

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté de la Technologie
Département Génie des Procédés



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master
En GENIE DES PROCÉDES
Option **SCIENCE ET TECHNOLOGIE DU MÉDICAMENT**

Par : BELKACEMI Amina

**Amélioration de la solubilité d'un anti-
cancéreux (Camptothécine) par piégeage à
l'aide de polymère de cyclodextrine**

Soutenu devant le jury composé de:

Président : Mr M. IGUER-OUADA

Examineur : Mr F. REZGUI

Invitée : Mme F. BRADAI

Encadreur : Mr S. FATMI

Juin 2013

Aux

Absents

Remerciement

Je désire tout d'abord exprimer ma très grande reconnaissance à l'égard de monsieur FATMI, qui non seulement a bien voulu diriger ce travail mais a tout mis en œuvre pour son bon déroulement par sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

Je le remercie de m'avoir fait bénéficier de son expérience, de m'avoir guidé avec patience, et tout particulièrement pour la rigueur scientifique qu'il a su m'inculquer, qu'il trouve ici le témoignage de ma plus haute considération et de mon plus profond respect.

J'adresse également mes remerciements à madame AMRANI, pour sa bonne humeur, sa disponibilité permanente, et particulièrement pour m'avoir soutenue et encouragée dans mes moments de doute.

Ainsi qu'aux techniciens et techniciennes, pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de leurs laboratoires et pour leurs aides maintes fois renouvelées.

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'être présents, de s'être penché sur mon travail et de l'avoir examiné.

SOMMAIRE

Abréviations**Nomenclature****Liste de figures****Liste de tableaux****Introduction générale1****Chapitre I : Camptothécine.....3**

I.1. Introduction3

I.2. Historique3

I.3. Définition et structure4

I.3.1. Définition4

I.3.2. Structure4

I.4. Caractéristiques5

I.4.1. Propriétés physico-chimiques5

I.4.1.1. Basicité5

I.4.1.2. Electrophilie5

I.4.1.3. Solubilité5

I.4.1.4. Instabilité5

I.4.2. Toxicité6

I.5. Mécanisme d'action6

I.6. Problème de formulation8

I.7. Analogue de camptothécine.....8

I.7.1. Première génération : analogues plus hydrosolubles9

I.7.2. Seconde génération : les analogues lipophiles et les homocamptothécines10

I.7.3. Troisième génération : les analogues non lactoniques10

I.8. Modélisation cellulaire	11
I.8.1. Définition	11
I.8.2. Intérêts	11
I.9. Conclusion	12
Chapitre II : Cyclodextrine.....	13
II.1. Introduction	13
II.2. Historique	13
II.2.1. Période de découverte, de 1891 au milieu des années 30	13
II.2.2. Période de développement, milieu des années 30 à 1970	14
II.2.3. Période d'utilisation, de 1970 à aujourd'hui	14
II.3. Définition et structure	14
II.3.1. Définition	14
II.3.2. Structure	15
II.3.2.1. CDs naturelles	15
II.3.2.1. CDs modifiées	17
II.4. Propriétés physico-chimiques	18
II.4.1. Amphiphilie	18
II.4.2. Basicité	18
II.4.3. Énantioselectivité	18
II.4.4. Solubilité	18
II.4.5. Stabilité	19
II.5. toxicité	20
II.5.1. CDs naturelles	20
II.5.2. CDs modifiées	20
II.6. Complexe d'inclusion	21

II.6.1. Facteurs influençant le phénomène d'inclusion	21
II.6.2. Techniques de préparation d'un complexe	22
II.6.2.1. Mélange physique	22
II.6.2.2. Méthode de pétrissage (kneading)	22
II.6.2.3. Co-précipitation	22
II.6.3. Mécanisme de formation d'un complexe	22
II.6.4. Forces d'interaction	24
II.6.5. Conséquences de l'inclusion	24
II.6.6. Caractérisation	25
II.6.6.1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	25
II.6.6.2. Spectroscopie Infrarouge (IR)	26
II.6.6.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)	26
II.6.6.4. Spectroscopie UV/VISIBLE	27
II.6.6.5. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)	27
II.6.6.6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	28
II.6.6.7. Diffraction des Rayons X (DRX)	28
II.6.6.8. Test de dissolution	28
II.7. Diagramme de phase	29
II.7.1. Profil A	30
II.7.2. Profil B	30
II.8. Applications des cyclodextrines	31
II.8.1. Domaine pharmaceutique	31
II.8.2. Autres domaines	31
II.8.2.1. En cosmétologique	31
II.8.2.2. Dans l'alimentaire.....	32
II.8.2.3. En environnement	32

II.8.2.4. Dans le textile	32
II.8.2.5. En chimie catalytique et analytique	32
II.9.Travaux antérieurs	33
II.10.Conclusion	34
Chapitre III : Matériels et méthodes.....	35
III.1. PREDEVELOPPEMENT	35
III.1.1. Matériels et réactifs	35
III.1.2. Mode opératoire	35
III.2. TEST DE SOLUBILITE (TEST D’HIGUCHI)	36
III.2.1. Matériels et réactifs	36
III.2.2. Mode opératoire	36
III.3. PRÉPARATION DE COMPLEXES D’INCLUSION	38
III.3.1. Matériels et réactifs	38
III.3.2. Mode opératoire	38
III.3.2.1. Mélange physique	38
III.3.2.2. Co-évaporation	39
III.4. CARACTERISATION DES COMPLEXES D’INCLUSION	39
III.4.1. Spectroscopie Infrarouge	39
III.4.1.1. Matériels et réactifs	39
III.4.1.2. Mode opératoire	39
III.4.2. Spectroscopie par diffraction de rayons X	40
III.4.2.1. Matériels et réactifs	40
III.4.2.2. Mode opératoire	40

III.4.3. Test de dissolution	40
III.4.3.1. Matériels et réactifs	40
III.4.3.2. Mode opératoire.....	41
III.5. MODELISATION CELLULAIRE	42
III.5.1. Test sur globules rouges et hémoglobines	42
III.5.1.1. Matériels et réactifs.....	42
III.5.1.2. Mode opératoire	43
III.5.2. Test sur spermatozoïdes	44
III.5.2.1. Matériels et réactifs	44
III.5.2.2. Mode opératoire	44
Chapitre IV : Résultats et discussions.....	46
IV.1. PREDEVELOPPEMENT	46
IV.1.1. Résultats	46
IV.1.2. Observations	46
IV.1.3. Interprétation des résultats	46
IV.2. TEST DE SOLUBILITE (TEST D’HIGUCHI)	46
IV.2.1. Résultats	46
IV.2.1.1. Réalisation de la gamme étalon	46
IV.2.1.2. Test de solubilité (test d’Higuchi)	47
IV.2.2. Observations	48
IV.2.3. Interprétation des résultats	48
IV.3. CARACTERISATION DES COMPLEXES D’INCLUSION	49
IV.3.1. Résultats obtenus par Spectroscopie Infrarouge	49

IV.3.1.1. Observations	49
IV.3.1.2. Interprétation des résultats	50
IV.3.2. Résultats obtenus par la spectroscopie par diffraction des rayons X	50
IV.3.2.1. Observations	50
IV.3.2.2. Interprétation des résultats	50
IV.4. Test de dissolution	51
IV.4.1. Observations	52
IV.4.2. Interprétation des résultats	52
IV.4.3. Modélisation mathématique	53
IV.4.3.1. Observations	53
IV.4.3.2. Interprétation des résultats	53
IV.5. Modélisation cellulaire	54
IV.5.1. Test sur globules rouges et hémoglobines.....	54
IV.5.1.1. Observations	55
IV.5.1.2. Interprétation des résultats.....	55
IV.5.2. Test sur spermatozoïdes.....	56
IV.5.2.1. Les vitesses VSL, VCL, VAP.....	56
• Observations.....	58
• Interprétation des résultats	58
IV5.2.2. Pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques.....	58
• Observations	59
• Interprétations	59
Conclusion générale.....	60

Annexes

Résumé

ABREVIATIONS

α -CD: Alpha-cyclodextrine.

β -CD: Beta-cyclodextrine.

γ -CD: Gamma-cyclodextrine.

μm : Micromètre.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATG : Analyse thermogravimétrique.

CD : Cyclodextrine.

CGTase : Cyclodextrin glycosyl transferase.

CPT : Camptothécine.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DRX: Diffraction des rayons X

DSC: Differential scanning calorimetry.

HCl: Acide chlorhydrique.

HP β CD: Hydroxypropyl-béta-cyclodextrine.

IR : Infrarouge.

KBr: Bromure de potassium.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

nm: Nanomètre.

PA: Principe actif.

PBS: Sulfate buffered solution.

PEG 6000: Polyéthylène glycol 6000.

PM β CD: Per méthyle beta cyclodextrine.

Poly β CD : Polymère de bêta cyclodextrine.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

UV: Ultra violet.

NOMENCLATURE

α : Pente.

λ : Longueur d'onde (nm).

CPT 11 : camptothécine 11 (irinotecane)

F : Fraction de médicament libérée dans le temps.

K_C : Constante de stabilité ou d'association (M^{-1}).

K_D : Constante de dissociation (M^{-1}).

K_0 : Constante de libération d'ordre zéro.

K_{1st} : Constante de libération du premier ordre.

K_H : Constante de dissolution Higuchi.

K_p : Constante de vitesse.

m : Nombre de molécule de cyclodextrine (nombre entier).

n : Nombre de molécule du PA (nombre entier).

n : m : Ratio moléculaire de complexation (nombre entier).

n : Exposant indiquant le mécanisme de libération du PA.

R^2 : Coefficient de corrélation ou d'ajustement.

S_0 : Solubilité aqueuse du principe actif sans cyclodextrines (mol/l).

T : Température ($^{\circ}C$).

t : Temps.

VSL: Straight Line Velocity

VCL: Curvi Linear Velocity

VAP: Average Path Velocity

LISTE DES FIGURES

Fig I.1. Structure de la camptothécine.

Fig I.2. Forme active (Lactone) et inactive (Carboxylate) de la CPT.

Fig I.3. Mécanisme d'action de la topoisomérase I.

Fig I.4. Mécanisme d'action de la CPT.

Fig I.5. Formule chimique de la Topotécane, Irinotécane et de la SN-38.

Fig I.6. Formule chimique de l'Homocamptothécine.

Fig I.7. Formule chimique du S36272, S39625 et du S38809.

Fig II.1. Représentation schématique de la conformation chaise rigide de la α -, β -, et γ -CD.

Fig II.2. Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine.

Fig II.3. Structure chimique des cyclodextrines α , β , γ .

Fig II.4. Processus de complexation des cyclodextrine.

Fig II.5. Représentation schématique de complexes d'inclusion 1 :1, 2 :1, 1 :2.

Fig II.6. Représentation graphique des types de diagramme de solubilité selon la classification de Higuchi et Connors.

Fig IV.1. Courbe d'étalonnage de la CPT.

Fig IV.2. Diagramme de solubilité POLY β -CD.

Fig IV.3. Diagramme de solubilité PEG 6000.

Fig IV.4. Profils de dissolution des mélanges physique et complexe de β CD- CPT, HP β CD-CPT, M β CD-CPT, et des deux témoins CPT et CPT11.

Fig IV.5. Profils de dissolution des mélanges physique et complexe de poly β CD- CPT, PEG-CPT, et des deux témoins CPT et CPT11.

Fig IV.6. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des absorbances cellulaires et d'hémoglobines en fonction des traitements utilisés.

Fig IV.7. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des absorbances cellulaires et d'hémoglobines en fonction des contrôles et des traitements.

Fig IV.8. Diagramme en bâtons représentant la VSL en fonction des échantillons testés.

Fig IV.9. Diagramme en bâtons représentant la VAP en fonction des échantillons testés.

Fig IV.10. Diagramme en bâtons représentant la VCL en fonction des échantillons testés.

Fig IV.11. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des vitesses VSL, VAP et VCL en fonction des contrôles et traitements.

Fig IV.12. Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction des échantillons testés.

Fig IV.13. Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes statiques en fonction des échantillons testés.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1. Solubilité de la CPT dans différents milieux.

Tableau II.1. Propriétés structurales des principales cyclodextrines.

Tableau II.2. Propriétés physicochimique des CDs natives.

Tableau III.1. Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec la poly β -CD.

Tableau III.2. Concentrations en CPT utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage pour le test d'Higuchi.

Tableau III.3. Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec la PEG.

Tableau III.4. Quantité de CPT et quantités équivalentes de β -CD, HP β -CD, M β -CD, poly β -CD et PEG 6000 nécessaire à la préparation des mélanges physiques et des complexes d'inclusion.

Tableau III.5. Quantités de complexe correspondant à 10 mg de CPT.

Tableau III.6. Concentrations en CPT 11 utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage.

Tableau IV.1. Modélisation des données de dissolution des complexes β CD- CPT, HP β CD-CPT, M β CD-CPT, POLY β CD- CPT, PEG-CPT.

INTRODUCTION GENERALE

Depuis quelques années la chimiothérapie connaît un développement considérable notamment grâce à un diagnostic plus précoce de certains cancers et à la découverte de molécules innovantes dont la majorité sont isolées à partir de plantes, de micro-organismes marins ou d'animaux. Les agents anti-cancéreux utilisés agissent essentiellement sur l'ADN, et ce par une action sur le cycle cellulaire, sur la cellule tumorale ou encore par la multiplication cellulaire comme les inhibiteurs de topoisomérase I et II comme tel que la camptothécine [1, 2]

La camptothécine est un alcaloïde pentacyclique, dont l'instabilité en milieu physiologique et sa faible hydrosolubilité représentent un problème majeur de formulation malgré une grande activité anti-cancéreuse.

Plusieurs solutions ont été envisagées, comme l'élaboration de nouveaux analogues possédant un meilleur profil thérapeutique ; leurs synthèse étant difficiles car reposant sur plusieurs critères, l'encapsulation par des molécules hôtes comme la cyclodextrine peut être envisagée pour résoudre ces problèmes de formulation [3].

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques, dont l'une des propriétés les plus intéressantes est liée à la faible polarité de leur cavité centrale, qui permet la formation de complexes d'inclusion, favorisant ainsi la solubilité et la dissolution hydrophobe de substances actives [4].

Etant elles-mêmes limitées en solubilité, il serait intéressant de comparer leurs effets avec un polymère à base de ces molécules, utilisant comme témoin un polymère hydrophile le PEG 6000.

Dans ce mémoire, nous passerons tout d'abord en revue les principales caractéristiques de la camptothécine, son mécanisme d'action, ainsi que son problème de formulation et les différents analogues synthétisés pour y remédier.

Ensuite il sera question d'une synthèse bibliographique regroupant les différentes propriétés physico-chimiques des cyclodextrines natives et modifiées, les méthodes de préparation et de caractérisation des complexes formés avec elles, ainsi que leurs divers domaines d'applications.

Puis nous résumerons et discuterons les différents tests et essais effectués ; détermination du ratio molaire de complexation, préparation de complexes d'inclusion, leurs caractérisation par

diverses techniques (spectroscopie IR, spectroscopie par diffraction des rayons X, et test de dissolution) et modélisation cellulaire (test sur globules rouges et spermatozoïdes).

On conclura par un résumé des résultats obtenus, ainsi que par quelques directives qui pourraient consolider ces derniers.

CHAPITRE I : CAMPTOTHECINE

I.1. Introduction

La camptothécine est un puissant agent cytotoxique utilisé en chimiothérapie, agissant sur la réplication de l'ADN. Son développement fut ralenti par sa toxicité élevée, malgré un effet thérapeutique prouvé, jusqu'à la découverte de son mécanisme d'action, qui relança l'intérêt de cette molécule, en suscitant de nouvelles recherches pour contourner ce problème. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les principales caractéristiques de cette molécule à grand effet thérapeutique.

I.2. Historique

La camptothécine est un alcaloïde, extrait de la plante chinoise *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), qui fut initialement isolée par WALL et coll en 1966. On la retrouve également dans d'autres plantes, elle est par exemple extraite de la tige de *Pyrenacantha klaineana*, arbre de la famille des Icacinaceae [3, 5].

Au début des années soixante-dix, suite à ses activités tumorales intéressantes, les premiers essais cliniques de phase I ont été réalisés sur cette molécule, étant très peu soluble sous sa forme lactonique, c'est sa forme carboxylée qui a été testée. Cependant ces tests se sont avérés décevants. La molécule ne donnait que des rémissions partielles dans la plupart des cas, et les effets secondaires étaient nombreux [3, 6].

C'est pourquoi durant une dizaine d'années, la camptothécine n'a rencontré qu'un intérêt mineur. Néanmoins deux découvertes ont permis de ranimer l'intérêt de cette molécule :

- En 1980, Wall et son équipe ont démontré que l'activité de la camptothécine était fortement dépendante du motif lactonique intact. Le cycle lactone de la CPT subit une réaction d'hydrolyse en milieu basique ou neutre pour conduire à la forme ouverte carboxylée qui est moins active que la forme lactonique. Ainsi, dans le plasma, l'équilibre est fortement déplacé vers la forme carboxylate ouverte [5, 6].
- En 1985, l'équipe de Liu a découvert la cible moléculaire de la camptothécine, la topoisomérase I, une enzyme essentielle pour la réplication et la transcription de l'ADN. Ce type de mécanisme d'action étant jusqu'alors inconnu pour un agent anticancéreux, cette découverte débouchera sur la synthèse de dérivés de la CPT possédant un meilleur profil pharmacologique [3, 6].

I.3. Définition et structure

I.3.1. Définition

La CPT est un alcaloïde pentacyclique avec un motif pyrrolo quinoléine sous forme de poudre cristalline jaune pâle, de formule brute $C_{20}H_{16}N_2O_4$ et de masse moléculaire 348.111 g/mol [5].

I.3.2. Structure

Les alcaloïdes de la famille des camptothécines sont caractérisés par une structure indolizino quinoléique conjuguée unique. La principale représentante de cette famille, la CPT, est un alcaloïde composé de cinq cycles (A B C D E) décliné en trois éléments adjacents (Fig I.1); la partie quinoline A-B est reliée au chaînon lactone E par l'intermédiaire d'un fragment indolizine C-D [7, 8].

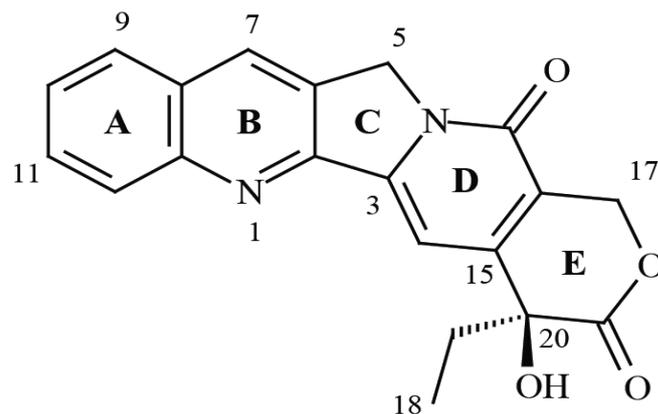


Fig I.1. Structure de la camptothécine [3].

La CPT est une molécule électriquement neutre, de structure quasiment plane, le haut degré de conjugaison entre les cycles (ABCD) confère à la molécule sa fluorescence bleue.

Cette molécule très insaturée, présente une configuration S au niveau du centre asymétrique en C₂₀, cruciale pour l'activité antitumorale [3, 6].

I.4. Caractéristiques

I.4.1. Propriétés physico-chimiques

I.4.1.1. Basicité

L'une des caractéristiques chimiques principales de la molécule, est qu'elle soit faiblement basique et ne forme pas de sels stables avec les acides minéraux. C'est pourquoi elle ne peut être considérée comme étant un alcaloïde au sens strict du terme [6, 8].

I.4.1.2. Electrophilie

L'électrophilie inhabituelle du carbonyle de la lactone est probablement due à une forte liaison hydrogène intramoléculaire présente au niveau de l'hydroxyle tertiaire en C-20. Cette caractéristique justifie son comportement vis-à-vis des alcalins aqueux, des amines nucléophiles et du borohydrure de sodium [6].

I.4.1.3. Solubilité

La CPT est insoluble dans l'eau ce qui est à l'origine des problèmes de formulation pharmaceutique, et très peu soluble dans les solvants polaires et apolaires. Sa dissolution complète n'est obtenue que dans le DMSO [9].

I.4.1.4. Instabilité

En milieu aqueux neutre et dans les liquides biologiques la CPT est instable, le cycle lactame s'hydrolysant facilement pour donner la forme carboxylée, conduisant à la perte d'activité de la molécule (Fig I.2) [3, 7].

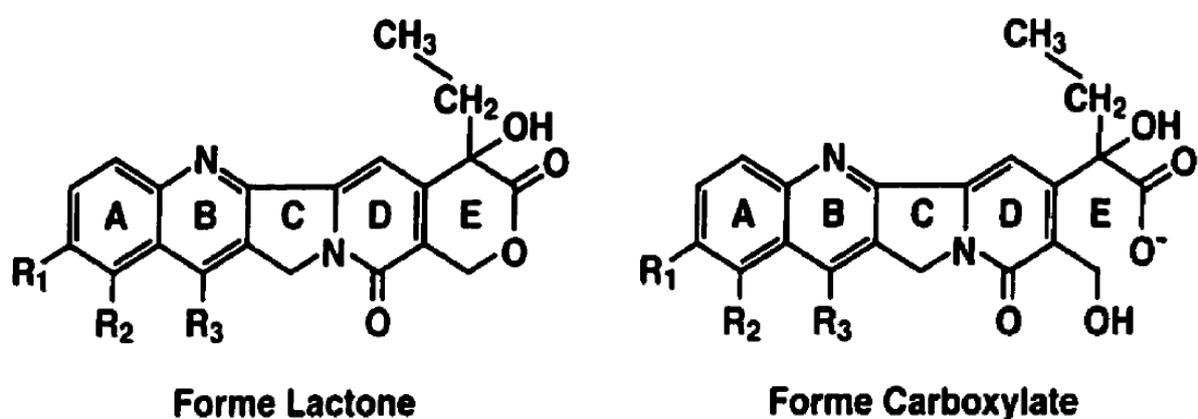


Fig I.2. Forme active (Lactone) et inactive (Carboxylate) de la CPT [8].

Cette réaction est très dépendante du pH de la solution (Tableau I.1). A l'équilibre, la forme lactone est prédominante pour des valeurs de pH acides. En milieu neutre et alcalin, c'est la forme carboxylée qui est majoritaire [3, 8].

Tableau I.1. Solubilité de la CPT dans différents milieux [8]

	pH= 5.6	pH=7.1	pH=7.6	pH=7.4 en présence d'albumine humaine
Lactone active	91%	27%	12%	0.2%
Carboxylate inactive	9%	73%	88%	99.8%

I.4.2. Toxicité

Les effets indésirables de la CPT peuvent :

- Apparaître rapidement comme les modifications hématologiques (anémie, leucopénie, neutropénie...) provenant de l'amplification de l'activité topoisomérase 1 de l'ADN.
- Etre dus à un traitement chronique entraînant une exposition prolongée et à concentration élevée, comme les diarrhées tardives, les douleurs abdominales, les nausées et les vomissements [9].

I.5. Mécanisme d'action

Les topoisomérases sont une classe d'enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires dans celui-ci et en catalysant le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Deux classes sont citées dans la littérature :

- La topoisomérase I, est un monomère qui coupe un seul brin et qui catalyse la relaxation de la double hélice par rotation des segments d'ADN
- la topoisomérase II, est un homodimère qui catalyse la relaxation de l'ADN en coupant les 2 brins [7, 10].

Ces enzymes sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes et procaryotes et jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes...).

Elles ont aussi un rôle crucial dans la plupart des mécanismes génétiques et sont les cibles pharmacologiques d'importants agents anticancéreux en agissant comme inhibiteurs [10, 11].

Du point de vue mécanique, la réaction catalysée par la topoisomérase I est une simple trans-estérification qui se déroule en trois grandes étapes (Fig I.3) :

- Formation d'un complexe enzyme-ADN et coupure d'un des brins de l'ADN.
- Déspiralisation de l'ADN rendue possible par la présence de la coupure.
- Nouvelle ligation de l'ADN, libération de la topoisomérase I et reprise de la réplication [3, 12].

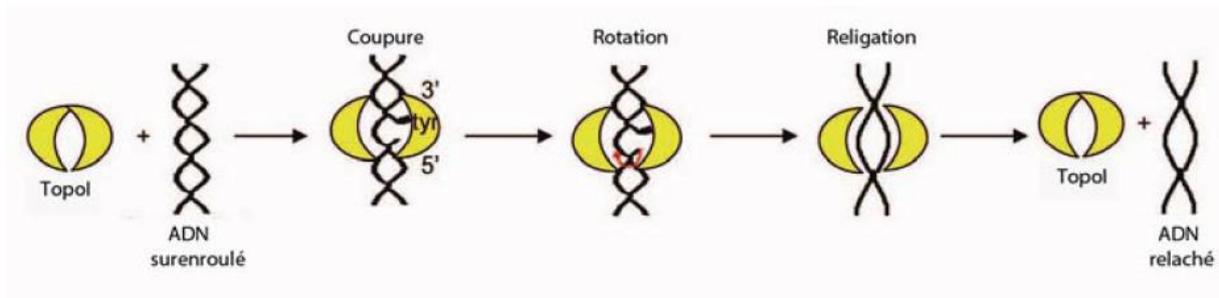


Fig I.3. Mécanisme d'action de la topoisomérase I [6].

Ces molécules peuvent être de deux types : supprimeurs et inhibiteurs de topoisomérase I.

La CPT appartient à la seconde catégorie puisqu'elle n'inhibe pas la formation du complexe avec l'ADN mais se fixe sur ce dernier pour former un complexe ternaire (enzyme-ADN-inhibiteur) qui va saboter l'action de l'enzyme en coupant l'ADN irréversiblement en de multiples endroits, conduisant à la mort cellulaire (Fig I.4) [14].

Les cellules cancéreuses sont les plus sensibles à cette inhibition car elles contiennent une très grande concentration de l'enzyme, et ce en raison de leur grande vitesse de développement et de reproduction. C'est pourquoi, l'affinité de la CPT envers les topoisomérase I se traduit par une toxicité sélective pour les cellules tumorales [12, 13].

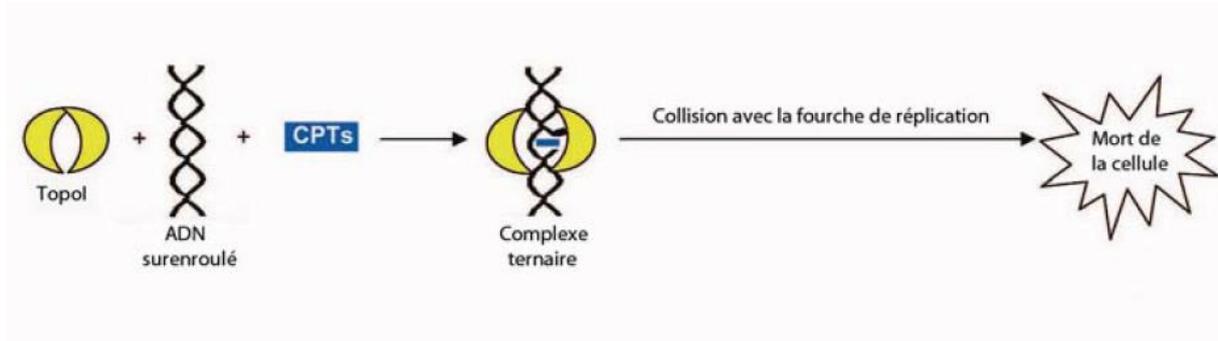


Fig I.4. Mécanisme d'action de la CPT [6]

I.6. Problème de formulation

Après administration, la plupart des principes actifs (Pas) sont métabolisés dans l'organisme, la CPT quant à elle est soumise à un équilibre chimique dynamique entre la forme lactone "active" et la forme carboxylate "inactive". De plus, cet équilibre en solution, déjà peu en faveur de la forme active à pH 7,6, est encore bien plus défavorable en présence d'albumine plasmatique d'origine humaine [5, 7].

Sa faible hydrosolubilité et sa grande toxicité, ont fait de la CPT une molécule peu viable, ce qui a conduit à l'élaboration de nouveaux analogues possédant un meilleur profil thérapeutique en optimisant la solubilité et la stabilité du cycle lactonique du produit naturel, cela suite à la découverte du mécanisme d'action moléculaire [3, 5].

I.7. Analogue de camptothécine

De façon générale, pour qu'un analogue de la CPT présente une activité intéressante, on doit maintenir la planéarité du système pentacyclique [6].

En effet L'ensemble des travaux consacrés à la synthèse d'analogues ont permis de déterminer les caractéristiques indispensables à l'activité anti-tumorale :

- La structure entière pentacyclique (Les analogues tétracyclique, tricyclique ou bicyclique sont inactifs).
- La fonctionnalisation des cycles A et B ; en effet les substituants en position C-7, C-9, C-10 augmentent souvent l'activité, tandis que les substitutions en position 11 et 12 la diminuent généralement.
- Les modifications des cycles C et D entraînent en général une baisse de l'activité.

- Le carbonyle et le groupement hydroxyle en C-20 du cycle E sont indispensables, en effet le remplacement de ce dernier par un groupement amino ou par un halogène a conduit à une baisse d'activité importante.
- De même, le motif lactonique à 6 chaînons était considéré comme indispensable car la substitution par un azote, ou un soufre de l'alcool ou de l'oxygène rendait le composé totalement inactif, jusqu'à apparition des homocamptothécines, analogues possédant une lactone à 7 chaînons, qui se sont révélés intéressants du point de vue pharmacologique, comme les composés possédant un cycle E sans l'oxygène de la lactone, c'est-à-dire un cycle E à 5 chaînons [6, 14].

