

## 3. Solution Tampon ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) :

La solution tampon de phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) à  $\text{pH} = 7,24$  et  $0,1\text{ M}$  a été préparée en mélangeant le phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Sigma–Aldrich)  $23\text{ mg} / 5\text{ ml}$  avec l'hydrogénophosphate de disodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; Fluka)  $47,3\text{ mg} / 5\text{ ml}$ .

## 4. Les molécules étudiées :

- Doxycycline hydrochlorate : dimethylamino-4 pentahydroxy-3,5,10,12,12a methyl-6 dioxo-1,11 octahydro-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a naphacenecarboxamide-2-chlorhydrate ; M = 480 g /mol, Synopharm (Germany).
- $\beta$ -citronellol : 2, 6 – diméthyl – 6 - octen – 1 – ol,  $C_{10}H_{20}O$ , M = 156,27 g /mol, Aldrich (Milwaukee, Wi, USA).
- cis-Jasmone : cis-3-Methyl-2-(2-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one , $C_{11}H_{16}O$ ,M = 164,25 g /mol, Aldrich (Milwaukee, Wi, USA).
- $\alpha$ CD :  $\alpha$ -cyclodextrine, M = 972 g /mol, Wacker Specialties (Burghausen, Germany).
- $\gamma$ CD :  $\gamma$ -cyclodextrine, M = 1297 g /mol, Wacker Specialties (Burghausen, Germany).
- $\beta$ CD :  $\beta$ -cyclodextrine, M = 1135 g /mol, Roquette (Lestrem, France).
- CRYSMEB : 2 – methyl -  $\beta$ -cyclodextrine, M = 1191 g /mol , Roquette (Lestrem, France).
- Poly- $\alpha$ CD, poly- $\beta$ CD, poly- $\gamma$ CD, polyCRYSMEB, poly $\beta$ CDins : Polymères à base d'acide citrique comme agent réticulant, synthétisés par le Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire de l'Université de Sciences et Technologies de Lille 1 (dirigé par le professeur M. MORCELLET).

## Liste des Figures

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CDS.....	6
FIGURE 2 : SCHÉMA DE L'INCLUSION D'UNE MOLÉCULE DANS LA CAVITÉ HYDROPHOBE DE CYCLODEXTRINE (FRÖMMING AND SZEJTLI: CYCLODEXTRINS IN PHARMACY, KLUWER ACAD. PRESS, DORDRECHT, 1994).....	9
FIGURE 3 : SCHÉMA DE COMPLEXE 1 : 1 ; 2 : 1 ; 1 : 2.....	10
FIGURE 4: DIAGRAMME DE LA SOLUBILITÉ.....	23
FIGURE 5: COURBE DE LA SOLUBILITÉ ST EN FONCTION DE LA CONCENTRATION CYCLODEXTRINE [CD]T.....	24
FIGURE 6: SPECTRE 1H DE LA $\beta$ CD DANS D2O (10 MM).....	30
FIGURE 7 : COSY DE LA $\beta$ CD NATIVE DANS D2O (10 MM).....	32
FIGURE 8: SPECTRE HSQC DE LA $\beta$ CD NATIVE (10 MM).....	33
FIGURE 9 : SPECTRE HMBC DU CITRONELLOL DANS L'ACÉTONE (10 MM).....	34
FIGURE 10 : PRINCIPE HR-MAS.....	35
FIGURE 11: LA COURBE DE L'INTENSITÉ DU SIGNAL EN FONCTION DU GRADIENT $I = F(G)$ .....	36
FIGURE 12 : CARTE DOSY 2D DE LA $\beta$ CD (12 MM).....	37
FIGURE 13: ANGLE DE ROTATION MAGIQUE (MAGIC ANGLE SPINING).....	38
FIGURE 14: SPECTRE 13C DE LA $\beta$ CD DANS D2O (10 MM).....	41
FIGURE 15: SPECTRE 1H DE CRYSMEB {UNITÉ GLUCOSIDIQUE NON SUBSTITUÉE ANNOTÉE DE 1A – 6A} (10 MM DANS D2O).....	43
FIGURE 16: SPECTRE J-MOD (13C) DE CRYSMEB (UNITÉ GLUCOSIDIQUE NON SUBSTITUÉE ANNOTÉE DE 1A – 6A) (10 MM DANS D2O).....	44
FIGURE 17: SPECTRE 1H DE DOX 10 MM ( LA FORME CÉTO EST ANNOTÉE EN PRIME).....	46
FIGURE 18: SPECTRES 1H DE $\beta$ CD – DOX (PARTIE CYCLODEXTRINE).....	47
FIGURE 19: SPECTRES 1H DE $\beta$ CD – DOX (PARTIE DOX).....	48
FIGURE 20: COURBE DE JOB DE $\beta$ CD – DOX ( $[X] = [\beta\text{CD}]$ OU $[\text{DOX}]$ ).....	49
FIGURE 21: COURBE DE SCOTT DU COMPLEXE $\beta$ CD – DOX (PROTONS 6-ME DE DOX).....	50
FIGURE 22: CARTE DOSY 2D DE LA DOX (0,5 MM DANS D2O).....	52
FIGURE 23: CARTE DOSY 2D DE LA DOX/ $\beta$ CD (0,5/4 MM) DANS D2O.....	52

<b>FIGURE 24: VARIATION DE LA PROPORTION DE LA MOLÉCULE COMPLEXÉE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE <math>\beta</math>CD.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURE 25: ROESY 2D DE <math>\beta</math>CD/DOX (MÉLANGE 5/5 MM).....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURE 26: LA FORME GÉOMÉTRIQUE DU COMPLEXE <math>\beta</math>CD – DOX.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURE 27: SPECTRE 1H DU CITRONELLOL DANS L'ACÉTONE D6.....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURE 28: SPECTRE 1H DE LA CIS-JASMONE DANS L'ACÉTONE D6.....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURE 29: SPECTRES 1H DU <math>\beta</math>CD – JAS EN DIFFÉRENTES PROPORTIONS....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURE 30: COURBE DE JOB DE <math>\beta</math>CD – JAS ( X = <math>\beta</math>CD OU JAS).....</b>	<b>59</b>
<b>FIGURE 31: COURBE DE JOB DE <math>\beta</math>CD – CIT ( X = <math>\beta</math>CD OU CIT).....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURE 32: COURBE DE SCOTT POUR LE COMPLEXE <math>\beta</math>CD – JAS.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURE 33: COURBE DE SCOTT DU COMPLEXE <math>\beta</math>CD – CIT.....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURE 34: VARIATION DE PROPORTION DE JAS COMPLEXÉE DANS LE MÉLANGE <math>\alpha</math>CD – JAS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE <math>\alpha</math>CD.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURE 35: ROESY 2D DE <math>\beta</math>CD – JAS (MÉLANGE 1 / 1 MM).....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURE 36: COURBE DES EFFETS NOE EN FONCTION DU TEMPS DE MÉLANGE (SPIN LOCK).....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURE 37: FORME GÉOMÉTRIQUE DU COMPLEXE <math>\beta</math>CD – JAS.....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURE 38: ROESY 2D DE <math>\beta</math>CD – CIT (MÉLANGE 1/1 MM).....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURE 39: FORME GÉOMÉTRIQUE DU COMPLEXE <math>\beta</math>CD – CIT.....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURE 40: COURBE DE VARIATION DE <math>K_A</math> EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.....</b>	<b>71</b>
<b>FIGURE 41: RÉACTION DE POLYCONDENSATION ENTRE PCA ET LES CDS POUR L'OBTENTION DE POLYMÈRES.....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURE 42: SPECTRE 1H AVEC PRÉSATURATION DE POLY<math>\beta</math>CD SOLUBLE DANS D2O.....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURE 43: SPECTRE 13C J-MOD DE POLY<math>\beta</math>CD DANS D2O.....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURE 44: CARTE HSQC_DEPT DE POLY<math>\beta</math>CD DANS D2O.....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURE 45: SCHÉMA REPRÉSENTATIF DU POLY<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>78</b>
<b>FIGURE 46: SPECTRE 1H DU POLYCRYSMEB DANS D2O (UNITÉ GLUCOSIDIQUE NON SUBSTITUÉE ANNOTÉE DE 1A – 6A).....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURE 47: VARIATION DE <math>T_R</math> EN FONCTION DE TEMPS DE POLYMÉRISATION POUR LE POLY<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURE 48: SPECTRE ROESY 2D DU COMPLEXE POLY<math>\beta</math>CD – DOX.....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURE 49: SPECTRE ROESY 2D DU POLY<math>\beta</math>CD–JAS.....</b>	<b>83</b>
<b>FIGURE 50: SPECTRE ROESY 2D DU POLY<math>\beta</math>CD - CIT .....</b>	<b>83</b>



