



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

SEBIANE SARA

AINSEBA SAMAH

Sur le thème

L'ENCAPSULATION D'UN ANTICANCEREUX CAPECITABINE AVEC LA CYLODEXTRINE ET EVALUATION DE SON ACTIVITE BIOLOGIQUE.

Soutenu publiquement le 19 juin 2023 à Tlemcen devant le jury composé de :

Pr. ADJEKOUN	Professeur	CRSP Constantine	Président
Pr. Zoheir ARRAR	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Pr.DjedainiPilard Florence	Professeur	Université de Jules Verne, France	Invitée
Pr.Burkhard BECHINGER	Professeur	Université de Strasbourg France	Invité
Pr.A.KRID	Professeur	CRSP Constantine	Superviseur (Partie Docking)
Dr.AssiaKENICHE	MCA	Université de Tlemcen	Encadrante
Pr.IbtissemEL OUAR	Professeur	CRSP Constantine	Encadrante

Année Universitaire : 2022 ~ 2023

REMERCIEMENTS

*Louange au Bon Dieu Tout Puissant, de nous avoir accordées la force, le courage et la patience pour surmonter toutes les difficultés rencontrées pendant la réalisation de ce travail et pouvoir l'achever ma copine : **Mlle AIN SEBA SAMAH**, et moi **Mlle SEBIANE SARA**.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), aussi notre reconnaissance envers le Directeur de Centre de recherche en Sciences pharmaceutiques (CRSP) Constantine **Mr DJEKOUN ABD ELHAMID** ce grand Monsieur nous a été serviable et a veillé sur l'achèvement de notre travail lors de notre stage dans le centre, et a mis à notre disposition tous le personnel et les moyens nécessaires à notre travail. Nous exprimons nos profonds remerciements au chef de département de Pharmacie, **Pr AMARA**, et le doyen **Pr BERBER doyen de la faculté médecine** Université Abou Bakr Belkaid qui nous a accueilli lors de notre stage au laboratoire de Galénique.*

*Nos vifs remerciements vont vers **Pr GHANEM SAID**, le directeur du Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour son accueil chaleureux, sa bonne humeur et, ainsi qu'au laboratoire de CATALYSE et à son directeur **Mr ZIANI CHERIF CHEWKI** notre mobilité vers leur laboratoire à tous besoin lors de notre travail.*

*Nos profondes reconnaissances s'adressent au **Dr KENICHE ASSIA** et au **Pr LOUAR IBTISSEM** pour leurs encadrement, leurs précieux conseils, leurs serviabilité, et l'aide qu'elles nous ont apportés en vue de concrétiser ce travail. Merci pour votre confiance, votre patience et votre soutien permanent.*

*Nous tenons également à remercier le **Dr KRID ADEL** qui nous a formé dans la partie in-silico, en enrichissant ce projet par ses idées. Et nous exprimons notre gratitude envers **Mme GANDOUZ SOUHILA** pour notre stage au niveau du département de pharmacie.*

*Nous remercions sincèrement **Pr DJEKOUN ABD ELHAMID** pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Notre gratitude va également aux examinateurs : **Pr ARRAR ZOHEIR** doyen de la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, **Pr Florence DJEDAINI PILARD** du laboratoire des glucides de l'Université de Jule Verne, Amiens France et **BOURKHARD BECHINGER** Membrane Biophysics and NMR*

Chemistry Institute UMR7177 de l'Université de Strasbourg France, de nous avoir honorées d'accepter d'examiner et juger ce travail. Que ce mémoire soit l'occasion de leur exprimer le témoignage de notre reconnaissance, de notre gratitude et de notre grand respect aussi pour leur participation à notre formation lors des séminaires du master chimie pharmaceutique.

De même, nous tenons à remercier fortement les chercheurs **BENATALLAH AMIRA, BOULHEM RYM, YOUSSEFI BILLEL et DERBAL SAID** du centre CRSP de Constantine pour leurs aides appréciables et leur disponibilité tout au long de notre stage au centre CRSP.

Nous souhaitons exprimer nos remerciements à l'ingénieur de laboratoire au sein du Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives, **Mr BENMANSOUR BOUMEDIENE** pour, le maître de recherche **Mr HASSAINE RIDA** du laboratoire de CATALYSE, ainsi qu'à l'ingénieur de laboratoire des macromolécules, **Mr SID AHMED** de l'Université AbouBakrBelkaid Tlemcen.

Nous avons également une pensée pour tous les membres du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), et de Centre de recherche en Sciences pharmaceutiques (CRPS).

DEDICACE

J'ai atteint le point final où les espoirs de l'enfance et le rêve que j'aspire à atteindre qui est l'obtention de diplôme du master sont sur le point de voir le jour.

A l'occasion de la fin de ce travail, je vais le dédier :

A mes chères parents : maman qui a m'encouragé et soutenu durant toute la période de mes études, mon cher papa qui inspire mon existence et qui m'a appris à être moi-même.

A mon frère et ma douce sœur : "SEBIANE OUSSAMA et HADJER" en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès. Je vous aime énormément.

A toute ma famille grande et petite, a tous mes amis et collègues de la promotion à mes amis proches, avec qui je partage la joie la tristesse mais aussi des moment d'espoir de bonheur et surtout d'aventure.

SEBIANE SARA

DEDICACE

Je remercie d'abord Dieu pour se succès atteint dans ma carrière scolaire. Dieu merci beaucoup. Grâce à Lui, je suis fier de moi-même pour atteindre ce niveau. J'espère qu'Allah Tout-Puissant que mon savoir sera bénéfique pour moi et ma nation, je vaisle dédier :

A mes chers parents SADIJIAA et ABDELHAMIDE:«n'avez jamais cessé de me encourager et me conseiller vous me avez beaucoup aide tout en long de me chemin, grâce à le tiens amour, le tiens dénouement, le tiens compréhension et le tiens patience sans jamais me quitter des yeux ni baisser les bras et le tiens soutien moral et matériel, je ne saurait jamais traduire ce que je ressent vraiment envers vos,je demande à Dieu de prolonger votre vie dans la santé et le bien-être, et je serai à la hauteur de vos attentes , je t'aimes beaucoup. »

A mes chères sœurs: MANEL et NOSSAIBA: «Vous êtes ma joie de vie, j'espère vous voir dans les meilleures conditions et atteindre vos objectifs et ambitions je t'aimes ».

A ma cher collègue dans ce travail « SARA » on a passé des bons moments ensemble que dieu garde notre amitié pour toujours.

A ma chère amie : « NOUR ELHOUDA».

A tous mes chers amis « IBRAHIM, SARA, AMINA, FATIMA, HANAN et MARAWA» qui m'ont accompagné dans mon parcours universitaire, et pour la motivation et le soutien inconditionnel qu'ils m'ont offert durant toute la période du mémoire.

A ma famille paternelle et maternelle AIN SEBA et ZEGHOUDI

A tous ceux qui ont contribué à ce travail et à tous ceux qui me sont chers.....

SAMAH AIN SEBA

TABLE DES MATIERES

<i>REMERCEMENTS</i>	i
<i>DÉDICACE</i>	iii
<i>DÉDICACE</i>	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
Liste Des Tables	vii
Liste Des Figures	viii
Liste Des Abréviations.	x
INTRODUCTION GENERALE :	1
<i>PARTIE I:</i>	1
<i>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	1
PARTIE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I : Le Capécitabine CAP	5
INTRODUCTION.....	5
I. Propriétés de biodisponibilité :.....	5
1) Définition :	5
2) Etude in vitro et in vivo :[8].....	6
CONCLUSION	7
CHAPITRE II: Etude des cyclodextrines et leurs complexes d'inclusions.....	8
INTRODUCTION :	8
I. Les cyclodextrines :	8
❖ Définition et propriétés :.....	8
II. Les complexes d'inclusion :	8
1. Conséquences de la complexation :.....	9
2. Différence entre les différentes CDs :	9
3. Méthodes de préparation des complexes d'inclusion :.....	9
4. Les propriétés de complexe inclusion (CD/CAP) :	9
III. Efficacité d'un complexe inclusion par le couplage CD/ Principe actif sous forme de liposome :	13

❖ Définition et composition de liposome :	13
CONCLUSION :	13
PARTIE II:Travail Effectué	16
Matériels et méthode :	16
1. Préparation des complexes d'inclusion :	16
2. Analyse de complexe inclusion :	20
A. Analyse chimique :	20
B. Analyse biologique:(Etude de l'effet biologique des complexes β CD-CAP).....	20
C. Analyse in-silico :(Vérification de complexe inclusion (CAP/β-CD) par le Dokingmoléculaire) (lors de notre stage au CRSP de Constantine).	22
PARTIE III : Résultats et Discussions	25
Résultats de complexe inclusion :	25
A. Pour le β-CD/CAP :	25
B. Pour le complexe α-CD/CAP :	43
C. Etude de capacité d'analogue du CAP de former des liposomes à base de CD :	52
D. Activités biologiques des complexes :	54
E. Analyse in-silico des complexes :	58
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE :	63
REFERENCES	65
ANNEXES	69

LISTE DES TABLES

Tableau 1: L'interprétation des spectres de FTIR de complexe β -CD/CAP	33
Tableau 2: Les différents essais pour tracer la courbe d'étalonnage	34
Tableau 3: L'interprétation des spectres RMN ^1H de complexe β -CD/CAP	42
Tableau 4: L'interprétation des spectres de FTIR de complexe β -CD/CAP	48
Tableau 5: Les différents essais pour tracer la courbe d'étalonnage	49
Tableau 6: Détermination de la forme et le type des nanoparticules.....	53

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1: <i>La structure moléculaire du capécitabine CAP.</i> [2].....	1
Figure I. 2: <i>L'action du Capécitabine CAP.</i> [5]	2
figure II. 1: <i>Schéma représentant la conversion enzymatique de la capécitabine en 5-fluorouracile</i> [9].	5
figure II. 2: <i>Structure chimique du 5-fluorouracile</i> [10].	6
figure II. 3: <i>Les sites de déprotonation N1 et N3 du 5-fluorouracile</i> [11].	6
Figure III. 1: <i>Représentation structurale des α-CD, β-CD et γ-CD de gauche à droite.</i> [14].....	8
Figure III. 2: <i>Représentation d'un complexe d'inclusion caractérisé par sa constante de formation K_a.</i> [16]	8
Figure III. 3: <i>Spectre FTIR de CD mesure et effectuées sur le disque KBr.</i> [7]	10
Figure III. 4: <i>Spectre FTIR de CD + CAP mesure et effectuées sur le disque KBr.</i> [7]	10
Figure III. 5: <i>Dépendance de l'absorbance du 5-FU à partir de la concentration d'α-CD dans des solutions aqueuses à différentes valeurs de pH : (a) pH = 4,3 ($\lambda = 266,6$ nm) ; (b) pH = 6,8 ($\lambda = 266,6$ nm) ; et (c) pH = 9,8 ($\lambda = 271,2$ nm).</i> [17]	11
Figure III. 6: <i>Dépendance de l'absorbance du 5-FU à partir de la concentration de β-CD dans des solutions aqueuses à différentes valeurs de pH : (a) pH = 4,3 ($\lambda = 266,2$ nm) ; (b) pH = 6,8 ($\lambda = 266,4$ nm) ; et (c) pH = 9,8 ($\lambda = 269,8$ nm).</i> [17]	11
Figure III. 7: <i>Activité cytotoxique exprimée en IC (μM) de 5-FU, α-KND et β-KND, α-PM et β-PM, α-CD et β-CD contre MCF-, A-549, Hep-G2, et les lignées cellulaires Caco-2</i> [17].	12
Figure III. 8: <i>Dessin schématique de la structure des liposomes et des modèles de piégeage de médicaments lipophiles ou hydrophiles.</i> [21].....	13
Figure IV. 1: <i>Structure 3D de β-CD.</i>	23
Figure IV. 2: <i>Structure 3D de Capécitabine.</i>	23
Figure IV. 3: <i>Boîte de grille (Grid Box) de simulation.</i>	24
Figure V. 1: <i>Les spectres d'absorbances UV-Visible.</i>	25
Figure V. 2: <i>La courbe de Job de complexe β-CD /CAP.</i>	26
Figure V. 3: <i>La courbe de K_a de complexe β-CD/CAP.</i>	27
Figure V. 4: <i>La courbe de Job pour le complexe β-CD/CAP.</i>	28
Figure V. 5: <i>La courbe de K_a pour le complexe β-CD/CAP.</i>	29
Figure V. 6: <i>Le spectre d'absorbance de complexe β-CD/CAP.</i>	29
Figure V. 7: <i>La courbe de Job de complexe β-CD/CAP à $\lambda=304$ nm.</i>	30
Figure V. 8: <i>La courbe de K_a pour le complexe β-CD/CAP.</i>	31
Figure V. 9: <i>Les spectres de FTIR pour (β-CD; CAP; β-CD/CAP).</i>	32

Figure V. 10: <i>Le spectre d'absorbance de CAP dans le méthanol à $\lambda_{max}=309,95$ nm.</i>	34
Figure V. 11: <i>La courbe d'étalonnage de CAP dans le méthanol.</i>	35
Figure V. 12: <i>Le spectre de fluorescence de CAP dans l'eau.</i>	35
Figure V. 13: <i>Les spectres de fluorescence de CAP; β-CD; Complexe inclusion.</i>	36
Figure V. 14: <i>Les spectres de fluorescence de complexe inclusion des différentes concentration.</i>	36
Figure V. 15: <i>La courbe de Job de complexe β-CD/CAP par la fluorescence.</i>	37
Figure V. 16: <i>Les spectres de fluorescence le CAP($2,78 \times 10^{-5}$M) avec des solutions de β-CD des différentes concentrations (1,39 ; 2,78 ; 4,17 ; 5,6 ; 6,9 ; 8,3 ; 0) $\times 10^{-5}$M.</i>	37
Figure V. 17: <i>La courbe de K_a de complexe β-CD/CAP.</i>	38
Figure V. 18: <i>Le spectre de RMN 1H de β-CD.</i>	39
Figure V. 19: <i>Le spectre de RMN 1H de CAP.</i>	40
Figure V. 20: <i>Le spectre de RMN 1H de complexe inclusion (β-CD/ CAP).</i>	41
Figure V. 21: <i>Les spectres d'absorbances UV-Visible.</i>	43
Figure V. 22: <i>La courbe de Job de complexe α-CD/CAP.</i>	44
Figure V. 23: <i>La courbe de K_a de complexe α-CD/CAP.</i>	45
Figure V. 24: <i>La courbe de Job de complexe α-CD/CAP.</i>	45
Figure V. 25: <i>La courbe de K_a pour le complexe α-CD/CAP à $\lambda=241$ nm.</i>	46
Figure V. 26: <i>La courbe de Job de complexe α-CD/CAP.</i>	46
Figure V. 27: <i>Les spectres de FTIR pour (α-CD; CAP; α-CD/CAP).</i>	47
Figure V. 28: <i>La Courbe d'étalonnage absorbance en fonction de [CAP] à $\lambda_{max}=309$ nm.</i>	49
Figure V. 29: <i>Les spectres de fluorescence de CAP; α-CD; Complexe inclusion.</i>	50
Figure V. 30: <i>Les spectres de fluorescence de Complexe inclusion des différentes concentrations.</i>	50
Figure V. 31: <i>La courbe de job du complexe α-CD/CAP par la fluorescence.</i>	51
Figure V. 32: <i>Les spectres de fluorescence le CAP($2,78 \times 10^{-5}$M) avec des solutions de α-CD des différentes concentrations (1,39 ; 2,78 ; 4,17 ; 5,6 ; 6,9 ; 8,3 ; 0) $\times 10^{-5}$M.</i>	51
Figure V. 33: <i>La courbe de K_a de complexe α-CD/CAP.</i>	52
Figure V. 34: <i>La variation du % d'inhibition de la dénaturation de BSA par CAP, β-CD/CAP et déclofénac.</i>	55
Figure V. 35: <i>Effet d'encapsulation sur les taux des enzymes ALAT, ASAT et phosphatase alcaline.</i>	57
Figure V. 36: <i>Effet d'encapsulation sur la formation des vaisseaux sanguin.</i>	57
Figure V. 37: <i>Complexe d'inclusion β-CD/CAP par docking moléculaire (top and side views).</i>	60
Figure V. 38: <i>Liaison Hydrogène établie dans le complexe β-CD-CAP.</i>	60
Figure V. 39: <i>Visualisation des différents types d'interactions dans le complexe β-CD-CAP.</i>	61

Liste Des Abreviations.