Donc pour résumer le cycle C-D central est toujours préservé dans les différentes familles d'analogues de la CPT, à l'inverse des parties extrêmes A-B et E qui s'aménagent et s'accommodent facilement. Une génération d'analogue plus soluble et avec un meilleur profil thérapeutique a donc vu le jour [9].

I.7.1. La première génération : Analogues plus hydrosolubles

Le topotécane et l'irinotécane font partie de la première génération d'analogues. Ils ont tous deux reçu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) en 1996 [3].

Le topotécane, commercialisé par Glaxo-SmithKline sous le nom d'Hycamptin®, est utilisé pour le traitement du cancer des ovaires et du poumon à petites cellules. La structure cristalline du complexe ternaire (topoisomérase I, ADN, topotécane) montre que la drogue est à la fois présente sous sa forme lactone et carboxylate, ce qui suggère que la forme ouverte du topotécane, et par extension celle d'autres analogues, pourrait être active biologiquement [5, 6].

L'irinotécane, commercialisé par Pharmacia (Pfizer) sous le nom de Camptosar® et qui est utilisé pour le traitement du cancer colorectal, est en réalité une prodrogue dont le métabolite actif est le SN-38. Dernièrement, des essais ont montré que cette molécule pourrait également être efficace dans le traitement d'autres tumeurs solides, comme les cancers du poumon, des ovaires et de l'estomac [3, 6].

Le SN-2310, une autre prodrogue ayant le même métabolite actif que l'irinotécane. Il s'agit d'une émulsion (huile/eau) conjuguant le SN-38 au succinate de la vitamine E, augmentant ainsi la solubilité de la molécule et lui permettant d'être administré sans dilution. Ce composé fait l'objet de tests cliniques de phase I depuis 2006 (Fig I.5) [5].

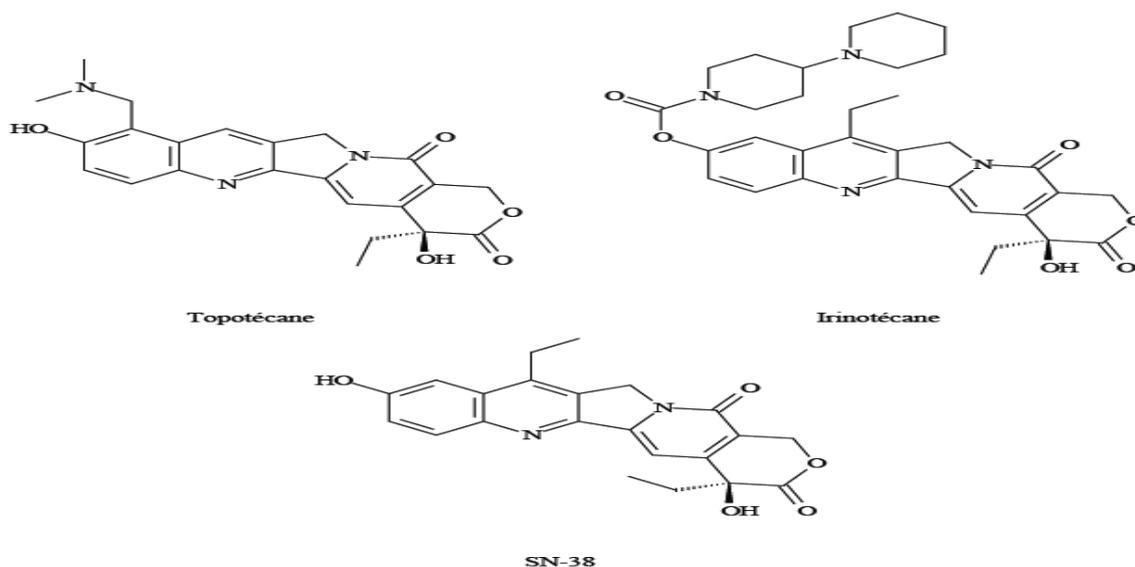


Fig I.5. Formule chimique de la Topotécane, Irinotécane et de la SN-38 [3].

I.7.2. La seconde génération : Les analogues lipophiles et les homocamptothécines

L'un des objectifs principaux de la recherche a été de trouver des analogues moins sensibles à la réaction d'hydrolyse de la CPT. L'homocamptothécine, possédant un méthylène supplémentaire au niveau du cycle E, semble répondre à cette exigence (Fig I.6) [3, 6].

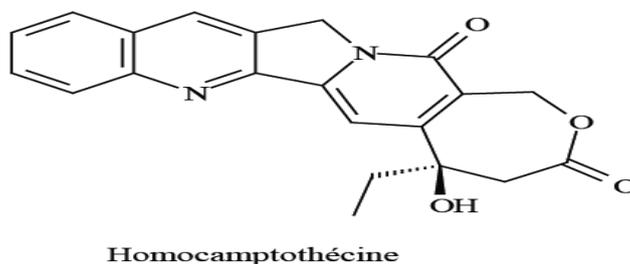


Fig I.6. Formule chimique de l'Homocamptothécine [3].

Un autre moyen de contourner ce problème d'ouverture de la lactone dans le sang est de rendre les composés plus lipophiles. L'incorporation de substituants lipophiles à la structure de la CPT induit une stabilité plus élevée dans le sang, et également une pénétration plus rapide dans les cellules [5].

I.7.3. La troisième génération : Les analogues non lactoniques

En 2003, les équipes de C. Bailly et G. Lavielle ont démontré que les analogues dépourvus de la fonction lactone au niveau du cycle E, étaient aussi de puissants inhibiteurs de la relaxation de l'ADN et des réactions de clivage catalysées par les topoisomérases. Ainsi, le S36272, le

S39625, ou encore le S38809 montrent une cytotoxicité pour les cellules tumorales comparable à celle du topotécane et à celle du SN-38 (fig I.7) [3, 6].

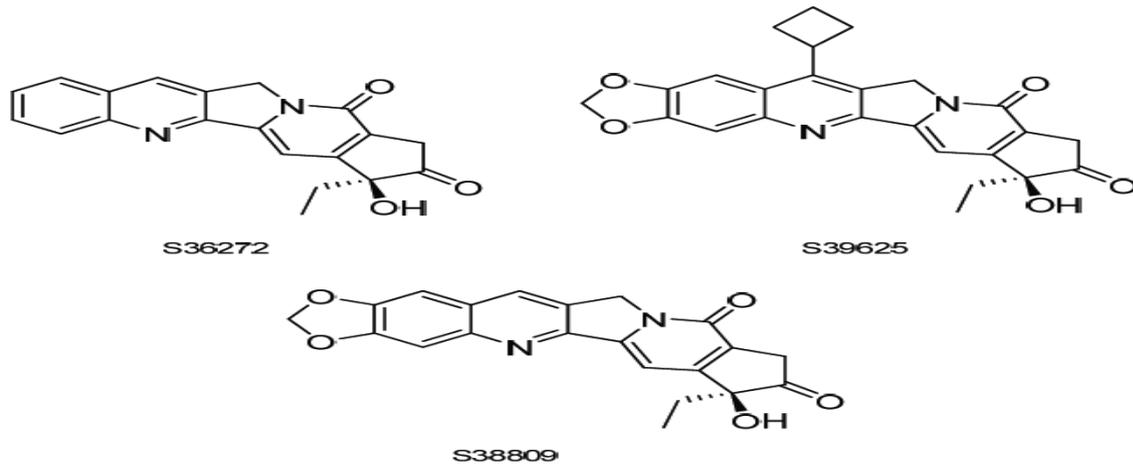


Fig I.7. Formule chimique de quelque dérivé de la CPT : S36272, S39625 et S38809 [6].

I.8. Modélisation cellulaire

I.8.1. Définition

La modélisation cellulaire consiste à tenter de reproduire à l'échelle cellulaire des événements ou dans certains cas des symptômes caractéristique d'une pathologie, elle représente souvent une étape transitoire qui doit permettre la compréhension des mécanismes mis en jeu, avant de passer aux modèles sur animaux [16].

I.8.2. Intérêts

La modélisation cellulaire peut permettre :

- La détection de changements morphologiques par simple observation au microscope optique.
- La localisation d'une ou plusieurs protéines, observable par fractionnement cellulaire ou par microscopie à fluorescence.
- La viabilité des cellules ou leur mortalité, quantifiables par dosages biochimiques ou par microscopie à fluorescence [17].

Nos essais s'effectueront sur les globules rouges humaines qui ont longtemps été utilisées pour élucider une grande variété de phénomènes dynamiques, et comprendre la topologie fondamentale des voies métaboliques, ainsi que sur les spermatozoïdes humains, dont les

paramètres basés sur le mouvement peuvent être utiles pour l'évaluation in vitro de la cytotoxicité des produits chimiques car même après éjaculation il conserve sa mobilité et sa capacité de fécondation [16, 18].

I.9. Conclusion

Il apparaît, à travers cette recherche bibliographique, que la CPT a le potentiel pour devenir la molécule phare de ce siècle, sauf que sa faible solubilité, son instabilité en milieu physiologique et sa forte toxicité ralentissent considérablement sa pleine exploitation.

L'élaboration de nouveaux analogues possédant un meilleur profil thérapeutique a donc vu le jour pour y remédier, la synthèse d'analogues actifs étant difficile car reposant sur plusieurs critères, l'encapsulation par des molécules hôtes comme la cyclodextrine peut être envisagée pour contrer ces problèmes de formulation.

CHAPITRE II : CYCLODEXTRINE

II.1. Introduction

Les cyclodextrines sont connues pour leur capacité à former des complexes avec une très large gamme de composés organiques. Elles ont une multitude d'applications industrielles utilisant cette propriété comme réducteur de volatilité, solubilisant, protecteur physique et chimique ... [19, 20].

La réversibilité des complexes hôte – invité offre aussi la possibilité d'exploiter ces molécules dans le domaine pharmaceutique [20].

Dans ce chapitre, nous passerons en revue les principales caractéristiques de ces molécules cages.

II.2. Historique

La production chimique de CDs et leur développement industriel peuvent être divisés en trois étapes ; la période de découverte, la période de développement, et celle d'utilisation. Ces trois phases suivent de près les progrès technologiques qui ont pris place durant le siècle dernier, d'abord dans l'instrumentation analytique, puis en biotechnologie [21].

II.2.1. La période de découverte, de 1891 au milieu des années 30

La première trace écrite de CDs a été publiée en 1891 par un scientifique français A. Villiers, après les avoirs découverts et isolés à partir de produits de dégradation de l'amidon, elles étaient appelées cellulose car leurs propriétés se rapprochent de celles de la cellulose (résistance à l'hydrolyse acide, propriétés non réductrices) [21, 22].

Ce n'est qu'en 1901 que le microbiologiste Sharding isole la souche microbienne *Bacillus macerans*, responsable de la formation de ces dextrines cristallisées (les dextrines désignant l'ensemble des produits de dégradation) qui furent appelées par la suite sucre de Sharding en son honneur [21, 23].

Au début des années 30, l'équipe de Pringsheim, découvre la capacité de ces dextrines à former des complexes avec divers composés organiques [22].

II.2.2. La période de développement, milieu des années 30 à 1970

En 1938 Freudenberg et son équipe ont mis en évidence la structure des CDs et leurs capacités à former des complexes d'inclusion.

Dans les années 50, le groupe de French et celui de Cramer ont intensément travaillé sur la synthèse et la purification de complexes de CDs. A partir de ce moment, l'étude des CDs prend un essor considérable : fabrications industrielles, synthèse de CDs modifiées, synthèse de complexes d'inclusion... [22, 23].

En 1953, un premier brevet sur l'application des CDs dans la formulation de composés à visée biologique fut déposé par Freudenberg, Cramer et Plieninger [21].

II.2.3. La période d'utilisation, de 1970 à aujourd'hui

A partir des années 70, et après plusieurs études prouvant qu'il n'y a pas de toxicité inhérente à la CD empêchant son utilisation dans l'industrie, les CDs sont produites et utilisées dans l'industrie malgré des difficultés présentes lors de la purification et de la préparation à rendement raisonnable [21, 23].

Dans les années 70 à 80, Szejtli apporte une importante contribution dans le domaine avec une étude poussée sur les complexes d'inclusion formés à partir des CDs et leur développement en chromatographie [22, 23].

En 2007, M. Loftsén dénombra un peu plus de 130000 documents traitant des CDs (publications, brevets...) [22].

II.3. Définition et structure

II.3.1. Définition

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs, constitués d'unités glucopyranoses liées entre elles par des liaisons glycosidiques α (1-4). Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amidon par les Cyclodextrines Glucosyl Transférases (CGTases), telles que *Bacillus macerans* et *Alcaliphilic bacilli*, d'origine bactérienne. Cette réaction génère le détachement d'une partie de l'hélice d'amidon accompagné d'une cyclisation [21, 24].

Les quantités relatives des différentes CDs ainsi obtenues dépendent non seulement du type d'enzyme utilisée mais également de l'addition de composés organiques dans le milieu réactionnel. Bien que des CDs contenant jusqu'à 12 unités glucoses aient été isolées, seules la α (cyclomaltohexaose, 6 unités glucoses), β (cyclomaltoheptaose, 7 unités glucoses) et γ (cyclomaltooctaose, 8 unités glucoses), ont été l'objet d'études extensives et sont commercialement disponibles [24].

II.3.2. Structure

II.3.2.1. CDs naturelles

Les CDs sont uniquement composées d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, dont chaque unité glucopyranose se trouve dans une conformation chaise rigide (Fig II.1) [22, 24].

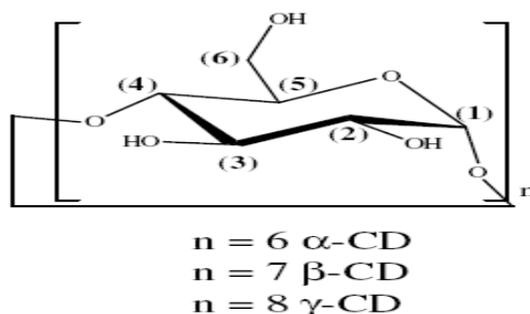


Fig II.1. Représentation de la conformation chaise rigide de la α -, β -, et γ -CD [20].

L'arrangement macrocyclique des CDs correspond à un cône, le côté le plus étroit étant appelé face primaire (les hydroxyles primaires y étant situés) et le côté le plus large, face secondaire (les deux groupes hydroxyles secondaires de chaque unité y étant localisés) [20, 23].

De plus les hydroxyles primaires et secondaires forment un réseau dense de liaisons hydrogène, contribuant ainsi à la rigidité du macrocycle, et stabilisant la forme tronc-conique des molécules. Cette structure spatiale est aussi responsable de certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques.

La cavité externe est tapissée par les fonctions hydroxyles des unités glucose, tandis que les atomes de carbone et d'hydrogène tapissent l'intérieur de la cavité, qui est à la fois hydrophobe et apolaire du fait de l'absence de groupes hydroxyles (Fig II.2) [25, 26].

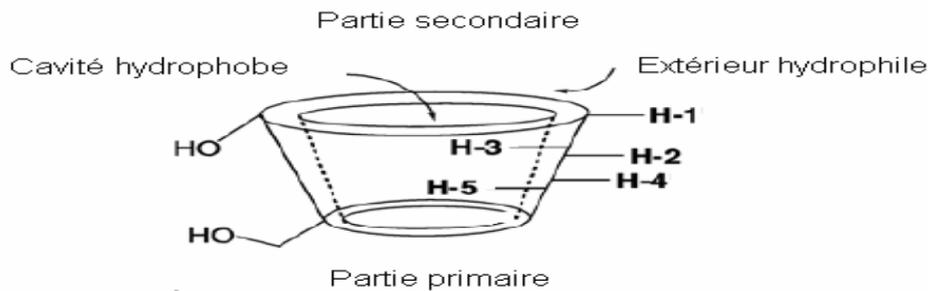


Fig II.2. Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine [23].

Comme nous l'avons déjà mentionné, les CDs les plus utilisées dans le domaine industriel sont l' α -, la β - et la γ -CD (Fig II.3). Ce sont des produits cristallins, homogènes et non hygroscopiques, leurs caractéristiques structurales les plus importantes sont décrites dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Propriétés structurales des principales cyclodextrines [20, 22].

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
N de glucoses	6	7	8
Formule brute (anhydre)	$C_{30}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{72}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse atomique (anhydre)	972.85	1134.99	1294.14
Longueur de la cavité, Å	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1
Diamètre de la cavité, Å	4.7-5.3	6.0-6.6	7.5-8.4
Diamètre extérieur, Å	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	17.5 ± 0.4
Volume de la cavité, Å ³	174	262	427

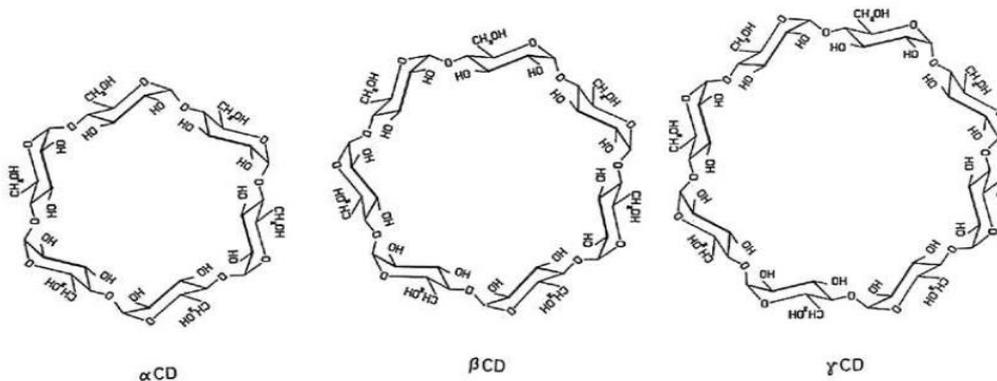


Fig II.3. Structure chimique des cyclodextrines α , β , γ [22].

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives. Les cyclodextrines se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. La teneur en eau à l'équilibre dépend des conditions de cristallisation et de la nature de la CD [19].

II.3.2.1. CDs modifiées

Sous leur forme initiale, les cyclodextrines n'offrent qu'un intérêt limité du fait de leur polarité élevée, leur hydrosolubilité limitée surtout lorsqu'elles doivent être utilisées en milieu aqueux et leur rigidité structurelle. C'est pourquoi, elles sont souvent utilisées comme précurseurs pour la synthèse d'autres composés par modification contrôlée des hydroxyles en position 2, 3 et 6 ou par polymérisation [25, 26].

- **Modification des hydroxyles**

Les principaux types de fonctionnalisations chimiques effectuées sur les CDs, peuvent être classées de la façon suivante :

- Ethérisation (dérivés alkylés et silylés) ;
- Estérisation (dérivés acylés et sulfonylés) ;
- Halogénéation ;
- Substitution nucléophile de groupes partants (tosylates, halogénures) pour donner des dérivés azotures, amines, thioalkyles,...

Ces modifications permettent l'amélioration des propriétés physico-chimiques (augmenter leur solubilité dans un solvant donné) et/ou du pouvoir de complexation, mais aussi la création de molécules originales avec des fonctions spécifiques, trouvant des applications variées au-delà des frontières de la chimie classique (une activité catalytique de type enzymatique, des propriétés de vectorisation) [25].

- **Polymérisation**

On appelle polymère de CD, toute molécule contenant au moins deux unités de CD liées de manière covalente. Ils peuvent se présenter selon les conditions de synthèse, soit sous forme de gels, soit sous forme de polymères hydrosolubles.

Il existe diverses approches de la synthèse des polymères de CDs, elles peuvent être soit polymérisées par réaction des fonctions hydroxyles avec différentes molécules fonctionnelles

en présence d'un agent réticulant, ou alors fixées sur un support préexistant. L'enjeu de la synthèse de ces polymères est de ne pas bloquer l'accès à la cavité de la CD, afin de conserver ses propriétés de complexation [26].

Les polymères ramifiés présentent à l'état pur ou en solution des propriétés très différentes de celles de leurs homologues linéaires c'est pourquoi la recherche de méthodes de synthèse de polymères présentant des architectures variées (étoiles, peignes...) ont fait l'objet de nombreux travaux [25].

II.4. Propriétés physico-chimique

II.4.1. Amphiphilité

La structure des CDs, alliée à l'orientation particulière adoptée par les diverses fonctions hydroxyles des unités glucopyranose, leurs donnent un caractère amphiphile, dû à un extérieur relativement hydrophile (surface de contact avec le solvant) et à un cœur relativement hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée).

C'est ce caractère qui donne aux CDs leur plus intéressante propriété : former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une molécule invitée [22, 25].

II.4.2. Basicité

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) [20].

II.4.3. Énantioselectivité

La chiralité des CDs est due à leurs unités D glucopyranose. Chaque unité de glucose contient 5 centres chiraux. La combinaison entre le pouvoir complexant des CDs et ces centres chiraux fournit l'énantiosélectivité [26].

II.4.4. Solubilité

Grâce à sa structure amphiphile, la CD est soluble dans l'eau Néanmoins, le comportement de la solubilité est très différent d'une cyclodextrine à une autres (Tableau II.2) [19, 20].

Tableau II.2. Propriétés physicochimiques des CDs natives [20, 21].

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
pKa 25 °C	12.332	12.202	12.081
ΔH° (ionisation), kcal. Mol ⁻¹	8.36	9.98	11.22
ΔS° (ionisation), cal. Mol ⁻¹ . K ⁻¹	-28.3	-22.4	-17.6
Solubilité (eau, 25°C), mol l ⁻¹	0.1211	0.0163	0.168
Solubilité (eau, 25°C), g/100ml	14.5	1.83	23.2
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6-7.6	11-12	13.3-17

Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leurs solubilité dans l'eau augmentent dans le sens : $\beta < \alpha < \gamma$ CD [19].

La faible solubilité de la β CD en comparaison avec celle de l' α et de la γ CD, semble être due au réseau de liaisons hydrogène particulièrement fort dans le cas de CD à 7 unités. Dans le cas de l' α CD cette ceinture de liaisons H est incomplète, l'une des unités étant dans une position distordue, il n'y a donc que 4 liaisons formées (au lieu des 6 prévues). Elles favorisent donc les liaisons hydrogènes avec le solvant, augmentant ainsi leur solubilité aqueuse [23, 25].

Les termes thermodynamiques en solution montrent que la solubilité relativement faible de la β -CD est associée à un ΔH° et un ΔS° moins favorables [24].

En ce qui concerne les solvants organiques, l' α - et la β -CD sont légèrement soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol, l'acétone, le chloroforme. En revanche le diméthylformamide est un bon solvant [26].

II.4.5. Stabilité

Les cyclodextrines sont stables en milieu alcalin mais peuvent subir une hydrolyse partielle à un pH < 3.5 et à une température supérieure à 60°C, produisant du glucose et une série de maltosaccharides acycliques détruisant ainsi leur structure [27].

II.5. Toxicité

II.5.1. CDs naturelles

De manière générale, les CDs traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles comme la cornée, les muqueuses ou la peau, et présentent très peu de toxicité lors de leur administration par voie orale car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal (0,1 à 3%). On peut supposer que le haut poids moléculaire des CDs est une des causes limitant ce passage [24, 28].

In vivo, la α et la β -CD, contrairement à la γ -CD, ne peuvent pas être hydrolysées par la salive humaine et les amylases d'origine pancréatique mais peuvent se fermenter au contact de la flore intestinale [28, 29].

Les CDs et leurs dérivés hydrophiles sont considérées comme étant non ou faiblement toxiques. Pour de hautes concentrations, cette cytotoxicité entraîne une hémolyse dans l'ordre $\beta > \alpha > \gamma$ reposant sur la capacité de chaque CD à solubiliser les composants de la membrane cellulaire, et ce par absorption des molécules de cholestérol et de phospholipide présentes dans la membrane cellulaire conduisant à la destruction de la cellule.

Chez l'homme, la dose journalière tolérée est de 1,4 g pour l' α -CD, 0,35 g pour la β -CD et 10 g pour la γ -CD [30].

L'administration par voie orale n'induit aucun effet avéré en ce qui concerne l' α -CD, contrairement à la voie parentérale qui provoque des irritations, et qui dans le cas de la β -CD peut même provoquer une néphrotoxicité qui peut être due à sa cristallisation ou à la formation de complexes avec le cholestérol dans les tissus rénaux [31, 32].

La γ -CD semble être la CD la moins toxique du fait qu'elle soit très peu métabolisée par injection intra veineuse et qu'elle présente une absorption intestinale négligeable [33, 34].

II.5.2. CDs modifiées

Parmi les cyclodextrines modifiées hydrophiles, seules les 2-HP- β -CD, la sulfobutyl- β -CD et la β -CD sulfaté sont désignées comme étant sans danger et aucun effet secondaire n'a été observé chez l'homme lors de leur administration par voie parentérale [35, 36].

II.6. Complexe d'inclusion

La propriété la plus remarquable des CDs est la capacité de se lier avec des molécules très diverses, pour donner des complexes d'inclusion de type hôte – invité (Fig II.4). C'est le cas de nombreuses autres classes de macromolécules mais les CDs semblent être les plus intéressantes car :

- Ce sont des produits "semi naturels" issus d'une simple conversion enzymatique de l'amidon.
- Elles sont fabriquées en grande quantité en utilisant des technologies non-polluantes.
- Le prix initial élevé est devenu abordable grâce à une augmentation de la production.
- A partir des complexes d'inclusion formés, les propriétés des substances complexées peuvent être modifiées [19, 20].
- Les effets secondaires toxiques peuvent être éliminés grâce à une sélection appropriée des dérivés des cyclodextrines [22].
- 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 [20].

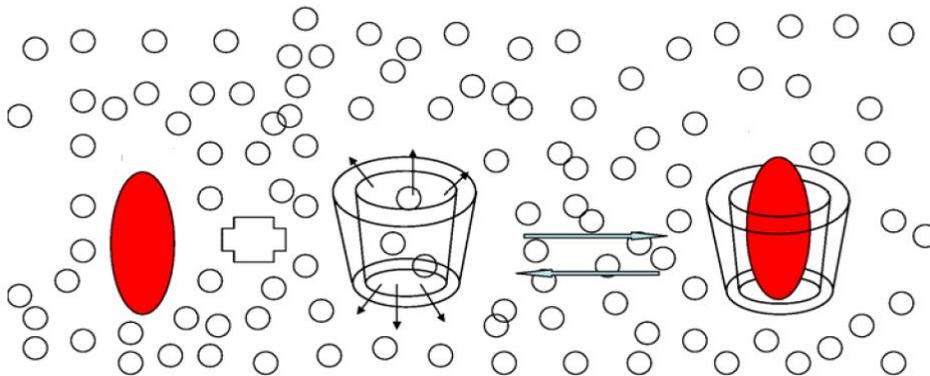


Fig II.4. Processus de complexation des cyclodextrine [37].

II.6.1. Facteur influençant le phénomène d'inclusion

La formation des complexes d'inclusion dépend de plusieurs facteurs :

- La taille de la molécule hôte ;
- Les propriétés de la molécule hôte (composition des fonctions chimiques, solubilité...);
- Les structures des CDs (ioniques, ramifiées...);

- Les propriétés du solvant (polarité, pH) ;
- Le déroulement de la synthèse organique [38].

II.6.2. Techniques de préparation d'un complexe

La préparation des complexes d'inclusion peut se faire en phase solide ou en phase liquide par plusieurs méthodes, nous pouvant citer :

II.6.2.1. Le mélange physique

Il s'agit d'un simple mélange de deux poudres jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Généralement ce protocole est réalisé à température ambiante, son principal avantage est qu'il n'utilise pas d'eau mais on a un risque de formation de croutes des poudres et d'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante [24].

II.6.2.2. La méthode de pétrissage (kneading)

Les CDs ne sont pas dissoutes, mais mélangées avec une petite quantité d'eau ou quelques gouttes d'une solution tampon, dans laquelle la substance invitée a été rajoutée préalablement. On obtient alors une pâte dont la viscosité augmente au fur et à mesure de la formation des complexes d'inclusion [26].

II.6.2.3. La Co-précipitation

C'est la méthode la plus couramment utilisée, on ajoute à une solution aqueuse de CD froide, la molécule invitée dissoute dans un solvant (acétone, éthanol...). Pour obtenir le complexe en phase solide, l'eau est enlevée par évaporation ou lyophilisation. Dans le cas où on obtient un précipité il peut être recueilli par décantation, filtration ou centrifugation [26].

II.6.3. Mécanisme de formation d'un complexe

Les CDs sont entourées de molécules d'eau d'hydratation qui sont relativement labiles et peuvent être éliminées par séchage, et de molécules d'eau d'inclusion énergétiquement défavorables (interaction polaire – apolaire) dans la cavité apolaire, qui ne peuvent être que remplacées par une « molécule invitée » appropriée, moins polaire que l'eau [24].