<b>FIGURE 51: VARIATION DE LA PROPORTION DE LA MOLÉCULE COMPLEXÉE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE POLY<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURE 52: SPECTRE RMN 1H EN LIQUIDE ( 20 MG DE POLYMÈRE DANS 500 ML DE D2O).....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURE 53: SPECTRES 1H HR-MAS DE POLY<math>\beta</math>CDINS.....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURE 54: SPECTRES 1H HR-MAS DE POLY<math>\beta</math>CDINS EN PRÉSENCE DE DOX (20MM).....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURE 55: SCHÉMA REPRÉSENTATIF D'UNE CYCLODEXTRINE GREFFÉE SUR UN TEXTILE À L'AIDE DE L'ACIDE CITRIQUE.....</b>	<b>94</b>
<b>FIGURE 56: SPECTRES 1H HR-MAS DES DIFFÉRENTS TEXTILES DANS D2O (SYNDIFF, NS = 4K).....</b>	<b>95</b>
<b>FIGURE 57: SPECTRE 1H HR-MAS DE TEXTILE_CD EN PRÉSENCE DE DOX (10 MM, NS = 512).....</b>	<b>96</b>

## Liste des tableaux

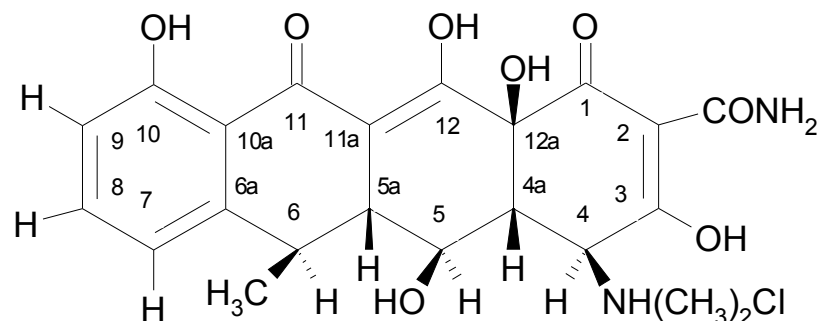
<b>TABLEAU 1 : CARACTÉRISTIQUES DES 3 PRINCIPALES CDS.....</b>	<b>7</b>
<b>TABLEAU 2 : MÉTHODES GRAPHIQUES, CORRESPONDANT AUX TROIS ÉQUATIONS, PERMETTANT L'OBTENTION DE LA CONSTANTE D'ASSOCIATION KA. ....</b>	<b>19</b>
<b>TABLEAU 3: ATTRIBUTION DE 1H ET DE 13C DE LA βCD DANS D2O.....</b>	<b>42</b>
<b>TABLEAU 4: DÉTERMINATION DES RAYONS DES CYCLODEXTRINES (I : NOTRE TRAVAIL "DANS D2O"; A, B SONT RESPECTIVEMENT LES VALEURS DÉTERMINÉES DANS LES RÉFÉRENCES 1, 2) .....</b>	<b>42</b>
<b>TABLEAU 5: INFLUENCE DE LA CYCLODEXTRINE SUR LA SOLUBILITÉ DE L'HYDROCORTISONE (HPβCD: HYDROXYPROPYL β-CYCLODEXTRINE, RAMEB: RANDOMLY METHYLATED β-CYCLODEXTRINE, DIMEB : DIMETHYLATED β-CYCLODEXTRINE).....</b>	<b>43</b>
<b>TABLEAU 6: ATTRIBUTION DE 1H ET DE 13C DE CRYSMEB DANS D2O (UNITÉ GLUCOSIDIQUE NON SUBSTITUÉE ANNOTÉE DE 1A – 6A).....</b>	<b>44</b>
<b>TABLEAU 7: VARIATION DE LA PROPORTION DE LA FORME ÉNOL / CÉTO EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.....</b>	<b>46</b>
<b>TABLEAU 8: VARIATIONS DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES EN FONCTION DE LA PROPORTION DES MOLÉCULES (<math> \Delta\delta  =  \delta_{\text{LIBRE}} - \delta_{\text{COMPLEXÉ}}</math>).....</b>	<b>48</b>
<b>TABLEAU 9: VARIATIONS DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DE PROTONS DE DOX EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE βCD.....</b>	<b>50</b>
<b>TABLEAU 10: CONSTANTES D'ASSOCIATIONS DU COMPLEXE DOX AVEC DIFFÉRENTES CYCLODEXTRINES (N = NÉGLIGEABLE).....</b>	<b>51</b>
<b>TABLEAU 11: COEFFICIENTS DE DIFFUSION DES CONSTITUANTS DE COMPLEXE βCD – DOX.....</b>	<b>53</b>
<b>([DOX] = 0,5 MM, D EN 10-10 M<sup>2</sup>/S, DβCD SEUL = DCOMPLEXÉ = 2,28 . 10-10 M<sup>2</sup>/S ) .....</b>	<b>53</b>
<b>TABLEAU 12: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION.....</b>	<b>59</b>
<b>(R = [X]/([βCD] + [JAS]) ; X = βCD OU JAS).....</b>	<b>59</b>
<b>TABLEAU 13: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE POUR DIFFÉRENTES PROPORTIONS βCD-CIT.....</b>	<b>60</b>
<b>TABLEAU 14: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE H10 DE JAS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE βCD NATIVE.....</b>	<b>61</b>

<b>TABLEAU 15: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE H11 DE LA JAS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE <math>\alpha</math>CD NATIVE.....</b>	<b>62</b>
<b>TABLEAU 16: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE H10 DU CIT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE <math>\beta</math>CD NATIVE.....</b>	<b>62</b>
<b>TABLEAU 17: VARIATIONS DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE H10 DU CIT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE <math>\alpha</math>CD NATIVE.....</b>	<b>63</b>
<b>TABLEAU 18: COEFFICIENTS DE DIFFUSION DE <math>\alpha</math>CD ET JASMONE DANS DIFFÉRENTS MÉLANGES (D EN 10-10 M<sup>2</sup>/S).....</b>	<b>64</b>
<b>TABLEAU 19: CONSTANTES D'ASSOCIATION DE DIFFÉRENTS COMPLEXES D'INCLUSION.....</b>	<b>65</b>
<b>TABLEAU 20: DISTANCE ENTRE LES PROTONS DE LA JASMONE ET CEUX DE LA <math>\beta</math>CD.....</b>	<b>68</b>
<b>TABLEAU 21: LES CONSTANTES D'ASSOCIATIONS DÉTERMINÉES PAR SCOTT ET DOSY.....</b>	<b>69</b>
<b>TABLEAU 22: CONSTANTES D'ASSOCIATION DU COMPLEXE <math>\beta</math>CD – DOX À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES.....</b>	<b>70</b>
<b>TABLEAU 23: ATTRIBUTION PROTON ET CARBONE DE POLY<math>\beta</math>CD DANS D<sub>2</sub>O..</b>	<b>78</b>
<b>TABLEAU 24: ATTRIBUTION PROTON ET CARBONE DU POLYCRYSMEB DANS D<sub>2</sub>O.....</b>	<b>80</b>
<b>TABLEAU 25: VARIATION DU TAUX DE RÉTICULATION (TR) ET DE LA QUANTITÉ DE L'UNITÉ CYCLODEXTRINE DANS 10 MG DE POLYMÈRE AVEC LE TEMPS DE POLYMÉRISATION (T).....</b>	<b>81</b>
<b>TABLEAU 26: COEFFICIENTS DE DIFFUSION D EN 10-10 M<sup>2</sup>/S DES CONSTITUANTS DU COMPLEXE POLY<math>\beta</math>CD–DOX ([DOX] = 0,5 MM, AVEC DPOLY-<math>\beta</math>CD SEUL = DCOMPLEXE = 0,95 X 10-10 M<sup>2</sup>/S).....</b>	<b>85</b>
<b>TABLEAU 27: LES VALEURS DES CONSTANTES D'ASSOCIATIONS DES DIFFÉRENTS COMPLEXES OBTENUS PAR DOSY.....</b>	<b>86</b>
<b>TABLEAU 28: VARIATION DE LA CONCENTRATION DE DOX SELON LES TEXTILES.....</b>	<b>96</b>