- **A** : Absorbance UV
- **ADN** :Acide désoxyribonucléique
- **ALAT**: Alanine aminotransférase
- **ASAT** :Aspartateaminotransférase
- **ARN** :Acide ribonucléique
- **ΔA** : Différence d'absorption entre le principe actif complexé et le principe actif libre
- **A-549**: Le cancer du poumon
- **AMES** : Le test d'Ames est une méthode largement utilisée pour évaluer le potentiel mutagène d'un composé à l'aide de bactéries.
- **ADME** : absorption, distribution, métabolisme et élimination
- **A°** : Unité 10^{-10} m
- **BBB** : Le cerveau est protégé des composés exogènes par la barrière hémato-encéphalique (BHE) cette dernière est mesurée in vivo dans des modèles animaux
- **log (BB)** :C'est mesurée le rapport logarithmique des concentrations de médicament dans le cerveau et dans le plasma.
- **BSA** : L'albumine de sérum bovin
- **CAP** : Capécitabine
- **CAM** :La membrane chorio-allantoïde
- **CD** : Cyclodextrine
- **C_i** : Concentration initial de complexe
- **C_s** : Concentration de CAP libre
- **C_e** :Concentration de CAP encapsulé
- **C_f** : Concentration finale
- **CE** : Carboxylesterase
- **CyD** :Cytidinedeaminase
- **[CD]**: Concentration en CD
- **α -CD** : alpha -cyclodextrine
- **β -CD** : bêta -cyclodextrine
- **γ - CD** : gamma-cyclodextrine

- **CYP2D6 ;CYP3A4 ;CYP1A2 ;CYP2C19 ;CYP2C9 ;CYP2D6 ;CYP3A4** :Des inhibiteurs du cytochrome P450
- **5'-DFCR** : 5-désoxy-5-fluorocytidine
- **5'-DFUR** :5-désoxy-5-fluorouridine
- **DMSO_{d6}** :Diméthylsulfoxyde
- **DPD**:Dihydropyrimidinedehydrogenase
- **DFT** : La théorie fonctionnelle de la densité
- **dTMP**:Deoxythymidinemonophosphate;
- **dUMP**:Deoxyuridinemonophosphate
- **2D**: Bidimensionnel
- **3D** : Tridimensionnel
- **EE%** : Facteur d'efficacité de l'encapsulation
- **FDHU**:Fluorodihydrouracil;
- **FdUMP**:Fluorodeoxyuridinemonophosphate
- **FUTP**:Fluorouridine triphosphate
- **FTIR** : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- **5-FU** :5-fluorouracil
- **GGT**:Gamma-glutamyl transférase
- **HepG2** : La cellulaire de cancer du foie
- **HT-29** :La cellulaire de cancer du colon
- **HeLa** : Le cancer du col de l'utérus
- **hERGI,II** : Les inhibiteur des canaux potassiques codés par hERG (gène humaine ether-a-go-go).
- **IC** : Concentration inhibitrice médiane
- **Ka** : Constante de stabilité
- **log(Kp)**
- **α -KND ; β -KND** :Les composés de pétrissage
- **μ L**:(Microlitre), unité de mesure de volume
- **LOAEL** : La dose la plus faible d'un composé qui entraîne un effet indésirable observé
- **LD50** :C'est la quantité d'un composé administré en une seule fois qui provoque la mort de 50 % d'un groupe d'animaux de test.
- **MTT** :(3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium).Utilisé pour

déterminer l'activité antiproliférative

- **MCF-7** : Les cellules cancéreuses du sein humain
- **MCF-7 ; A-549 ; Hep-G2 ; Caco-2** : Des cellules cancéreux
- **μM** : Le mécro mol/L
- **M** : La masse molaire
- **M** : mol/L
- **M^{-1}** : L/mol
- **MHz** : (Mégahertz), unité de mesure de fréquence
- **m** : La masse en (g ou mg)
- **NOAEL** : La dose la plus élevée à laquelle aucun effet indésirable n'est observé
- **n** : Le nombre de mole
- **nm** : Le nanomètre
- **PA** : Le principe actif
- **pK_a** : D'un couple acide base
- **pH** : Le potentiel hydrogène
- **PBS** : Phosphate du buffer pH=7,4
- **[PA]** : Concentration en principe actif
- **ppm** : Partie par million
- **PDB** : Protein Data Bank
- **pkCSM** : Prédiction de la pharmacocinétique des petites molécules
- **Log(Ps)** : Le produit perméabilité hémato-encéphalique-surface
- **QSP** : Quantité suffisante pour utiliser à l'origine en médecine et en pharmacie
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- **RMN ¹H** : La spectroscopie RMN du proton
- **SCN** : système nerveux central.
- **SDF** :
- **T** : La température
- **TS** : Thymidylatesynthase
- **UV-Visible** : La spectroscopie ultraviolet-visible
- **V_f** : Le volume final
- **V_i** : Volume initial
- **V_{PA}** : Le volume du principe actif

- **V_{diluant}** : Le volume de diluant
- **V_a** : Le volume apparent du principe actif
- **VD_{ss}** : Le volume de distribution à l'état d'équilibre (est le volume théorique dont la dose totale d'un médicament)
- **V_{dw}** : Interaction de type Van Der Waals
- **WRL-68** : Lacellule hépatiques normales
- **λ** : La longueur d'onde (nm)
- **σ** : Le nombre d'onde (cm⁻¹)
- **Δε** : Différence du coefficient d'extinction entre le principe actif complexé et le principe actif libre.
- **δ** : Le champ magnétique (ppm)

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE :

I. Définition du CAP :

La **capécitabine** est un médicament anticancéreux qui appartient à la famille des **fluoropyrimidines** orales; il guérit plusieurs tumeurs comme (cancer du côlon, cancer de l'estomac, cancer du sein)[1]. Il interfère avec la croissance des cellules en multiplication.

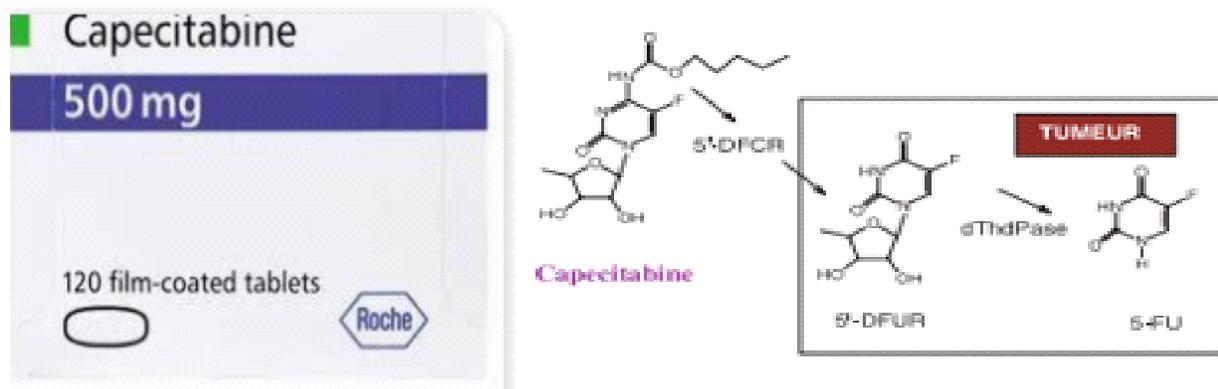


Figure I. 1: La structure moléculaire du capécitabine CAP.[2]

II. Importance Biologique du CAP :

La capécitabine est une molécule inactive, une fois absorbée, par les cellules tumorales, elle sera transformée en une forme active la 5- fluorouracile (5-FU). Le métabolisme ce dernier perturbe la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines à travers l'inhibition de la méthylation de l'acide désoxyuridylique en acide thymidylique[3][4]. L'activité cytotoxique du 5-FU est dépende du temps sa courte demi-vie du médicament.

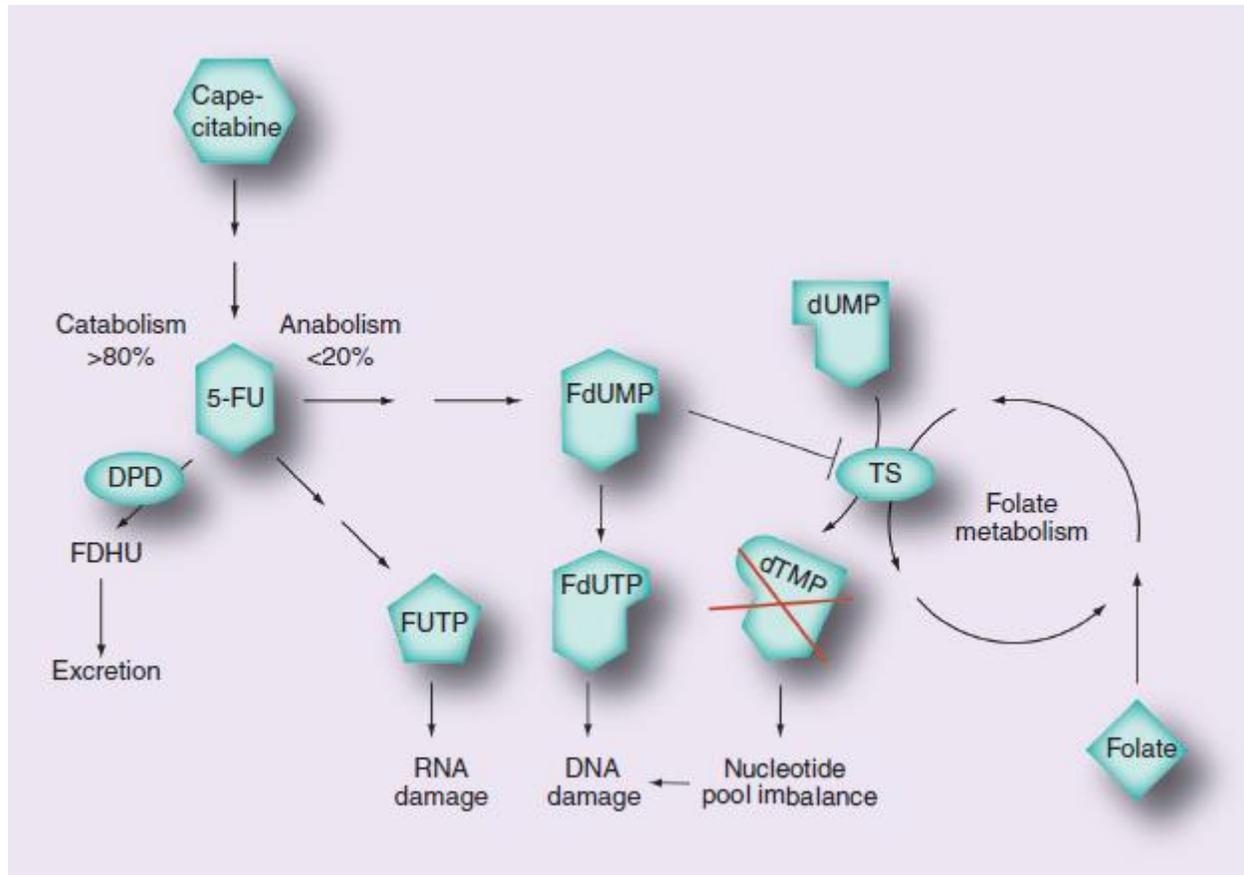


Figure I. 2: *L'action du Capésitabine CAP.*[5]

❖ PROBLEMATIQUE :

La capécitabine est un médicament impliquée dans le traitement de nombreux types de cancers notamment le cancer du sein, le cancer de l'estomac et le cancer colorectal. La molécule a une durée de vie variante entre 0.5 à 2h, et la dose quotidienne de médicament varie entre 10 à 14 comprimés par jour[6]. L'administration d'un tel nombre de comprimés entraîne une augmentation continue du pic de capécitabine dans le sang, ce qui entraîne une toxicité hépatique en plus de l'inconfort du patient avec la prise répétée au quotidien[7].

❖ OBJECTIFS:

Notre objectif dans ce travail est de proposer un système alternatif d'administration de ce médicament, afin d'améliorer son efficacité thérapeutique notamment sa biodisponibilité qui a pour intérêt de réduire la toxicité de la molécule et le nombre de doses prises par jour. Nous

avons choisi, les cyclodextrines (CD) qui sont des oligosaccharides (α 1 \rightarrow 4)-glucopyranoses cycliques solubles dans l'eau naturellement disponibles composées de six unités de glucose ou plus ; nous avons choisi d'étudier les complexes inclusions (CD α/β + CAP) en utilisant plusieurs méthodes à savoir : l'analyse par RNM ^1H ; l'Absorbance UV ; fluorescence et FTIR. De plus une étude in-silico ADMET du CAP ainsi qu'une évaluation in vivo de l'activité biologique de la nouvelle formulation.