Ces molécules invitées pénètrent dans la cavité par la plus grande ouverture et le côté le plus accessible, elles sont incluses de manière à éloigner leur portion non polaire pour avoir un maximum de contact avec la cavité hydrophobe, et leur partie polaire interagit avec la surface

hydrophile de la CD, donc le mécanisme de formation d'un complexe n'est régi essentiellement que par un facteur géométrique ; le substrat doit avoir une taille compatible avec la cavité de la CD. En effet, les molécules trop grosses ne pénétrant que partiellement, ne pourront pas former de complexes stables, et les molécules trop petites pourront en sortir très rapidement car les interactions formées seront trop faibles pour les maintenir à l'intérieur. Il faut donc une certaine proximité de la molécule invitée pour former un complexe d'inclusion stable avec la cavité de la molécule hôte [20, 39].

Ces inclusions partielles ou totales donnent lieu à la formation de complexes avec divers arrangements structuraux. On trouve des complexes de type 1:1 si une molécule de CD interagit avec une molécule invitée, de type 1:2, 1:3 si la molécule invitée est de grande taille et que plusieurs molécules de CDs peuvent interagir avec, ou de type 2:1 ou la cavité de la CD est assez spacieuse pour accueillir deux molécules invitée (Fig II.5) [19, 24].

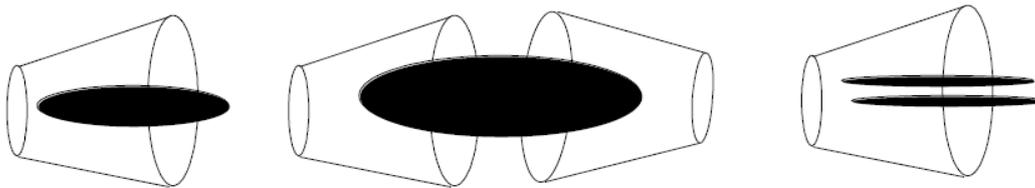
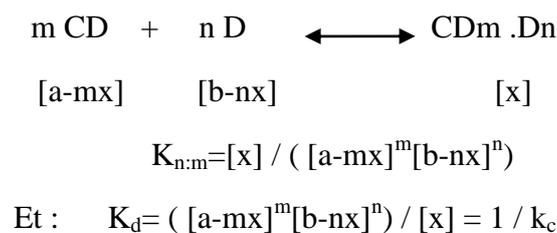


Fig II.5. Représentation schématique de complexes d'inclusion 1:1, 2:1, 1:2 [20].

En solution, le complexe étant régi par de faibles forces d'interactions, un équilibre thermodynamique s'établit entre les molécules complexées et les molécules libres en solution. Ce processus réversible peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité (K_c ou $K_{n:m}$) ou par une constante de dissociation K_d [19, 21].

Dans le cas d'une cyclodextrine CD et d'une molécule invitée D, on peut écrire les relations suivantes :



Avec :

m : nombre de moles de CD ; n : nombre de moles de molécules invitée.

a : quantité initiale en CD ; b : quantité initiale en molécule invitée.

x : quantité de complexe formé.

K_c : constante d'association ; K_d : constante de dissociation.

Plus K_c (1:1) est grand, plus le complexe est stable [26].

II.6.4. Force d'interaction

Les interactions mises en œuvre entre l'hôte et l'invité peuvent être de différentes natures :

- Adaptation stérique ; par des changements conformationnels de la molécule invitée et/ou de la CD (conformation induite) lors du processus d'inclusion.
- Formation de liaisons hydrogène.
- Interactions de Van der Waals (interactions dipôle-dipôle).
- Interactions hydrophobes, dipôle-dipôle, de transfert de charges et électrostatiques.
- Relargage de molécules d'eau à «haute-enthalpie» de la cavité de la CD.
- Relargage de molécules de solvant de la cavité de la CD avec un gain d'entropie [25].

C'est l'action simultanée de plusieurs de ces interactions qui rend effective l'inclusion spécifique.

Ce phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente mais uniquement des forces telles que les liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, ce qui permet ainsi le relargage de la molécule invitée, ouvrant la voie à de multiples applications [27].

La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité, des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui créent des associations apolaires-apolaires [37].

II.6.5. Conséquences de l'inclusion

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et une molécule invitée confère à ce complexe des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la CD et de la molécule incluse prises séparément, ce qui ouvre la voie à de nombreuses études tant théoriques qu'industrielles. Ces différences se traduisent au niveau [22, 35] :

- **Des propriétés de la molécule complexée**
 - Augmentation de la solubilité dans l'eau ;
 - Augmentation de la stabilité de la molécule invitée en diminuant sa réactivité même si parfois la CD se comporte comme un catalyseur ;
 - Diminution de la diffusion et de la volatilité ;
 - Modification des propriétés biologiques (par exemple, le caractère hémolytique) ;
 - Protection de la substance complexée contre tous types de réactions sauf celles avec les hydroxyles de la CD [21, 22].
- **Du comportement de celle-ci lors des différentes études analytiques**
 - Modification des propriétés spectrales le maximum en UV est déplacé de plusieurs nm ;
 - Modification de déplacement chimique en RMN du fait de ce changement d'environnement anisotropique ;
 - Les propriétés chirales : Lorsque des composés achiraux sont inclus dans une CD, le complexe formé est optiquement actif et montre un important effet de Cotton induit en dichroïsme circulaire ;
 - Modification de la fluorescence car la molécule fluorescente passe d'un milieu aqueux à un milieu apolaire ;
 - Modification de la mobilité en chromatographie : La molécule invitée initialement hydrophobe devient, sous forme de complexe, hydrophile [24, 25].

Ces différences de comportement permettront de mettre en évidence ces complexes et de les étudier.

II.6.6. Caractérisation

II.6.6.1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules biochimiques, aujourd'hui considérée comme une méthode de choix dans l'étude des complexes formés par CDs, elle permet de mettre en évidence l'environnement chimique des noyaux étudiés (le déplacement chimique).

Après inclusion, les protons situés à l'intérieur de la cavité de la β -CD (H-3, H-5) voient leur environnement électronique modifié du fait de la présence d'une molécule invitée dans la cavité, ce qui est caractérisé par une modification du déplacement chimique, tandisque

les protons localisés à l'extérieur de la cavité (H-2, H-4, H-6) restent pratiquement inchangés. Pour la molécule invitée, ces modifications se présentent au niveau de la plus part de ses protons, on peut donc considérer la molécule cage comme solvant de la molécule invitée.

La RMN du proton (RMN H) est utilisée pour l'étude des interactions de substance avec les CDs, en identifiant la position de leurs protons, ce qui permet de déterminer la direction de pénétration de la molécule invitée. La RMN du carbone 13 donne également des informations concernant les propriétés dynamiques du complexe [26, 27].

II.6.6.2. Spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectroscopie IR mesure l'excitation vibrationnelle induite par une exposition à des radiations électromagnétiques, et permet donc d'étudier l'arrangement des atomes et les distances interatomiques [27, 28].

Les spectres des complexes présentent généralement un léger déplacement des pics indiquant l'absence de fortes liaisons chimiques, ce déplacement étant dû à l'influence du complexe formé sur la bande OH des CDs et sur les bandes de la partie incluse suite à la modification de l'environnement [26, 28].

Chaque bande du spectre caractérise un groupe fonctionnel de la molécule, et leur déplacement permet de désigner quelle partie de la molécule invitée interagit avec la CD. La position des bandes d'absorption dépendant de la nature des groupes fonctionnels présents dans une molécule, met en évidence les limites d'utilisation de cette méthode, qui est souvent peu appropriée pour la détection de complexes [26].

II.6.6.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)

La thermogravimétrie, ou analyse thermique pondérale est une méthode thermo-analytique de mesure continue de la variation de masse d'un matériau soumis à une loi de chauffe définie, soit par des paliers de température en fonction du temps (mode isotherme), soit par élévation constante de la vitesse de chauffe. Elle permet, ainsi, d'obtenir une quantification de la perte d'éléments constituant les matériaux et de surveiller leurs stabilités thermiques [29].

Le spectre d'une molécule en thermogravimétrie présente des points caractéristiques en fonction de la température : point de fusion, d'ébullition et de sublimation, représentant le passage à différents états : état amorphe, état cristallin, état de fusion.

Quand deux molécules s'associent pour former un complexe, on observe un déplacement de ces points vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors une disparition dans l'intervalle de température où la CD est décomposée. Toutes les modifications structurales de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CD peuvent être évaluées par ces techniques [26].

II.6.6.4. Spectroscopie UV/VIS

La spectroscopie d'absorption UV/visible est une technique fréquemment utilisée pour la détermination de la constante d'équilibre d'association dans les applications biochimiques. C'est une technique assez sensible, qui permet de travailler dans des gammes de concentrations faibles, ce qui peut être intéressant pour des produits peu solubles. Elle permet de mettre en évidence la formation des complexes qui souvent produit des modifications du spectre d'absorption de la molécule invitée par déplacement et/ou d'un élargissement de bande. 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 [26, 32].

II.6.6.5. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle est une méthode thermo-analytique qui permet d'étudier les transformations physiques ou chimiques que subissent de nombreux matériaux pendant leur chauffage ou leur refroidissement.

La formation des complexes d'inclusion peut être vérifiée par cette technique, et ce par l'étude de l'effet thermodynamique résultant de la présence de la molécule invitée.

Néanmoins, cette technique est limitée aux composés ayant une température de fusion et d'ébullition en dessous de celle de dégradation de la CD. Il a été observé que la formation des complexes CD-molécules invitées provoque la diminution du pic endothermique de fusion de la molécule invitée (cas d'un mélange physique), et sa disparition dans le cas d'une complexation complète [37].

II.6.6.6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Cette méthode fournit des informations sous forme d'images lumineuses. Elle consiste à balayer ligne par ligne, la surface de cet échantillon avec un faisceau lumineux puis à

transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau incident [27].

Elle est utilisée pour étudier les aspects microscopiques de la CD et de la molécule invitée d'une part et du produit obtenu par complexation d'autre part. L'état de cristallisation des molécules brutes (CD + molécule invitée) et du produit obtenu n'est pas le même ; cette différence indique la formation d'un complexe d'inclusion [36, 37].

II.6.6.7. Diffraction des Rayons X (DRX)

C'est une méthode facile à mettre en œuvre, nécessitant de faibles quantités de composés. Elle repose sur l'observation des différences entre le mélange physique simple des deux composés et le complexe d'inclusion potentiel. La formation d'un complexe CD-molécule invitée altère les modèles de diffraction et change la nature cristalline de la molécule invitée. La diffraction aux rayons X permet non seulement de prouver l'inclusion mais aussi d'obtenir des informations sur la structure du complexe formé [36, 37].

II.6.6.8. Test de dissolution

Le test de dissolution est effectué pour déterminer la quantité et le profil de libération de la molécule invitée. Dans ce cas les complexes sont mis sous forme pulvérulente ou comprimés dans les bacs de l'appareil contenant une solution aqueuse, gastrique ou basique maintenue à 37°C grâce à un bain thermostaté. A intervalles réguliers, des échantillons de 4 à 5 ml sont prélevés, filtrés de préférence puis analysés [20].

NB: Ces techniques ont des approches qualitatives (il s'agit juste de mettre en évidence qu'il y a eu inclusion) et/ou quantitatives si elles permettent de déterminer la constante d'association K_a ($n : m$) [22]. A côté des méthodes d'analyses expérimentales, des méthodes théoriques (modélisation moléculaire) se basant sur des modèles mathématiques peuvent être utilisées [19].

II.7. Diagramme de phase

La formation de complexe avec la CD fait augmenter la solubilité de la molécule incluse, ce phénomène peut apporter des informations sur la constante d'association. L'analyse de la solubilité permet aussi bien d'évaluer la stabilité que de donner un aperçu stœchiométrique de l'équilibre. Expérimentalement, un excès d'une substance peu soluble dans l'eau est introduit dans différentes fioles auxquelles un véhicule aqueux contenant de CDs de concentrations croissantes est ajouté [31].

Les suspensions sont filtrées et la quantité de substance solubilisée est déterminée par une méthode de dosage appropriée et ce après que l'équilibre de complexation soit établi, en agitant les fioles à température constante (plusieurs heures à plusieurs jours) [19, 31].

L'évaluation de l'effet de la CD sur la solubilité apparente de molécules invitées permet de construire le diagramme de phase ou isotherme de solubilité, en rapportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe des abscisses et la concentration molaire de l'agent complexant (les cyclodextrines) sur l'axe des ordonnées [19].

En 1964 Higuchi et Connors ont classé les différents types d'isothermes qui caractérisent les interactions substrat-ligand pouvant être assimilées aux interactions CD-molécule invitée. On distingue deux profils majeurs ; le profil A et le profil B (Fig II.6) [19, 31].

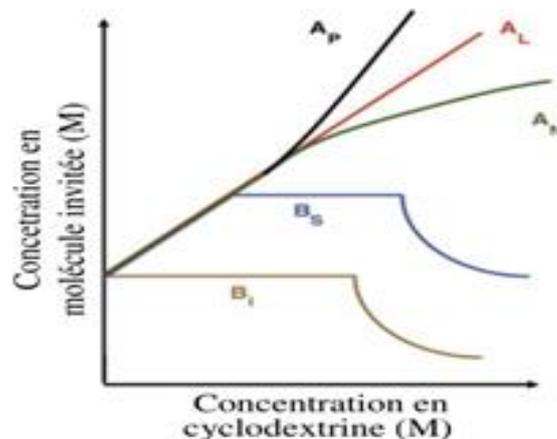


Fig II.6. Représentation graphique des types de diagramme de solubilité selon la classification de Higuchi et Connors [19].

II.7.1. Le profil A

Le profil A est obtenu lorsque la solubilité du substrat augmente avec des concentrations croissantes en CD. On y trouve :

- Les profils de type A_L , indiquant une augmentation linéaire de la solubilité apparente en fonction de la concentration de CD. Ces profils sont généralement attribués à la formation de complexes $n : m$ [31].
- Les profils de type A_P , indiquant une déviation positive de la linéarité de l'isotherme ; c'est-à-dire que la CD est proportionnellement plus effective à de haute concentration. Ces profils traduisent la formation simultanée de complexes à stœchiométrie différente (1:1 à l'origine, puis 1 :2, 1:3 ...) [31, 41].
- Les profils de type A_N indiquent une déviation négative par rapport à la linéarité, en d'autres termes, la CD est proportionnellement moins effective à de haute concentration. Cependant, ces profils peuvent être difficiles à interpréter. La chute de solubilité par rapport au profil linéaire peut être liée à des modifications de la solubilité du complexe, de la constante diélectrique du milieu ou à l'association de CD entre elles à de hautes concentrations [31, 34].

II.7.2. Le profil B

Le profil de type B indique la formation d'un complexe à solubilité limitée. On y trouve :

- Le profil de type B_s suit au départ le profil de type A_L puis à partir d'un certain point, tout ajout de CDs entraîne une précipitation du complexe (au fur et à mesure que le complexe précipite, le principe actif non encore dissout se solubilise sous forme libre). La courbe décroît ensuite (tout l'excès de principe actif est dissout, et cette fraction est progressivement complexée et précipitée).
- Le profil de type B_I peut être interprété de la même manière sauf que dans ce cas, le complexe est tellement insoluble que l'augmentation initiale de la solubilité ne peut être détectée [31, 32].

L'établissement de ces diagrammes de solubilité permet de calculer, à partir de la partie linéaire de la courbe, une constante de stabilité apparente K_c , en se basant sur l'équation d'Higuchi :

$$K_c = \frac{\alpha}{S_0(1-\alpha)}$$

Avec α : la pente de la partie linéaire de la courbe.

S_0 : la solubilité aqueuse en mol/L du principe actif sans CD.

K_c : la constante de stabilité en M^{-1} .

Cette constante peut refléter la stabilité du complexe formé et le devenir de ce complexe dans les milieux biologiques. Plus la constante de stabilité est petite, plus vite est libéré le principe actif [32].

II.8. Application des cyclodextrines

II.8.1. Domaine pharmaceutique

Les cyclodextrines servent à :

- Solubiliser des substances actives peu solubles en milieu aqueux ;
- Améliorer potentiellement la biodisponibilité de molécules hydrophobes ;
- Augmenter la stabilité ;
- Diminuer la perception du mauvais goût voire les effets indésirables de certains principes actifs ;
- Intervenir dans le stockage, la protection des médicaments sensibles à la lumière, à la chaleur ou à l'air ;
- Employées comme vecteurs pour cibler et contrôler la libération du principe actif et pour maintenir les distributions homogènes ;

Les principales CDs utilisées à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutique sont des β -CD naturelles ou modifiées. La plupart des médicaments à base de CDs sont administrés par voie orale (comprimés, dragées, sirops,...) [21, 26].

II.8.2. Autres domaines

II.8.2.1. En cosmétologique

Les principaux avantages des cyclodextrines dans ce secteur sont la stabilisation, le relargage, la protection et la livraison des arômes [20, 24].

II.8.2.2. Dans l'alimentaire

L'incorporation de cyclodextrines offre différents avantages:

- Protection des molécules actives contre l'oxydation, contre la lumière, contre la décomposition par la chaleur, l'humidité ...
- Elimination ou réduction de goûts indésirables, d'odeurs, de contaminations microbiennes, etc;
- Amélioration des caractéristiques nutritionnelles de nombreux produits laitiers [19, 26].

II.8.2.3. En environnement

Les cyclodextrines peuvent jouer un rôle important dans la science environnementale en terme de :

- Solubilisation des contaminants organiques ;
- Enrichissement et déplacement des polluants organiques et des métaux lourds du sol, de l'eau et de l'atmosphère ;
- Traitement de l'eau afin d'éliminer les agents contaminant ;
- Formulation d'insecticide [21, 24].

II.8.2.4. Dans le textile

- Éliminer ou masquer les odeurs indésirables par exemple la fumée de cigarette et la sueur.
- Renforcer la prise des colorants par le tissu et par suite réduire la quantité de colorant perdue lors du lavage [20].

II.8.2.5. En chimie catalytique et analytique

- Catalyseurs chimiques efficaces (augmentent le taux de conversion) ;
- Modèles d'enzymes artificielles ;
- En raison de leurs effets stériques, les CDs jouent un rôle significatif dans des processus biocatalytiques en augmentant l'énantiosélectivité ;
- En chromatographie, potentiel incroyable pour la séparation chirale (HPLC, Electrophorèse capillaire) [20, 21].

II.9. Travaux antérieurs

Afin d'être optimal et exacte dans notre démarche nous nous sommes proposés de faire une recherche bibliographique sur ce qui a été déjà fait concernant l'amélioration de la solubilité de PA(s) en général et de la CPT en particulier par les cyclodextrines et plus exactement par les polymères de cyclodextrine.

En 2005, Y. A. Rakawa et son équipe, ont étudié l'effet du polymère de β -cyclodextrine sur la libération in vitro de la lidocaïne et le kétoprofène, deux médicaments avec différents degrés de lipophilie. Obtenant pour la lidocaïne, une libération retard qui pourrait être due à la diminution de l'activité thermodynamique par la formation de complexes d'inclusion, et une libération accélérée qui pourrait être due à la prévention de la recristallisation, pour le kétoprofène [40].

En 2008, S. Joudieh et son équipe, ont étudié le comportement d'inclusion de cyclodextrines naturelles (CD) et de leurs polymères, en solution et à l'état solide avec l'albendazole (ABZ). Les systèmes solides médicament-cyclodextrine ont été préparés par lyophilisation. L'étude de la solubilité de phase a été utilisée pour évaluer l'interaction en solution, entre ABZ / (CD) et ABZ / polymère CD. La solubilité aqueuse de l'albendazole a été sensiblement améliorée en particulier avec les polymères de CDs, ce qui a permis de conclure que le pouvoir de solubilisation de CDs naturelles a été fortement augmenté dans leur forme polymérisée, en raison d'une plus grande solubilité intrinsèque [41].

En 2009, A. M. Layre et son équipe, ont étudié la libération d'un PA apolaire, la benzophénone, à deux valeurs de pH et différentes teneurs de polymère de cyclodextrine.

Ce qui a permis de montrer que la libération du PA est régie à la fois par diffusion dans le réseau et par les interactions des complexes d'inclusion de cyclodextrine avec des cavités [39].

En 2010, Y. P. Chin et son équipe, se sont intéressés à l'utilisation de polymères de β CDs pour éliminer les parabènes contenus dans une solution aqueuse, plusieurs complexes ont été préparés en utilisant différents rapports molaires d'agent de réticulation. Les paramètres étudiés étaient la capacité d'adsorption, la rétention d'eau, et la réutilisabilité. Ces polymères ont été appliqués à des échantillons réels et ont montré des résultats positifs [43].

En 2012, S. Gaur et son équipe, ont évalués l'efficacité préclinique de CRLX101, des nanoparticules (NP) contenant un polymère de CD et de la camptothécine, par des tests in vitro et in vivo de cytotoxicité sur des cellules cancéreuses gastriques [44].

II.10. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons passé en revue, les aspects essentiels des cyclodextrines. Les différentes caractéristiques de ces molécules cages offrent un potentiel certain pour la résolution de notre problématique de départ ; à savoir, la faible solubilité de la camptothécine.

D'une autre part, la rareté des travaux effectués sur l'amélioration de la solubilité de la CPT par des polymères de CD soulève l'importance et la nécessité de l'exploration de cette voie.

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1. Predéveloppement

III.1.1. Matériels et réactifs

- β CD, HP β CD, PM β CD et Poly β CD furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- CPT et CPT 11 furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

III.1.2. Mode opératoire

Nous avons suivi les étapes suivantes :

- Préparation de solutions de 0.25mg/ml de β CD, de HP β CD, PM β CD, de poly β CD, de CPT et de CPT 11 dans un mélange méthanol/ DMSO (9 :1).
- Mise sous agitation des solutions jusqu'à dissolution complète.
- Prélèvement de 2 ml de chaque solution.
- Préparation de solutions (v/v) de β CD-CPT, poly β CD-CPT, β CD-CPT 11, et poly β CD-CPT 11, à partir des solutions de départ.
- Réalisation de scans par spectroscopie UV-Visible, en balayant un intervalle allant de 200 à 500 nm et détermination de l'absorbance maximale ainsi que la longueur d'onde correspondante.

III.2. Test de solubilité (test D'HIGUCHI)

III.2.1. Matériels et réactifs

- Poly β CD fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Poly Ethylène Glycol (PEG) 6000
- CPT et CPT 11 fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate di-sodique (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate mono-potassique (BIOCHEM Pharma)
- Acide phosphorique (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- pH-mètre (HANNA Instrument pH 209)
- spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

III.2.2. Mode opératoire

L'observation du passage en solution de la CPT est essentielle dans la mise en évidence de l'effet du polymère cyclodextrine sur celle-ci. Le diagramme de solubilité du poly β -CD est réalisé selon la méthode d'Higuchi et Connors et ce en suivant les étapes suivantes :

- Préparer des solutions de (5 ml) de concentrations croissantes en poly β CD dans une solution tampon PBS à un pH= 2 (Voir les tableaux III.1).
- Ajout d'un excès de CPT (20 mg).
- Placer les solutions dans l'obscurité, à température ambiante et sous agitation 7 jours.
- Décanter et filtrer les solutions après sept jours, avec des micro-filtres (0.45 μ m).

- Quantifier la CPT dissoute par la formation de complexes avec le poly β CD par spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde λ égale à 365 nm.

Tableau III.1. Masses et concentrations utilisées pour le test de solubilité

Echantillon N°	01	02	03	04	05
Concentration Poly β -CD (mg/ml)	5	10	15	50	75
Quantités théoriques de Poly β -CD (mg) dans 5ml	25	50	75	250	375
Quantité pratiques de Poly β -CD (mg) dans 5 ml	25	51	74	251	375

- Réaliser une courbe d'étalonnage, en préparant des solutions de CPT à différentes concentration dans un mélange méthanol / DMSO (9 :1) (Tableau III.2). Ces dernières sont ensuite quantifiées par spectroscopie UV-Visible.

Tableau III.2. Concentrations en CPT utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07
Concentration (mg/ml)	0.020	0.015	0.010	0.008	0.004	0.002	0.0011

Le diagramme de solubilité du PEG est réalisé de la même manière, en utilisant les quantités indiquées dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Masses et concentrations utilisées pour le diagramme de solubilité avec le PEG 6000

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06
Concentration PEG 600 (mg/ml)	10	15	50	75	100	300
Quantités théoriques de PEG (mg) dans 5ml	50	75	250	375	500	1500
Quantité pratiques de PEG (mg) dans 5ml	51.2	74	250	375.3	500.1	1500

III.3. Préparation de complexes d'inclusion

III.3.1. Matériels et réactifs

- β CD, HP β CD, PM β CD et Poly β CD furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Poly Ethylène Glycol 6000 (BIOCHEM Pharma)
- CPT et CPT 11 furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Ethanol (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Etuve (BINDER)

III.3.2. Mode opératoire

III.3.2.1. Le mélange physique

- Une quantité de CPT avec des quantités de : β -CD, HP β -CD, M β -CD, poly β -CD et PEG 6000 sont mélangées dans un mortier (voir tableau III.4). Les mélanges obtenus sont conservés dans un dessiccateur.

Tableau III.4. Quantité de CPT et de : β -CD, HP β -CD, M β -CD, poly β -CD et PEG 6000 nécessaire à la préparation des mélanges physiques et complexes d'inclusion.

	β -CD, CPT	HP β -CD, CPT	M β -CD, CPT	Poly β - CD, CPT	PEG 6000, CPT
Quantités théoriques de CPT (mg)	250	250	250	50	50
Quantités pratiques de CPT (mg)	250	250	250.5	51	50.7
Quantités théoriques de CDs (mg)	814.57	854.30	955.46	450	450
Quantités pratiques de CDs (mg)	814.7	854.2	955.4	449.8	451

III.3.2.2. La Co-évaporation

- Les même quantités de CPT et de : β -CD, HP β -CD, PM β -CD, poly β -CD et PEG 6000 sont dissoutes dans de l'éthanol (voir tableau III.4) et laissées sous agitation durant 2 heures.
- La solution est mise à l'étuve jusqu'à évaporation complète du solvant.
- la poudre est récupérée puis conservée dans un dessiccateur.

III.4. Caractérisation des complexes d'inclusion

III.4.1. Spectroscopie Infrarouge

III.4.1.1. Matériels et réactifs

- β CD, HP β CD, PM β CD et Poly β CD furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Poly Ethylène Glycol 6000 (BIOCHEM Pharma)
- CPT et CPT 11 furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Quelques milligrammes de complexes obtenus avec chacune des deux méthodes citées précédemment.
- Quelques milligrammes de KBr (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Appareil de réalisation de pastille (SHIMADZU)
- Spectrophotomètre Infrarouge (IRAffinity-1 SHIMADZU)

III.4.1.2. Méthode

Des pastilles contenant un mélange échantillons / KBr sont préparées et par suite analysés par spectroscopie infrarouge entre les longueurs d'onde à 500 à 4000 cm^{-1} .

III.4.2. Spectroscopie à diffraction des rayons X

III.4.2.1. Matériels et réactifs

- β CD, HP β CD, PM β CD et Poly β CD furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Poly Ethylène Glycol 6000 (BIOCHEM Pharma)
- CPT et CPT 11 furent fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Quelques milligrammes de complexes obtenus avec chacune des deux méthodes citées précédemment.
- Spectrophotomètre de diffraction de rayons X (EXPERT Pro PANalytical theta II theta, système vertical, mode automatique); plate-forme pour échantillons (SPENER); détecteur (excellerator 2 x 128)

III.4.2.2. Mode opératoire

Les échantillons sont directement analysés par l'appareil en balayant des angles 2θ entre 0 et 60° .

III.4.3. Test de dissolution

III.4.3.1. Matériels et réactifs

- Camptothécine et camptothecin 11 sont fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Les complexes d'inclusion ainsi que les melanges physiques préparés.
- Acide chlorhydrique HCL (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Dissolutest et accessoires (PharmaTest DT70)
- Spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

III.4.3.2. Méthode

Le test de dissolution consiste à suivre l'évolution de la quantité de CPT dissoute en fonction du temps, nous avons suivi les étapes suivantes:

- Préparation du milieu de dissolution ; milieu acide à pH = 1,2 (HCl 0,1N) afin de simuler le milieu physiologique gastrique.
- Remplissage des bacs (qui sont chauffés à 37°C grâce à un bain thermostaté) avec le milieu (900 ml).
- Ajout des quantités de complexe correspondant à 10 mg de CPT (voir tableau III.5) dans chacun des six bacs, et une quantité de 10mg de CPT dans le septième.
- Mise en marche de l'agitation (75 tours/min).
- Prélèvements de 4 à 5 ml dès la cinquième minute et par la suite à intervalles réguliers. Filtrer et quantifier la quantité de CPT dissoute par UV /Visible.

La CPT, CPT 11, les complexes préparés ainsi que leurs mélanges physiques correspondants furent analysés en double.

Tableau III.5. Quantités de complexe correspondant à 10 mg de CPT

Mélange physique	β -CD, CPT	HP β -CD, CPT	M β -CD, CPT	Poly β -CD, CPT	PEG 6000, CPT
Quantités théoriques correspondantes à 10 mg de CPT (mg)	42.584	44.168	48.216	100	100
Quantités pratiques correspondantes à 10 mg de CPT (mg)	42.6	44.1	48.3	100.1	100
Complexe	β -CD, CPT	HP β -CD, CPT	M β -CD, CPT	Poly β -CD, CPT	PEG 6000, CPT
Quantités théoriques correspondantes à 8 mg de CPT (mg)	32.58	34.172	38.218	76.5	76.5
Quantités pratiques correspondantes à 8 mg de CPT (mg)	32.6	34.1	38.3	76.5	76.5

Nous réaliserons une courbe d'étalonnage, en préparant des solutions de CPT11 à différentes concentrations dans un mélange méthanol / DMSO (9 :1), qui sont ensuite quantifiées par spectroscopie UV-Visible. (Tableau III.6.)