# **ANNEXES**

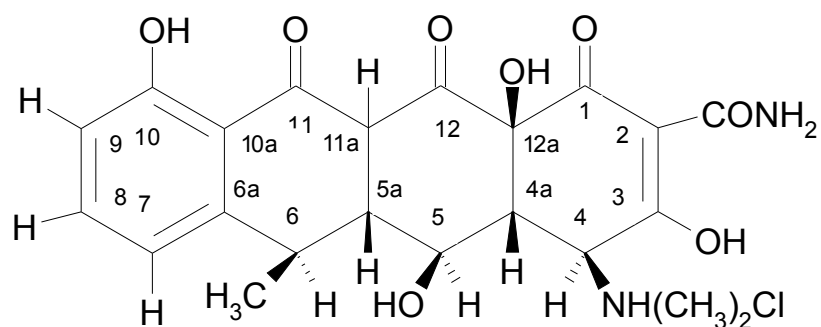
# 1. Attribution des spectres RMN des différentes molécules étudiées

## 1. 1. Doxycycline hyclate (DOX) (dans D<sub>2</sub>O):



### a. Forme enol

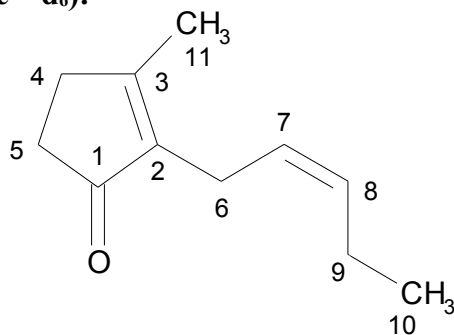
1H	$\delta$ ppm	Multiplicité	J Hz	13C	$\delta$ ppm
1	-----	-----	-----	1	191.24
2	-----	-----	-----	2	99.52
3	-----	-----	-----	3	182.91
4	4.23	d	$J_{4-4a} = 1.10$	4	65.07
4a	2.77	dd	$J_{4a-4} = 1.10 ; J_{4a-5} = 11.34$	4a	38.20
5	3.68	dd	$J_{5-5a} = 8.23 ; J_{5-4a} = 11.53$	5	66.96
5a	2.51	dd	$J_{5a-5} = 8.23 ; J_{5a-6} = 12.44$	5a	43.56
6	2.71	m	$J_{6-5a} = 12.44 ; J_{6-6Me} = 6.59$	6	35.92
6a	-----	-----	-----	6a	145.70
7	6.95	d	$J_{7-8} = 7.87$	7	113.93
8	7.48	dd	$J_{8-7} = J_{8-9} = 8.05$	8	134.53
9	6.79	d	$J_{9-8} = 8.23$	9	113.42
10	-----	-----	-----	10	158.08
10a	-----	-----	-----	10a	103.80
11	-----	-----	-----	11	188.93
11a	-----	-----	-----	11a	105.42
12	-----	-----	-----	12	169.70
12a	-----	-----	-----	12a	72.35
6-Me	1.45	d	$J_{6-Me-6} = 6.77$	6-Me	12.65
4-N(Me) <sub>2</sub>	2.86	S	-----	4-N(Me) <sub>2</sub>	38.89
				CO-NH <sub>2</sub>	168.62



**b- Forme cétone**

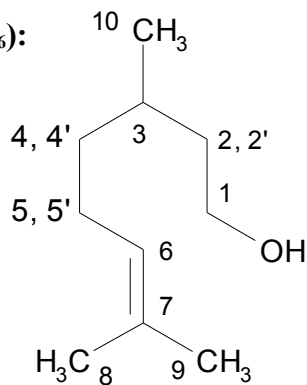
<sup>1</sup> H	δ ppm	Multiplicité	J Hz	<sup>13</sup> C	δ ppm
1	-----	-----	-----	1	-----
2	-----	-----	-----	2	-----
3	-----	-----	-----	3	181.92
4	4.036	d	J <sub>4-4a</sub> = 1.83	4	67.46
4a	2.94	dd	J <sub>4a-4</sub> = 1.83 ; J <sub>4a-5</sub> = 10.98	4a	42.60
5	3.53	dd	J <sub>5-4a</sub> = J <sub>5-5a</sub> = 10.98	5	64.83
5a	2.58	dd	J <sub>5a-5</sub> = 10.98 ; J <sub>5a-6</sub> = 2.01	5a	44.67
6	3.45	m	J <sub>6-5a</sub> = 2.01 ; J <sub>6-6Me</sub> = 7.68	6	30.86
6a	-----	-----	-----	6a	145.40
7	6.85	d	J <sub>7-8</sub> = 7.32	7	118.54
8	7.48	dd	J <sub>8-7</sub> = J <sub>8-9</sub> = 8.05	8	136.33
9	6.78	d	J <sub>9-8</sub> = 8.05	9	113.42
10	-----	-----	-----	10	158.56
10a	-----	-----	-----	10a	-----
11	-----	-----	-----	11	-----
11a	-----	-----	-----	11a	-----
12	-----	-----	-----	12	-----
12a	-----	-----	-----	12a	76.21
6-Me	1.23	d	J <sub>6-6Me</sub> = 7.32	6-Me	18.88
4-N(Me) <sub>2</sub>	2.87	s	-----	4-N(Me) <sub>2</sub>	40.36
				CO-NH <sub>2</sub>	167.23

### 1. 2. Jasmone (dans l'acétone – d<sub>6</sub>):



<sup>1</sup> H	δ ppm	multiplicité	<sup>13</sup> C	δ ppm
1	-----	-----	1	207,15
2	-----	-----	2	172,59
3	-----	-----	3	137,93
4	2.5	m	4	31,9
5	2.24	m	5	34,53
6	2.9	d ; J <sub>6-7</sub> = 7.22 Hz	6	21,64
7	5.22	m	7	126,33
8	5.32	m	8	132,46
9	2.16	m	9	21,10
10	0.96	t ; J <sub>10-9</sub> = 7.45 Hz	10	14,45
11	2.07	s	11	17,13

### 1. 3. Citronellol (dans l'acétone – d<sub>6</sub>):



<sup>1</sup> H	δ ppm	<sup>13</sup> C	δ ppm
1	3,56	1	60,42
2; 2'	1,56; 1,315	2	40,74
3	1,59	3	30
4; 4'	1,34; 1,15	4	38,23
5	2,00	5	26,24
6	5,1	6	125,5
7	-----	7	131,6
8	1,59	8	22,49
9	1,65	9	30,82
10	0,9	10	19,98

**1.4.  $\alpha$ CD native (dans D<sub>2</sub>O):**

<sup>1</sup> H	$\delta$ ppm	Multiplicité	<sup>2</sup> J Hz	<sup>13</sup> C	$\delta$ ppm
1	5,05	d	<sup>2</sup> J <sub>1,2</sub> = 3,48	1	101,32
2	3,64	dd	<sup>2</sup> J <sub>2,1</sub> = 3,48 ; <sup>2</sup> J <sub>2,3</sub> = 9,88	2	71,63
3	3,98	t	<sup>2</sup> J <sub>3,2</sub> = <sup>2</sup> J <sub>3,4</sub> = 9,55	3	73,24
4	3,58	dd	<sup>2</sup> J <sub>4,3</sub> = 9,55	4	81,16
5	3,85	-----	-----	5	71,96
6	3,87	-----	-----	6	60,36

**1. 5.  $\gamma$ CD native (dans D<sub>2</sub>O):**

<sup>1</sup> H	$\delta$ ppm	Multiplicité	<sup>2</sup> J Hz	<sup>13</sup> C	$\delta$ ppm
1	5,08	d	<sup>2</sup> J <sub>1,2</sub> = 3,84	1	101,6
2	3,63	dd	<sup>2</sup> J <sub>2,1</sub> = 3,84 ; <sup>2</sup> J <sub>2,3</sub> = 9,88	2	71,70
3	3,90	t	<sup>2</sup> J <sub>3,2</sub> = <sup>2</sup> J <sub>3,4</sub> = 9,51	3	72,87
4	3,56	dd	<sup>2</sup> J <sub>4,3</sub> = 9,51	4	80,38
5	3,82	-----	-----	5	72,25
6	3,84	-----	-----	6	60,18