Le plan de ce mémoire s'articule autour de deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique qui s'étend sur deux chapitres : dans le 1^{er}, nous exposons les propriétés et les caractéristiques du CAP ainsi que ses effets thérapeutiques. Dans le second chapitre, nous discutons l'intérêt de la CD dans encapsulation du CAP.

La deuxième « partie pratique », englobe le travail effectué ainsi que les résultats et discussions concernant les études réalisées, ainsi que le détail des données expérimentales de l'encapsulation entre (CD /CAP), l'évaluation de son activité biologique et l'étude de docking.

Notre partie pratique a été réalisée au laboratoire COSNA de l'université de Tlemcen et le Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutique à Constantine.

PARTIE I:

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Le Capécitabine CAP

INTRODUCTION

Il existe plusieurs études dans la littérature sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de l'action de la capécitabine CAP, on passe en revue dans ce chapitre, quelques propriétés.

I. Propriétés de biodisponibilité :

1) Définition :

Le capécitabine est un pro médicament antinéoplasique oral. L'activation du CAP suit une voie avec trois étapes enzymatiques et deux métabolites intermédiaires, la 5-désoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) et la 5-désoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR), pour former le 5-FU préférentiellement dans les tissus tumoraux[8].

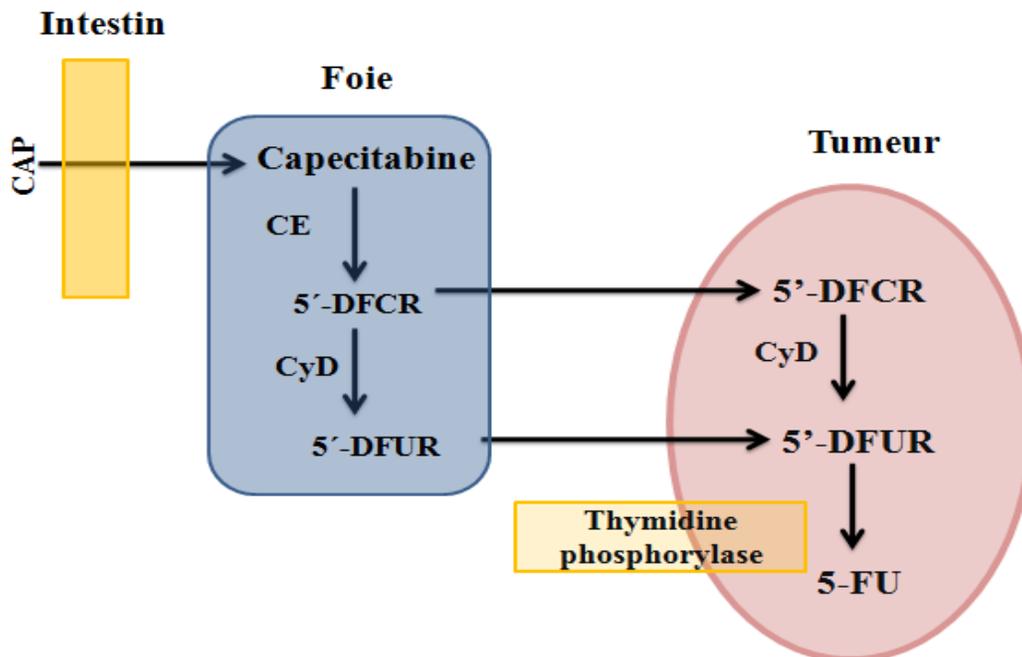


Figure II. 1: Schéma représentant la conversion enzymatique de la capécitabine en 5-fluorouracile[9].

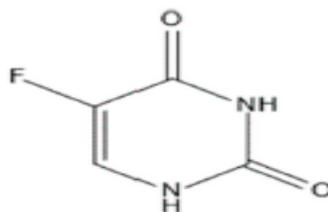


Figure II. 2: Structure chimique du 5-fluorouracile[10].

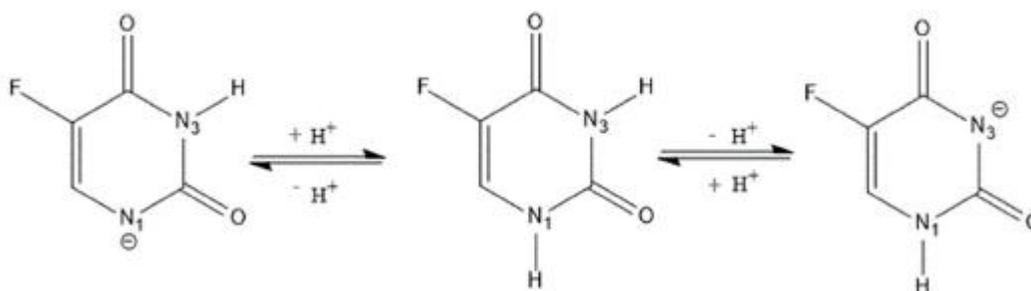


Figure II. 3: Les sites de déprotonation N1 et N3 du 5-fluorouracile[11].

Le 5-fluorouracile (5-FU), 5-fluoro-2,4-(1H ;3H)-pyrimidindione (**fig.2**) [10], est un uracile substitué présentant un atome de fluor en position 5. La molécule peut être déprotonée différemment dans les positions N1 et N3, provoquant des corrélations simples entre des propriétés inductives et pK_a (milieu basique) (**fig.3**) [11].

2) Etude in vitro et in vivo : [8]

- *Dans les expériences in vitro* : la CAP subit le métabolisme hépatique.
- *Dans les conditions in vivo* : la CAP administrée par voie orale doit passer la barrière intestinale pour atteindre le foie puis se répandre dans le corps.

Le CAP excrétée dans l'urine dépend des métabolismes gastro-intestinaux, hépatique, extra-hépatique et de l'efficacité de la clairance rénale. Les récupérations de substances liées au médicament dans l'urine ne sont pas significativement différentes entre les rats et les souris lorsqu'ils sont administrés à la même dose, ce qui est cohérent avec un traitement presque complet et une absorption fiable de CAP par le tractus gastro-intestinal chez ces espèces, comme cela a déjà été observé dans d'autres études chez l'animal ou chez l'homme. Le reste des composés liés au médicament pourrait être éliminé via les matières fécales sous forme de

Partie I Synthèse Bibliographique

médicament intacte. La CAP excrétée dans l'urine pendant 72 h est significativement plus élevée chez la souris que chez le rat.

CONCLUSION

L'activité du capicitabine (5-FU) dépendant du temps, en fonction de la courte demi-vie du médicament. Il est nécessaire d'administrer des doses croissantes et progressivement fréquentes pour assurer l'obtention de concentrations plasmatiques optimales. Néanmoins, l'exposition systémique à fortes doses de 5-FU peut induire de forts effets secondaires. En raison de sa biodisponibilité réduite, le mode d'administration le plus approprié pour le 5-FU est sous forme d'injections .

CHAPITRE II: Etude des cyclodextrines et leurs complexes d'inclusions.

INTRODUCTION :

Lors de ce chapitre, nous passons en revue quelques travaux réalisés, sur les complexes d'inclusion des (CD / CAP), pour améliorer la solubilité, l'absorption cellulaire et la pénétration intestinale du CAP.

I. Les cyclodextrines :

❖ Définition et propriétés :

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon, ou plus précisément de l'amylose[12]. Il existe trois principaux CD, appelés CDs natives ainsi obtenues sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucose. Ces unités glucopyranoses, en conformation chaise, sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α -(1,4).[13]

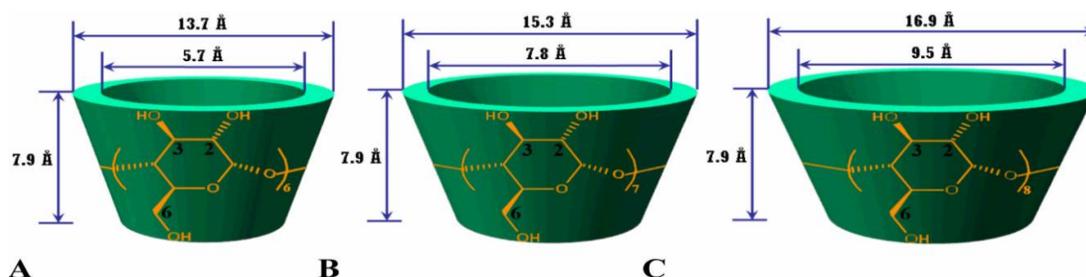


Figure III. 1: Représentation structurale des α -CD, β -CD et γ -CD de gauche à droite.[14]

II. Les complexes d'inclusion :

Un complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules (*fig.2*) dont l'une, le substrat (ou « invité ») est encapsulée de façon totale ou partielle par l'autre, le récepteur (ou « hôte ») sous l'effet d'interactions faibles.[15].

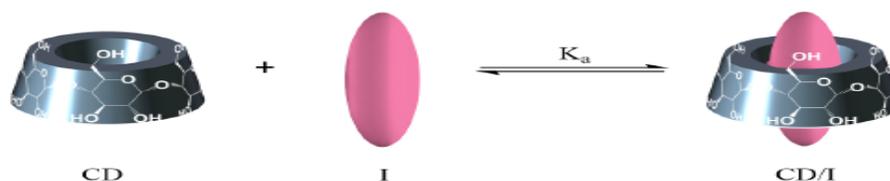


Figure III. 2: Représentation d'un complexe d'inclusion caractérisé par sa constante de formation K_a . [16]

1. Conséquences de la complexation :

L'inclusion des molécules invitées dans la cavité des CD constitue une encapsulation moléculaire et ces molécules modifiées leurs propriétés physicochimiques[12] . On peut citer [15] :

- L'amélioration de la dissolution et de la solubilité du soluté et l'augmentation de sa biodisponibilité (dans le cas de principes actifs),
- La modification de ses propriétés spectrales (déplacements chimiques en RMN, longueur d'onde du maximum d'absorption en UV, intensité de la fluorescence, etc.),
- La modification de sa réactivité. Le soluté bénéficie ainsi d'une protection contre la dégradation thermique ou photochimique.

2. Différence entre les différentes CDs :

La β -CD peut facilement accueillir des structures aromatiques et hétérocycliques, cependant, la β -CD est moins soluble dans l'eau que les CD α et γ . [17] Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogène intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyles secondaires [15]. Au sein de la β -CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau. Dans l' α -CD, cette ceinture est incomplète car l'une des unités glucopyranose est dans une position distordue. La γ -CD, non planaire et plus flexible et possède la plus grande solubilité dans l'eau[13].

3. Méthodes de préparation des complexes d'inclusion :

Les méthodes les plus connues pour former les complexes d'inclusions à base de CD sont : La co-évaporation[18] ; Préparation complexe en phase aqueuse [19] et le Malaxage[20].

4. Les propriétés de complexe inclusion (CD/CAP) :**1. La spectrométrie (FTIR) :**

Les spectres IR du CD et de CAP plus le complexe (CAP + CD), où l'on note dans le spectre du complexe d'inclusion absence des bandes de C-F (1041 cm^{-1}) ; O-H (3131 cm^{-1}) ; N-H (3519 cm^{-1}) ; et l'apparition des bandes de C=O (pyrimidine) ; C-O-H (2859 cm^{-1}) ; C-N (1245 cm^{-1}), plus l'apparition des bandes de cyclodextrine.

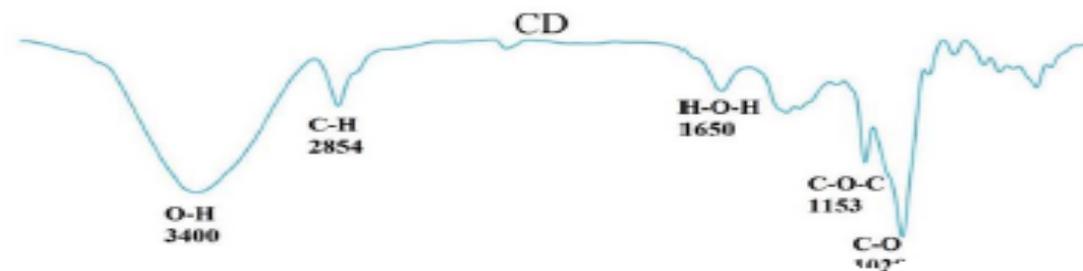


Figure III. 3: Spectre FTIR de CD mesuré et effectué sur le disque KBr. [7]

-3400 et 2854 cm^{-1} : l'étirement du O-H et C-H.

-650, 1153, 1029 et 841 cm^{-1} peuvent être observés qui correspondent aux unités de glucose HOH, C-O, C-O-C et le C-O-C des anneaux de CD, respectivement.