Tableau III.6. Concentrations en CPT 11 utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage.

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06
Concentration (mg/ml)	0.011	0.008	0.0055	0.0044	0.0022	0.0011

Afin de prévoir et d'établir une corrélation entre le mécanisme et la cinétique de dissolution de la CPT à partir des complexes formés, il est nécessaire de s'inscrire dans un modèle mathématique approprié. Les données de libération ont été corrélées à divers modèles :

- **Modèle d'ordre zéro:** $F = K_0 t$, où F représente la fraction de médicament libérée dans le temps t , et K_0 est la constante de vitesse de libération apparente ou constante de libération d'ordre zéro.
- **Modèle du premier ordre:** $\ln (1-F) = - K_{1st} t$, où F représente la fraction de médicament libérée dans le temps t , et K_{1st} est la constante de libération du premier ordre.
- **Modèle d'Higuchi:** $F = K_H t^{1/2}$, où F représente la fraction de médicament libérée au temps t , et K_H est la constante de dissolution Higuchi.
- **Modèle de Korsmeyer-Peppas:** $F = K_p t^n$, où F représente la fraction de médicament libérée dans le temps t , K_p est la constante de vitesse et n est l'exposant qui indique le mécanisme de libération du PA [45].

III.5. MODELISATION CELLULAIRE

III.5.1. Test sur globule rouge et hémoglobine

III.5.1.1. Matériel et réactif

- Complexes préparés par co-évaporations : β CD-CPT, HP β CD-CPT, PM β CD-CPT, poly β CD-CPT, PEG-CPT.
- Sang frais (quotidien) donné généreusement par le laboratoire d'hématologie de l'hôpital FRANTZ FANON de Bejaia.
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)

- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Chlorure de Sodium (NaCl) (BIOCHEM Pharma)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Centrifugeuse (SIGMA Laborzentrifugen)
- Spectrophotomètre UV-Visible (BIOTECH engineering)

III.5.1.2. Mode opératoire

Les étapes communes aux deux tests sont mentionnées ci-dessous :

- Préparation d'une solution de NaCl à 0.9%
- Préparation de solutions de 50 μ M de camptothécine et de camptothécine 11 dans la solution de NaCl 0,9 %.
- Préparation de solution de β CD, HP β CD, M β CD, poly β CD, PEG ainsi que les cinq complexes correspondant à 50 μ M de CPT.
- Préparation d'un mélange NaCl / DMSO à 1%.
- Préparation d'une solution DMSO-CPT/NaCl.
- Mise sous agitation des solutions jusqu'à dissolution complète.
- Centrifugation du sang pendant 10 minutes à 2000 tour/min.
- Remplacement du surnageant pas une solution isotonique (NaCl 0.9%).
- Préparation des traitements échantillons/sang (v/v).
- Incubation pendant 30 minutes à température ambiante.
- Dilution du traitement : 100 μ l / 3.9 ml de NaCl 0.9%.
- Quantifier la concentration cellulaire par spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde λ égale à 620 nm.
- Centrifugation du sang avec traitement pendant 10 minutes à 2000 tour/min.
- Récupération de l'hémoglobine
- Quantifier la concentration en hémoglobine par spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde λ égale à 412 nm.

III.5.2. Test sur spermatozoïdes

III.5.2.1. Matériel et réactif

- Complexes préparés par co-évaporations : β CD-CPT, HP β CD-CPT, PM β CD-CPT, poly β CD-CPT, PEG-CPT.
- Semence fraîche (quotidienne), donnée généreusement par le laboratoire d'analyse MOUALEK.
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Tris (BIOCHEM Pharma)
- Acide citrique (BIOCHEM Pharma)
- D-glucose (BIOCHEM Pharma)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Computer Assisted Sperm Analysis(CASA) (MICROPTIC sl)

III.5.2.2. Mode opératoire

Nous avons suivi les étapes suivantes :

- Préparation du milieu de dilution (le tris Buffer) : Dissoudre 3.025 g de tris, 1.676 g d'acide citrique et 1.250 g de D-glucose dans 100 ml d'eau distillée.
- Préparation de solutions de 50 μ M de camptothécine et de son équivalent en complexes et 50 μ M de camptothécine 11.
- Préparation de control : NaCl/DMSO à 1%.
- Faire des dilutions à (1 / 5) à la semence avant de démarrer les traitements.
- Préparation des traitements échantillons / semence (v/v).
- Analyser par le CASA les différents paramètres :
 - VSL (Straight line Velocity) qui représente la vitesse mesurée en utilisant le trajet moyen entre le premier point et le plus éloignée pendant la période mesurée.

- VCL (Curvi Linear Velocity) qui représente la vitesse équivalente à la distance totale parcourue par seconde.
- VAP (Average Path Velocity) qui représente la vitesse calculée sur un tracé construit en utilisant une moyenne d'itinérance [46].

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Predéveloppement

IV.1.1. Résultats

Les scans effectués sur les solutions de β CD, HP β CD, PM β CD, poly β CD, CPT et de CPT11 dans un mélange méthanol/ DMSO (9 :1) de concentration égale à 0.25 mg/ml sont joints en annexe 1.

IV.1.2. Observations

Le balayage UV visible sur les solutions de β CD, HP β CD, PM β CD et poly β CD dans un mélange méthanol/ DMSO (9 :1) ne montre aucune absorbance entre 200 et 430 nm.

Dans le cas de la CPT et de la CPT11, nous observons clairement des absorbance maximale, et ce pour les longueurs d'onde (λ_{\max}) de 260, 290, 365 et 380 nm.

Nous remarquons aussi qu'à ces longueurs d'onde les cyclodextrines ne présentent aucuns pics d'absorbances.

IV.1.3. Interprétation des résultats

D'après les résultats obtenus la β CD, HP β CD, PM β CD et le poly β CD n'absorbent pas en UV-visible à 365 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de la CPT et CPT 11. Ainsi, cette longueur d'onde peut être sélectionnée pour le dosage de la CPT en présence de cyclodextrine (la spécificité est prouvée).

IV.2. Test de solubilité (test D'HIGUCHI)

IV.2.1. Résultats

IV.2.1.1. Réalisation de la gamme étalon

La courbe d'étalonnage de la CPT est représentée dans la Fig. IV.1 (les résultats bruts sont présentés en annexe 2)

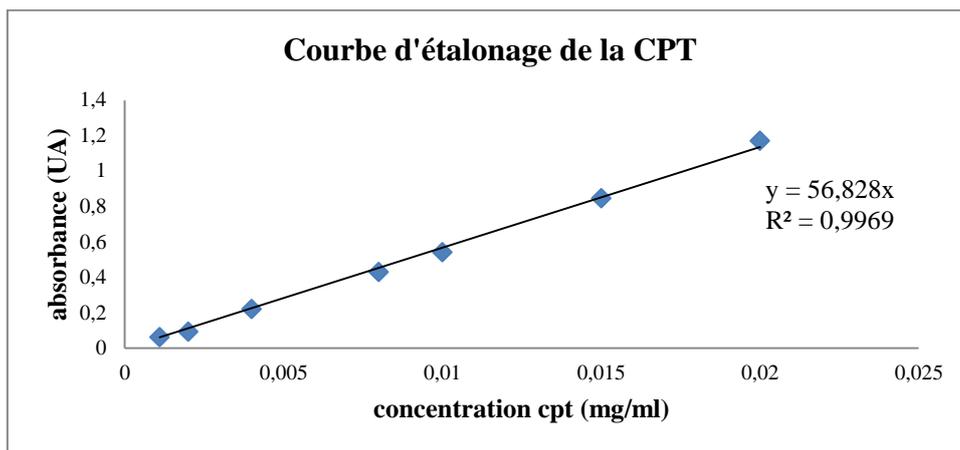


Fig IV.1. Courbe d'étalonnage de la CPT

IV.2.1.2. Diagramme de solubilité (Test d'Higuchi)

Après sept jours d'agitation, à l'abri de la lumière et à température ambiante, les solutions sont filtrées puis quantifiées par spectroscopie UV-Visible à $\lambda = 365$ nm. (Les résultats bruts sont représentés en annexe 2.)

- **Diagramme de solubilité de la CPT / poly B CD**

La concentration de la molécule invitée (CPT) en fonction de la concentration de la molécule hôte (POLY β -CD) est représentée dans la Fig. IV.2.

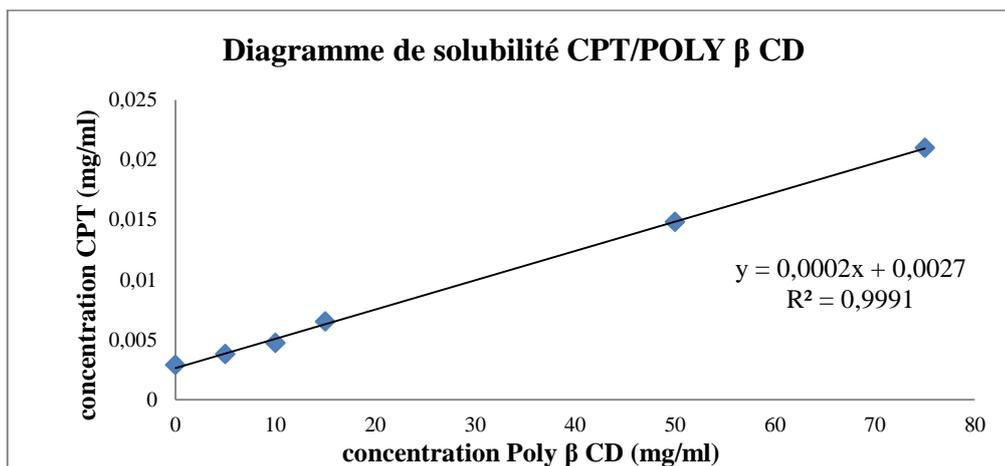


Fig. IV.2. Diagramme de solubilité CPT/POLY β CD.

- **Diagramme de solubilité de la CPT / PEG 6000**

La concentration de la CPT en fonction de la concentration du PEG 6000 est représentée dans la Fig. IV.3.

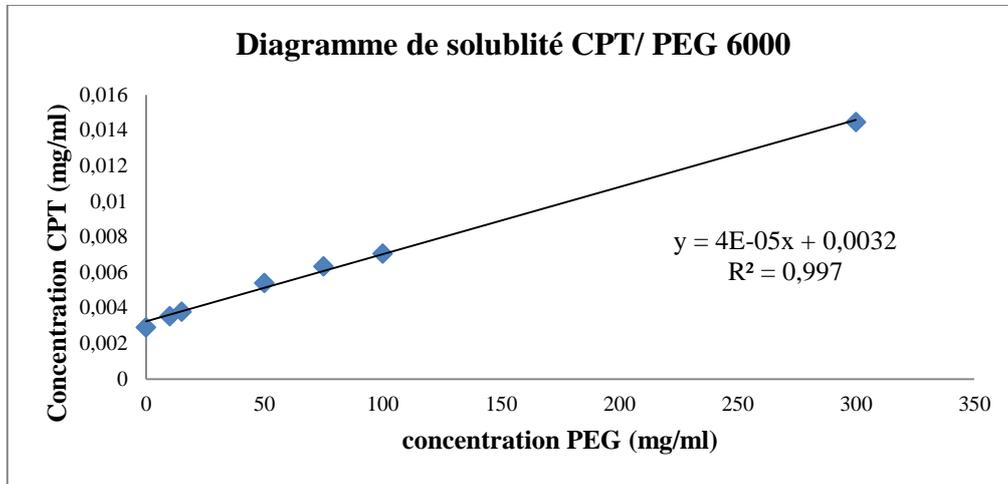


Fig IV.3. Diagramme de solubilité CPT/ PEG 6000

IV.2.2. Observations

Dans les deux cas, nous remarquons que la concentration de la CPT augmente avec l'augmentation de la concentration des polymères. De plus, cette augmentation est linéaire, du fait que les deux coefficients de corrélation R^2 se rapprochent de l'unité.

IV.2.3. Interprétation des résultats

Les deux diagrammes de solubilité montrent que :

- La solubilité de la CPT augmente avec des concentrations croissantes en Poly β CD et en PEG 6000 ; selon Higuchi et Connors, il s'agit d'une isotherme de type A.
- Comme la solubilité apparente de la CPT augmente de façon linéaire en fonction de la concentration, il s'agit d'un profil de type A_L , qui traduirait la formation probable de complexes de type 1 :1. Dans ce cas on peut calculer la constante d'équilibre (K_c).

- **Calcul de K_c :**

$$K_c = \frac{\alpha}{S_0(1-\alpha)}$$

Avec α : la pente de la partie linéaire de la courbe.

S_0 : la solubilité aqueuse en mol/L du principe actif sans cyclodextrine.

K_c : la constante de stabilité en M^{-1} .

La CPT a une solubilité maximale, au bout de sept jours d'agitation de 0,0209 mM.

- Dans le cas de CPT/ poly β CD on obtient une constante $K_c = 23,9851 M^{-1}$.
- Dans le cas de CPT/ PEG 6000 on obtient une constante $K_c = 4.7959 M^{-1}$.

Même si, réellement l'équation d'Higuchi n'est pas totalement exploitable dans ces deux cas, cela n'empêche qu'elle nous permet d'avoir une idée sur la force de liaison entre le PA et les polymères.

On observe que $K_{c \text{ poly } \beta} > K_{c \text{ PEG}}$, en principe cela voudrais dire qu'il y a une meilleure ou une plus favorable interaction entre le polymère de β CD et la CPT qu'avec le PEG 6000.

Cela peut être expliqué par le fait que dans le cas du polymère de β CD, la CPT est attiré par la cavité des CDs d'un part et par le réseau créé lors de la polymérisation d'autre part.

IV.3. Caractérisation des complexes d'inclusion

IV.3.1. Spectroscopie Infrarouge

La représentation des superpositions des résultats des différents mélanges physiques, complexes d'inclusion ainsi que les matières premières utilisées, sont joints en annexe 3.

IV.3.1.1. Observations

Le spectre IR de la CPT présente des pics caractéristiques, auquel correspond une fonction de la molécule, les plus importants étant:

- 2974.10 cm^{-1} correspondant aux vibrations des cycles aromatiques ;
- 1741.30 cm^{-1} correspondant au groupe C=O vibration d'élongation du cycle lactone ;
- 1655 cm^{-1} correspondant au groupe C = O vibration d'élongation des groupements cétoniques ;
- 1490 cm^{-1} correspondant aux vibrations des noyaux phényle [44].

Les mélanges physiques ont révélé la présence des pics caractéristiques de la CPT, ces spectres sont pratiquement équivalent à l'addition de ceux des CDs et de la CPT, tandis que sur les spectres des complexes d'inclusion, on note la disparition de quelques pics caractéristiques de la CPT comme celui correspondant aux liaisons C=O.

IV.3.1.2. Interprétation des résultats

L'addition des spectres des CDs et de la CPT dans le cas des mélanges physiques montre qu'il n'y a aucun élément en faveur de la formation d'une inclusion, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'interaction entre la CPT et les CDs en simple mélange physique,

La disparition d'un ou plusieurs pics caractéristiques de la CPT dans le cas des complexes indique qu'il y a une interaction entre la CPT et les CDs sans mise en jeu de liaison covalente, c'est-à-dire que l'ensemble de la molécule ou au moins certains de ses groupements (comme C=O) sont incorporés dans des cavités des CDs, ce qui prouve l'inclusion [44].

IV.3.2. Spectroscopie par diffraction des rayons X

La représentation des superpositions des résultats des différents mélanges physiques, complexes d'inclusion ainsi que les matières premières utilisées, sont joints en annexe 4.

IV.3.2.1. Observations

L'analyse de la CPT par diffraction des rayons X, montre des pics aigus, intenses, et caractéristiques à 2θ entre 0 et 60 °.

Les diffractogrammes des mélanges physiques montrent une superposition des spectres de la CPT et des composés ajoutés avec pratiquement aucune disparition des pics caractéristiques.

Tandis que sur les spectres des complexes d'inclusion, on note une disparition ou une nette diminution de l'intensité des pics, ainsi que l'apparition des quelque nouveaux pics.

Le PEG 6000 présente des pics aigus et arrangés, après dispersion solide de la CPT on note la disparition de cet arrangement.

IV.3.2.2. Interprétation des résultats

L'intensité et la forme des pics caractéristiques de la CPT suggèrent qu'elle est présente sous forme cristalline (état arrangé).

La disparition de ses pics caractéristiques ou la diminution de leur intensité, dans le cas des complexes, indique une réduction marquée de la cristallinité, ce qui suggère la formation de complexes d'inclusion amorphe avec, qui selon la littérature, confère une meilleure solubilité au PA [45].

La disparition de l'arrangement des pics dans le cas de la dispersion dans le PEG 6000 indique un passage de l'état cristallin à l'état amorphe, ce qui peut être expliqué par la dispersion par co-évaporation de la CPT dans le PEG 6000.

IV.4. Test de dissolution

Les résultats bruts de tous les tests de dissolution ainsi que les courbes d'étalonnages utilisées sont présentées en annexe 5.

Les pourcentages de la CPT et la CPT 11 dissous au bout de 120 minutes en milieu gastrique sont présentés dans la Fig. IV.4 et Fig. IV.5.

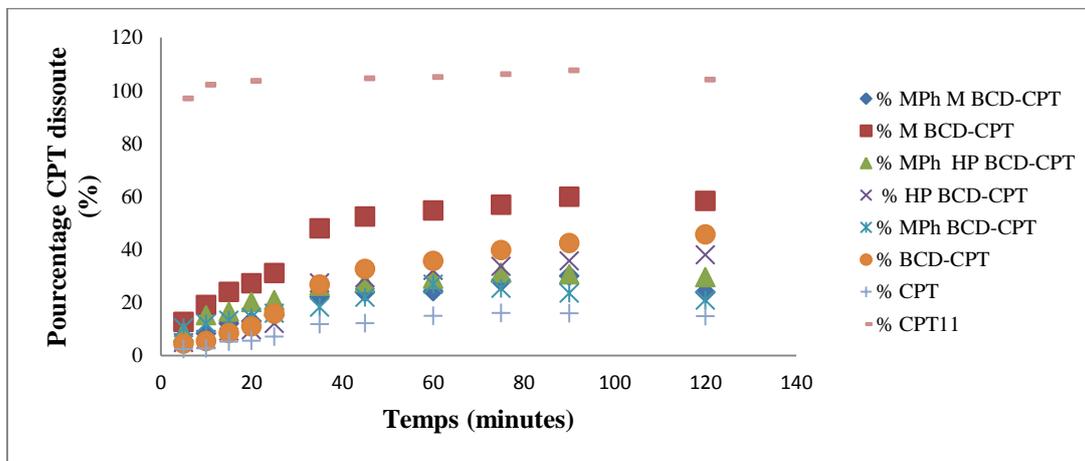


Fig IV.4. Profils de dissolution des mélanges physiques et complexes de β CD/CPT, HP β CD/CPT, M β CD/CPT et des deux témoins CPT et CPT11.

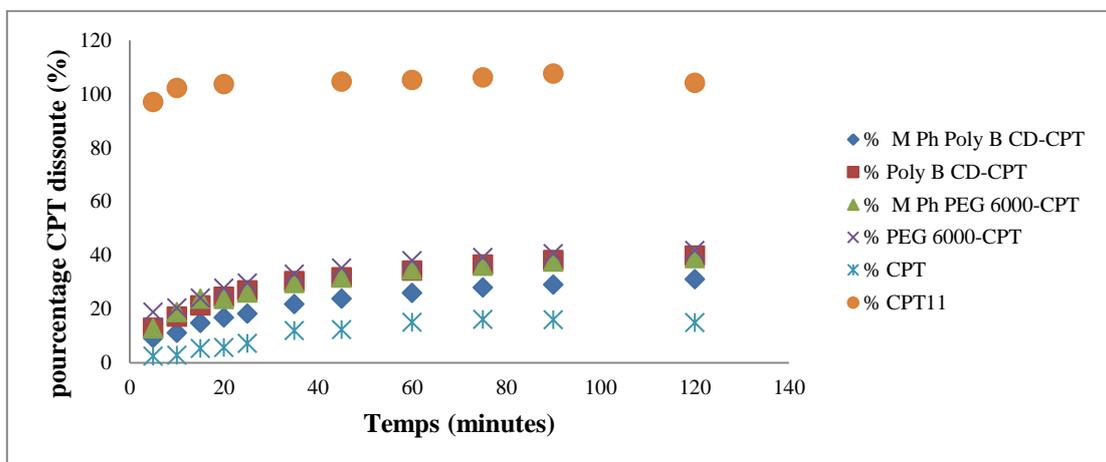


Fig.IV.5. Profils de dissolution des mélanges physiques et complexes de : poly β CD-CPT, PEG 6000-CPT et des deux témoins CPT et CPT11.

IV.4.1. Observations

- La quantité de CPT non traitée dissoute augmente jusqu'à atteindre les 7 %, puis forme un pseudo-palier ou au bout de 120 minutes elle atteint les 14%.
- La CPT 11 se dissout quasi-instantanément, en atteignant les 97 % dès les premières minutes du test, formant à partir de là un palier autour des 100%.
- Toutes les autres courbes montrent une augmentation de la quantité de CPT dissoute, sachant que :
 - Les complexes (CDs-CPT) et la dispersion solide (PEG 6000-CPT) formés offrent un meilleur pourcentage de dissolution de la CPT que les mélanges physiques, sachant que le PEG relâche plus rapidement la CPT et à plus grande dose.
 - Parmi les complexes β CD-CPT, HP β CD-CPT et M β CD-CPT, ce dernier atteint un meilleur pourcentage de dissolution, de telle sorte qu'il atteint un taux de dissolution quatre fois supérieur à celui de la CPT seule.
 - En ce qui concerne les deux polymères, ils atteignent au bout de 120 minutes environ le même pourcentage de dissolution (41 % pour le PEG 600 et 39 % pour le poly β CD)

IV.4.2. Interprétation des résultats

Le problème de solubilité de la CPT explique son faible taux de dissolution (14%).

La dissolution spontanée et complète de la CPT 11 est dû au fait qu'elle soit un dérivé hydrosoluble de la CPT, c'est d'ailleurs pour cela qu'elle fut justement choisit dans notre étude.

L'accroissement de la solubilité de la CPT dans les cas des complexes, est directement lié à la formation de complexes d'inclusion qui par la suite augmente la solubilité du PA.

Le complexe β CD-CPT offre une solubilité moindre par rapport aux autres complexes du fait que sous sa forme native le β CD a une hydrosolubilité limitée.

Pour le poly β CD, l'augmentation de la dissolution est due à l'inclusion et la fixation par réseaux, dans le cas du PEG 6000 cette augmentation est due au pouvoir hydrophilisant et à la mouillabilité du PEG [44] ainsi qu'au changement d'état observé lors de la DRX. Le faible K_c

calculé explique aussi le fait que la relargation de la CPT du PEG 6000 est plus importante que celle du Poly β CD

Le meilleur pourcentage de dissolution est obtenu lors de l'utilisation du PM β CD-CPT, cela peut s'expliquer par le fait que les groupements méthyle soient plus polaires que ceux de l'HP β CD, et que la PM β CD est plus soluble que la β CD et peut être même que le poly β CD.

IV.4.3. Modélisation mathématique

IV.4.3.1. Observation

Les graphes obtenus lors de la modélisation sont joint en annexe 6, ces derniers nous ont permis d'obtenir les résultats représentés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1. Modélisation des données de dissolution des complexes β CD- CPT, HP β CD-CPT, M β CD-CPT, POLY β CD- CPT, PEG-CPT.

Modèles mathématiques		β CD-CPT	HP β CD-CPT	M β CD-CPT	POLY β CD-CPT	PEG-CPT
Ordre zero	K_0	0.0040	0.0032	0.0420	0.0022	0.0020
	R^2	0.8828	0.8244	0.7655	0.8315	0.8337
Premier ordre	K_{1st}	0.0055	0.0042	0.0072	0.0031	0.0030
	R^2	0.9168	0.8496	0.8050	0.8669	0.8619
Higuchi	K_H	0.0554	0.0451	0.0602	0.0309	0.0284
	R^2	0.9572	0.9070	0.8875	0.9438	0.9423
Korsmeyer-Peppas	K_p	0.1612	0.2504	0.9262	0.9467	1.0475
	R^2	0.8871	0.8682	0.8540	0.8865	0.9072
	n	0.2832	0.2529	0.1725	0.1172	0.0928

IV.4.3.2. Interprétation des résultats

Le modèle d'Higuchi représente le meilleur ajustement, car il donne les meilleures valeurs de coefficient de corrélation en comparaison avec les autres modèles, ce qui indique que la dissolution (ou relargation) de ma CPT suit un mécanisme de diffusion Fickien.

L'exposant de libération n du modèle Korsmeyer-Peppas étant inférieur à 0.43, traduit un phénomène de dissolution dû à un gradient de potentiel chimique, ce qui est en adéquation avec le mécanisme de diffusion Fickien du modèle d'Higuchi [42].

IV.5. Modélisation cellulaire

IV.5.1. Test sur globule rouge et hémoglobine

Les résultats brutes du dosage cellulaire et de l'hémoglobine sont joints en Annexe 7, ces derniers nous ont permis de tracer les histogrammes en bâtons ci-dessous (Fig IV.6 et IV.7).

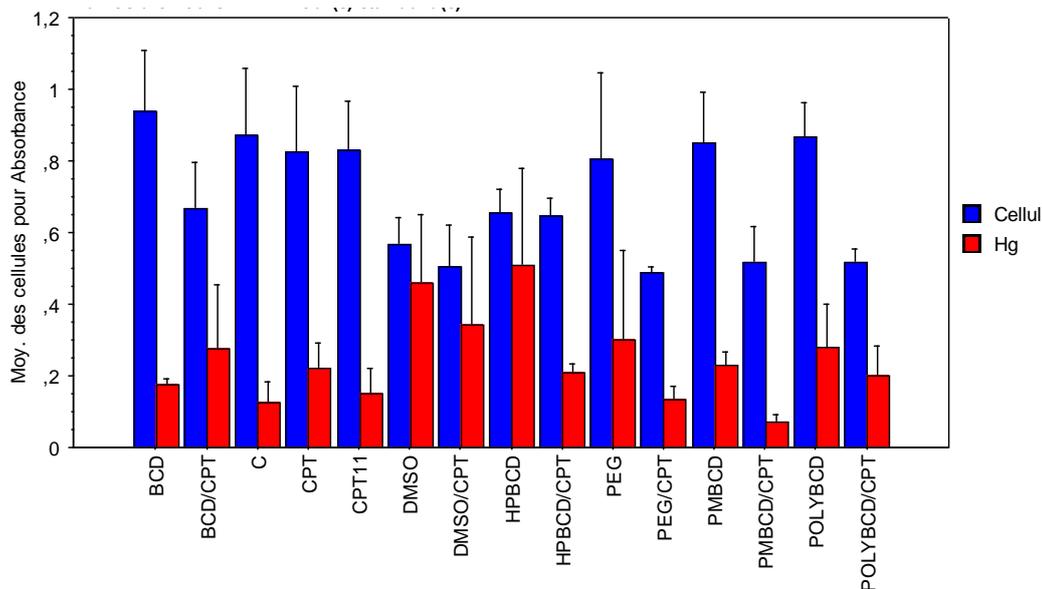


Fig IV.6. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des absorbances cellulaires et d'hémoglobines en fonction des traitements utilisés.

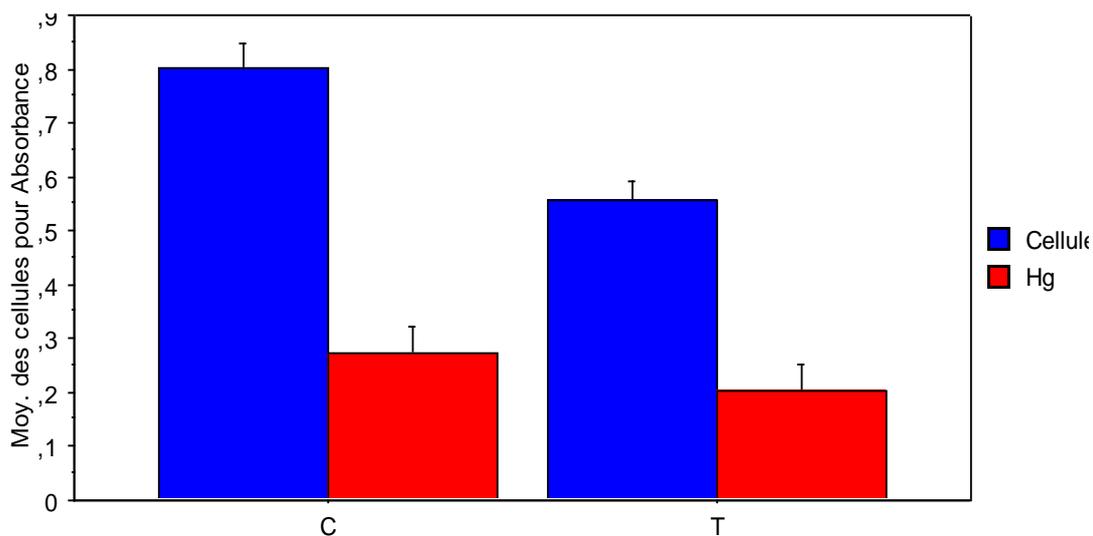


Fig IV.7. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des absorbances cellulaires et d'hémoglobines en fonction des contrôles et des traitements.