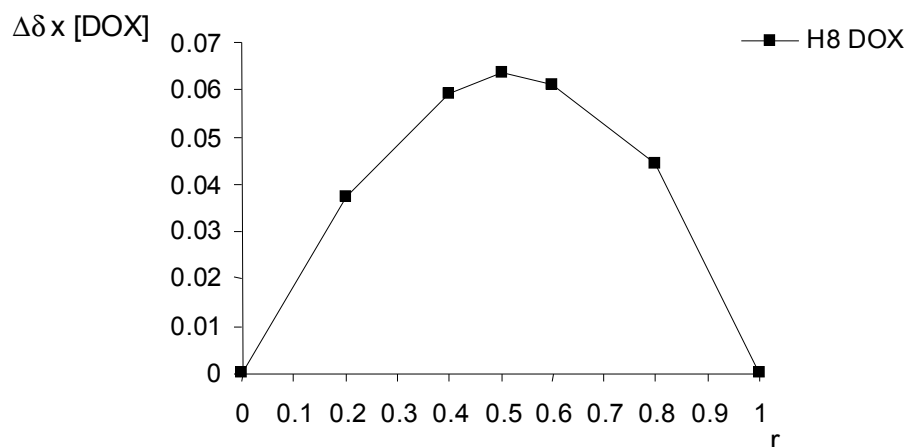


## 2. Méthode de Job

### 2. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :

[ $\gamma$ CD] mM	[DOX] mM	r	$\delta$ (H8 de DOX) HZ	$\Delta\delta$ (Hz)	$\Delta\delta \times$ [DOX]
20	0	0	-----	-----	0
16	4	0,2	2239,45	9,30	0,037
12	8	0,4	2241,32	7,43	0,059
10	10	0,5	2242,36	6,39	0,064
8	12	0,6	2243,65	5,10	0,061
4	16	0,8	2245,98	2,77	0,044
0	20	1	2248,75	0	0

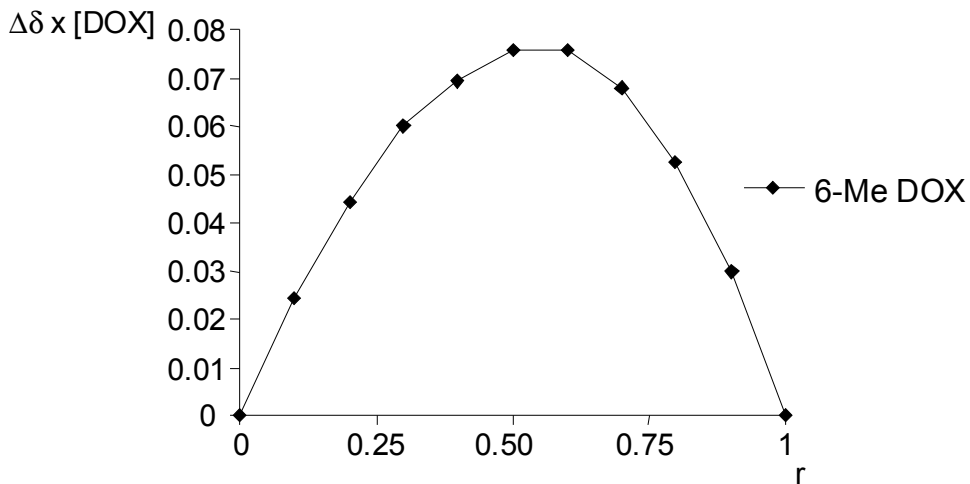
Avec :  $r = [\text{DOX}] / ([\text{DOX}] + [\gamma\text{CD}])$



### 2. 2. Complexe CRYSMEB – DOX :

[CRYS] mM	[DOX] mM	r	$\delta$ (6-Me de DOX) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times$ [DOX] $\times 10^{-2}$
10	0	0	-----	0	0
9	1	0,1	467,09	23,96	2,4
8	2	0,2	465,27	22,14	4,43
7	3	0,3	463,07	19,94	5,98
6	4	0,4	460,51	17,38	6,95
5	5	0,5	458,31	15,18	7,59
4	6	0,6	455,75	12,62	7,57
3	7	0,7	452,82	9,69	6,78
2	8	0,8	449,71	6,58	5,26
1	9	0,9	446,42	3,29	2,96
0	10	1	443,13	0	0

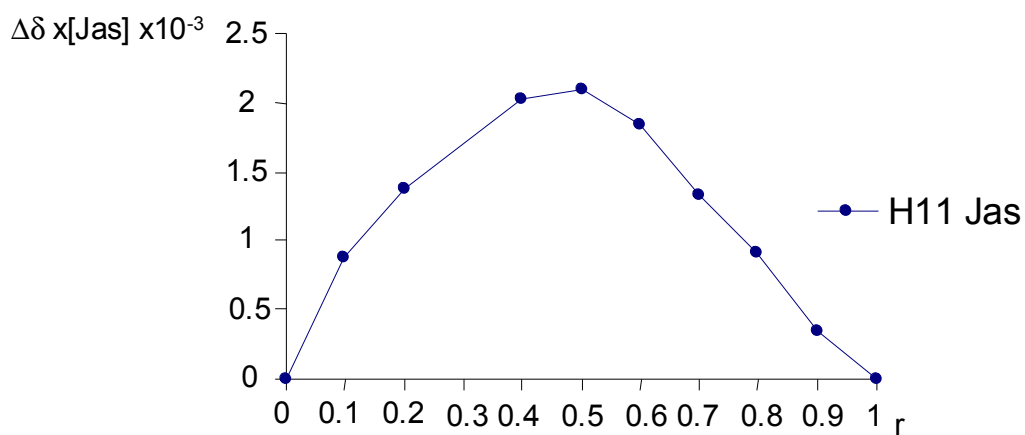
Avec :  $r = [\text{DOX}] / ([\text{DOX}] + [\text{CRYS}])$



### 2. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :

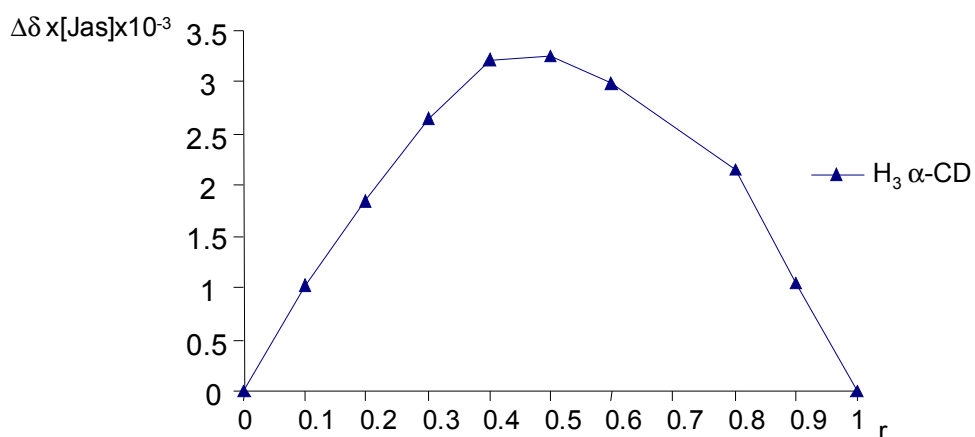
$[\alpha\text{CD}]$ mM	$[\text{jas}]$ mM	r	$\delta$ ( $\text{H}_{11}$ de jas) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times [\text{jas}] \times 10^{-3}$
0	2	1	642,48	0	0
0,2	1,8	0,9	642,67	0,19	0,34
0,4	1,6	0,8	643,05	0,57	0,91
0,6	1,4	0,7	643,43	0,95	1,33
0,8	1,2	0,6	644,01	1,53	1,84
1	1	0,5	644,58	2,1	2,10
1,2	0,8	0,4	645,01	2,53	2,02
1,6	0,4	0,2	645,92	3,44	1,38
1,8	0,2	0,1	646,87	4,39	0,88
2	0	0	0	0	0