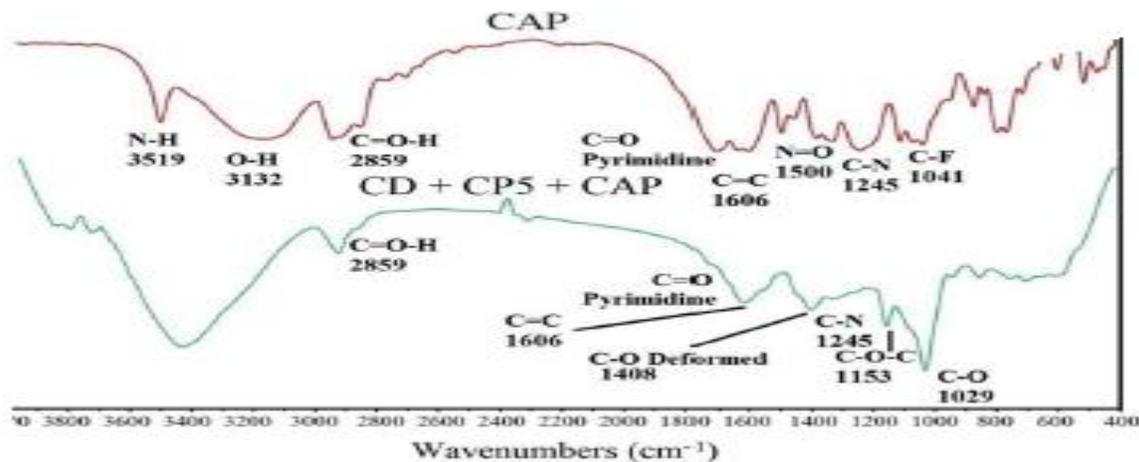


Figure III. 4: Spectre FTIR de CD + CAP mesuré et effectué sur le disque KBr. [7]

-1153 cm^{-1} et 1029 cm^{-1} : correspondent au glucose C-O et C-O-C unités de CD

-1245 cm^{-1} : est lié à la flexion C-N

-1688,90 cm^{-1} : la bande de pyrimidine carbonyle

-1606 cm^{-1} : la bande de C=C l'étirement de la CAP

2. Impact de PH pour l'absorption : [17]

L'inclusion de 5-FU avec α -CD et β -CD a été étudiée dans des solutions tampons à différents pH Dans les (fig.5) et(fig.6) :

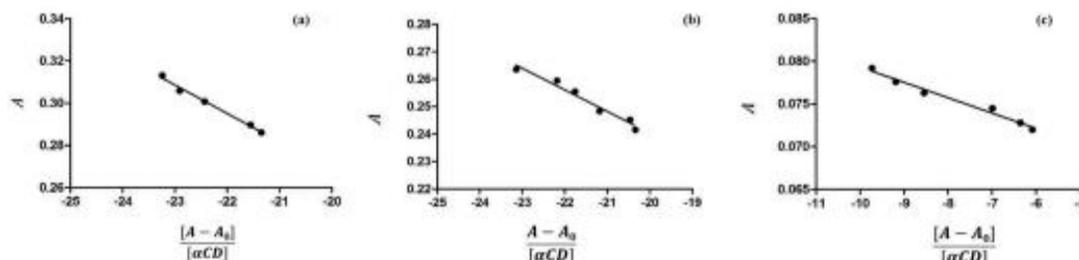


Figure III. 5: Dépendance de l'absorbance du 5-FU à partir de la concentration d' α -CD dans des solutions aqueuses à différentes valeurs de pH : (a) pH = 4,3 ($\lambda = 266,6$ nm) ; (b) pH = 6,8 ($\lambda = 266,6$ nm) ; et (c) pH = 9,8 ($\lambda = 271,2$ nm).[17]

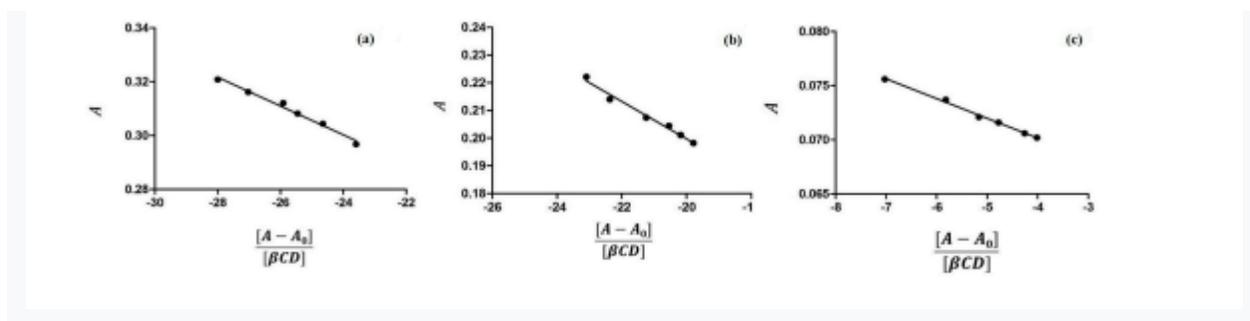


Figure III. 6: Dépendance de l'absorbance du 5-FU à partir de la concentration de β -CD dans des solutions aqueuses à différentes valeurs de pH : (a) pH = 4,3 ($\lambda = 266,2$ nm) ; (b) pH = 6,8 ($\lambda = 266,4$ nm) ; et (c) pH = 9,8 ($\lambda = 269,8$ nm).[17]

Ces résultats suggèrent que l'inclusion de la molécule de 5-FU à l'intérieur des cavités α -CD et β -CD est plus appropriée dans des conditions basiques. Le pH basique est susceptible de favoriser un nombre plus élevé de liaisons hydrogène qui stabilisent l'interaction en raison de la forme déprotonée du médicament.

3. Pharmacocinétique de complexe inclusion :

L'exposition systémique à fortes doses de 5-FU peut induire des effets secondaires graves, la solubilité aqueuse limitée, qui est égale à 12,5 mg/mL, limite encore son utilisation. Par

conséquent, l'élaboration d'une nouvelle stratégie pour la l'administration de 5-FU, qui améliorera sa solubilité et son efficacité thérapeutique et, également, diminuera la répartition des médicaments dans la circulation systémique, est hautement souhaitable. Dans ce contexte, il existe de nombreuses possibilités approches dans la formulation de médicaments, telles que l'ajout de surfactants et de co-solvants, la modification de la forme médicamenteuse et l'utilisation de cyclodextrine.[17]

❖ *In vitro* :[17]

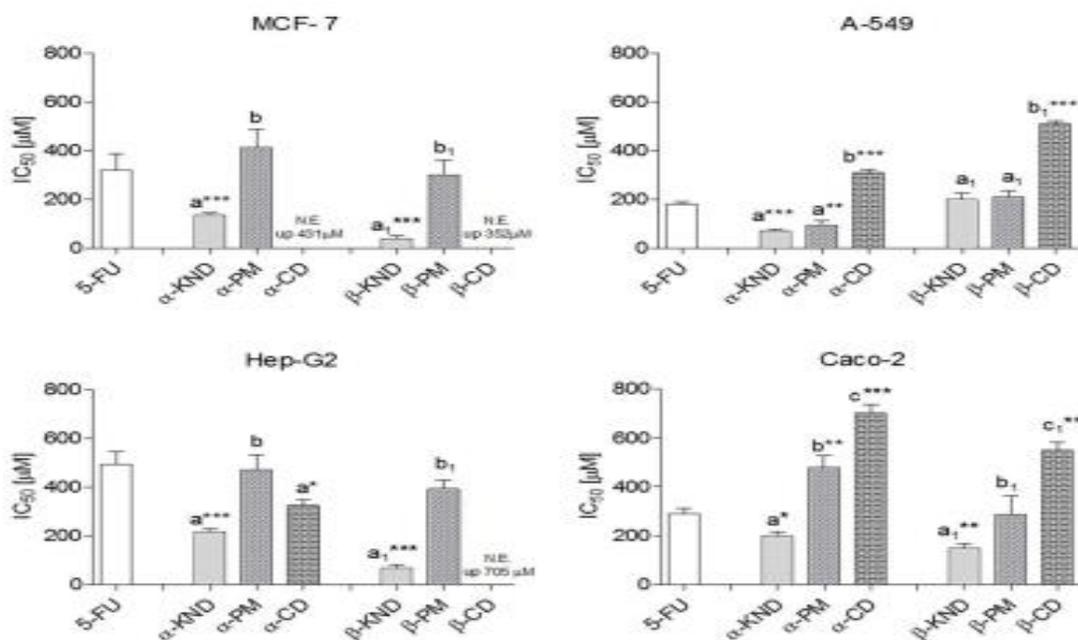


Figure III. 7:Activité cytotoxique exprimée en IC (μM) de 5-FU, α -KND et β -KND, α -PM et β -PM, α -CD et β -CD contre MCF-, A-549, Hep-G2, et les lignées cellulaires Caco-2[17].

❖ *Différences significatives avec le 5-FU* :[17]

En l'absence de 5-FU, α - et β -CD n'ont montré aucune cytotoxicité sur les cellules MCF-7 à des concentrations allant jusqu'à 431 et 352 μM , respectivement. Le même résultat a également été trouvé pour la β -CD sur des cellules Hep-G2 jusqu'à 705 μM . La β -CD a montré une certaine capacité à inhiber la croissance cellulaire des lignées A-549 et Caco-2 bien qu'elle ait été trouvée

à des concentrations élevées. Donc, l' α -CD a diminué la viabilité de Caco-2 montrant des valeurs de CI égales à 698 μ M à 72 h.

Les données ont montré que la complexation du 5-FU avec l' α -CD et le β -CD est capable de déterminer même une augmentation spectaculaire de 10 fois de l'activité du médicament anticancéreux, probablement attribuable à l'amélioration de la perméabilité des membranes cellulaires. En raison de l'interaction entre les CD et le cholestérol contenu dans les membranes cellulaires.

III. Efficacité d'un complexe inclusion par le couplage CD/ Principe actif sous forme de liposome :

❖ Définition et composition de liposome :

Le mot liposome se compose de deux parties d'origine grecque «lipos » et « Soma » qui signifient respectivement gras et corps. De plus les liposomes ont la capacité de piéger des agents lipophiles dans la membrane lipidique, hydrophiles dans le cœur aqueux et amphiphiles à l'interface eau-lipide. Leur taille peut aller de quelques nanomètres à plusieurs micromètres.[21]

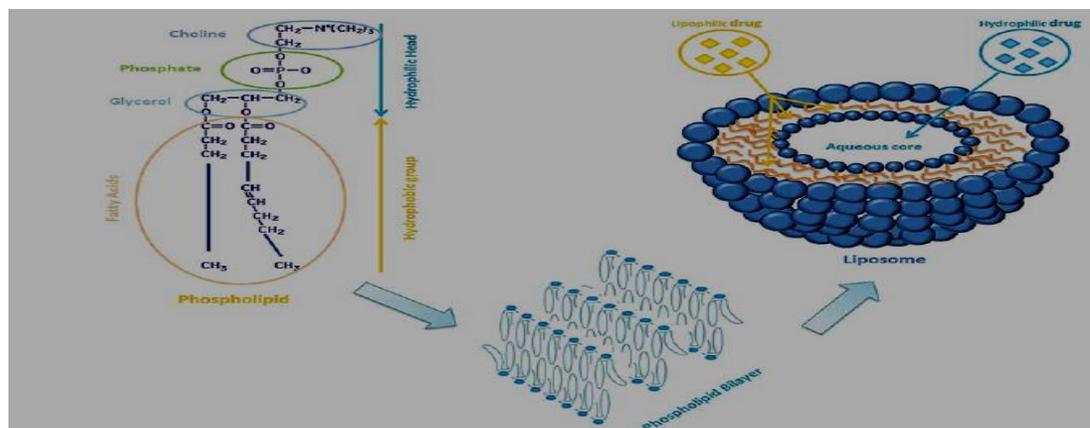


Figure III. 8: Dessin schématique de la structure des liposomes et des modèles de piégeage de médicaments lipophiles ou hydrophiles.[21]

CONCLUSION :

Ce qu'on peut conclure de ces études de la littérature qu'on a cité; que l'interaction du CAP avec la cyclodixtrene α et β a montré que le pyrimidine du CAP est situé à l'intérieur CD α et β , tandis que l'autre section du CAP reste à l'extérieur de la cavité. D'autre part, la complexation a nettement améliorée l'activité vis-à-vis la culture cellulaire in vivo.

PARTIE II

TRAVAIL EFFECTUE

PARTIE II:Travail Effectué**Matériels et méthode :****1. Préparation des complexes d'inclusion :**a) En solution (pour étude par UV-Visible et Fluorescence) :[22]

Deux solutions aqueuses mères de CAP et de β -CD à une concentration de $2,78 \times 10^{-3}$ M. Les dilutions sont préparées à partir de chaque solution mère. Donc les complexes inclusions sont formé à partir d'une série des solutions de différentes concentrations dont $V_f=3\text{mL}$: CAP $\times 10^{-4}$ M (0; 0,556; 1,11; 1,16; 2,22; 2,78; 3,33; 3,8; 4,44; 5,56).

b) En solide pour FTIR:

La préparation de complexe se fait par la méthode de pate complexe de malaxage (mélange équimolaire $n=1 \times 10^{-5}$ mol), dans laquelle 11 mg de β -CD sont mélangés avec 3,5 mg de CAP, et broyer pendant 30min.

c) Facteur d'efficacité de l'encapsulation EE% :[7]

A fin de vérifier la formation des complexes d'inclusion plusieurs essais sont effectuées.

• 1^{er} essai (β -CD/CAP):

Préparation de la solution mère du CAP dans 15 mL de méthanol de concentration égale à $1,92 \times 10^{-3}$ M, et puis préparer une série des solutions filles des différentes concentrations pour mesurer l'absorbance et tracer la courbe d'étalonnage $A=f([CAP])$. Une autre solution a été préparée du complexe β -CD/CAP dans méthanol de concentration $C_i=7 \times 10^{-4}$ M. Par la suite, prélever de cette solution un volume CAP (libre) qu'on a soumis aux analyses UV, pour déterminer l'absorbance. La projection sur la courbe détalonnage (**fig.11**), et déterminer la concentration du [CAP] libre. Résultats : $A=2.52$; $C_s=3.45 \times 10^{-4}$ M.

• 2^{ème} essaie (β -CD/CAP):

Prélever 5 ml de la solution du complexe β -CD/CAP, et ajouter 2 mL de phosphate du buffer (PBS ; pH=7.4), puis la soumettre à une forte agitation. Au final, soumettre au analyse par UV-Visible.

- 3^{ème} essaie (α -CD/CAP):

Faire le même protocole (1^{er} essai) pour le complexe inclusion (α -CD/CAP).

d) En solution de RMN ¹H:

Préparer, trois échantillons pour analyse RMN:CAP dans 0,5 mL du DMSO_{d6} (diméthylsulfoxyde), β -CD dans 0,5 mL du DMSO_{d6} et le dernier échantillon c'est le complexe d'inclusion (β -CD/CAP) préparer en mélangeant 0.25mL des deux solutions précédentes (CAP et DMSO_{d6}).

e) La formulation des gélules du complexe inclusion β/α -CD CAP :

Les gélules comportent une enveloppe préfabriquée constituée de 2 parties cylindriques ouvertes, à une extrémité et dont le fond est hémisphérique : la partie inférieure est nommée « corps », la partie supérieure un peu plus courte est appelée « coiffe », les deux parties(généralement à base de gélatine animale, d'origine végétale ou extraite de poissons) s'emboîtent exactement l'une dans l'autre. Le contenu des gélules est généralement solide (poudres, granulés, petits comprimés, produits pâteux...).

Il existe huit tailles de gélules en rapport avec leur volume nominal :

La masse du principe actif (PA) c'est : la masse de CAP plus de α -CD ou β -CD.

Formulation de 5 gélules par utilisation de la table de remplissage :

Formule :

Capécitabine25 mg
DiluantlactoseQSP.....1 gélule N° 2

Etapas à suivre :

Peser la quantité de PA(complexe CAP- α/β -CD) pour un lot de 5 gélules, mélanger bien le complexe CAP / α -CD ou β -CD à l'aide d'un mortier et le pilon, et mesurer sans tasser le volume apparent du principe actif **V_a** dans une éprouvette graduée. Reporter **V_{PA}** sur la table de remplissage de gélule « l'ABAQUE » et déterminer graphiquement, le numéro de gélule puis déduire le volume de diluant à ajouter **V_{diluant}**, donc la quantité du diluant est déterminée en

- Formation de film mince:

Pour la préparation de la phase lipidique, varier les proportions: de Tween 80 et le cholestérol, ont été dissous dans un solvant organique (5,3 mL chloroforme) ; ensuite éliminer sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 55°C. Donc l'obtention d'un film mince lipidique sec sur les parois de l'erlenmeyer, l'évaporation a été poursuivie pendant 1h, pour éliminer les traces du solvant organique.