IV.5.1.1. Observations

On remarque qu'il y a une relation inversement proportionnelle entre les concentrations cellulaires et l'hémoglobine pour la majorité des échantillons.

On observe aussi que les valeurs en concentrations cellulaires dans tous les contrôles utilisés, sont proches du contrôle avec milieu physiologique (solution NaCl à 0.9%), à l'exception de l'échantillon traité par le DMSO.

On voit aussi que globalement les valeurs de la concentration cellulaire des complexes, sont faibles par rapport à leurs contrôles respectifs et que dans le cas du traitement DMSO-CPT on obtient une diminution qui reste proche de celle obtenue en utilisant le DMSO seul.

Les observations citées ci-dessus, sont plus accentuées et plus claires dans la figure IV.7, représentant une comparaison par catégorie (contrôle et traitement).

IV.5.1.2. Interprétation des résultats

La relation inversement proportionnelle entre les quantités d'hémoglobine et de concentration cellulaire peut être expliquée par l'hémolyse des globules rouges libérant ainsi l'hémoglobine.

Les concentrations cellulaires dans tous les contrôles utilisés sont élevées à l'exception du DMSO, Ce qui indique que :

- Les contrôles à base de cyclodextrines et PEG n'ont pas une influence sur les globules rouges. Donc, aux concentrations utilisées, ces molécules ne présentent pas d'effet toxique notable, cette explication peut être appuyée par le fait que la Food and Drug Administration (FDA) a accepté ces deux molécules à l'usage pharmaceutique.
- Le DMSO présente une faible toxicité même à 1% (v/v).

On note les mêmes observations en ce qui concerne les contrôles à base de CPT et CPT11, ce qui peut être dû à la faible solubilité de la CPT d'une part, et à l'instabilité du cycle lactame de ces deux molécules, essentiel à leurs effet anticancéreux d'autre part.

Le traitement DMSO-CPT montre une diminution de la concentration cellulaire bien qu'elle reste proche de celle du DMSO seul, ce qui indique qu'elle est probablement due à la toxicité du DMSO et non à celle de la CPT même si cette dernière y est totalement soluble.

Ceci nous permet donc de dire que la diminution de la concentration cellulaire dans le cas des traitements est due à l'augmentation de la solubilité et stabilité de la CPT et donc de son effet toxique grâce à la complexation avec les différentes CDs et à la dispersion solide dans le PEG 6000.

La figure IV.7 confirme les observations ainsi que les hypothèses émises, car la tendance prouve que les complexes formés et la dispersion solide effectuée, ont un effet plus important que les contrôles.

IV.5.2. Test sur spermatozoïdes

IV.5.2.1. Les vitesses VSL, VCL, VAP

L'analyse du sperme traité a généré les résultats joints en annexe 8, ces derniers nous ont permis de tracer les histogrammes (Figures IV.8, IV.9, IV.10, IV.11).

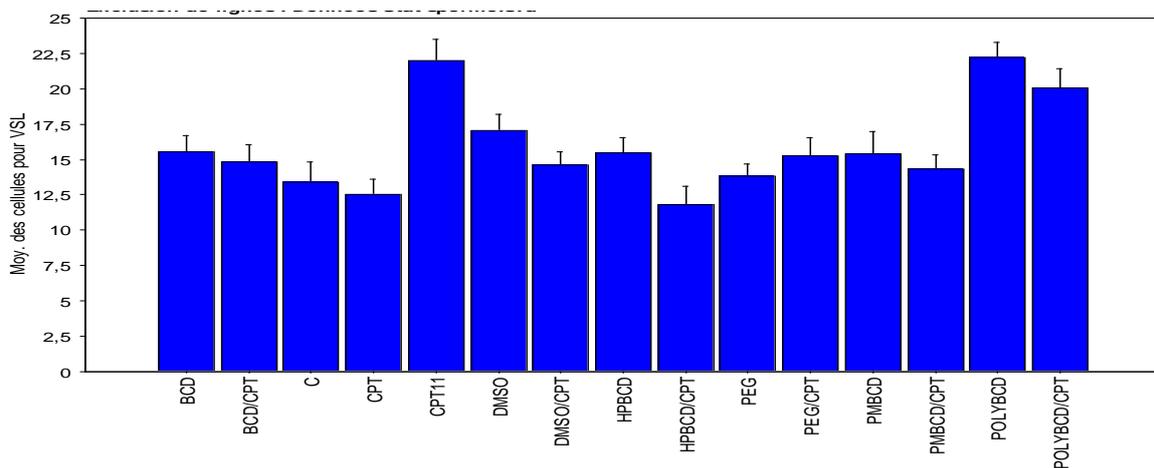


Fig IV.8. Diagramme en bâtons représentant la VSL en fonction des échantillons testés.

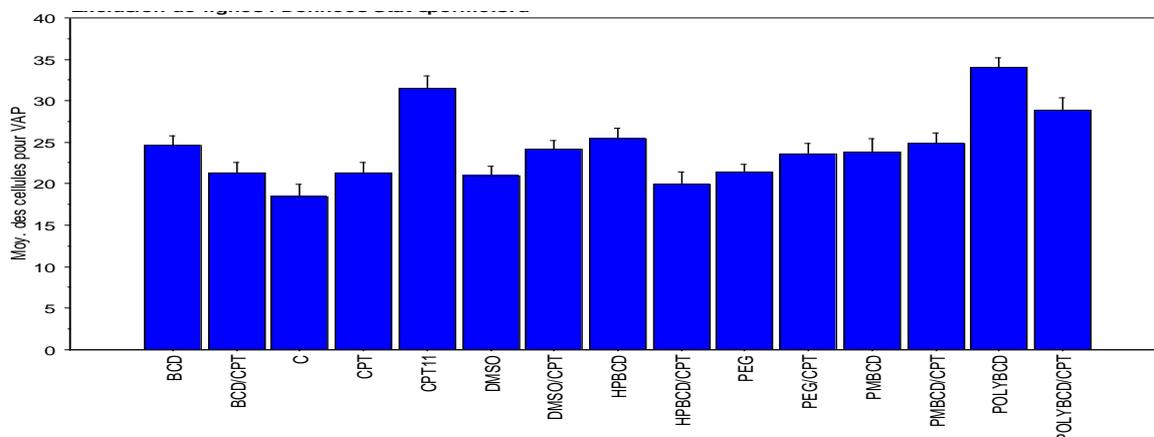


Fig IV.9. Diagramme en bâtons représentant la VAP en fonction des échantillons testés.

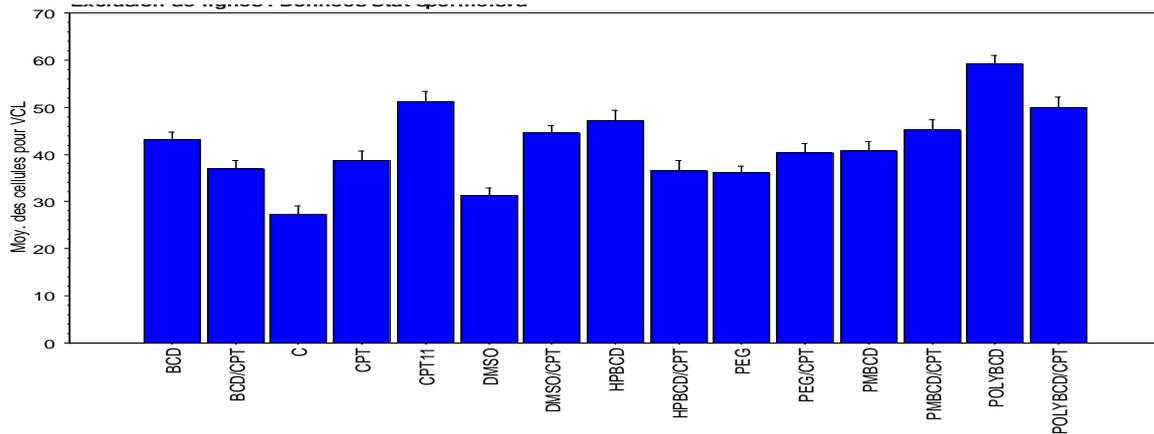


Fig IV.10. Diagramme en bâtons représentant la VCL en fonction des échantillons testés.

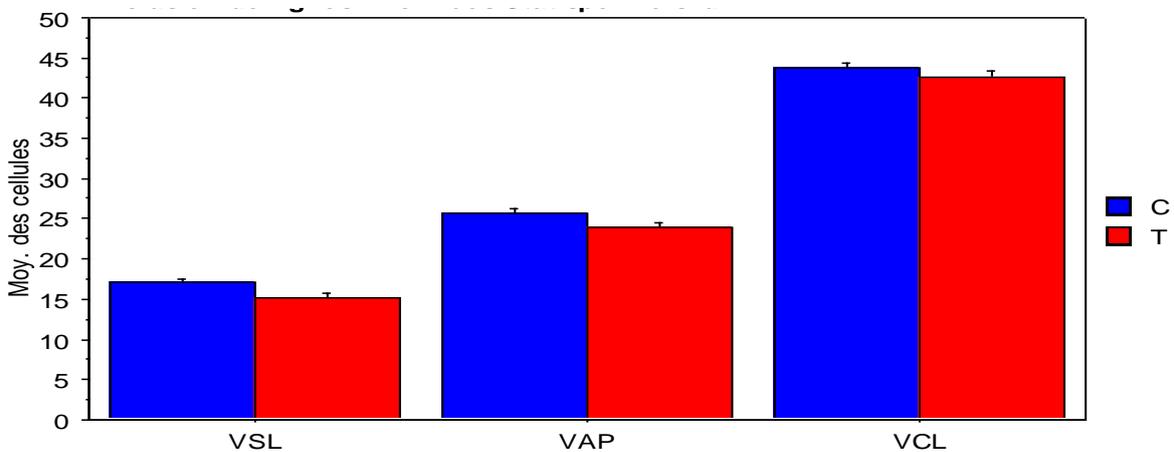


Fig IV.11. Diagramme en bâtons représentant les moyennes des vitesses VSL, VAP et VCL en fonction des contrôles et traitements.

• **Observations**

On note un maximum pour les trois types de vitesse (VCL, VSL et VAP) lors de l'utilisation de la CPT 11 et des complexes PM β CD-CPT, poly β CD-CPT, et de la dispersion solide PEG 6000-CPT.

La figure IV.11, montre que la VCL est plus importante que les autres vitesses. Globalement, les vitesses des spermatozoïdes sont moins importantes lorsque le sperme est traité avec les complexes et dispersions, vérifiant ainsi la tendance déjà obtenue lors de l'étude effectuée sur globule rouge (GR).

• **Interprétation des résultats**

Les résultats des figures IV.8, IV.9, IV.10 pris individuellement, ne permettent pas d'émettre des hypothèses fiables.

Par contre la figure IV.11, nous permet de dire avec certitude que les complexes ont un effet nocif sur le spermatozoïde qui induit ; une diminution des trois types de vitesses, rejoignant ainsi, les constatations obtenues lors de l'étude sur GR.

Ainsi, nous pouvons dire que la formation des complexes d'inclusion par cyclodextrines a permis de protéger et de solubiliser la CPT, démontrant ainsi, un effet cytotoxique via la cellule et le spermatozoïde.

IV5.2.2. Pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques

Pour consolider les constatations et explications trouvées ci-dessus, nous avons choisi de calculer le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapide et statiques dans les différents échantillons testés, les résultats obtenus sont tracés sous forme d'histogrammes présentés dans les figures IV.12 et IV.13.

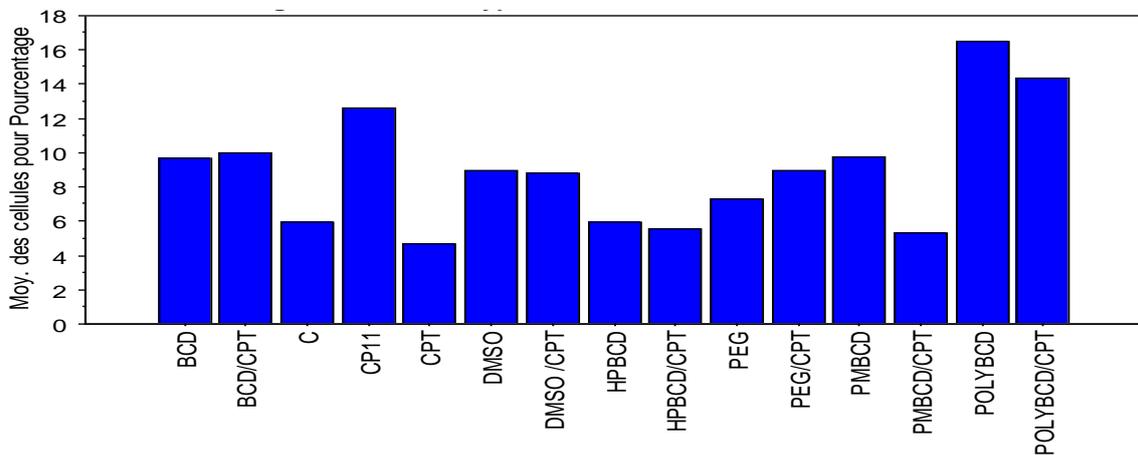


Fig IV.12. Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction des échantillons testés.

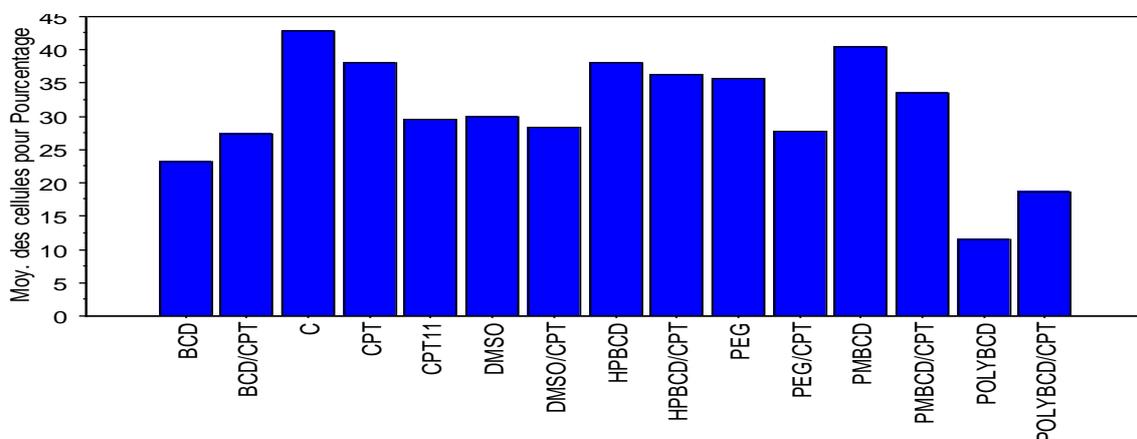


Fig IV.13. Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes statiques en fonction des échantillons testés.

- **Observations**

En comparant les résultats de deux figures IV.12 et IV.13., on observe qu'à l'exception du POLY- β -CD (contrôle et complexe), les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides sont majoritairement faibles par rapport aux statiques.

On peut aussi voir que globalement, les complexes d'inclusion induisent un nombre de spermatozoïdes statiques plus important que leurs contrôles respectifs.

- **Interprétations**

Les résultats obtenus, corroborent les interprétations précédentes, à savoir : Les traitements à base de complexes induisent plus de spermatozoïdes statiques que leurs contrôles respectifs, indiquant ainsi, un effet toxique sur le spermatozoïde.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre étude a été atteint, ceci en ayant amélioré la solubilité de la CPT, qui à son état naturel présente une instabilité et une faible solubilité connue.

Pour cela, nous avons donc préparé des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines naturelles, modifiées et un polymère de ces dernières (poly β CD), nous avons aussi choisi de comparer l'effet de ce polymère avec un polymère très hydrophile : le PEG 6000.

La détermination du ratio molaire de complexation par le test de solubilité (test d'Higuchi) fut la première étape de notre travail, nous avons noté une augmentation linéaire de la concentration du principe actif en fonction des deux polymères utilisés, Même si l'équation d'Higuchi n'est pas totalement exploitable dans ces deux cas, elle nous a permis d'avoir une idée sur la force de liaison entre le PA et les polymères ; la constante de stabilité K_c obtenue avec le polymère de β cyclodextrine étant plus élevée que celle du PEG 6000 ($K_c = 23,9851 \text{ M}^{-1}$ et $K_c = 4.7959 \text{ M}^{-1}$) indique qu'il y'aurait des interactions plus favorables entre le polymère de β CD et la CPT qu'avec le PEG 6000.

L'étape suivante consiste en une caractérisation par infra-rouge et diffraction par rayon X, ce qui nous a permis de confirmer la formation de complexes d'inclusion et l'obtention d'une bonne dispersion de la CPT dans le PEG 6000.

Ensuite l'étude cinétique a montré que nous avons amélioré le pourcentage de dissolution de la CPT (14%) pour atteindre 39%, 41% et 58% pour le poly β CD-CPT, PEG 6000-CPT et la PM β CD-CPT, la modélisation mathématique de ces résultats nous a permis de prouver que la libération du PA suit un mécanisme de diffusion Fickien.

Afin de valoriser les résultats obtenus, nous avons utilisé des modèles cellulaires, à savoir, globules rouges et spermatozoïdes, qui ont permis de prouver de façon générale que les complexes et la dispersion solide préparés ont bien un effet cytotoxique, et ce probablement grâce à l'augmentation de la solubilité de la camptothécine d'une part et à la stabilisation de son cycle lactone d'autre part.

Il serait intéressant de compléter cette étude par des caractérisations plus poussées (MEB, ATG, DSC, RMN...) et d'aller vers une combinaison des deux polymères utilisés en créant un système ternaire (CPT- PEG 6000-POLY β CD).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Pierre Tambourin, « Biotechnologie et médicaments du futur », 2008.
- [2] G. M. Cragg, P. G. Grothaus, et D. J. Newman, “Impact of natural products on developing new anti-cancer agents,” *Chemical Reviews*, vol. 109, no. 7, pp. 3012–3043, 2009.
- [3] M.NEVES MUNIZ, thèse de doctorat « Synthèse d’alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. » université Joseph Fourier Grenoble I, juillet 2006.
- [4] H.DODZIUK, « Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, application », Wiley VCH Verlag GMBH and CO. KGaA, 1-16, 2006.
- [5] A.LANSIAUX ; Christian Bailly, « Symphonie pour camptothécines » bulletin du cancer ; 90 (3), 239-45, 2003.
- [6] F.GRILLET, thèse de doctorat «synthèse formelle de la (±)-camptothécine et préparation d’analogues de la 22-hydroxyacuminatine », université de Grenoble, 2010.
- [7] M-E.PROULX, thèse de fin d’étude « efficacité de la camptothécine libre et liposomale dans un modèle murin de leishmaniose viscérale », université Laval Québec, mai 2001
- [8] M.CUENDET, J-M.PEZZUTO, « Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology », Eds Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [9] M.TORCK, M.PINKAS, « Camptothécine et dérivés : Une nouvelle classe d’agents antitumoraux », *journal de pharmacie de Belgique* 0047-2166,1995.
- [10] J.KANG, V.KUMAR and D.YANG, «Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability and cytotoxicity of camptothécine, an antineoplastic agent», *European Journal Of Pharmaceutical Science* (15) 163-170, 2002.
- [11] *Genes VI* by B.LEWIN, oxford university press and cell press 1997
- [12] *Médicaments, pharmacie-biologie : concours en internat ; formation continue, tome 4, 3^{ème} édition, collection le moniteur* 2007.
- [13] dossier du C N H I M, *Revue de l’évaluation sur le médicament, médicaments utilisé en cancérologie*, 4^{ème} édition, publication bimestrielle, 2011, XXII, 1-2.

Références bibliographiques

- [14] R.WARGNIER, thèse de doctorat « dosage de l'ADN topoisomerase I dans les lignées cellulaires issues de tumeurs solides et approche nanotechnologique du dosage simultané de la protéine et de son gène », université de Reims Champagne Ardenne, décembre 2004.
- [15] T.Kobayashi, S.Tada, T.suyama, H.Murofushi, M.Seki, and T.Enomoto, «Effect of Topoisomerase inhibitors on the Formation of replication Protein A-Foci in Nuclei Reconstituted in Xenopus Egg Extract», *Journal of Health Science*, 48 (3) 296–301, 2002.
- [16] C.boiti, C;castellini, Mi theau-clément, U.besenfelder, L.liguori et T.renieri, « Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen», *World rabbit science*, 13:71-91, 2005.
- [17] M-L.Caillet, « Etude structurale et biochimique de la fibre de l'adénovirus de type 2 », Université Lille1, Janvier 1987.
- [18] A.Yachie-Kinoshita, T.Nishino, H.Shimo, M.Suematsu, and M.Tomita, «A Metabolic Model of Human Erythrocytes: Practical Application of the E-Cell Simulation Environment » *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 642420, pages 14, 2010.
- [19] D.CASTAGNE, thèse de fin d'étude « étude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomes ou biologiques » université de Liège ,2005.
- [20] Y.BAKKOUR, thèse de fin d'études « Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrine natives et polymérisées », Université des Sciences et Technologies de Lille 1,2005.
- [21] S.MOUTARD, thèse de doctorat « relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles », université de Picardie jules verne.
- [22] P.BONNET, thèse de doctorat « étude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion », université d'Orléans, 2001.
- [23] T.Loftsson, D.Duchene, «Historical Perspectives Cyclodextrins and their pharmaceutical applications», *International Journal of Pharmaceutics* 329(2007)1–11, 2006.
- [24] M.Tharin, thèse de fin d'étude «Synthèse de polyéthers linéaires et cycliques substitués par des cyclodextrines. Applications en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire», Université de Neuchâtel, 2002.

Références bibliographiques

- [25] S.WEISSE, thèse de doctorat « Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A: stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée » université paris xi, faculté de pharmacie de châtenay-malabry.2002
- [26] S.BENHADI, thèse de fin d'étude « Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux celluloses », Université Henri Poincaré Nancy 1, 2010.
- [27] J.GROSS, thèse de doctorat « caractérisation de surfaces bio fonctionnalisées pour l'étude de protéines de la chaîne respiratoire par spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie », université de Strasbourg.
- [28] C.BISSON-BOUTELLIEZ, thèse de doctorat « Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires », l'Université Henri Poincaré Nancy-1.
- [29] F.ACHCHAQ, K.DJELLAB, L.MARMORET, H.BEJI, Analyse thermogravimétrique appliquée aux matériaux isolants fibreux. Congrès SFT, 3–6 juin, Toulouse, 2008.
- [30] Y.Chreim, K.Kharaki, S.Reynaud, L.Billon et J.François, « peracylation de cyclodextrines (β -cd et α -cd) par différents halogénures d'alkanoyle », Lebanese Science Journal, VOL 7, NO 2,2006.
- [31] M-E.Brewster and T.Loftsson, «Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers», Advanced Drug Delivery Reviews 59, 2007.
- [32] A.RASHEED, A.KUMAR, V.SRANVANTHI, «Cyclodextrins as drug carrier molecules: a review», Scientia Pharmaceutica Reviews, 2008.
- [33] H. KHALIL, «Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols: Solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines», Ecole doctorale: Chimie de Lyon, 2004.
- [34] G.M.Cragg, P.G.Grothaus, et D.J.Newman, «Impact of natural products on developing new anti-cancer agents », Chemical Reviews, vol. 109, no. 7, pp. 3012–3043, 2009.
- [35] J. Szejtli, Chemistry Review, 1988

Références bibliographiques

- [36] G.FLEURY, « Des polyrtaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique : les gels à points de réticulation glissants », thèse de doctorat en chimie et science des matériaux, université de Strasbourg I, 2005.
- [37] RamnikSnigh ; NitinBahrti ; JyotsanaMadan ; S.N. Hiermath, «Characterization of CD inclusion complexes- A review», Journal Of Pharmaceutical Science and Technology vol. 2 (3), 2010
- [38] H.YANG, thèse de doctorat « beta-cyclodextrin complexation and formulation as an anti-hiv microbicide.», université de Pittsburg, 2008.
- [39] X.SEVILLANO, A.ROMO, J.R.ISASI, G.GONZALEZ-GAITANO & J.PEÑAS, D. ALMORZA, «Start-up of a fluidized-bed bioreactor with a β -cyclodextrin polymer support for treating wastewater» ,Waste management and the environment, WITpress,2002.
- [40] Y-A.RAKAWA, S-K.AWAKAMI , F-Y.AMASHITA , and M-H.ASHIDA, «Effect of Low-Molecular-Weight β -Cyclodextrin Polymer on Release of Drugs from Mucoadhesive Buccal Film Dosage Forms»,Biol. Pharm. Bull, 28 (9) 1679-1683, September 2005.
- [41] S.JOUDIEH, P.BON, B.MARTEL, M.SKIBA, AND M.LAHIANI-SKIBA, «Cyclodextrin Polymers as Efficient Solubilizers of Albendazole: Complexation and Physico-Chemical Characterization», Journal of Nanoscience and Nanotechnology Vol.8, 1–9, 2008.
- [42] A-M.LAYRE, G.VOLET, V.WINTGENS AND C.AMIE, «Associative Network Based on Cyclodextrin Polymer: A Model System for Drug Delivery», *Biomacromolecules*, 10 (12) 3283–3289, 2009.
- [43] Y-P.CHIN, M.SHARIFAH AND M-R.BIN ABAS, «Removal of Parabens from Aqueous Solution Using β -Cyclodextrin Cross-Linked Polymer», International Journal of Molecular Sciences, 11, 3459-3471, 2010.
- [44] S.GAUR, L.CHEN, T.YEN, Y.WANG, B.ZHOU, M.DAVIS, Y.YEN,«Preclinical study of the cyclodextrin-polymer conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of gastric cancer»,Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 8,72- 730,2012.
- [45] M.SAQUIB HASNAIN, A. KUMAR NAYAK, «solubility and dissolution enhancement of ibuprofen by solid dispersion technique using peg 6000-pvp k 30 combination carrier», Bulgarian Journal of Science Education, Volume 21, Numéro 1, 2012.

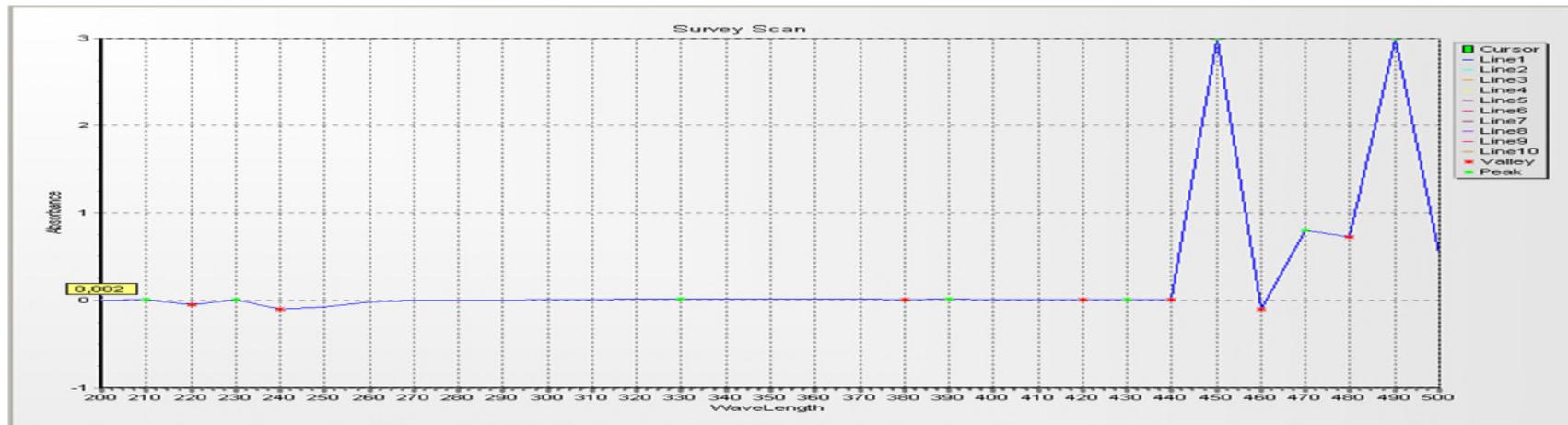
Références bibliographiques

[46] T.SUZUKI, H.SHIBAHARA, H.TSUNODA, Y.HIRANO, A.TANEICHI, H.OBARA, S.TAKAMIZAWA, I.SATO, «Comparison of the Sperm Quality Analyzer IIC variables with the computer-aided sperm analysis estimates, International Journal of Andrology», Volume 25, Issue 1, pages 49–54, février 2002.