Avec:  $r = [\text{jas}] / ([\alpha\text{CD}] + [\text{jas}])$



[ $\alpha$ CD] mM	[jas] mM	r	$\delta$ (H <sub>3</sub> de $\alpha$ CD) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times [\alpha\text{CD}] \times 10^{-3}$
0	2	0	0	0	0
0,2	1,8	0,1	1189,15	5,17	1,03
0,4	1,6	0,2	1189,73	4,59	1,84
0,6	1,4	0,3	1189,92	4,4	2,64
0,8	1,2	0,4	1190,3	4,02	3,22
1	1	0,5	1191,07	3,25	3,25
1,2	0,8	0,6	1191,83	2,49	2,99
1,6	0,4	0,8	1192,98	1,34	2,14
1,8	0,2	0,9	1193,74	0,58	1,04
2	0	1	1194,32	0	0

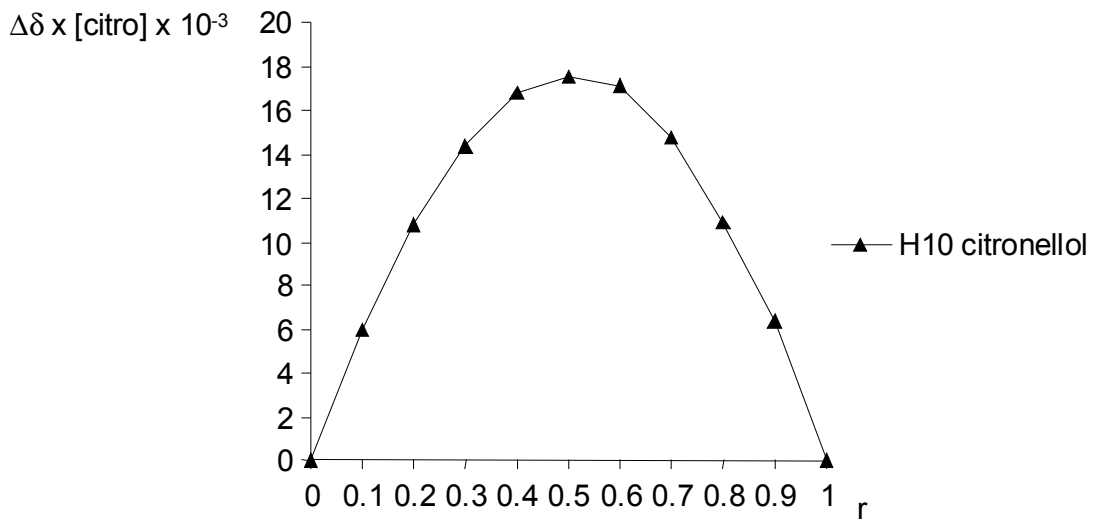
Avec:  $r = [\alpha\text{CD}] / ([\alpha\text{CD}] + [\text{jas}])$



#### 2.4. Complexe $\alpha$ CD – Citronellol :

[ $\alpha$ CD] mM	[cit] mM	r	$\delta$ (H <sub>10</sub> de cit) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times [\text{cit}] \times 10^{-3}$
0	2	1	269	0	0
0,2	1,8	0,9	272	3,51	6,32
0,4	1,6	0,8	276	6,80	10,9
0,6	1,4	0,7	279	10,5	14,7
0,8	1,2	0,6	283	14,3	17,1
1	1	0,5	286	17,5	17,5
1,2	0,8	0,4	290	21,1	16,8
1,4	0,6	0,3	293	23,9	14,3
1,6	0,4	0,2	296	27	10,8
1,8	0,2	0,1	298	29,6	5,92
2	0	0	0	0	0

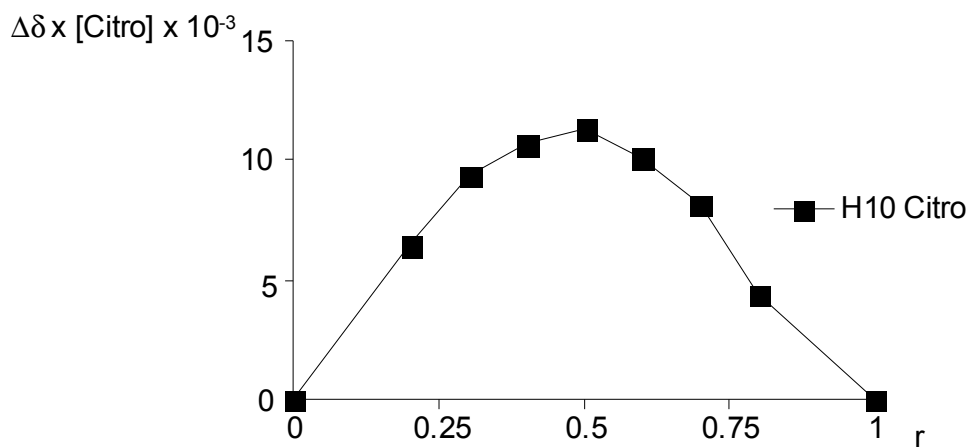
Avec:  $r = [\text{cit}] / ([\alpha\text{CD}] + [\text{cit}])$



## 2. 5. Complexe $\beta$ CD – Citronellol :

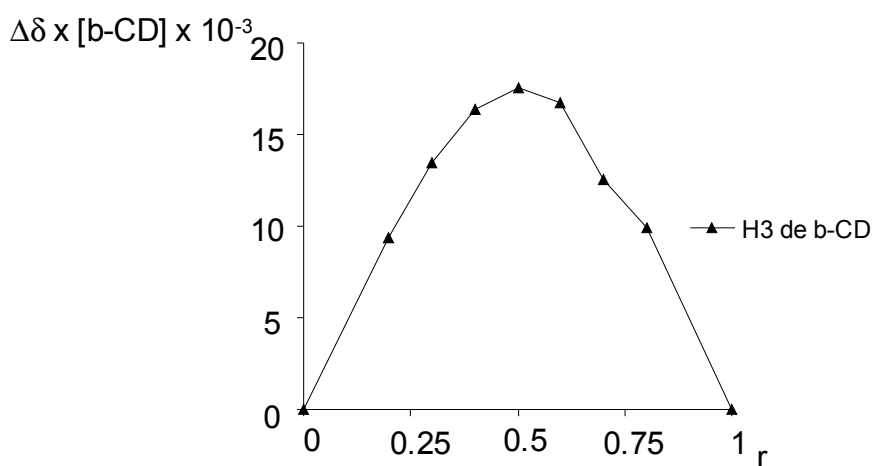
$[\beta\text{CD}]$ mM	$[\text{cit}]$ mM	$r$	$\delta$ ( $\text{H}_{10}$ de cit) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times [\text{cit}] \times 10^{-3}$
2	0	0	0	0	0
1,6	0,4	0,2	285,23	16,28	6,51
1,4	0,6	0,3	284,5	15,55	9,33
1,2	0,8	0,4	282,31	13,36	10,7
1	1	0,5	280,29	11,34	11,3
0,8	1,2	0,6	277,37	8,42	10,1
0,6	1,4	0,7	274,8	5,85	8,19
0,4	1,6	0,8	271,69	2,74	4,38
0	2	1	268,95	0	0

Avec:  $r = [\text{cit}]/([\beta\text{CD}] + [\text{cit}])$



[ $\beta$ CD] mM	[cit] mM	r	$\delta$ (H <sub>3</sub> de $\beta$ CD) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$\Delta\delta \times [\text{cit}] \times 10^{-3}$
2	0	1	1172,1	0	0
1,6	0,4	0,8	1165,88	6,22	9,95
1,4	0,6	0,7	1163,13	8,97	12,6
1,2	0,8	0,6	1158,19	13,91	16,7
1	1	0,5	1154,54	17,56	17,6
0,8	1,2	0,4	1151,61	20,49	16,4
0,6	1,4	0,3	1149,6	22,5	13,5
0,4	1,6	0,2	1148,68	23,42	9,37
0	2	0	0	0	0

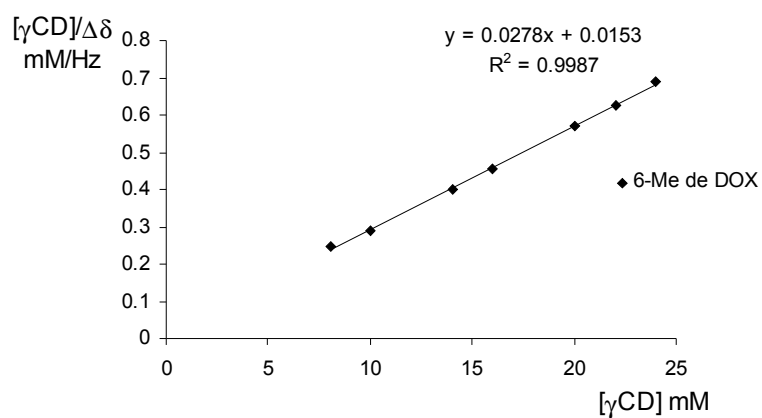
Avec:  $r = [\beta\text{CD}] / ([\beta\text{CD}] + [\text{cit}])$