- L'hydratation :

Dans cette étape, préparer déjà la solution du complexe (β -CD/CAP) des proportions différentes(2700 μ L CAP /300 μ L CD) dans l'acétonitrile et ajouter 5,3mLde la solution du complexe pour faire l'hydratation sur le film mince, le tout est soumis à une agitation pendant 1h et 30 min dans l'évaporateur rotatif dans 55°C, observer que le mélange est devenu sec, et que les vésicules sont apparues.

- Stockage des liposomes :

Les liposomes formés sont stockés à 4°C pendant une nuit dans un premier temps pour la maturation des vésicules. Les images des liposomes au cours de la préparation.

- 2^{ème} essai (*fig.22 ; page 70*) :

- Formation de film mince :

Suivre la même procédure du première essai(Hydratation film mince);sauf utilisation de 0,06g de Tween80 avec 0,04 g de cholestérol et ajouter 2mL de CH₃CN, le tout est placé dans évaporateur rotatif pour forme le film mince sous une température de 55°C, et en fixant pour la rotation60 tr/min pendant 1h.

- L'hydratation :

Après avoir, hydraté par 2mL de solution du complexe β -CD/CAP, placer le tout dans l'évaporateur rotatif pendant 1h et 30min, puis laisser au frigo à 4°C.

- 3^{ème} essai(*fig.23 ; page 70*):[24]

- Formation de film mince :

En suivant la même procédure, l'hydratation du film mince, mélanger 120 mg de Tween 80 avec 10 mg de cholestérol dans 6mL de chloroforme. Ensuite, évaporé sous pression réduite à une T=40°Cet sous une rotation à 50 tr/min pendant 1h.

- L'hydratation :

Dans cette étape, utiliser la solution de phosphate de buffer tampon pH=7,4 (PBS) avec le complexe β -CD /CAP soumis à une agitation pendant 10min, puis introduire dans le bain à ultrasons pendant 20min à une T= 37°C. Laisser murir les liposomes à température ambiante pendant 1 à 2h; suivi par un stockage à 4°C.

2. Analyse de complexe inclusion :**A. Analyse chimique :**

- a. Méthode spectrophotométrie UV-visible** a réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible *Perkin Elmer Lambda 25* à double faisceaux dans laboratoire (LASNABO) pour la formulation de complexe.
- b. Méthode spectrophotométrie UV-visible** a réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible *ZaZi de MODEL 4251/50* à double faisceaux dans (CRSP) pour l'activité anti-inflammatoire.
- c. Méthode FTIR** a réalisé à l'aide d'un appareil *Perkin Elmer Lambda 25* dans le laboratoire (LASNABO).
- d. Méthode la fluorescence** a réalisé à l'aide d'un appareil dans l'laboratoire de CATALYSE.
- e. Méthode de RMN ¹H** a réalisé sur un d'un appareil de 250 MHz à l'université de Constantine, et un spectre pour le CAP réalisé sur un appareil *magritek de 60 MHz* dans le laboratoire de CATALYSE de l'université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.
- f. L'analyse de ZETASIZER** a réalisé dans cette étude ont été effectuées laboratoire des macromolécules, de l'Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.
- g.** Les études de l'évaluation de l'activité biologique, et de Docking ont réalisé lors de notre stage au centre de recherche en sciences pharmaceutique (CRSP) à Constantine.

B. Analyse biologique:(Etude de l'effet biologique des complexes β CD-CAP)**1- Etude de l'activité anti inflammatoire des complexes :[25]****• Principe :**

Le test repose sur l'évaluation de l'effet protecteur de dénaturation de l'albumine de sérum bovin (BSA) provoquée par la chaleur (72°C).

- **Méthode :**

0.5 mL de chaque concentration des médicaments (150, 250, 500, 1000µg/mL) ou du standard (diclofénac sodique) ont été mis dans un tube stérile avec 0.5 ml de solution de BSA 0.2% préparée dans le Tris HCl (PH : 6,6 ; 1,2144g/ 200 mL de l'eau distillée).

La solution est ensuite chauffée en au bain marie, à 37 C° pendant 15 min, puis à 72°C pendant 5 min. Un volume similaire de BSA et méthanol est utilisé comme témoin.

Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition de la dénaturation} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

2- Effet des complexes sur l'angiogenèse : [26]

Le test de la membrane chorio-allantoïque de l'embryon de poulet

- **Principe :**

La membrane chorio-allantoïde embryonnaire de poulet (CAM) est un modèle pré-clinique pour étudier l'effet des molécules thérapeutiques et des produits cosmétiques sur la néovascularisation.

- **Méthode :**

Un œuf de poule fertilisé est incubé à 37°C durant quatre à sept jours, quand une ouverture est créée dans la coquille pour observer l'embryon en formation et les vaisseaux sanguins. Les œufs sont traités avec la CAP et le β-CAP au 4^{ème} jours et l'évolution est observé au 11^{ème} jour.

3- Etude de la toxicité des complexes (fig. 04; page 71) :

L'étude a été effectuée sur un groupe des souris mâles *Mus musculus*, âgées de 6 semaines, ayant un poids entre 22g et 28g. L'élevage des souris a été réalisé dans une batterie avec cages en plastiques au niveau de l'animalerie du centre de recherche en sciences pharmaceutiques, à une température ambiante et un régime alimentaire standard avec un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité. Les souris sont réparties en 3 lots, chaque lot contient 3 souris traités avec deux doses de CAP ou β-CD-CAP (11 mg et 16 mg).

- Lot contrôle
- Lot traité avec la CAP
- Lot traité avec le complexe β -CD/CAP

Après 14 jours les souris sont disséquées et le sang est prélevé pour les dosages des enzymes de toxicité hépatique.

L'aspartateaminotransférase (ASAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT)

La gamma-glutamyl transférase (GGT)

C. Analyse in-silico : (Vérification de complexe inclusion (CAP/ β -CD) par le Doking moléculaire) (lors de notre stage au CRSP de Constantine).

1. Matériel :

1.1 Un microordinateur :

1.2 Programmes et logiciels :

Autodock vina_1_1_2: <http://vina.scripps.edu/download.html/>.

Chimera software-1.11: chimera-1.11.2-mac_x11.dmg/.

Untitled.cml-Avogadro :[27]

1.3 **Bases des données :**

Protein Data Bank http : <http://www.pdb.org/>

PubChem : <https://bchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2. Méthodes :

2.1- Préparation de β -CD (récepteur) :

Comme mentionné plus haut, la structure de la β -CD a été extraite de l'entrée PDB 3CGT. Cette dernière représente la structure tridimensionnelle de la CYCLODEXTRIN

GLYCOSYLTRANSFERASE complexée avec la BETA-CYCLODEXTRINE. Elle a pour résolution 2.40 Å [28, 29].

Après ajout des atomes d'hydrogène au pH désiré (pH=7.2), la structure de la macrocycle a été objet d'une optimisation de géométrie en mécanique moléculaire par le biais du logiciel Avogadro. Cette dernière pourrait se faire aussi par le logiciel Chimera. Une fois les atomes d'hydrogène rajoutés, les charges atomiques sont assignées sur chaque atome de la macrocycle.

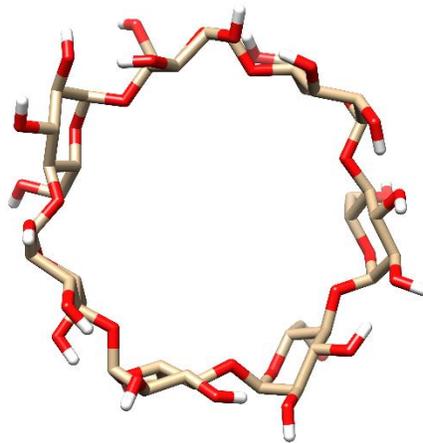


Figure IV. 1: Structure 3D de β -CD.

2.2- Préparation des ligands (Capécitabine) :

Le ligand concerné (CAPECITABINE) dans ce travail a été téléchargé de la base de données PubChem en format SDF. Le logiciel chimera a été appelé afin d'optimiser sa géométrie en mécanique moléculaire. Par la suite le ligand a été enregistré sous le format pdb.

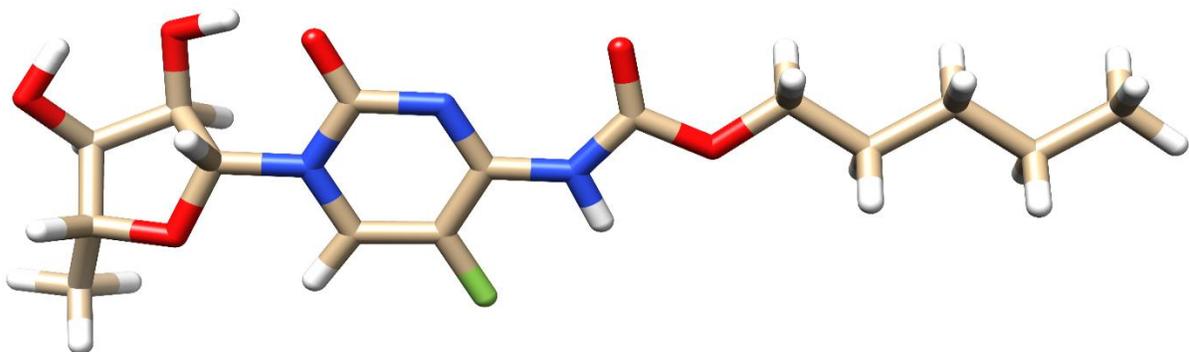


Figure IV. 2: Structure 3D de Capécitabine.

2.3-La Boite de grille (Grid BOX) :

Cette boite est une région tridimensionnelle afin de guider la recherche conformationnelle. C'est une cavité centrée principalement sur le site actif de la cible protéique en général. Elle définit un espace où toutes les conformations possible du ligand sont exploitées.

Cette boite est fragmentée en une grille tridimensionnelle régulière. Chaque point existant représente une position possible pour le centre moléculaire du ligand (invitée). Cependant, lors de la recherche conformationnelle, l'algorithme du docking évalue les différentes conformations possibles du ligand afin de trouver les meilleurs possibles, les plus favorables du point de vu énergétique en termes d'interactions et d'affinité avec la molécule hôte.

Dans notre cas, la boite de grille enveloppe toute la β -CD afin d'échantillonner tout l'espace conformationnel.

Les paramètres de la boite de grille retenus lors de la simulation sont les suivant :

$$\text{center_x} = 57.36 ; \text{center_y} = 12.02 ; \text{center_z} = 8.31$$

$$\text{size_x} = 15.22\text{\AA} ; \text{size_y} = 17.15\text{\AA} ; \text{size_z} = 16.58\text{\AA}$$

La figure suivante schématise la boite de simulation (en vert). Il est clair que la β -CD est complètement encapsulée dans la boite. Ce genre de simulations est appelé aussi blind (aveugle) docking.

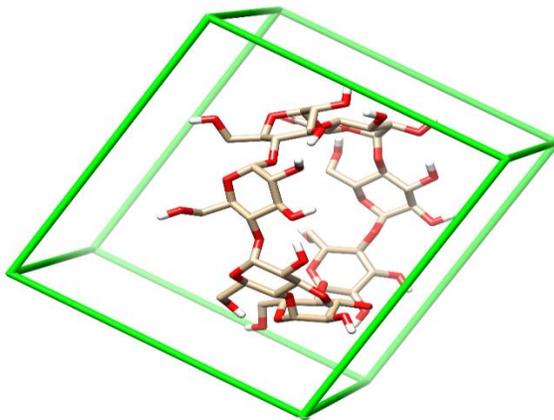


Figure IV. 3:Boite de grille (Grid Box) de simulation.

PARTIE III : Résultats et Discussions**Résultats de complexe inclusion :****A. Pour le β -CD/CAP :****1) Détermination de la complexation par UV-Visible :**

A travers les spectres suivants, le choix de la longueur d'onde max dépend de l'absorbance maximale :

[a]: $A = 4,01$; $\lambda_{max} = 240,07 \text{ nm}$; [b]: *Aucune absorbance de β -CD* ; [c]: $A = 3,39$; $\lambda = 240 \text{ nm}$

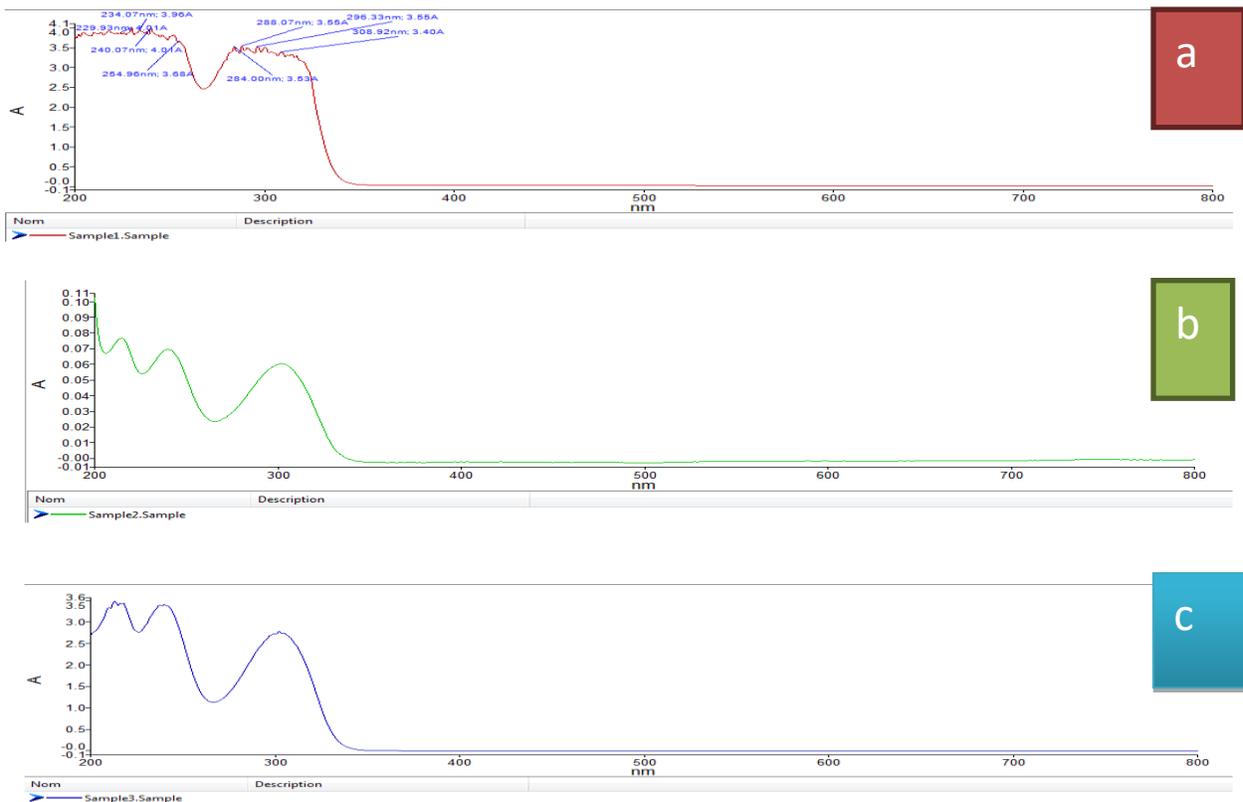


Figure V. 1: Les spectres d'absorbances UV-Visible.