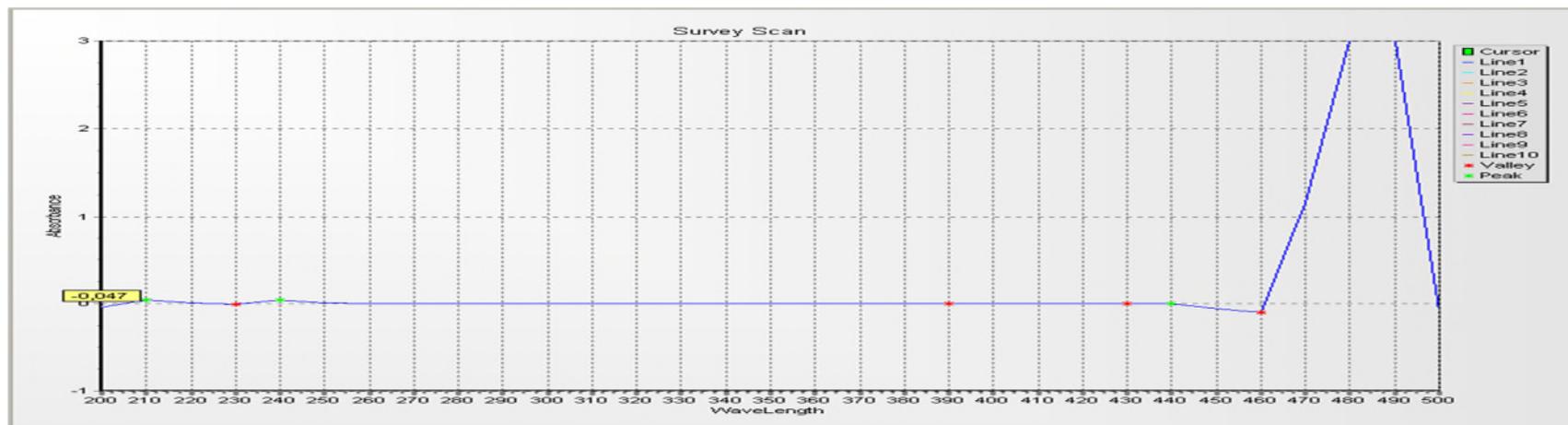
[47] S.SWAMINATHAN, L.PASTERO, L.SERPE, F.TROTTA, P.VAVIA, D.AQUILANO, M.TROTTA, G.P.ZARA AND R. AVALL, «Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity», European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 74, 2010.

[48] J.SHAIKH, D.D.ANKOLA, V.BENIWAL, D.SINGH, M.N.V.RAVIKUMAR, «Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer», European Journal of Pharmaceutical Sciences 37 (223–230), 2009.

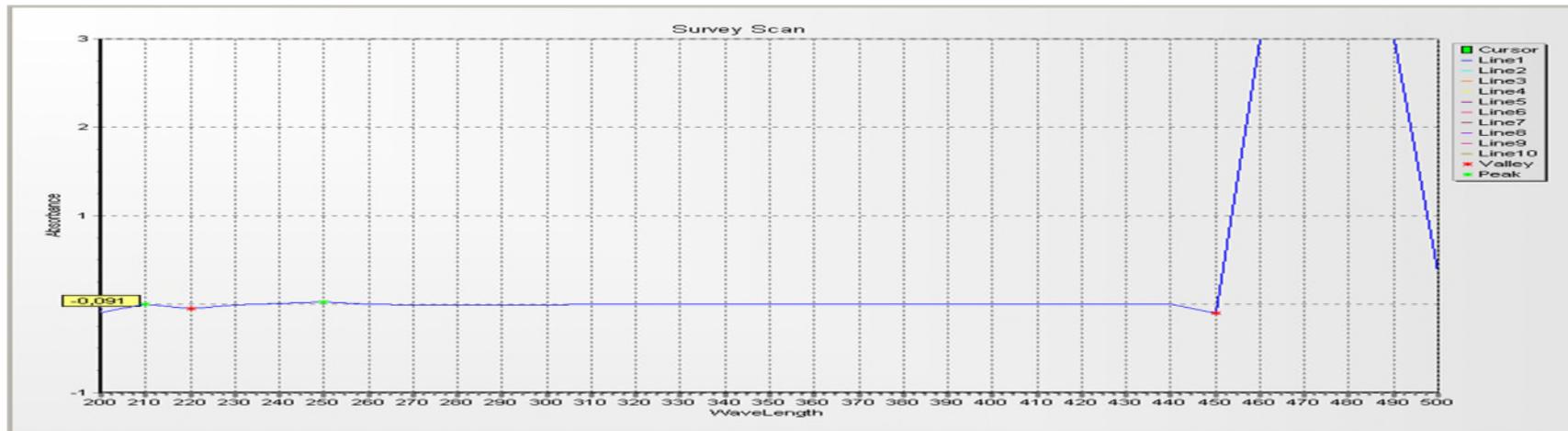
ANNEXES



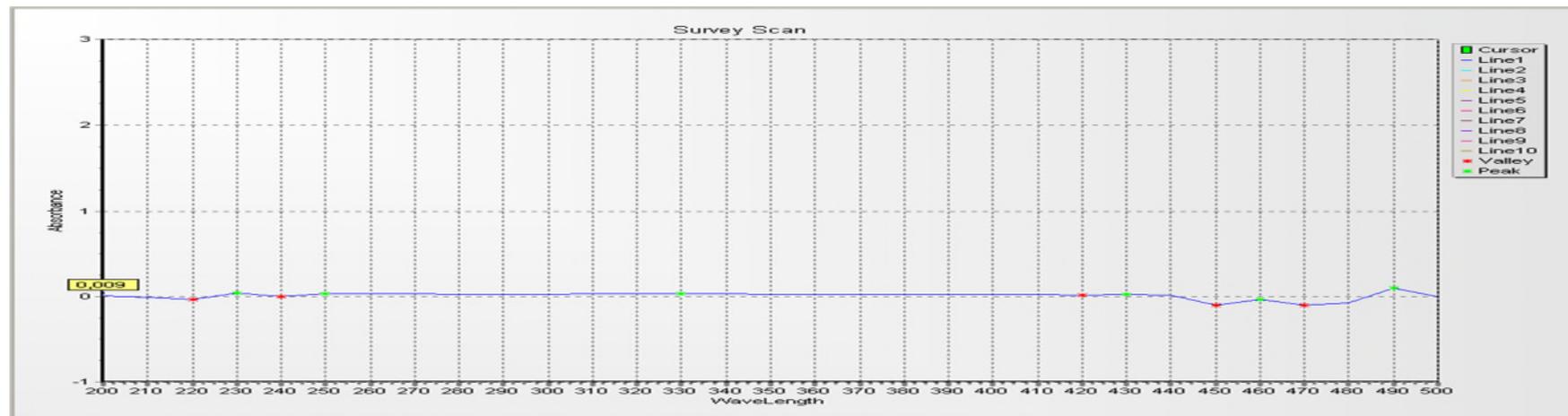
1-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la β CD de 200 à 500 nm



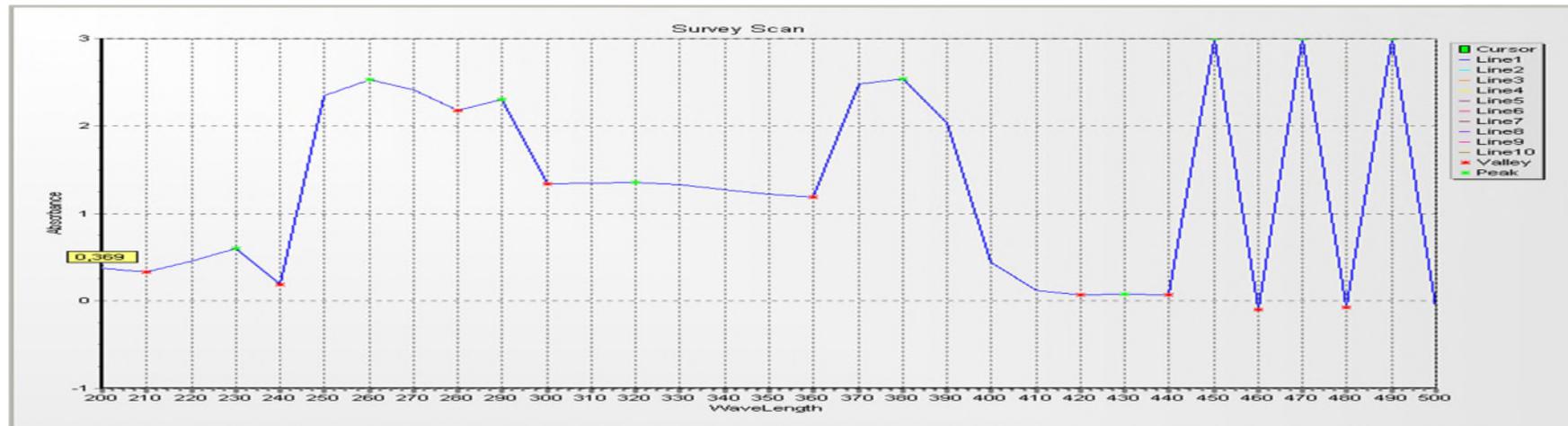
2-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de l' HP β CD de 200 à 500 nm



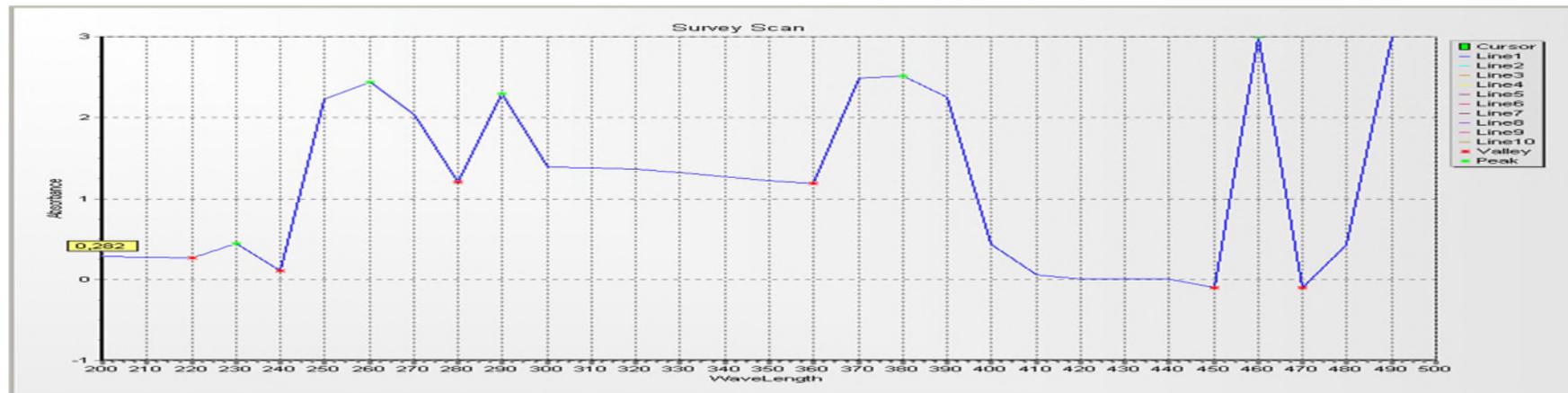
3-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la M β CD de 200 à 500 nm



4-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la POLY β CD (de 200 à 500 nm)



5-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la CPT (de 200 à 500 nm)



6-Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la CPT 11 de 200 à 500 nm

1-Droite d'étalonnage de la CPT

Les résultats de la quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions étalons pour l'élaboration de la droite d'étalonnage de la CPT sont représentés dans le tableau qui suit :

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07
Concentration (mg/ml)	0,011	0,008	0,0055	0,004	0,0022	0,0011	0,011
Absorbance (nm)	0,4	0,306	0,202	0,153	0,077	0,039	0,4

2-Test de solubilité

Les résultats de la quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions du test de solubilité avec la Poly β -CD sont représentés dans le tableau qui suit :

Echantillon N°	01	02	03	04	05	CPT seule
Absorbance (nm)	0.216	0.269	0.370	0.842	1.193	0.165

Grâce à la courbe d'étalonnage, on détermine les concentrations en CPT correspondant aux absorbances obtenues, obtenant les résultats rapportés dans le tableau qui suit :

Echantillon N°	1	2	3	4	5	CPT seule
Absorbance (UA)	0,216	0,269	0,37	0,842	1,193	0.165
Concentrations en CPT (mg/ml)	0,0029	0,0038	0,0047	0,0065	0,0148	0,0209

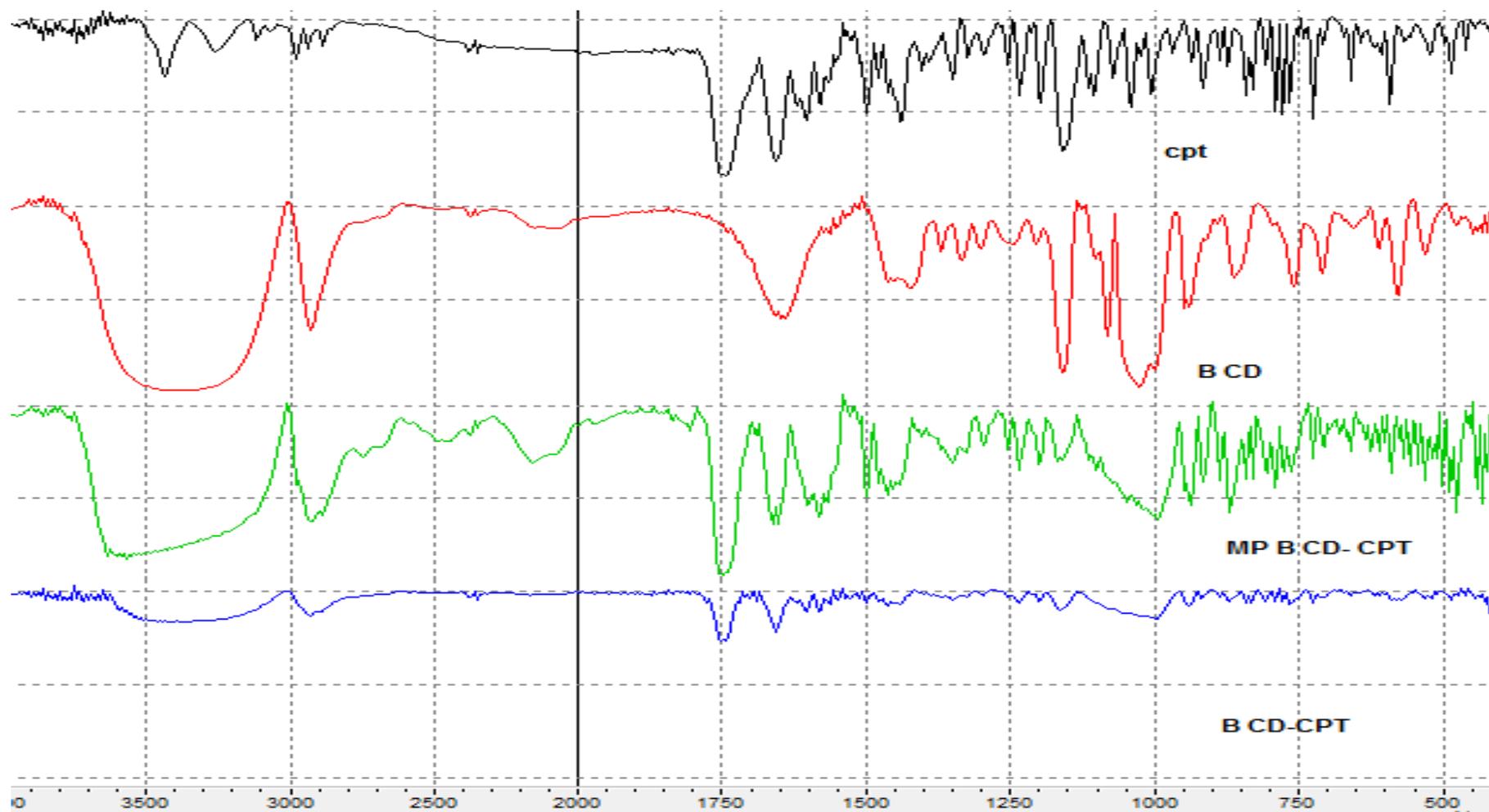
Annexe 2

Les résultats de la quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions du test de solubilité avec le PEG 6000 sont représentés dans le tableau qui suit :

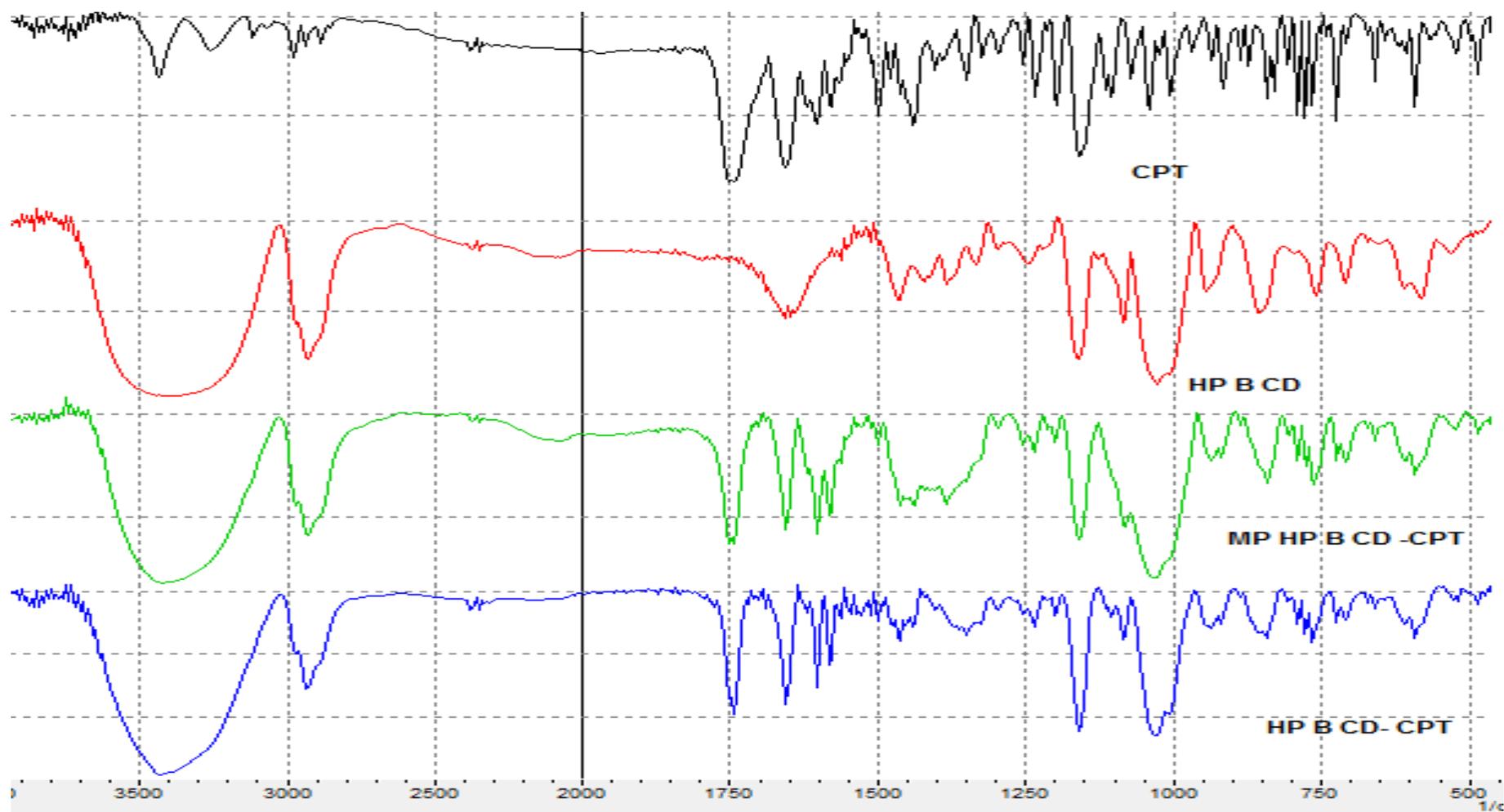
Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	CPT seule
Absorbance (nm)	0,2	0,215	0,307	0,36	0,401	0,822	0.165

Grâce à la courbe d'étalonnage, on détermine les concentrations en CPT correspondant aux absorbances obtenues, obtenant les résultats rapportés dans le tableau qui suit :

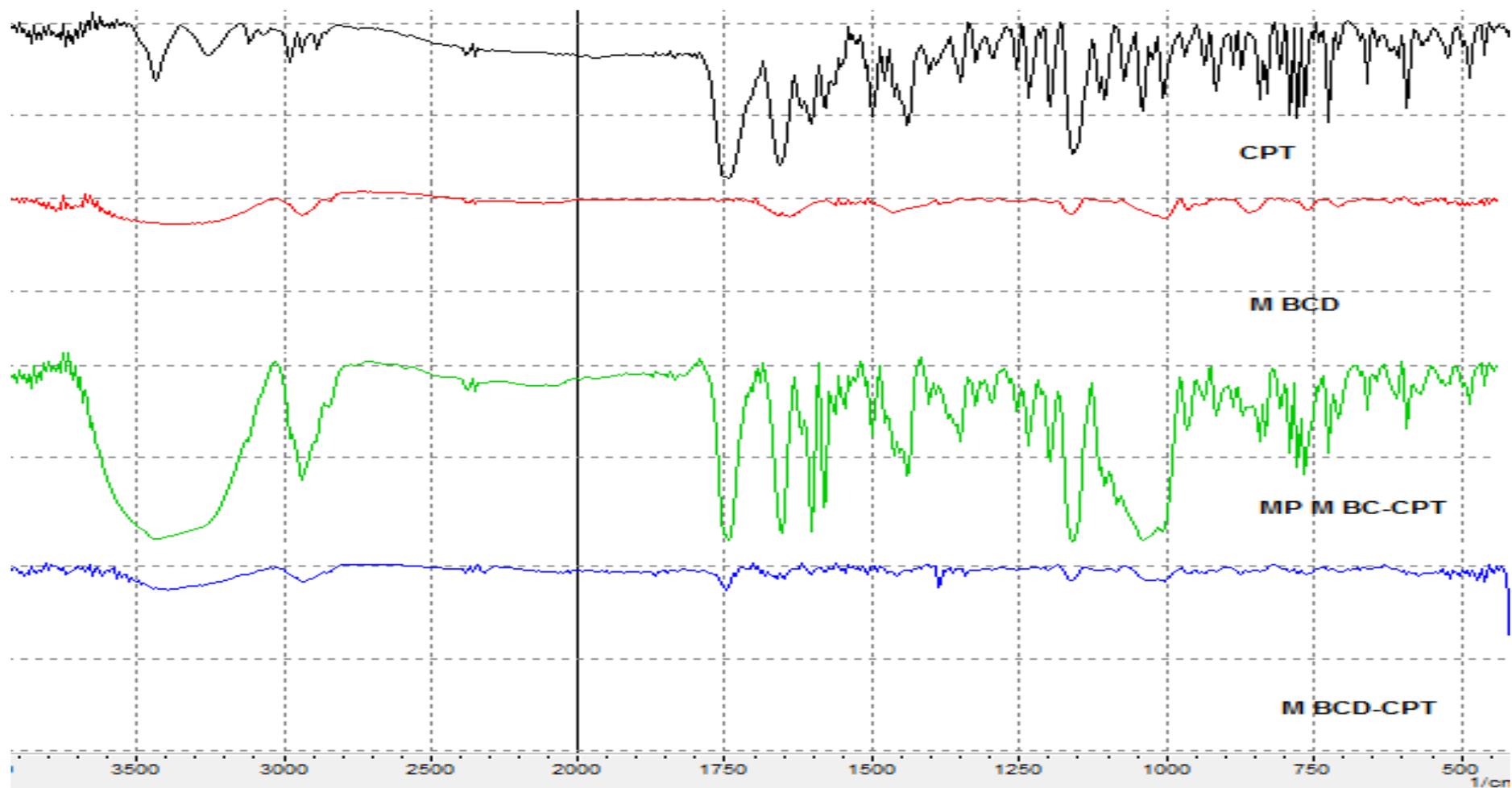
Echantillon N°	1	2	3	4	5	06	CPT seule
Absorbance (UA)	0,2	0,215	0,307	0,36	0,401	0,822	0.165
Concentrations en CPT (mg/ml)	0,0035	0,0037	0,0054	0,0063	0,0070	0,0144	0.0029



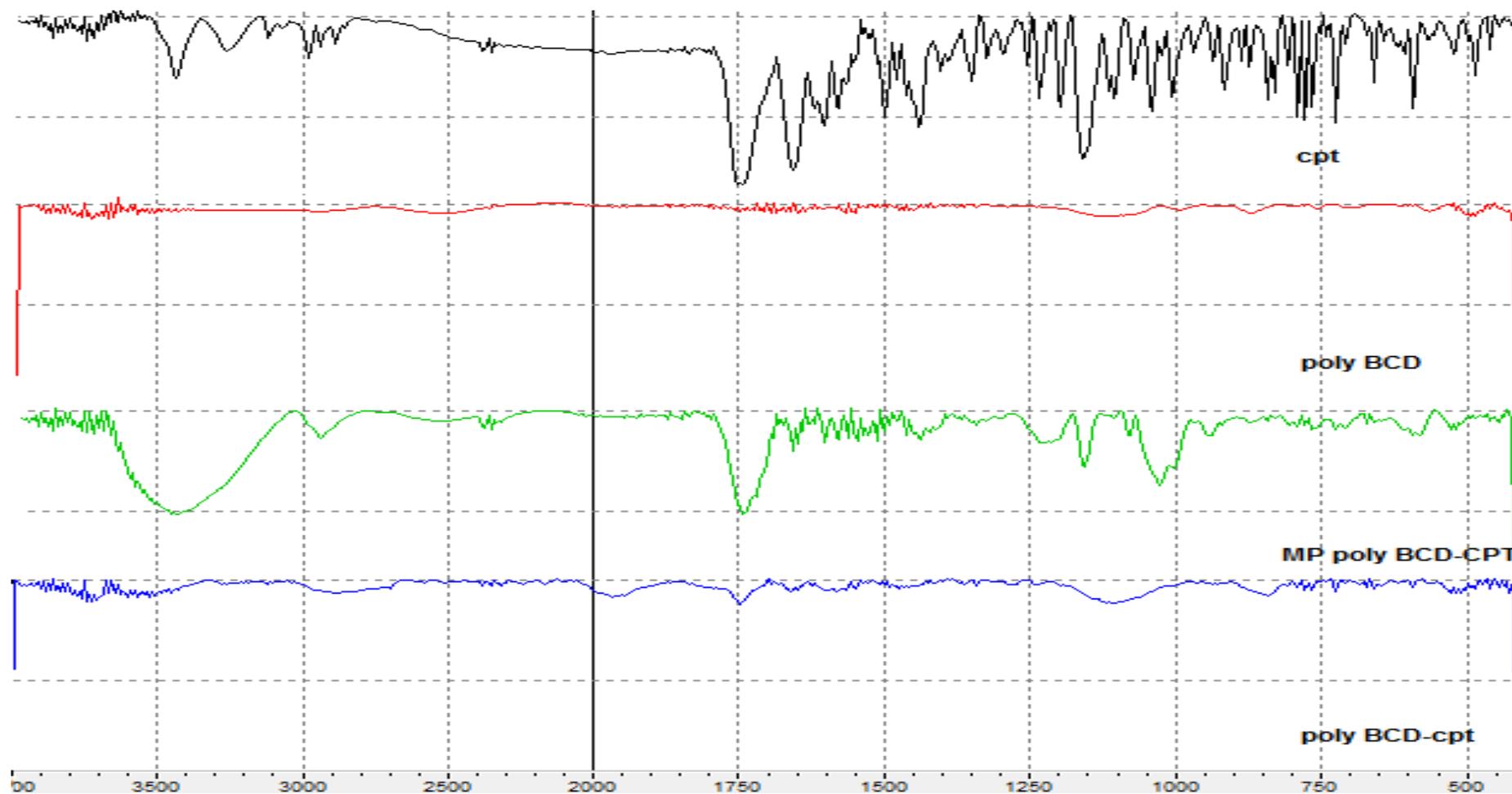
1-Spectres IR superposés de la β -CD, la CPT, du mélange physique et du complexe β CD-CPT