### 3. Méthode de Scott

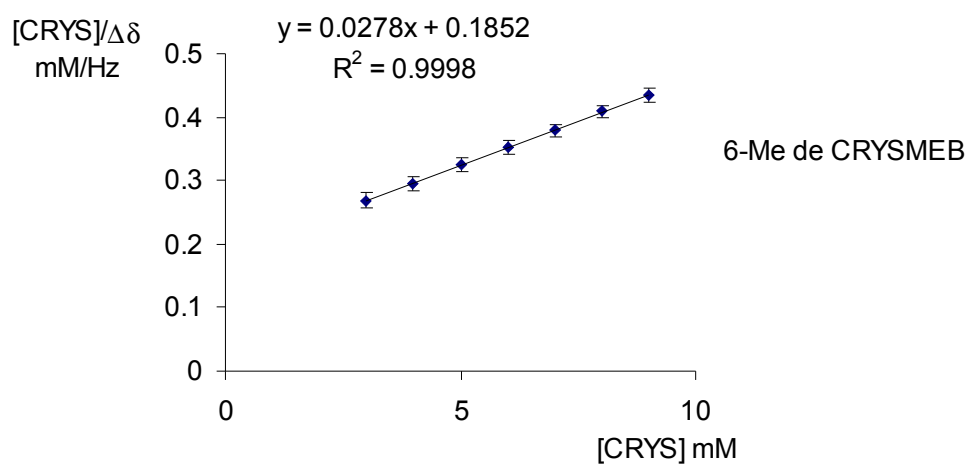
#### 3. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :

[ $\gamma$ CD] mM	[DOX] mM	$\delta$ (6-Me de DOX) Hz	$\Delta\delta$ Hz	[ $\gamma$ CD]/ $\Delta\delta$ mM/Hz
0	1	419,88	0	0
8	1	452,27	32,39	0,24
10	1	454,28	34,4	0,29
14	1	455,01	35,13	0,39
16	1	455,01	35,13	0,45
20	1	455,01	35,13	0,57
22	1	455,01	35,13	0,62
24	1	454,64	34,76	0,69



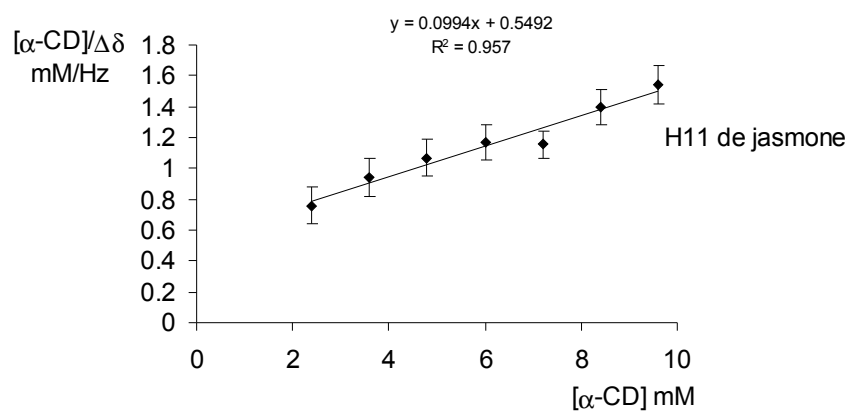
### 3. 2. Complexe CRYSMEB – DOX :

[CRYS] mM	[DOX] mM	$\delta$ (6-Me de DOX) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$[\text{CRYS}]/\Delta\delta$ mM/Hz
0	0,5	447,15	0	0
3	0,5	458,31	11,16	0,26
4	0,5	460,69	13,54	0,29
5	0,5	462,52	15,37	0,32
6	0,5	464,17	17,02	0,35
7	0,5	465,63	18,48	0,37
8	0,5	466,73	19,58	0,40
9	0,5	467,83	20,68	0,43



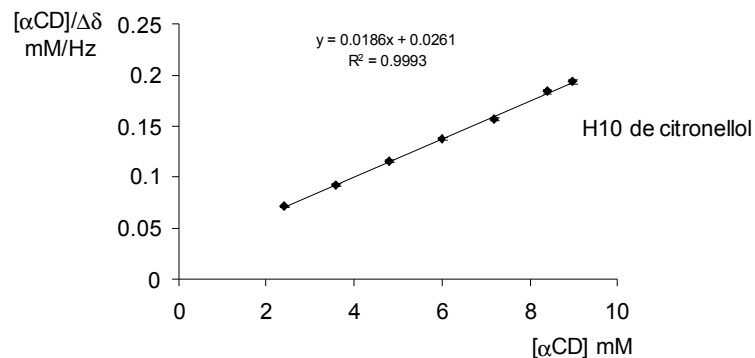
### 3. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :

$[\alpha\text{CD}]$ mM	$[\text{jas}]$ mM	$\delta$ ( $\text{H}_{11}$ de jas) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$[\alpha\text{CD}] / \Delta\delta$ mM/Hz
0	0,5	641,16	0	0
2,4	0,5	644,33	3,17	0,75
3,6	0,5	644,99	3,83	0,93
4,8	0,5	645,65	4,49	1,06
6	0,5	646,31	5,15	1,16
7,2	0,5	647,4	6,24	1,15
8,4	0,5	647,18	6,02	1,39
9,6	0,5	647,4	6,24	1,53



### 3. 4. Complexe $\alpha$ CD – citronellol :

$[\alpha\text{CD}]$ mM	$[\text{cit}]$ mM	$\delta$ ( $\text{H}_{10}$ de cit) Hz	$\Delta\delta$ Hz	$[\alpha\text{CD}] / \Delta\delta$ mM/Hz
0	0,5	267,91	0	0
2,4	0,5	301,45	33,54	0,07
3,6	0,5	306,71	38,8	0,09
4,8	0,5	309,56	41,65	0,11
6	0,5	311,53	43,62	0,13
7,2	0,5	313,51	45,6	0,15
8,4	0,5	313,51	45,6	0,18
9,6	0,5	314,38	46,47	0,19



## 4. Méthode DOSY

### 4. 1. Complexe CRYSMEB – DOX :

[CRYS] mM	[DOX] mM	D <sub>DOX corrigé (6-Me)</sub> m <sup>2</sup> /s	D <sub>CRYS corrigé (H3)</sub> m <sup>2</sup> /s	ρ
0	0,5	3,57 x 10 <sup>-10</sup>	-	-
2	0	-	2,35 x 10 <sup>-10</sup>	-
2	0,5	3,13 x 10 <sup>-10</sup>	2,27 x 10 <sup>-10</sup>	0,247
3	0,5	3,19 x 10 <sup>-10</sup>	2,25 x 10 <sup>-10</sup>	0,330
5	0,5	3,06 x 10 <sup>-10</sup>	2,36 x 10 <sup>-10</sup>	0,451

### 4. 2. Complexe αCD – jasmone :

[αCD] mM	[jas] mM	D <sub>jas corrigé (H10)</sub> m <sup>2</sup> /s	D <sub>αCD corrigé (H3)</sub> m <sup>2</sup> /s	ρ
0	1	5,56 x 10 <sup>-10</sup>	0	-
2	0	-	2,57 x 10 <sup>-10</sup>	-
1	1	5,28 x 10 <sup>-10</sup>	2,62 x 10 <sup>-10</sup>	0,093
1,5	1	4,98 x 10 <sup>-10</sup>	2,55 x 10 <sup>-10</sup>	0,190
2	1	5,07 x 10 <sup>-10</sup>	2,50 x 10 <sup>-10</sup>	0,158
2,5	1	4,89 x 10 <sup>-10</sup>	2,50 x 10 <sup>-10</sup>	0,217

### 4. 3. Complexe αCD – citronellol :

[αCD] mM	[cit] mM	D <sub>cit corrigé (H10)</sub> m <sup>2</sup> /s	D <sub>αCD corrigé (H3)</sub> m <sup>2</sup> /s	ρ
0	1	5,12 x 10 <sup>-10</sup>	0	-
2	-	-	2,57 x 10 <sup>-10</sup>	-