[a]: le spectre d'absorbance de CAP

[b]: le spectre d'absorbance de β -CD

[c]: le spectre d'absorbance de complexe β -CD/CAP

❖ On a choisi $\lambda_{max}=240 \text{ nm}$:

a. 1^{er} essai :

1. La courbe de job : (Tableau 01 ; page.72)

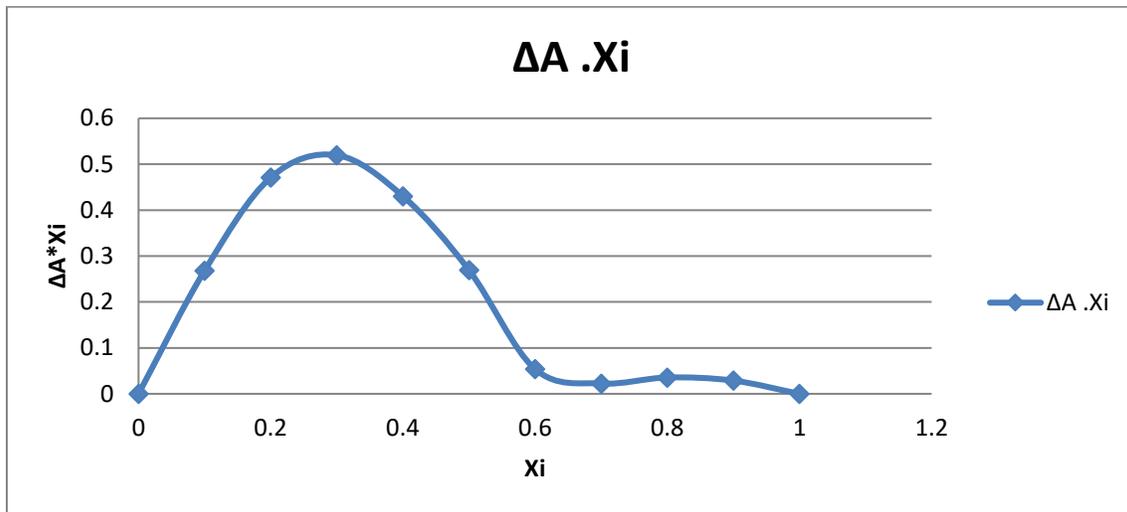


Figure V. 2: La courbe de Job de complexe β -CD /CAP.

- On a observé que $\xi=0,3$ correspond à la valeur maximale veut dire une complexation de la molécule invitée avec deux molécules de cyclodextrines. Ce qui est possible vue la durée de la complexation (l'analyse a été faite après deux jours).

2. Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand: (Tableau 02 ; page.72)

La constante de stabilité ou d'association K_a est déterminée graphiquement en traçant $1/\Delta A$ en fonction de $1/[\beta\text{-CD}]$ qui nous permis d'établir la relation qui correspond à l'équation d'une droite de type :

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{[PA] \times k_a \times \Delta \epsilon \times [CD]} + \frac{1}{[PA] \times \Delta \epsilon}$$

Avec :

ΔA : Différence d'absorption entre le principe actif complexé et le principe actif libre,

$\Delta\epsilon$: Différence du coefficient d'extinction entre le principe actif complexé et le principe actif libre.

[PA] : Concentration en principe actif.

[CD] : Concentration en CD.

L'ordonnée à l'origine donne $\Delta\epsilon$ et la constante d'association K_a est calculée à partir de la pente de la droite.

$$y = 9 \times 10^{-5}x - 1,289 \quad ; \quad \Delta\epsilon = 2790,63 \quad ; \quad K_{a(1)} = 1,4322 \times 10^4 \text{M}^{-1}$$

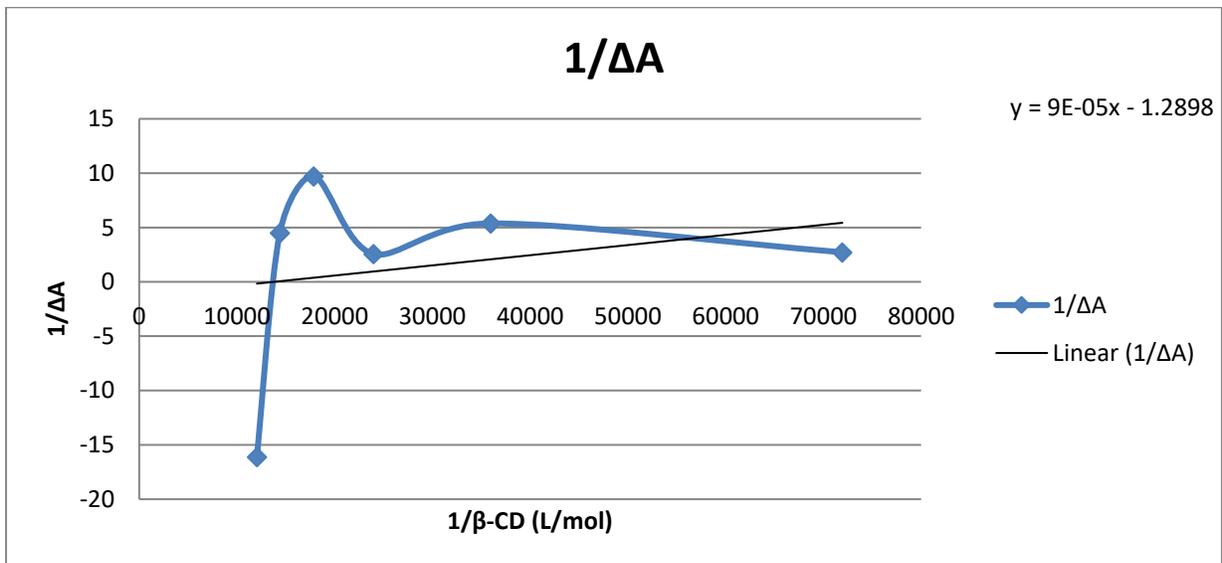


Figure V. 3: La courbe de K_a de complexe $\beta\text{-CD}/\text{CAP}$.

- Pour le complexe $\beta\text{-CD}/\text{CAP}$, on a constaté bien que les points sont d'une certaine linéarité ce qui s'explique par la formation d'un complexe d'une stabilité faible, malgré la valeur de $K_{a(1)}$ est important.
- La préparation de solution du complexe a été préparée plusieurs fois pour l'obtention d'une bonne courbe, mais sans réussite. Notre hypothèse, est que l'équilibre n'est pas atteint et la complication est un processus dynamique en solution.

b. 2^{ème} essai :

1. La courbe de job : (Tableau 03 ; page 73)

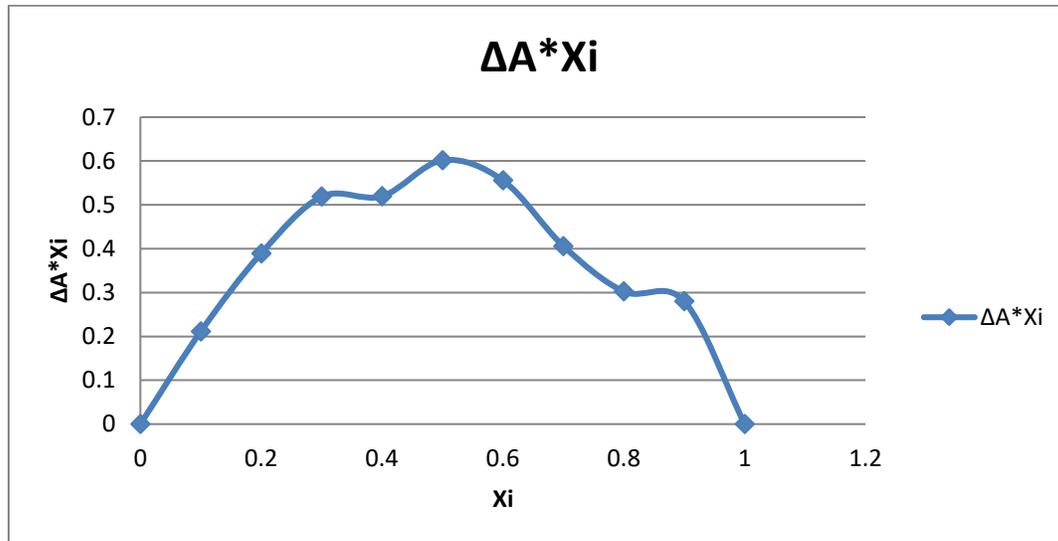


Figure V. 4: La courbe de Job pour le complexe β-CD/CAP.

- On a remarqué que la valeur maximale de Xi = 0,5; ce qui implique la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1, c'est dire qu'une molécule de β-CD a interagi avec une seule molécule invitée.
- Dans cet essai, l'analyse a été faite immédiatement après la préparation du complexe.

2. Détermination de la constante de stabilité Ka par la méthode de Benesi-Hildebrand: (tableau 04 ; page 73)

$$y = 2 \times 10^{-6} x + 1,193 \quad ; \quad \Delta\varepsilon = 9111,1192 \quad ; \quad K_{a(2)} = 5,965 \times 10^5 \text{M}^{-1}$$

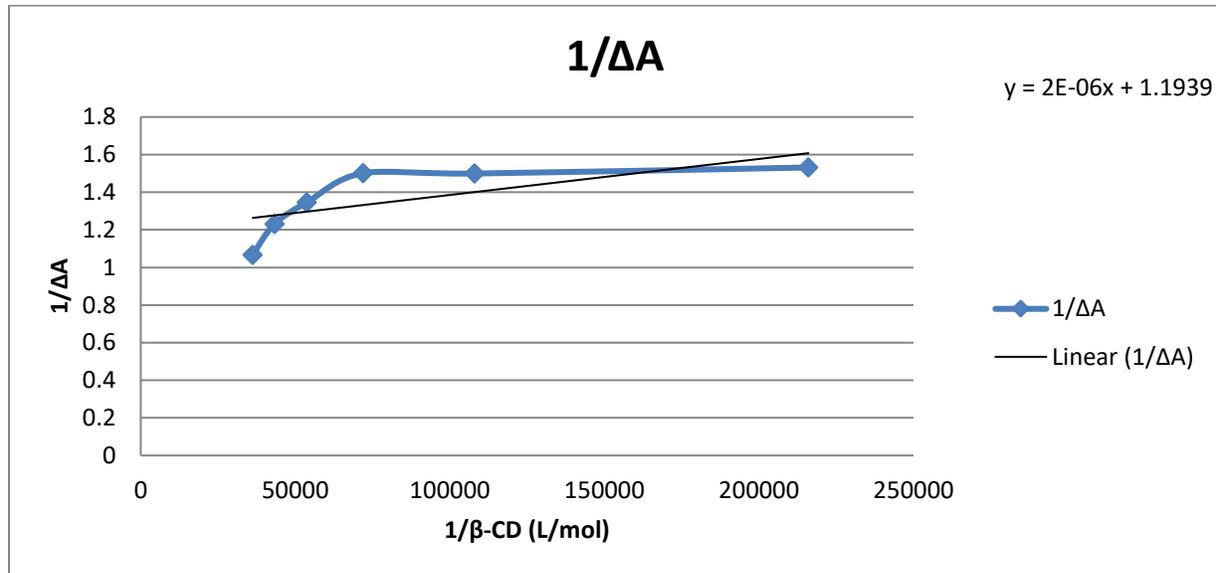


Figure V. 5: La courbe de K_a pour le complexe β -CD/CAP.

- Pour le calcul de K_a ici, on a vu bien que les points ne sont pas bien linéaires, ce qui nous a menées à dire que la molécule invitée est en échange rapide entre les deux formes libres et encapsulées. Et la valeur de $K_{a(2)}$ est importante.

c. 3^{ème} essai :

$A=1,77$; $\lambda_{max}=304 \text{ nm}$

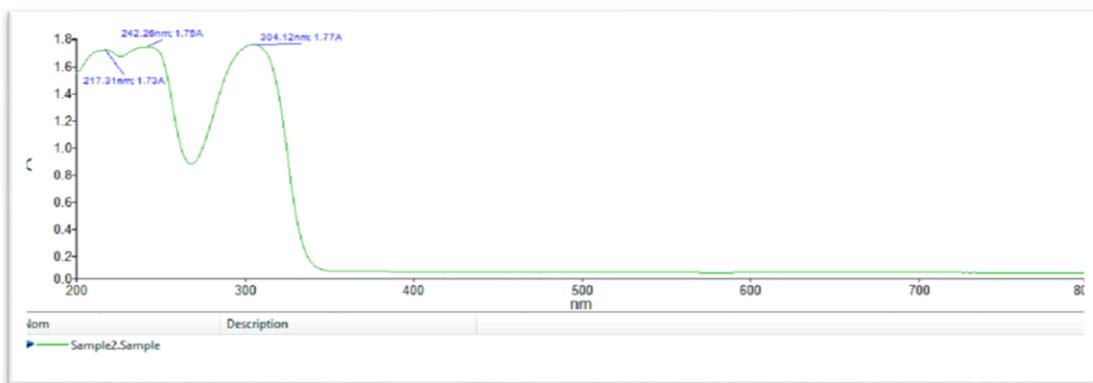


Figure V. 6: Le spectre d'absorbance de complexe β -CD/CAP.