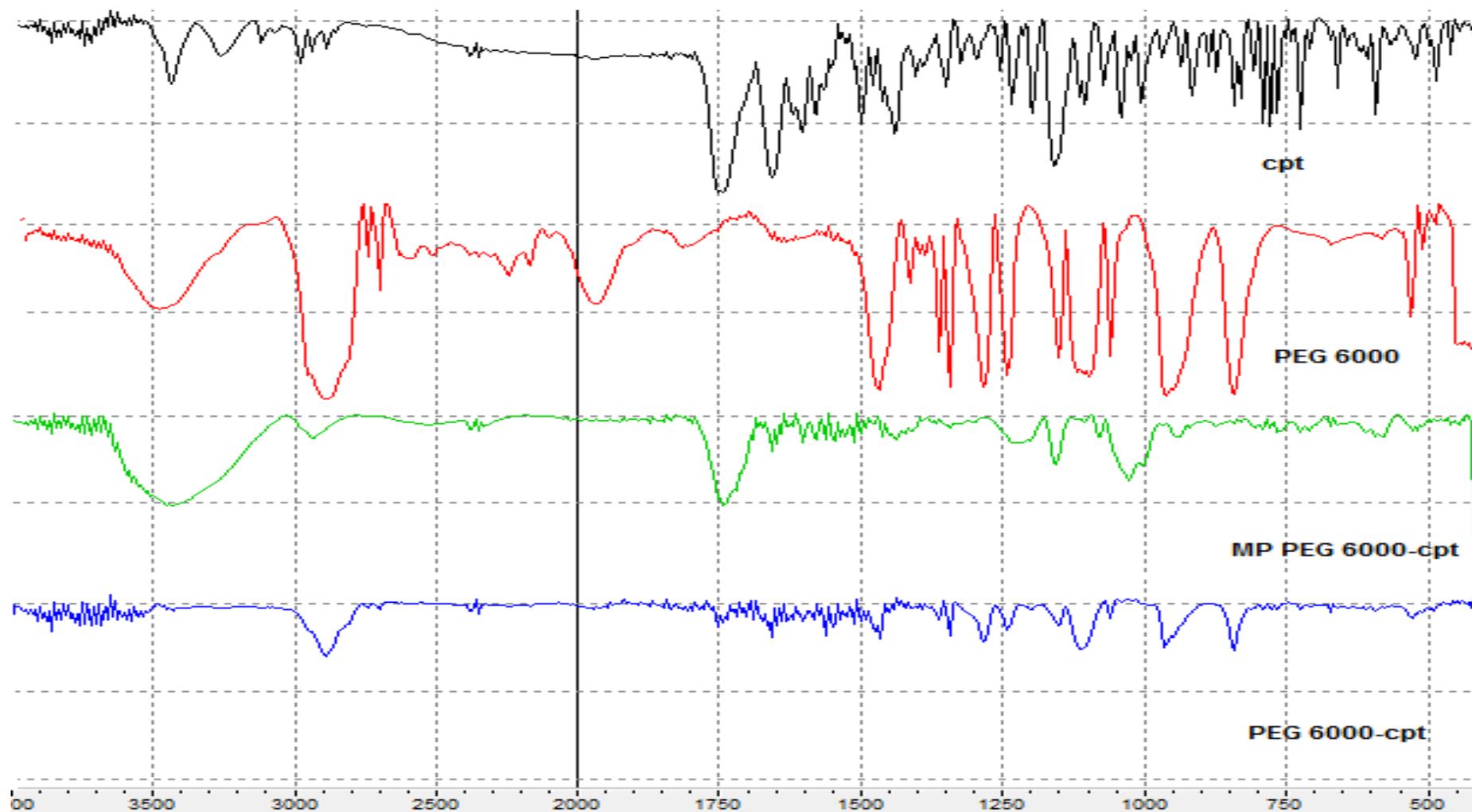
2-Spectres IR superposés de l'HP β -CD, la CPT, du mélange physique et du complexe HP β CD-CPT



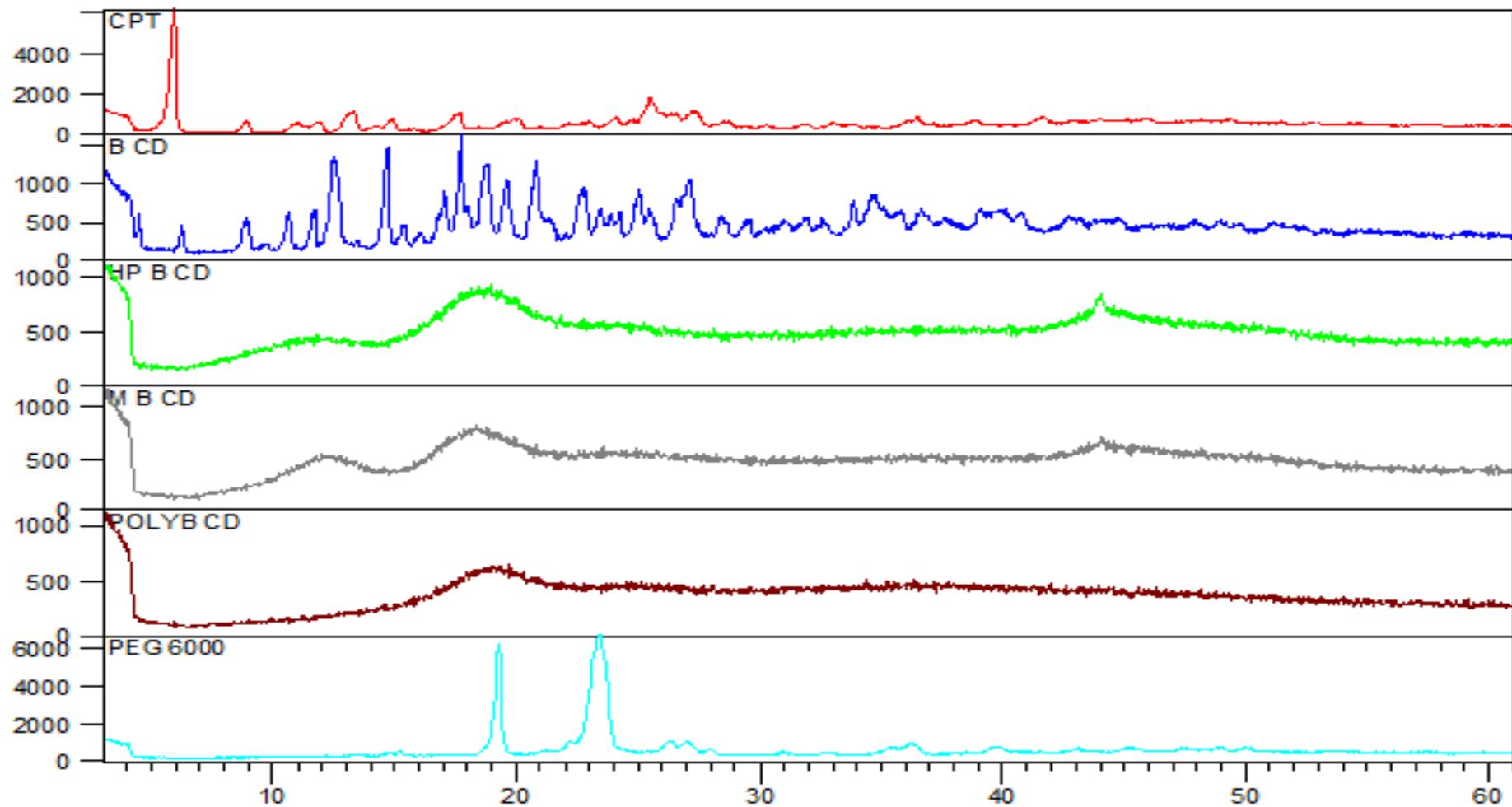
3-Spectres IR superposés de la M β -CD, la CPT, du mélange physique et du complexe M β CD-CPT



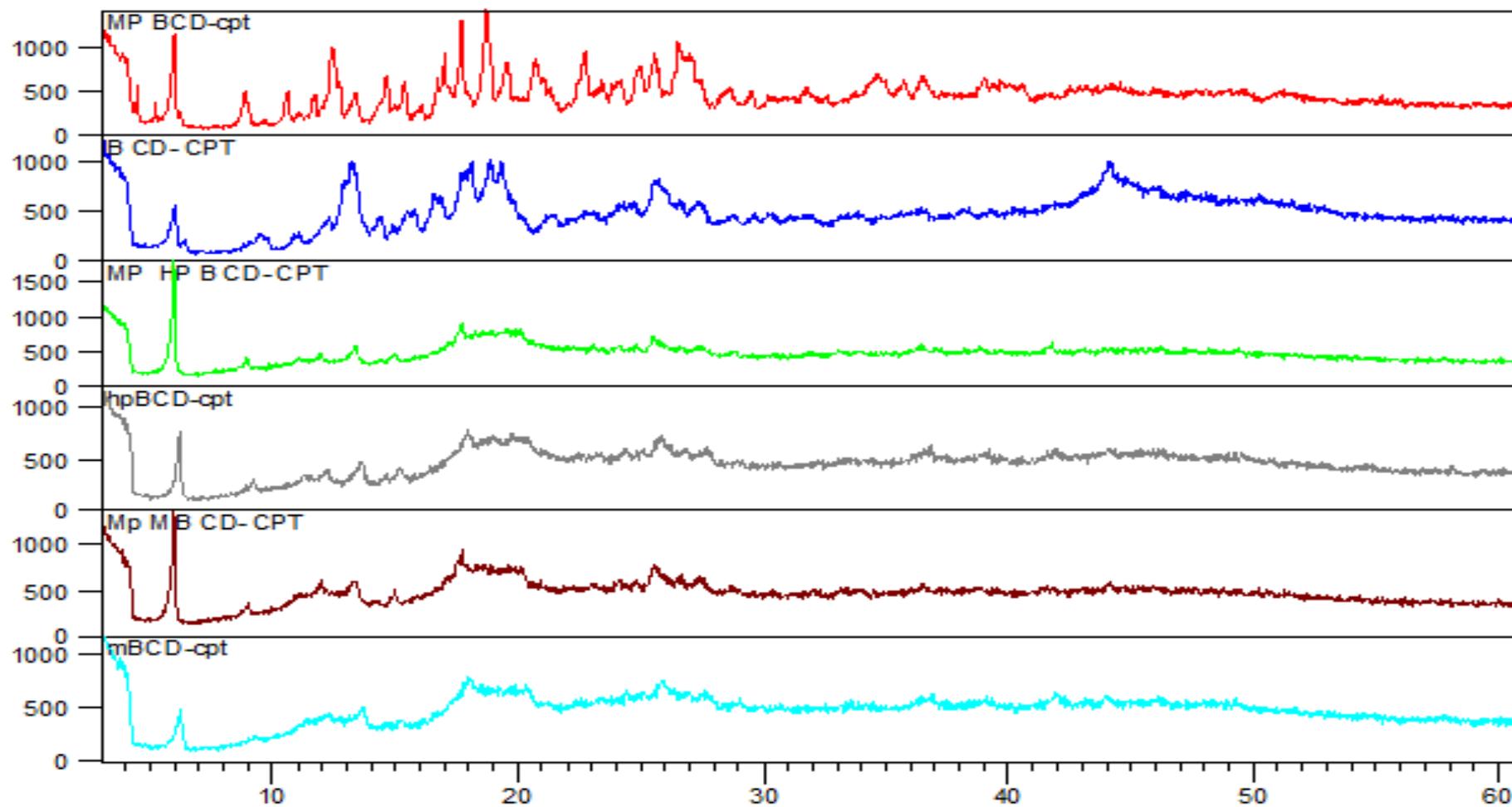
4-Spectres IR superposés du Poly β -CD, la CPT, du mélange physique et du complexe Poly β CD-CPT



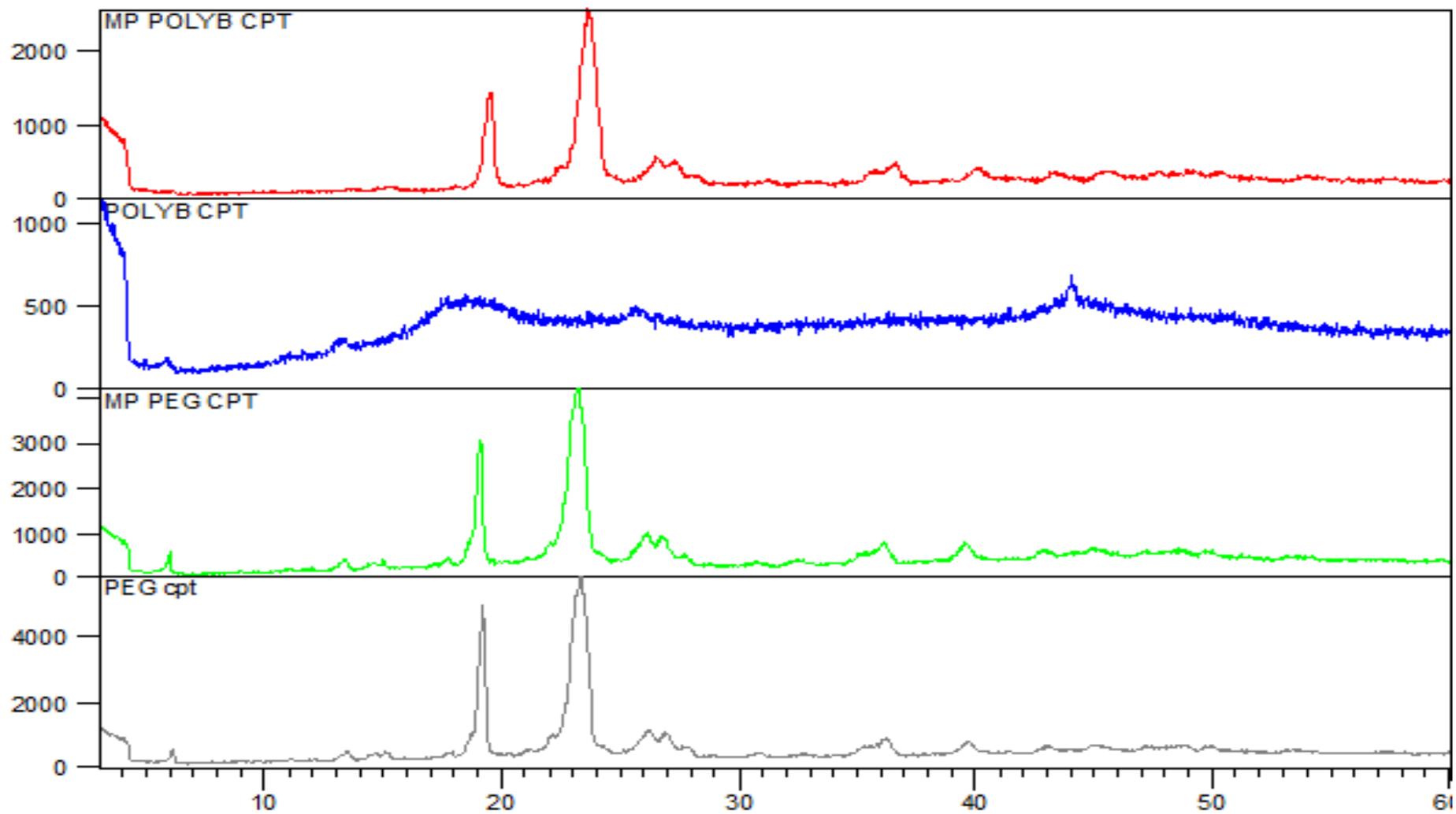
5-Spectres IR superposés du PEG, la CPT, du mélange physique et du complexe PEG-CPT



1-Diffractogramme de la CPT, de la β -CD, de l'HP la β -CD, de la M la β -CD, du Poly la β -CD et du PEG.



2-Diffractogramme des mélanges physiques et complexes de la β CD- CPT, de l' HP β CD- CPT et du M β CD- CPT



3-Diffractogramme des mélanges physiques et complexes du Poly β CD- CPT, et du PEG 6000- CPT.

Les absorbances (UA) obtenues suite au test de dissolution sont représentés dans les tableaux qui suivent :

1^{er} essai

	MPH BCD-CPT	BCD-CPT	MPH HP BCD-CPT	HP BCD-CPT	MPH M BCD-CPT	M BCD-CPT
5	0.028	0.021	0.045	0.021	0.044	0.069
10	0.043	0.026	0.067	0.030	0.054	0.096
15	0.017	0.036	0.039	0.042	0.018	0.122
20	0.067	0.048	0.097	0.045	0.064	0.138
25	0.077	0.063	0.100	0.059	0.071	0.148
35	0.164	0.061	0.185	0.066	0.149	0.690
45	0.111	0.129	0.127	0.132	0.759	0.234
60	0.153	0.149	0.162	0.139	0.120	0.260
75	0.255	0.185	0.148	0.164	0.110	0.280
90	0.764	0.200	0.146	0.176	0.106	0.289
120	0.120	0.221	0.140	0.180	0.095	0.289

2^{ème} essai

	MPH BCD-CPT	BCD-CPT	MPH HP BCD-CPT	HP BCD-CPT	MPH M BCD-CPT	M BCD-CPT
5	0.025	0.022	0.039	0.260	0.057	0.053
10	0.037	0.002	0.080	0.028	0.063	0.088
15	0.008	0.046	0.046	0.046	0.026	0.110
20	0.058	0.058	0.097	0.048	0.075	0.125
25	0.069	0.076	0.100	0.058	0.083	0.142
35	0.155	0.075	0.185	0.064	0.161	0.171
45	0.103	0.148	0.127	0.132	0.106	0.229
60	0.137	0.166	0.162	0.144	0.140	0.247
75	0.123	0.185	0.148	0.161	0.135	0.270
90	0.120	0.200	0.150	0.172	0.121	0.290
120	0.110	0.221	0.145	0.187	0.106	0.274

1^{er} essai

	MPH POLY BCD-CPT	POLY BCD-CPT	MPH PEG-CPT	PEG-CPT	CPT	CPT11
5	0.042	0.059	0.058	0.094	0.022	0.395
10	0.048	0.080	0.084	0.099	0.046	0.416
15	0.069	0.099	0.110	0.117	0.038	0.425
20	0.078	0.116	0.108	0.136	0.044	0.422
25	0.084	0.126	0.119	0.142	0.052	0.415
35	0.101	0.139	0.133	0.153	0.117	0.412
45	0.109	0.144	0.141	0.158	0.131	0.426
60	0.119	0.159	0.157	0.172	0.074	0.428
75	0.127	0.166	0.143	0.182	0.098	0.432
90	0.131	0.183	0.149	0.197	0.100	0.438
120	0.143	0.190	0.157	0.201	0.093	0.424

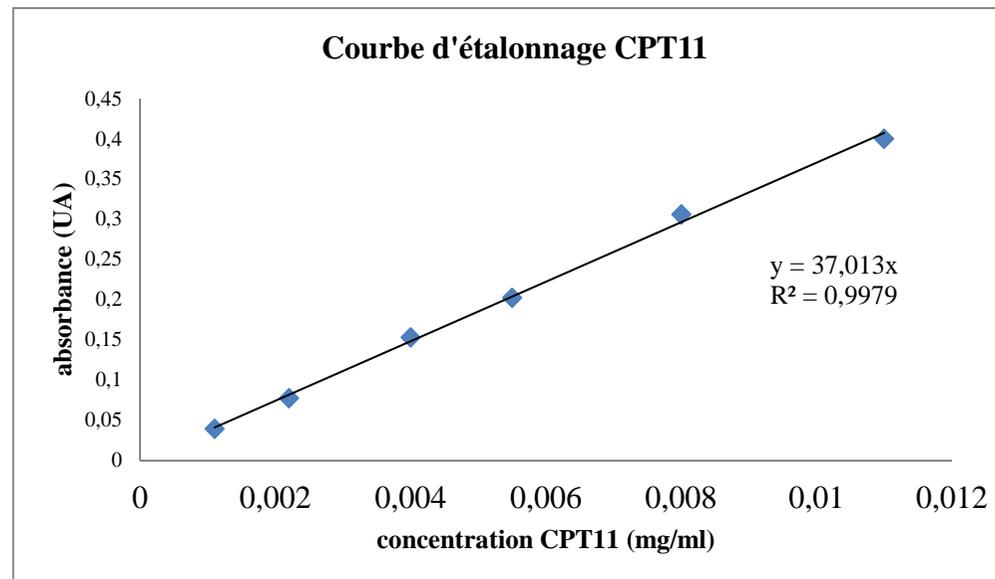
2^{ème} essai

	MPH POLY BCD-CPT	POLY BCD-CPT	MPH PEG-CPT	PEG-CPT	CPT
5	0.047	0.066	0.065	0.088	0.015
10	0.059	0.085	0.098	0.097	0.017
15	0.073	0.107	0.120	0.115	0.027
20	0.084	0.120	0.121	0.132	0.026
25	0.092	0.133	0.133	0.144	0.037
35	0.109	0.143	0.153	0.152	0.036
45	0.121	0.149	0.164	0.160	0.104
60	0.131	0.153	0.177	0.168	0.113
75	0.127	0.165	0.185	0.184	0.103
90	0.131	0.185	0.191	0.195	0.099
120	0.143	0.195	0.198	0.202	0.093

Les résultats de la quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions étalons pour l'élaboration de la droite d'étalonnage de la CPT 11 sont représentés dans le tableau qui suit :

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07
Concentration (mg/ml)	0.02	0.015	0.01	0.008	0.004	0.002	0.0011
Absorbance (nm)	1.17	0.845	0.541	0.429	0.219	0.092	0.06

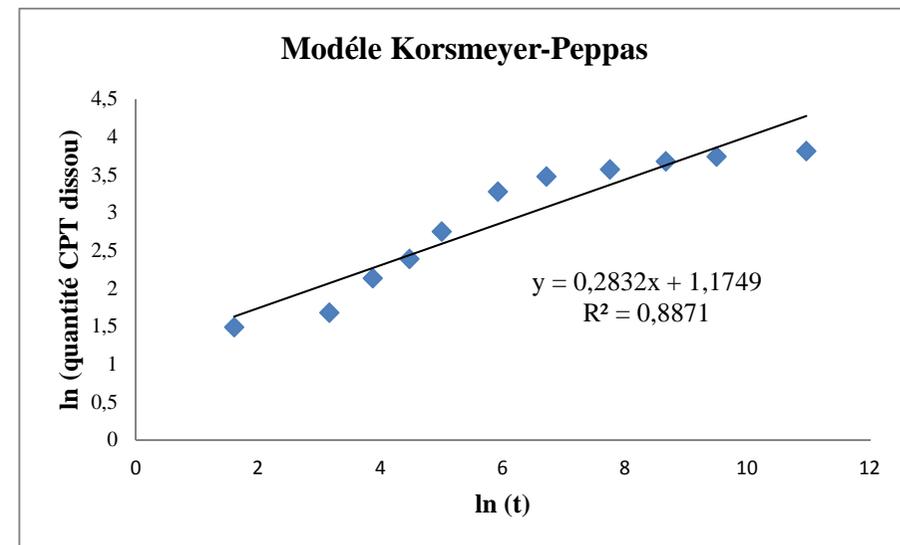
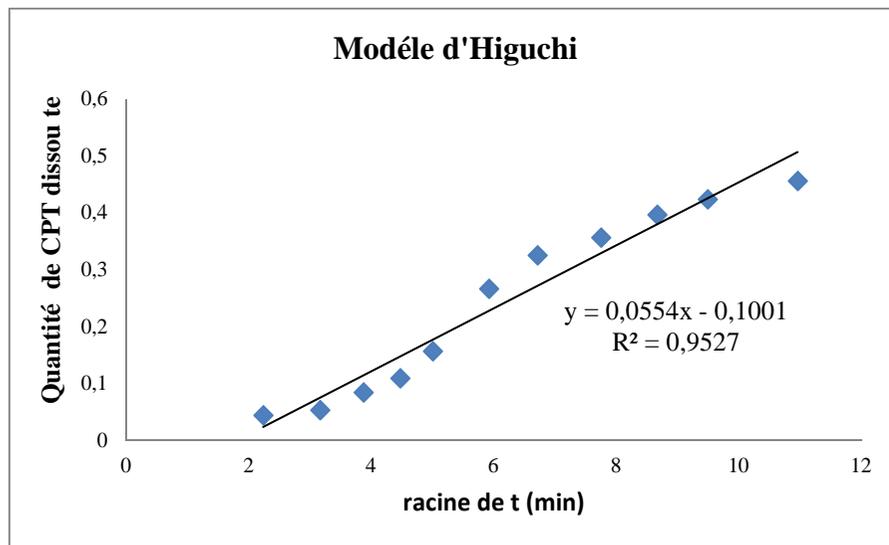
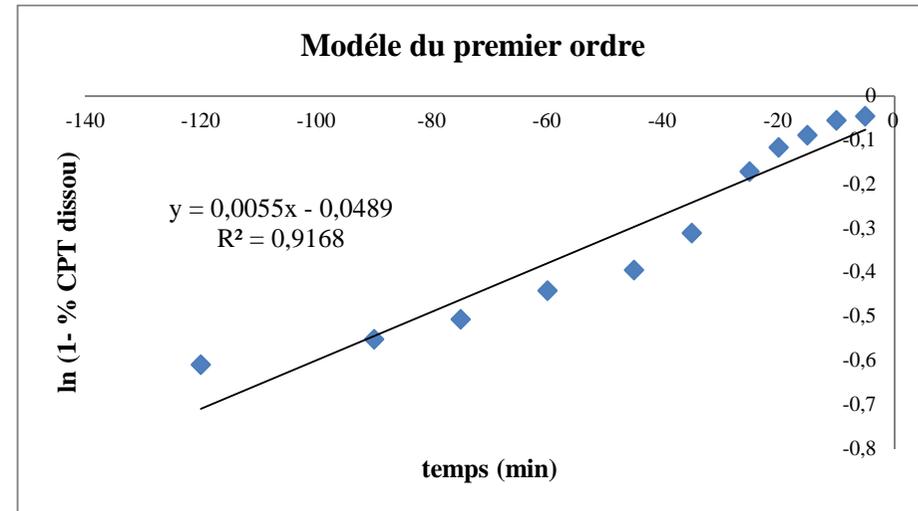
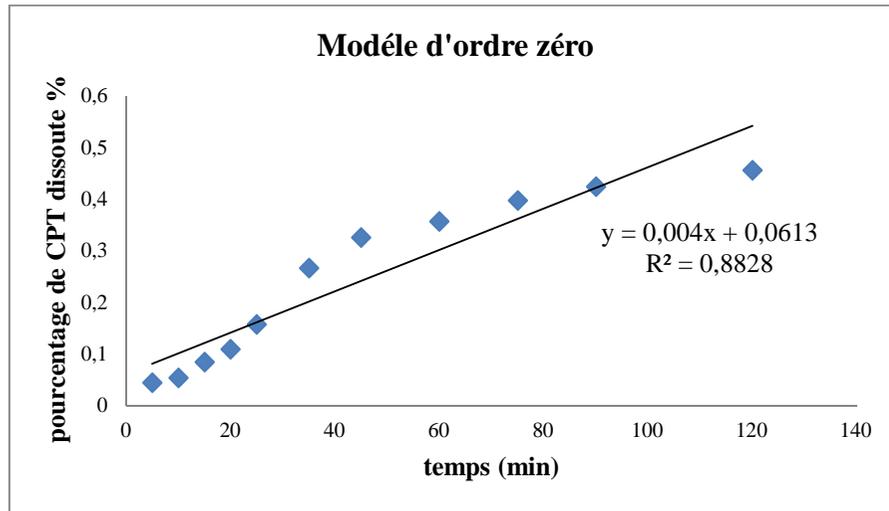
La courbe d'étalonnage de la CPT 11 est donc représentée comme suit :

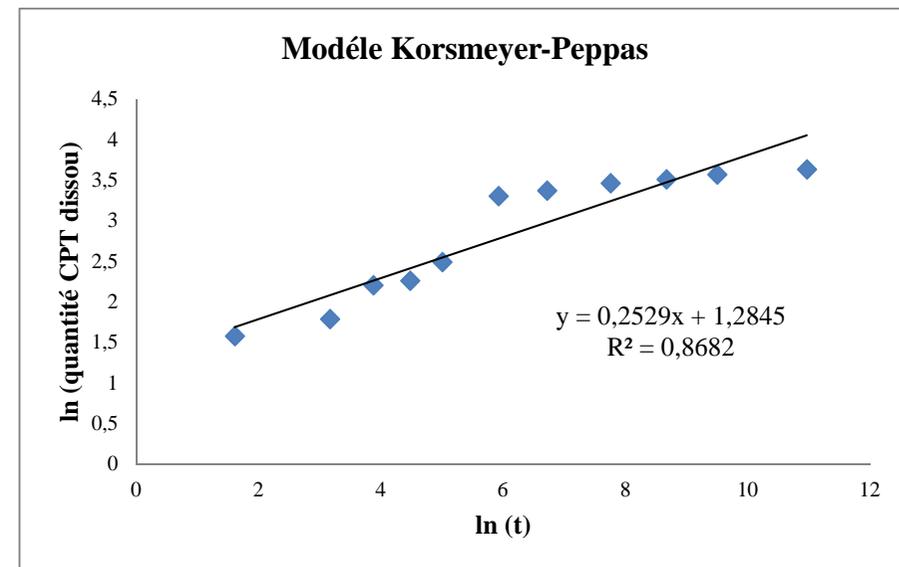
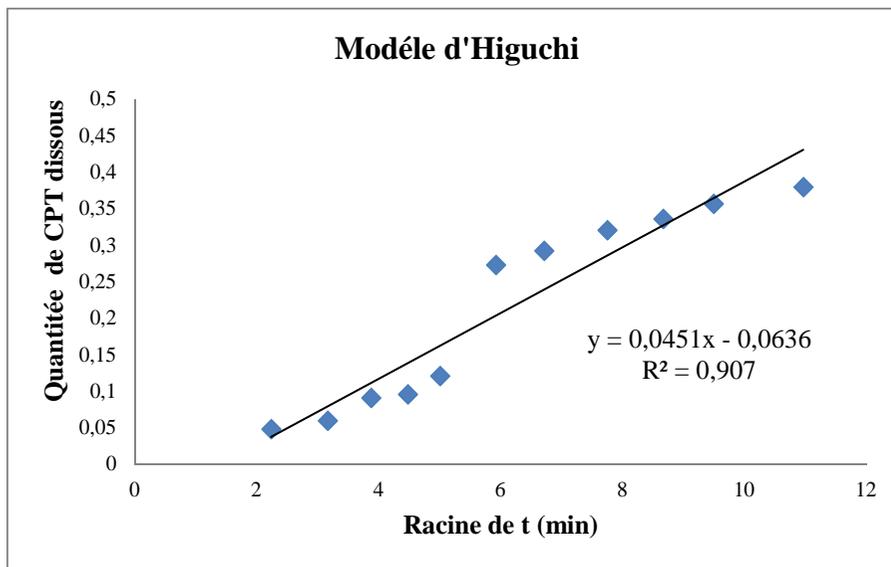
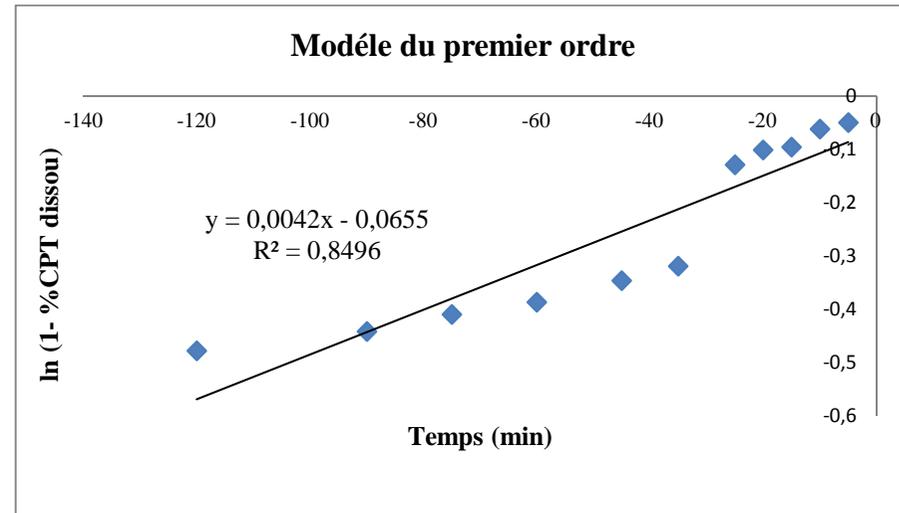
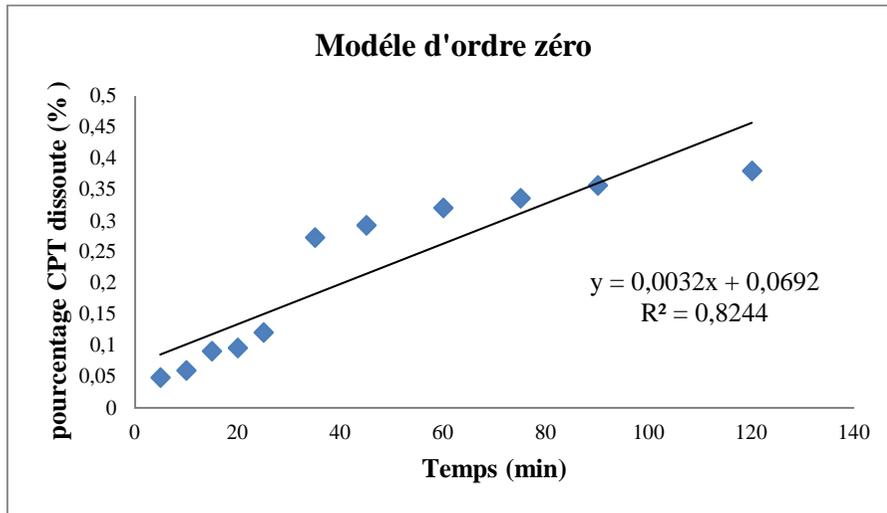