1	1	$4,17 \times 10^{-10}$	$2,55 \times 10^{-10}$	0,37
2	1	$3,84 \times 10^{-10}$	$2,55 \times 10^{-10}$	0,49
3	1	$3,43 \times 10^{-10}$	$2,52 \times 10^{-10}$	0,65

#### 4. 4. Complexe $\beta$ CD – citronellol :

[ $\beta$ CD] mM	[cit] mM	$D_{\text{cit corrigé (H10) m}^2/\text{s}}$	$D_{\alpha\text{CD corrigé (H3) m}^2/\text{s}}$	$\rho$
0	1	$5,12 \times 10^{-10}$	-	-
2	0	-	$2,28 \times 10^{-10}$	-
1	1	$3,96 \times 10^{-10}$	$2,63 \times 10^{-10}$	0,46
2	1	$3,51 \times 10^{-10}$	$2,53 \times 10^{-10}$	0,62
4	1	$3,14 \times 10^{-10}$	$2,28 \times 10^{-10}$	0,69

#### 4. 5. Complexe poly $\alpha$ CD – citronellol :

[P $\alpha$ CD] mM	[cit] mM	$D_{\text{cit corrigé (H10) m}^2/\text{s}}$	$D_{\text{P}\alpha\text{CD corrigé (H3) m}^2/\text{s}}$	$\rho$
0	0,5	$5,12 \times 10^{-10}$	0	-
2	0	-	$9,64 \times 10^{-11}$	-
2	0,5	$3,68 \times 10^{-10}$	$8,87 \times 10^{-11}$	0,34
4	0,5	$2,95 \times 10^{-10}$	$9,66 \times 10^{-11}$	0,52
6	0,5	$2,33 \times 10^{-10}$	$8,24 \times 10^{-11}$	0,65

#### 4. 6. Complexe poly $\alpha$ CD – jasmone:

[P $\alpha$ CD] mM	[jas] mM	$D_{\text{jas corrigé (H10) m}^2/\text{s}}$	$D_{\text{P}\alpha\text{CD corrigé (H3) m}^2/\text{s}}$	$\rho$
0	0,5	$5,56 \times 10^{-10}$	0	-
2	0	-	$9,64 \times 10^{-11}$	-
2	0,5	$4,80 \times 10^{-10}$	$9,53 \times 10^{-11}$	0,16
3	0,5	$4,57 \times 10^{-10}$	$8,59 \times 10^{-11}$	0,21
4	0,5	$4,27 \times 10^{-10}$	$9,00 \times 10^{-11}$	0,27

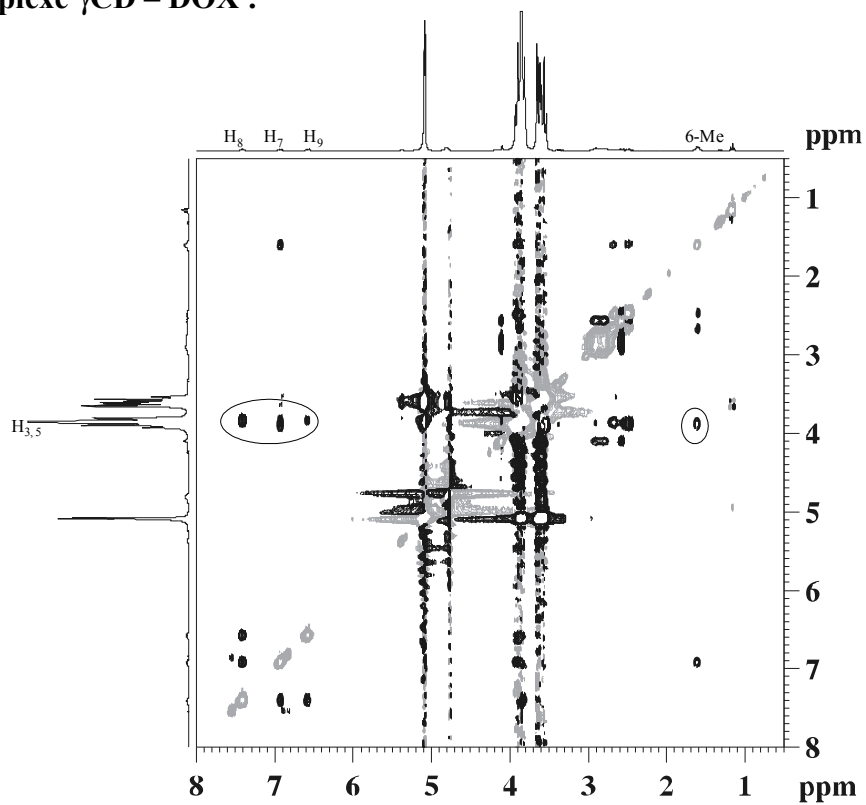
#### 4. 7. Complexe PolyCRYSMEB – DOX :

[PCRYYS] mM	[DOX] mM	$D_{\text{DOX corrigé (6-Me) m}^2/\text{s}}$	$D_{\text{CRYYS corrigé (H3) m}^2/\text{s}}$	$\rho$
0	0,5	$3,57 \times 10^{-10}$	0	-
2	0	-	$1,16 \times 10^{-10}$	-
2	0,5	$2,89 \times 10^{-10}$	$1,17 \times 10^{-10}$	0,28
3	0,5	$2,42 \times 10^{-10}$	$1,15 \times 10^{-10}$	0,48

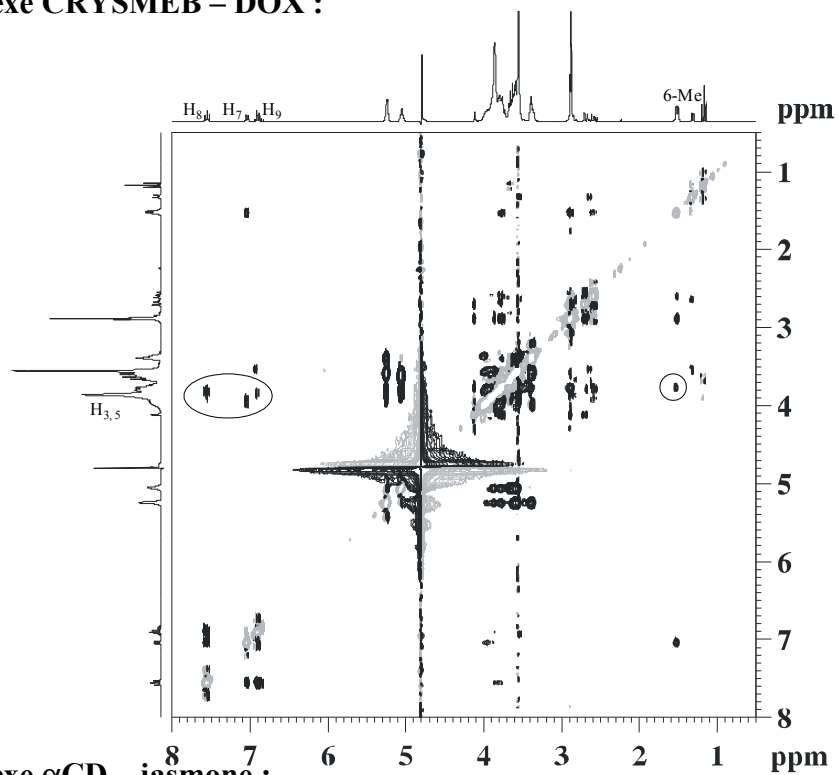
5	0,5	$2,16 \times 10^{-10}$	$1,15 \times 10^{-10}$	0,58
---	-----	------------------------	------------------------	------