❖ On a choisir $\lambda_{max}=304 \text{ nm}$:

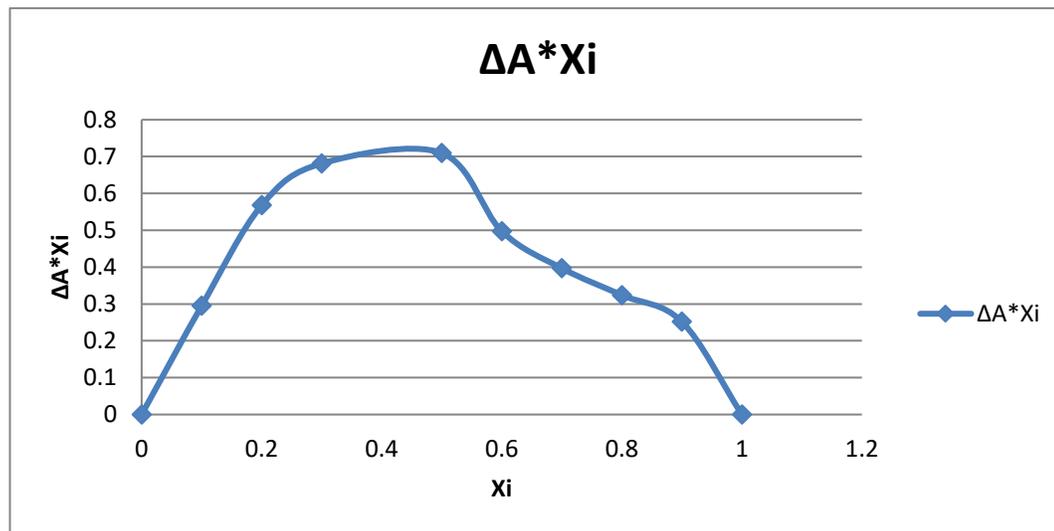
1. La courbe de job :(Tableau 05 ; page 74)

Figure V. 7: La courbe de Job de complexe β -CD/CAP à $\lambda = 304$ nm.

- On a observé que la valeur maximale de $X_i = 0,5$, ce qui implique la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1, c'est dire qu'une molécule de β -CD a interagi avec une seule molécule invitée.

2. Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand:
(Tableau 06 ; page 74)

$$y = -2 \times 10^{-6} x + 6,387 \quad ; \quad \Delta \varepsilon = 563,19; \quad K_{a(3)} = 3,193 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$$

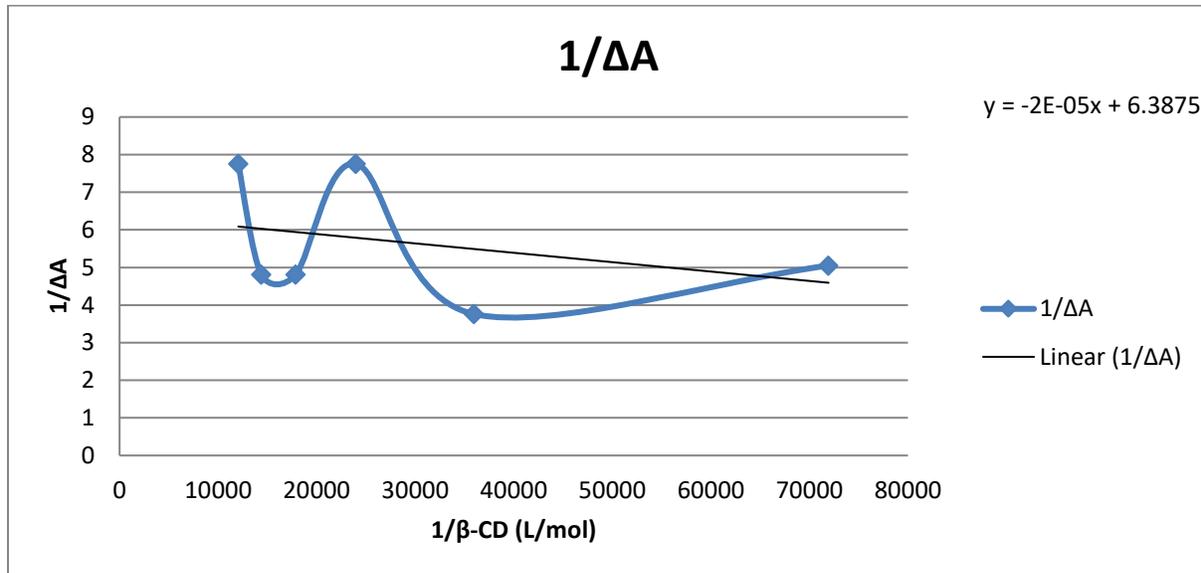


Figure V. 8: La courbe de K_a pour le complexe $\beta\text{-CD}/\text{CAP}$.

- On a constaté bien que les points sont d'une certaine linéarité, ce qui s'explique par le processus dynamique du complexe; mais la valeur de $K_{a(3)} = 3,193 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ est importante
- ❖ D'après les résultats des K_a on a remarqué que le $K_{a(3)}$ est le plus grand c à d le plus stable pour former le complexe inclusion, et plus on a obtenu la stœchiométrie 1:1. Et on a conclu que le temps joue un rôle très important lors de la détermination de la stœchiométrie du complexe inclusion.

2) Détermination de la complexation par FTIR :

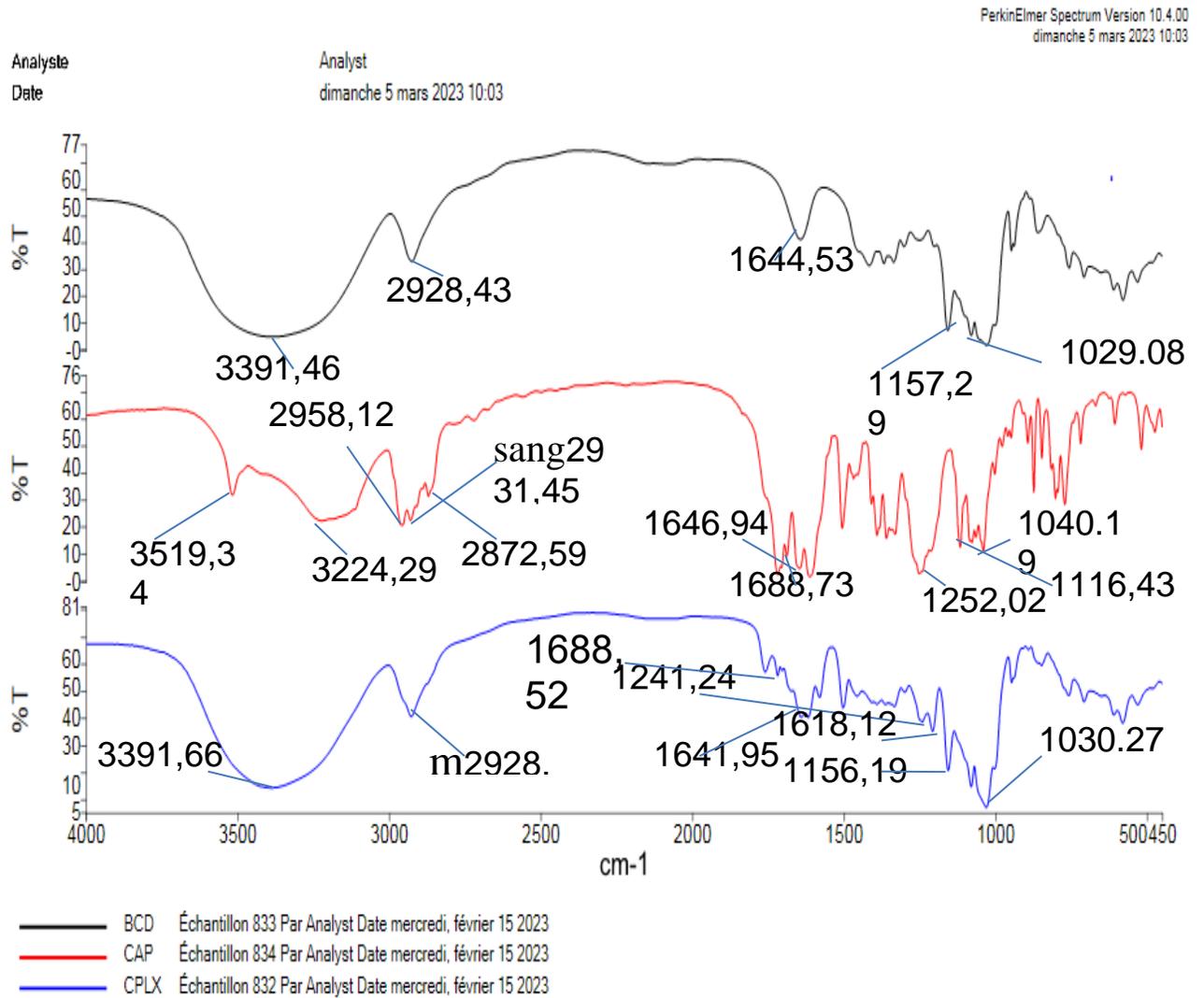


Figure V. 9: Les spectres de FTIR pour (β -CD; CAP; β -CD/CAP).

Tableau 1: L'interprétation des spectres de FTIR de complexe β -CD/CAP

Liaisons	Nombre d'onde (cm^{-1})		Nombre d'onde (cm^{-1})
	β -CD	CAP	β -CD/CAP
Alcool O-H	3391,46	3224,29	3391,66
Alcane $-\text{CH}_2$	2928,43		2928,85
H-O-H	1644,53		1618,12
C-O-C	1157,29	1116,43	1156,19
C-O	1029,08		
N-H Amine secondaire ou amides		3519,34	
C-H ₃		2872,59	
-C=O Amide (carbonyle de pyrimidine)		1688,73	1688,52
-C-H alcanes, cycloalcanes		2931,45 et 2958,12	
-C=C		1646,94	1641,94
C-N		1252,02	1242,24
C-F		1116,43	1030,27

Les résultats de l'infrarouge, prouvent bien la formation du complexe d'inclusion, car les valeurs et la forme des ondes des vibrations des différentes liaisons ont subi un changement.

3) *Vérification de l'encapsulation de complexe β -CD/CAP :*

Figure V. 10: Le spectre d'absorbance de CAP dans le méthanol à $\lambda_{max}=309,95$ nm.

Tableau 2: Les différents essais pour tracer la courbe d'étalonnage

Essais	V (CAP) mL	[CAP] mol/L ($\times 10^{-4}$)	A ($\lambda_{max}= 309$ nm)
1	0,2	0,384	0,091
2	0,4	0,768	0,307
3	0,6	1,152	0,480
4	0,8	1,536	0,957
5	1	1,92	1,238
6	1,2	2,30	1,700
7	1,4	2,6	1,805
8	1,6	3,072	1,924
9	1,8	3,45	2,572
10	2	3,84	2,568

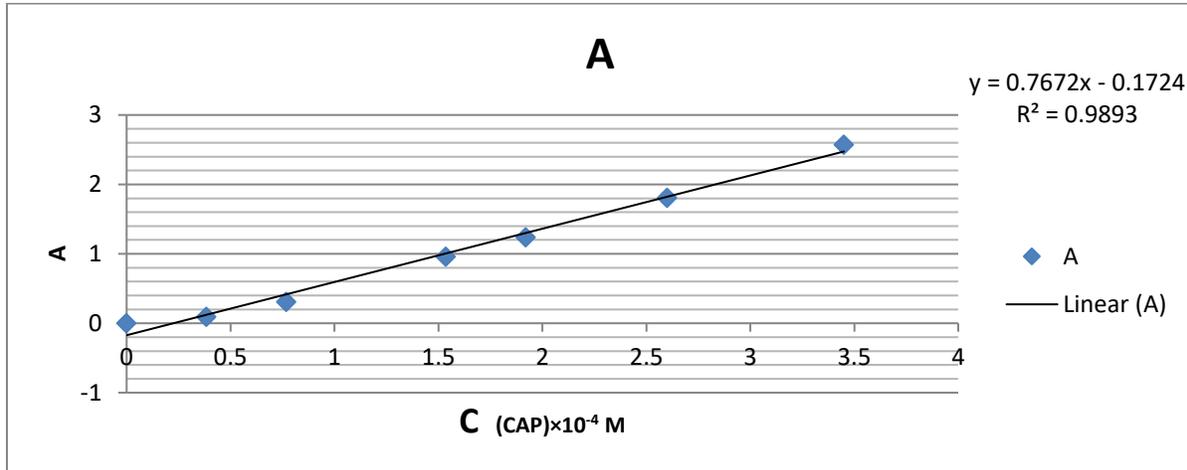


Figure V. 11: La courbe d'étalonnage de CAP dans le méthanol.

- 1^{er} essai : $EE\% = \frac{C_e}{C_i} \times 100 = \frac{3.55 \times 10^{-4}}{7 \times 10^{-4}} \times 100$; $EE\% = 50,71\%$
- 2^{ème} essai : $EE\% = \frac{C_e}{C_i} \times 100 = \frac{2.525 \times 10^{-4}}{4.375 \times 10^{-4}} \times 100$; $EE\% = 57,71\%$

1) Détermination de complexation par la fluorescence :

- On a remarqué que $\lambda_{\max} = 330.6\text{nm} (\pm 21) > \lambda_{\max} (\text{UV-Visible}) = 309,45\text{nm}$

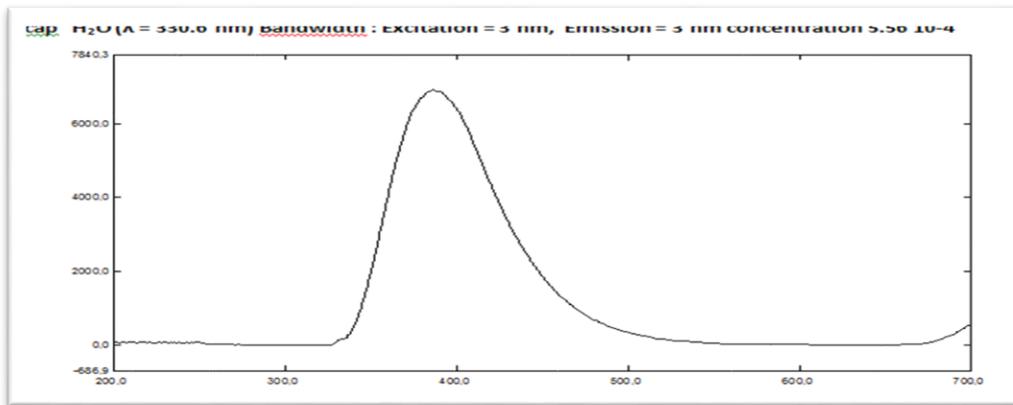


Figure V. 12: Le spectre de fluorescence de CAP dans l'eau.