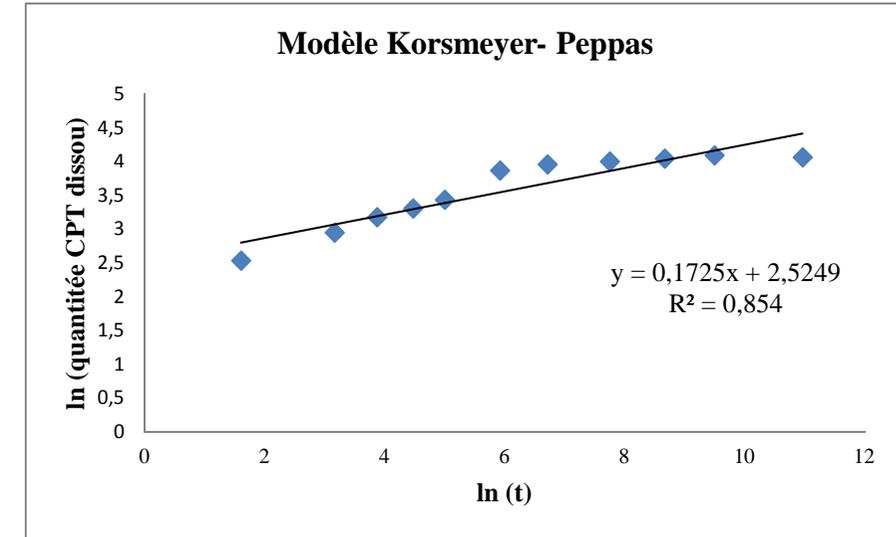
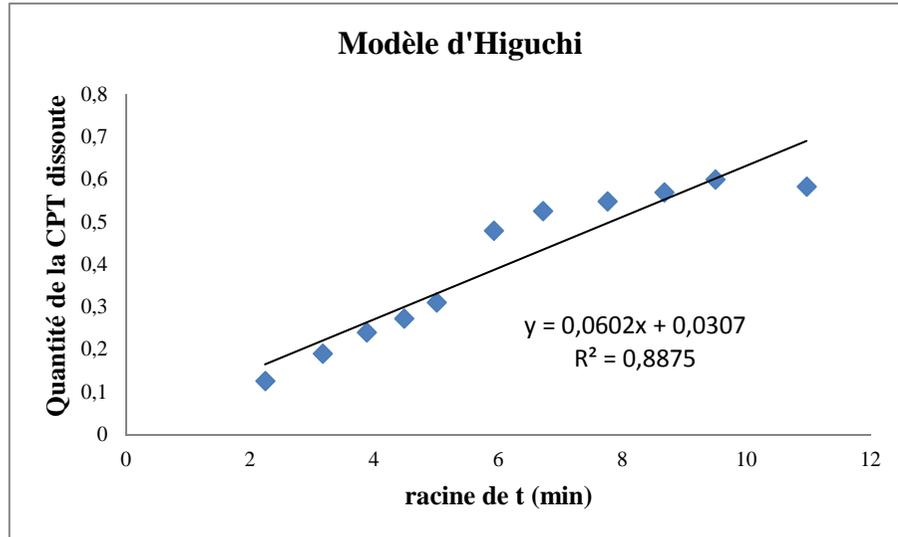
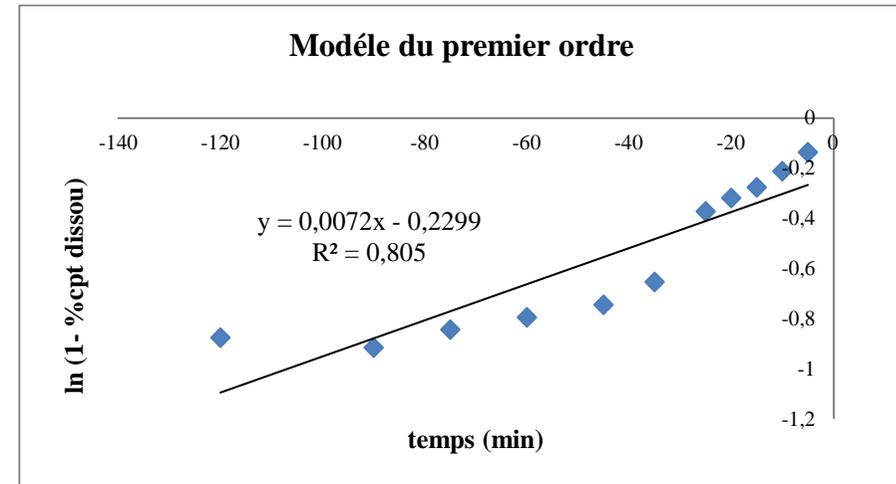
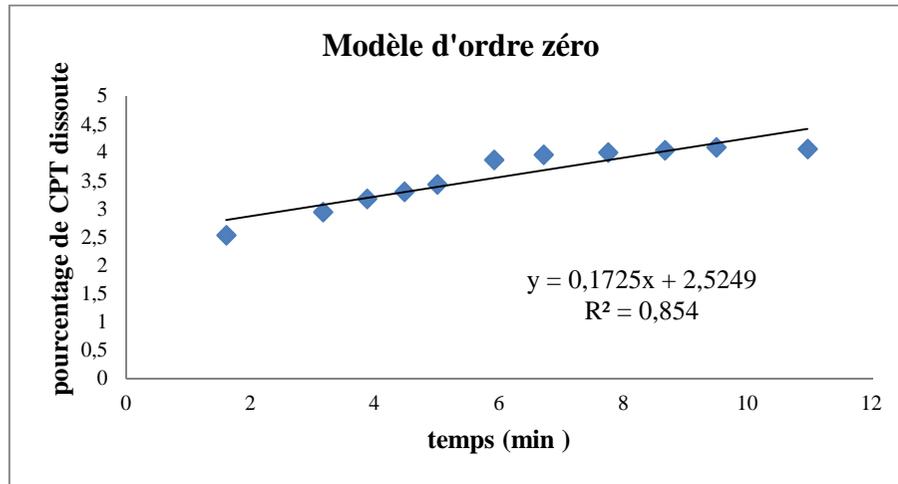
Les pourcentages de CPT et CPT 11 dissoute sont représentés dans les tableaux qui suivent :

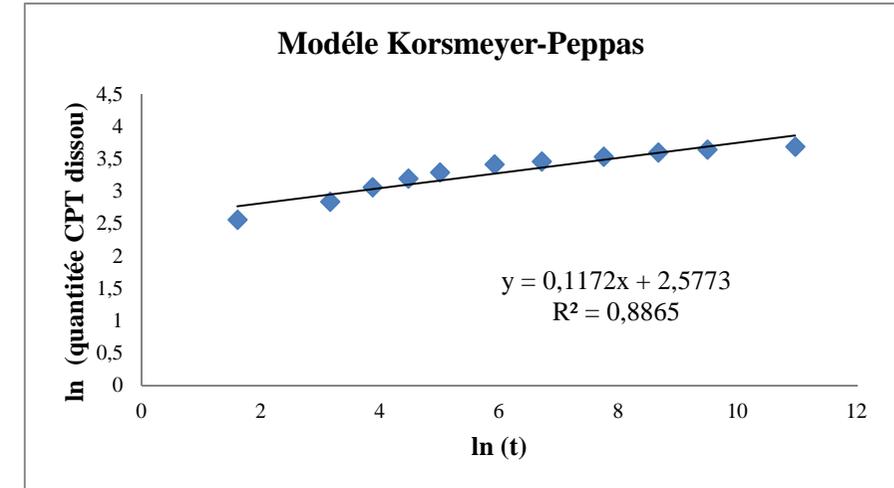
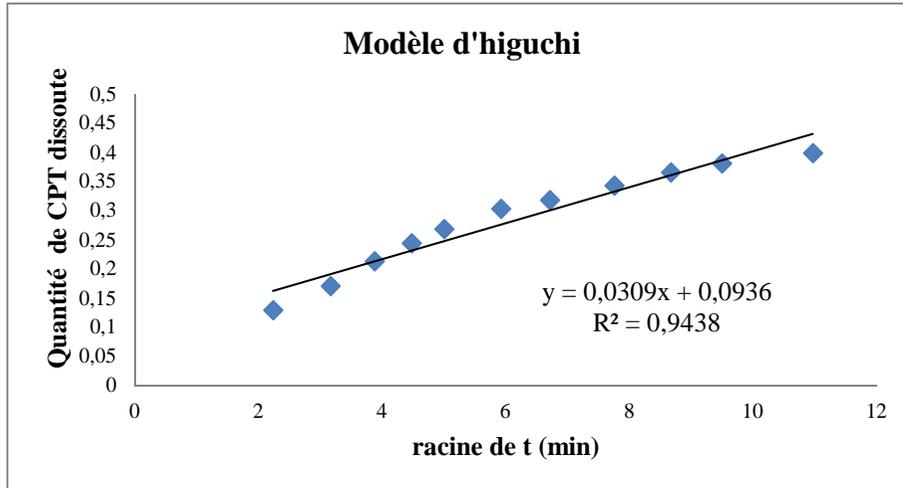
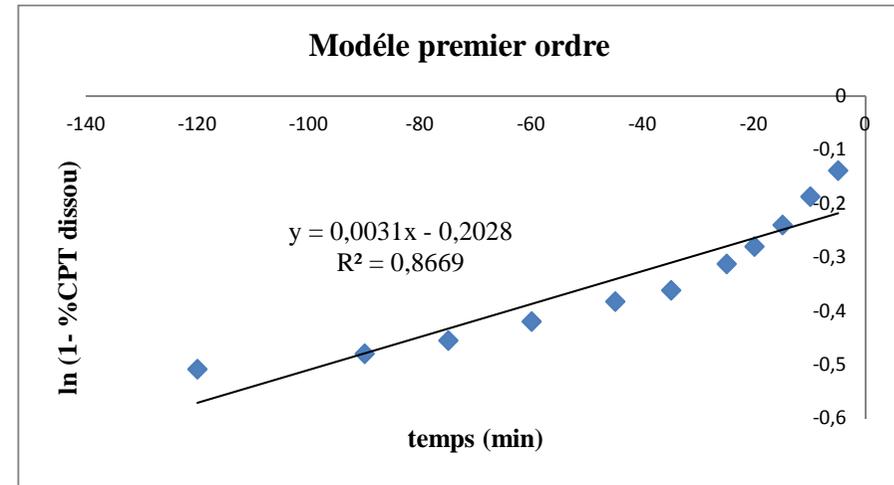
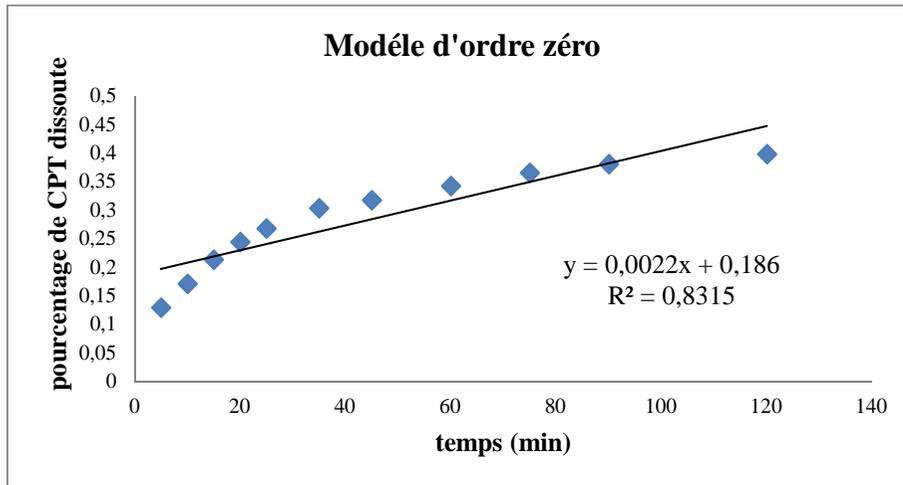
	MPH BCD-CPT	BCD-CPT	MPH HP BCD-CPT	HP BCD-CPT	MPH M BCD-CPT	M BCD-CPT
5	10,454664	4,4509955	8,6949681	4,8650416	5,4861108	12,6284060
10	12,110848	5,3825993	15,216194	6,0036684	8,2809220	19,0461206
15	13,249475	8,4879450	16,561844	9,1090142	12,007336	24,0146738
20	14,388102	10,972221	20,081235	9,6265718	12,938940	27,2235311
25	15,940774	15,733751	20,909328	12,110848	15,112682	31,0534575
35	18,207677	26,705973	26,291927	27,327042	22,151466	47,9258361
45	21,944443	32,606130	27,637577	29,293761	23,807650	52,4803432
60	26,912996	35,711476	28,983227	32,088572	24,221696	54,7575967
75	25,360323	39,748425	31,260480	33,641245	27,948111	56,9313387
90	23,497116	42,439725	30,639411	35,711476	30,018342	59,9331730
120	20,805816	45,648582	29,500784	37,988729	23,807650	58,2769886

	MPH POLY BCD-CPT	POLY BCD-CPT	MPH PEG-CPT	PEG-CPT	CPT	CPT11
5	9,2125257	12,938940	12,731917	18,839097	2,3995853	97,017509
10	11,075733	17,079401	18,839097	20,288258	2,7195300	102,17540
15	14,698636	21,323374	23,807650	24,014673	5,1991016	/
20	16,768867	24,428719	23,704139	27,741088	5,5990324	103,64908
25	18,218028	26,809485	26,084904	29,604296	7,1187698	/
35	21,737420	30,328876	29,604296	32,916664	11,837954	/
45	23,807650	31,778038	31,571015	35,193918	12,237885	104,63154
60	25,877881	34,262314	34,572849	37,885218	14,957415	105,12277
75	27,948111	36,539568	36,022010	39,127356	16,077221	106,10522
90	28,983227	38,092241	37,574683	40,576517	15,917249	107,57891
120	31,053457	39,851937	38,920333	41,715144	14,877429	104,14031

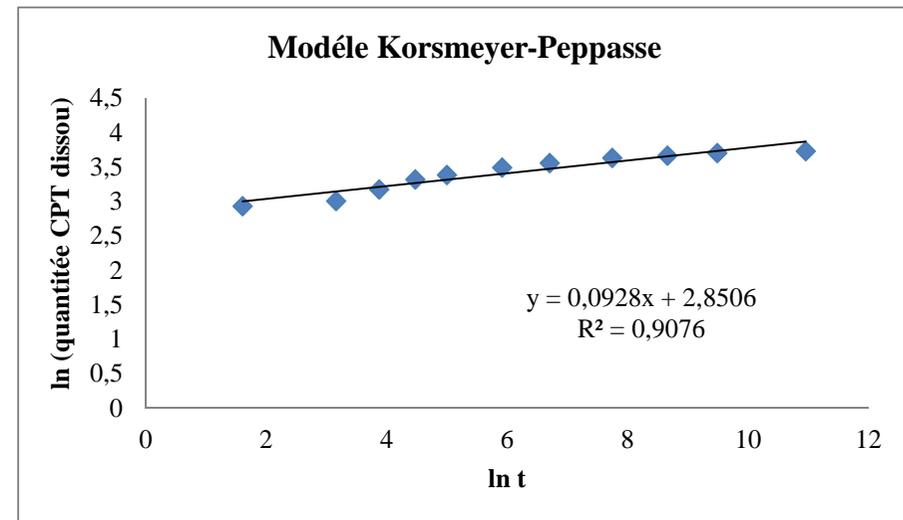
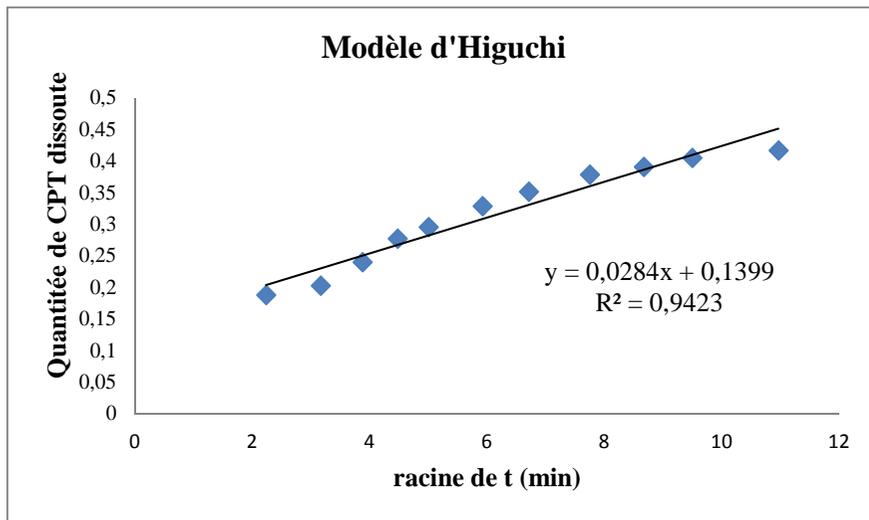
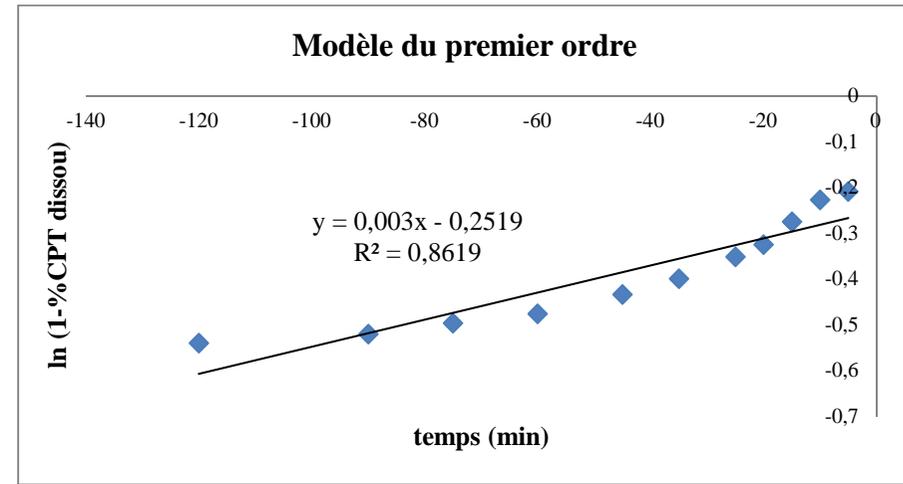
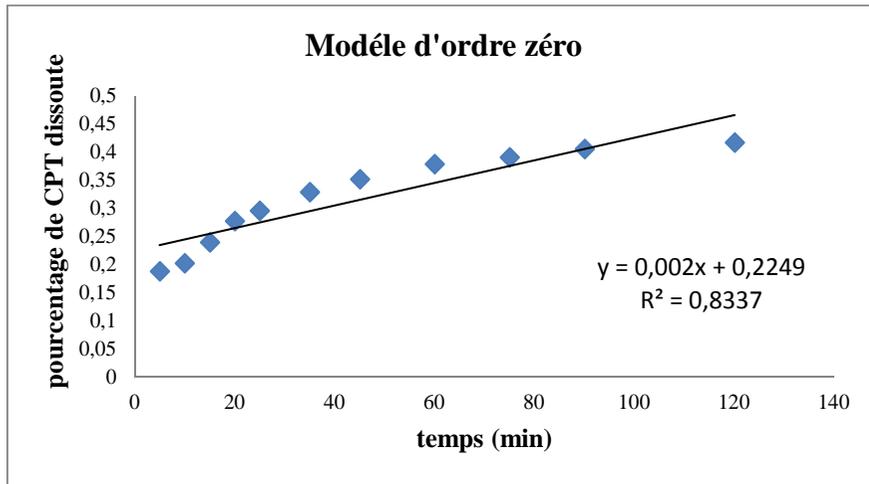
1-Modélisations mathématiques des résultats de dissolution du complexe β CD- CPT :

2-Modélisations mathématiques des résultats de dissolution du complexe HP β CD- CPT :

3-Modélisations mathématiques des résultats de dissolution du complexe PM β CD- CPT :

4-Modélisations mathématiques des résultats de dissolution du complexe Poly β CD- CPT :

5-Modélisations mathématiques des résultats de dissolution de la dispersion solide PEG 6000- CPT :



1^{er} ESSAI

Contrôle	NaCl 0,9 %	DMSO	CPT	CPT 11	β CD	HP β CD	PM β CD	POLY β CD	PEG6000
[cellulaire]	0,045	0,453	1,171	1,067	1,267	0,585	1,100	1,027	1,281
[hémoglobine]	0,431	0,810	0,357	0,278	0,144	1,047	0,237	0,134	0,085

Traitement	DMSO-CPT	β CPT	HP β CPT	PM β CPT	POLY β CD	PEG 6000 CPT
[cellulaire]	0,288	0,920	0,744	0,710	0,576	0,454
[hémoglobine]	0,836	0,108	0,207	0,057	0,038	0,112

2^{ème} ESSAI

Contrôle	NaCl 0,9 %	DMSO	CPT	CPT 11	β CD	HP β CD	PM β CD	POLY β CD	PEG6000
[cellulaire]	0,668	0,529	0,540	0,587	0,703	0,703	0,610	0,703	0,490
[hémoglobine]	0,236	0,157	0,176	0,142	0,185	0,184	0,287	0,156	0,016

Traitement	DMSO-CPT	β CPT	HP β CPT	PM β CPT	POLY β CD	PEG 6000 CPT
[cellulaire]	0,675	0,497	0,577	0,470	0,453	0,512
[hémoglobine]	0,053	0,078	0,166	0,043	0,231	0,071

3^{ème} ESSAI

Contrôle	NaCl 0,9 %	DMSO	CPT	CPT 11	β CD	HP β CD	PM β CD	POLY β CD	PEG6000
[cellulaire]	0,702	0,715	0,764	0,833	0,840	0,735	0,840	0,875	0,643
[hémoglobine]	2,434	0,408	0,132	0,044	0,195	0,292	0,168	0,402	0,800

Traitement	DMSO-CPT	β CPT	HP β CPT	PM β CPT	POLY β CD	PEG 6000 CPT
[cellulaire]	0,555	0,585	0,615	0,369	0,524	0,496
[hémoglobine]	0,131	0,637	0,249	0,109	0,325	0,211

Les moyennes d'absorbance obtenus lors des tests sur globules rouges sont présentées dans le tableau si dessous :

	MOY.	Déviati on standard (n=3)
Absorbance, total	0,48	0,33
Absorbance, cellule, BCD	0,94	0,29
Absorbance, cellule, BCD/CPT	0,67	0,22
Absorbance, cellule, NaCl 0,9 %	0 ,87	0,32
Absorbance, cellule, CPT	0,83	0,32
Absorbance, cellule, CPT 11	0,83	0,24
Absorbance, cellule, DMSO	0,57	0,13
Absorbance, cellule, DMSO/CPT	0,51	0,2
Absorbance, cellule, HPBCD	0,65	0,11
Absorbance, cellule, HPBCD/CPT	0,65	0,09
Absorbance, cellule, PEG	0,8	0,42
Absorbance, cellule, PEG/CPT	0,49	0,03
Absorbance, cellule, PMBCD	0,85	0,25
Absorbance, cellule, PMBCD/CPT	0,52	0,18
Absorbance, cellule, POLYBCD	0,87	0,16
Absorbance, cellule, POLYBCD/CPT	0,52	0,06
Absorbance, Hg, BCD	0,17	0,03
Absorbance, Hg, BCD/CPT	0,27	0,31
Absorbance, Hg, NaCl 0,9 %	0,13	0,1
Absorbance, Hg, CPT	0,22	0,12
Absorbance, Hg, CPT 11	0,15	0,12
Absorbance, Hg, DMSO	0,46	0,33
Absorbance, Hg, DMSO/CPT	0,34	0,43
Absorbance, Hg, HPBCD	0,51	0,47
Absorbance, Hg, HPBCD/CPT	0,21	0,04
Absorbance, Hg, PEG	0,3	0,43
Absorbance, Hg, PEG/CPT	0,13	0 ,07
Absorbance, Hg, PMBCD	0,23	0,06
Absorbance, Hg, PMBCD/CPT	0,07	0,03
Absorbance, Hg, POLYBCD	0,28	0,17
Absorbance, Hg, POLYBCD/CPT	0,2	0,15

traitements	DMSO-CPT %	β CD - CPT %	HP β CD - CPT %	PM β CD -CPT %	Poly β CD- CPT %	PEG 6000 - CPT %
Lent	16,62	23,15	20,91	19,63	19,77	19,79
Moyen	17,8	17,96	16,72	12,07	13,47	15,32
Progressif moyen	2,75	4,79	2,44	4,09	5,16	5,32
Progressif rapide	8,77	9,98	5,57	5,32	14,33	8,94
Rapide	25,65	16,77	18,12	25,36	28,65	22,77
Statique	28,4	27,35	36,24	33,54	18,62	27,87
total	100	100	100	100	100	100

Résumé : L'objectif de notre étude était d'améliorer la solubilité d'un agent anti-cancéreux la camptothécine (CPT) en utilisant une combinaison inédite : polymère de béta cyclodextrine (poly β CD) et CPT. Nous avons démontré par un test de solubilité qu'il y a une interaction entre la CPT et le poly β CD, de ce fait, des complexes d'inclusion entre ce polymère, des cyclodextrines naturelles et modifiées et la CPT furent préparés, ainsi qu'une dispersion de cette dernière dans le Poly éthylène glycol 6000 (PEG 6000). Ces préparations furent caractérisées par infra-rouge et DRX, confirmant l'existence d'interaction entre les polymères étudiés la molécule active. Le profil de dissolution de ces mêmes préparations prouve l'amélioration de la dissolution de la CPT et cela suivant une diffusion fickienne, cette amélioration ainsi que celle de la stabilité sont la cause de la cytotoxicité obtenue suite aux tests sur globules rouges et spermatozoïdes.

Mots clés : camptothécine, cytotoxique, polymère de cyclodextrine, solubilité.

Abstract: The aim of this study was the improvement of the solubility of an anticancer agent "camptothecin" (CPT) using a new approach: combination of beta cyclodextrin polymer (Poly β CD) and CPT. We have shown by solubility test occurring of interaction between the CPT and Poly β CD. After, inclusion complexes between the polymer, natural and modified cyclodextrins and CPT were prepared, dispersion of the later in PEG 6000 was also done. These preparations were characterized by IR and XRD, confirming the existence of interaction between the polymers and the active molecule. The dissolution profile of these preparations shows improvement of CPT dissolution following a Fickian distribution. The improvement of CPT solubility and its stability are the causes of cytotoxicity resulting from red blood cells and sperm tests.

Keywords: Camptothecin, cyclodextrin polymer, cytotoxic, solubility.