## 5. ROESY 2D :

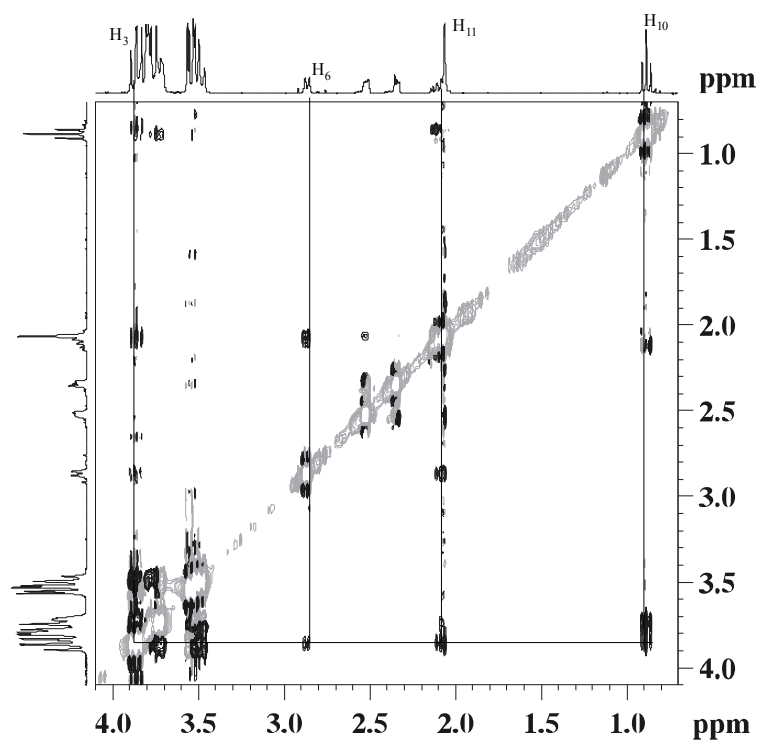
### 5. 1. Complexe $\gamma$ CD – DOX :



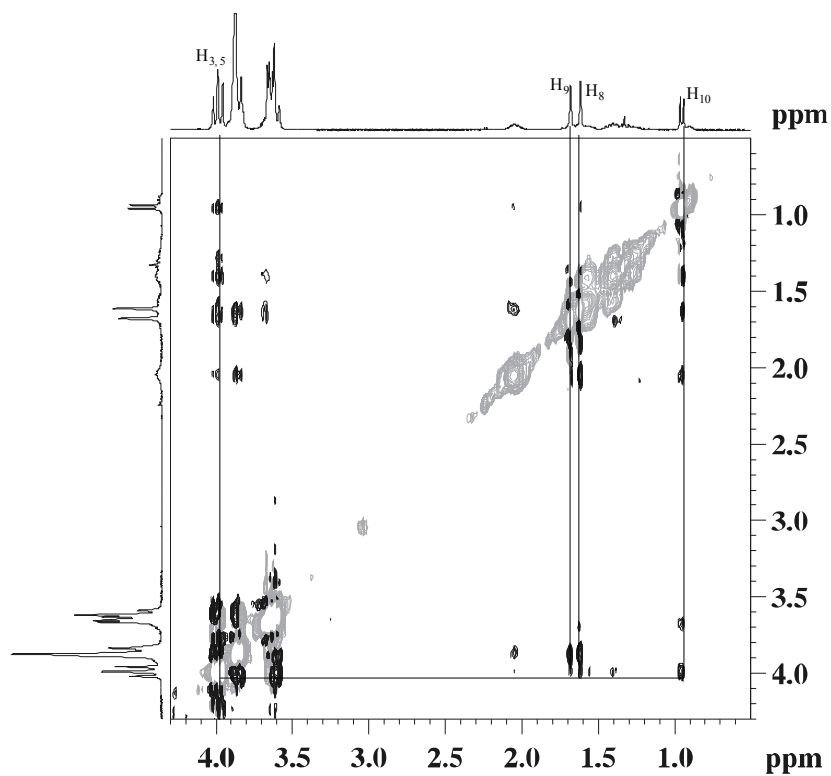
## 5. 2. Complexe CRYSMEB – DOX :



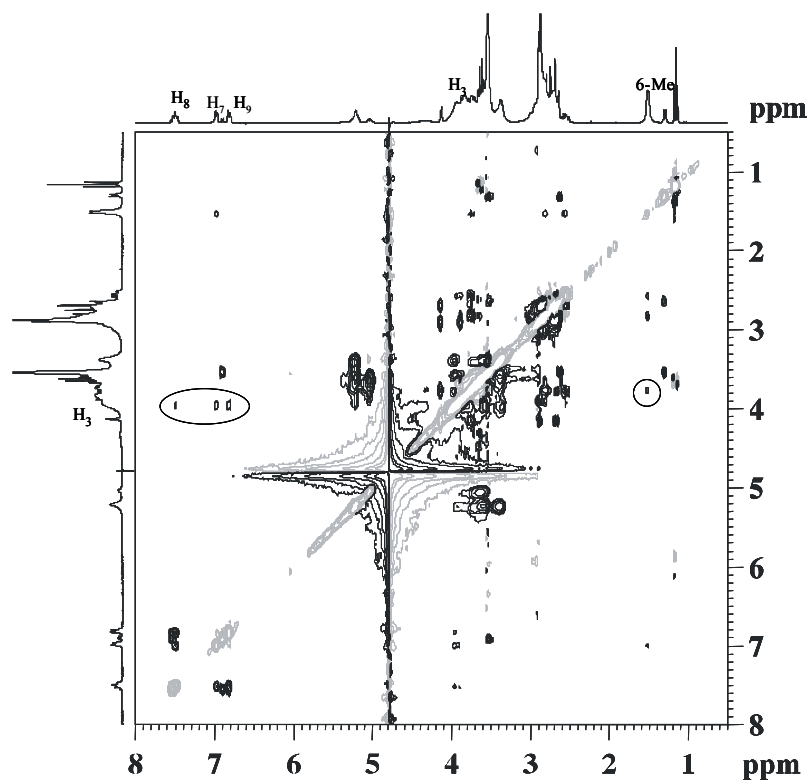
## 5. 3. Complexe $\alpha$ CD – jasmone :



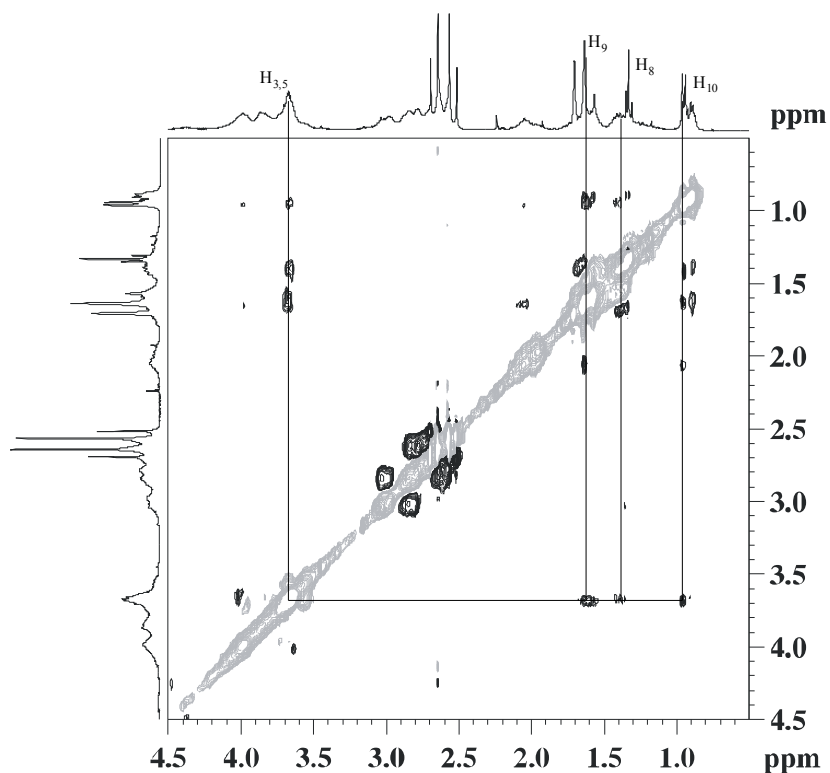
## 5. 4. Complexe $\alpha$ CD – citronellol :



5. 5. Complexe polyCRYSMEB – DOX :



5. 6. Complexe PolyαCD – citronellol



**6. Publication : Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2005**

**Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycyclin-hyclate: NMR  
investigation of their characterisation and stability**

Youssef BAKKOUR, Gaston VERMEERSCH, Michel MORCELLET\*, François  
BOSCHIN\*, Bernard MARTEL\* and Nathalie AZAROUAL

*Laboratoire de Physique, UMR CNRS 8009, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques, BP83, 59006 Lille cedex.*

*\* Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UMR CNRS 8009, Université des  
Sciences et Technologie de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.*