Il est à noter, que pour faire l'analyse on a utilisé les mêmes solutions de UV-Visible de complexe β -CD/CAP.

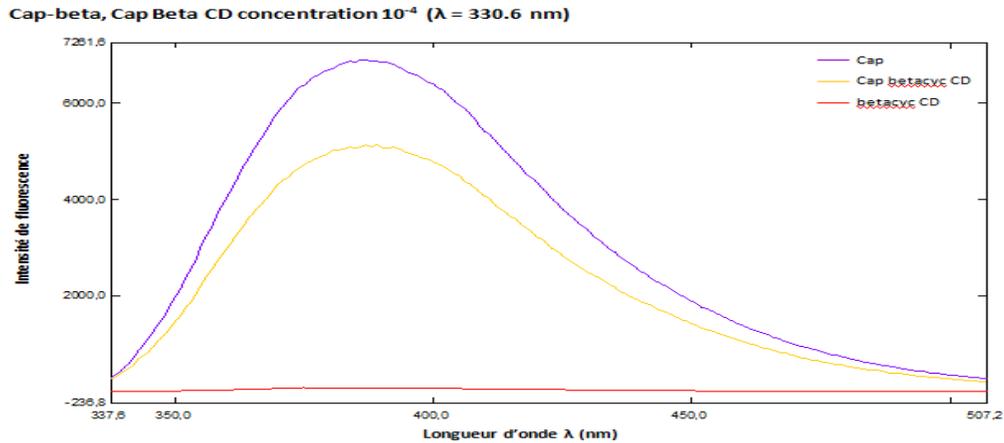


Figure V. 13: Les spectres de fluorescence de CAP; β -CD; Complexe inclusion.

- On a observé que l'intensité de la fluorescence pour le complexe CAP/CD a diminué par rapport au spectre de fluorescence du CAP libre, ce qui prouve bien son inclusion dans la cavité de (β -CD).

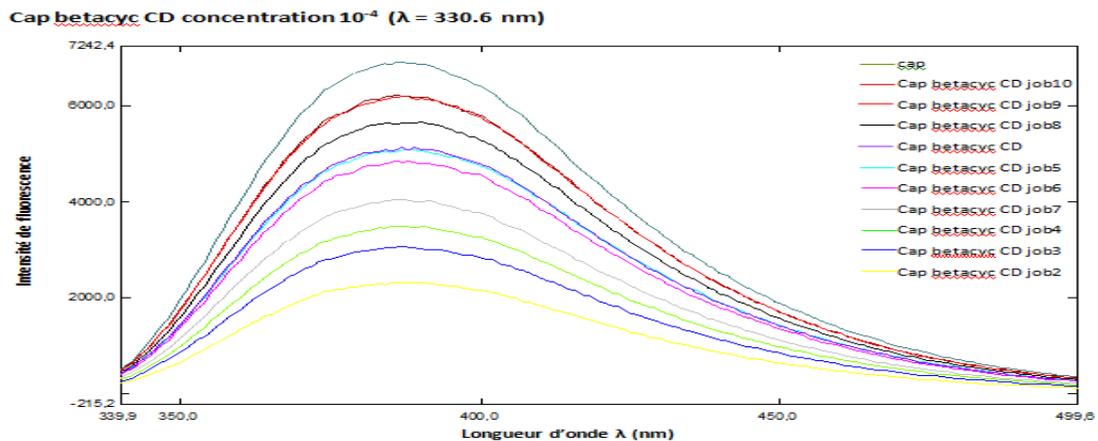


Figure V. 14: Les spectres de fluorescence de complexe inclusion des différentes concentration.

- On a remarqué quand la concentration du CAP est élevée, ce qui augmente les intensités de fluorescence.

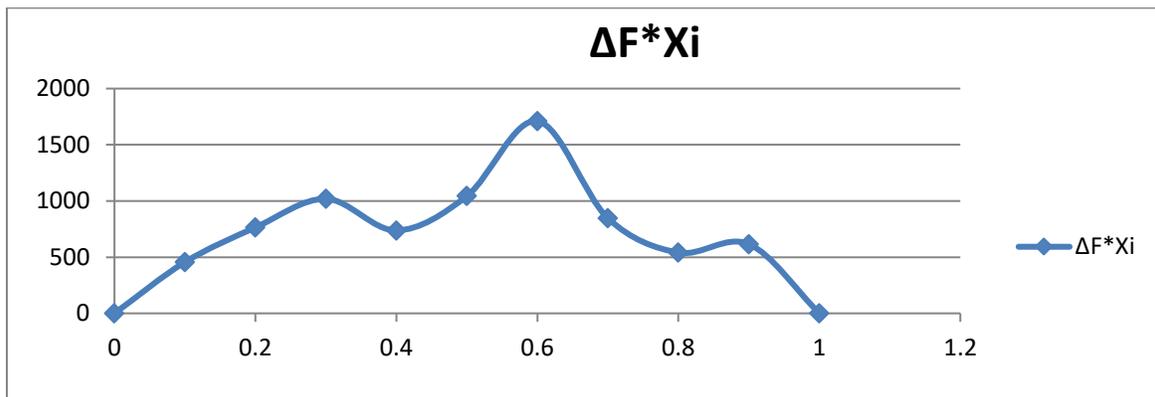
i. La courbe de job par la fluorescence : (Tableau 07 ; page 75)

Figure V. 15: La courbe de Job de complexe β -CD/CAP par la fluorescence.

- On a remarqué que le complexe le prédominant est de type 3:2 correspondant au rapport de $X_i=0,6$.

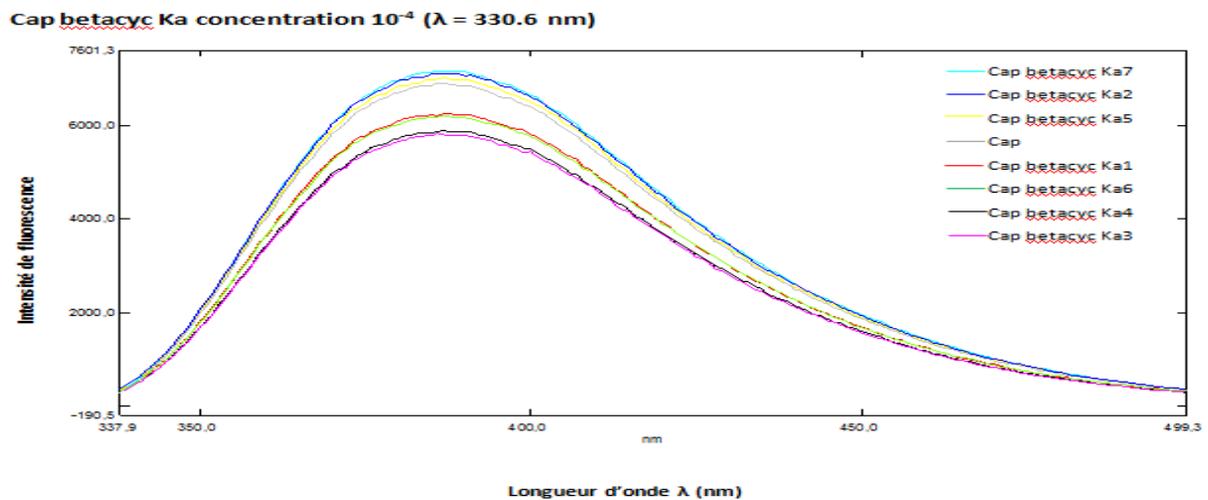


Figure V. 16: Les spectres de fluorescence le CAP ($2,78 \times 10^{-5} M$) avec des solutions de β -CD des différentes concentrations ($1,39 ; 2,78 ; 4,17 ; 5,6 ; 6,9 ; 8,3 ; 0$) $\times 10^{-5} M$.

ii. La constante de stabilité Ka :(Tableau 08 ; page 75)

$$Y=2 \times 10^{-8}x+0,004 \quad ; \quad \Delta\varepsilon = 89,928 \times 10^4 \quad ; \quad K_a=20,001 \times 10^4 \text{M}^{-1}$$

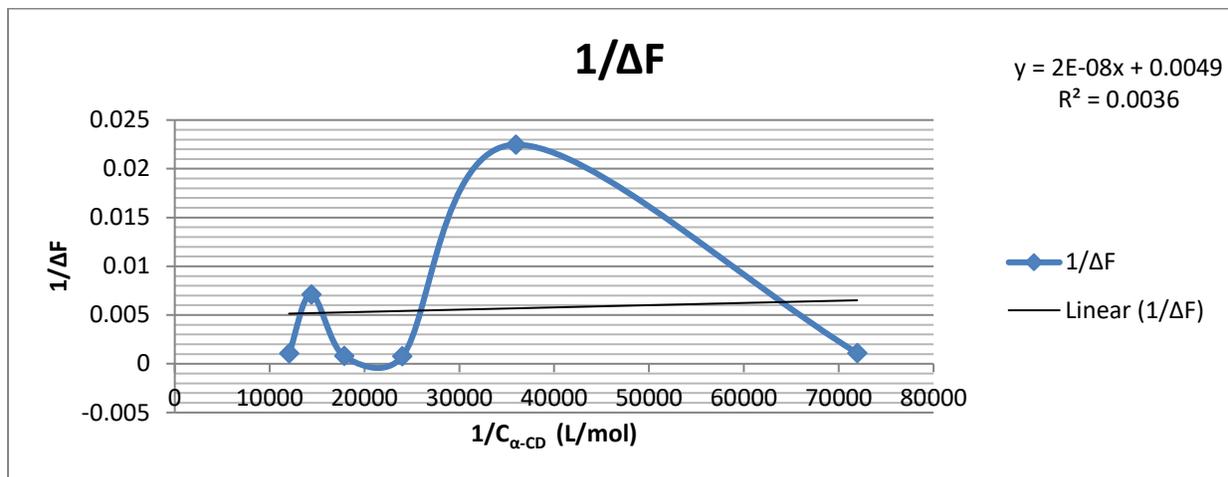
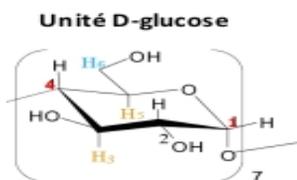


Figure V. 17: La courbe de K_a de complexe β -CD/CAP.

- On a remarqué que les points pas linéaire c.à.d. le complexe n'est pas bien stabilisé mais la valeur de K_a est importante. Ce résultat est négatif.

2) Identification des molécules par analyse des spectres RMN ^1H :

$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{42}$:

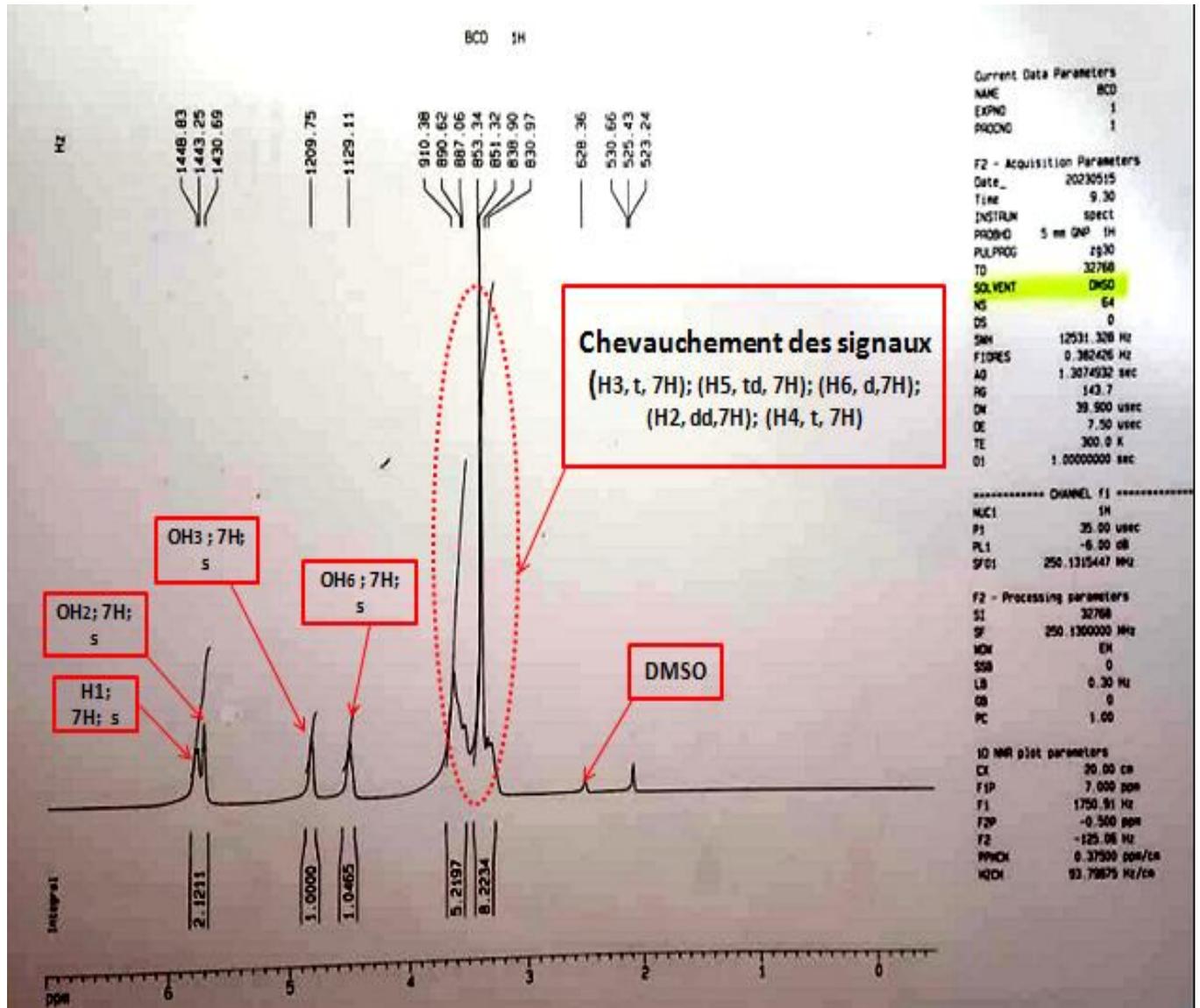


Figure V. 18: Le spectre de RMN ^1H de β -CD.

RMN ^1H (250 MHz, DMSO δ) : 5,80 (s,H1,7H) ; 5,70 (s, OH2), 4,82 (s, OH3),4,50 (s, OH6), 3,2-3,8 (m, ,(H₂,H₃,H₄,H₅,2H₆)^{I-VIII},28H).

Le chevauchement des signaux car l'analyse effectuée sur un appareil bruker 250 MHz.

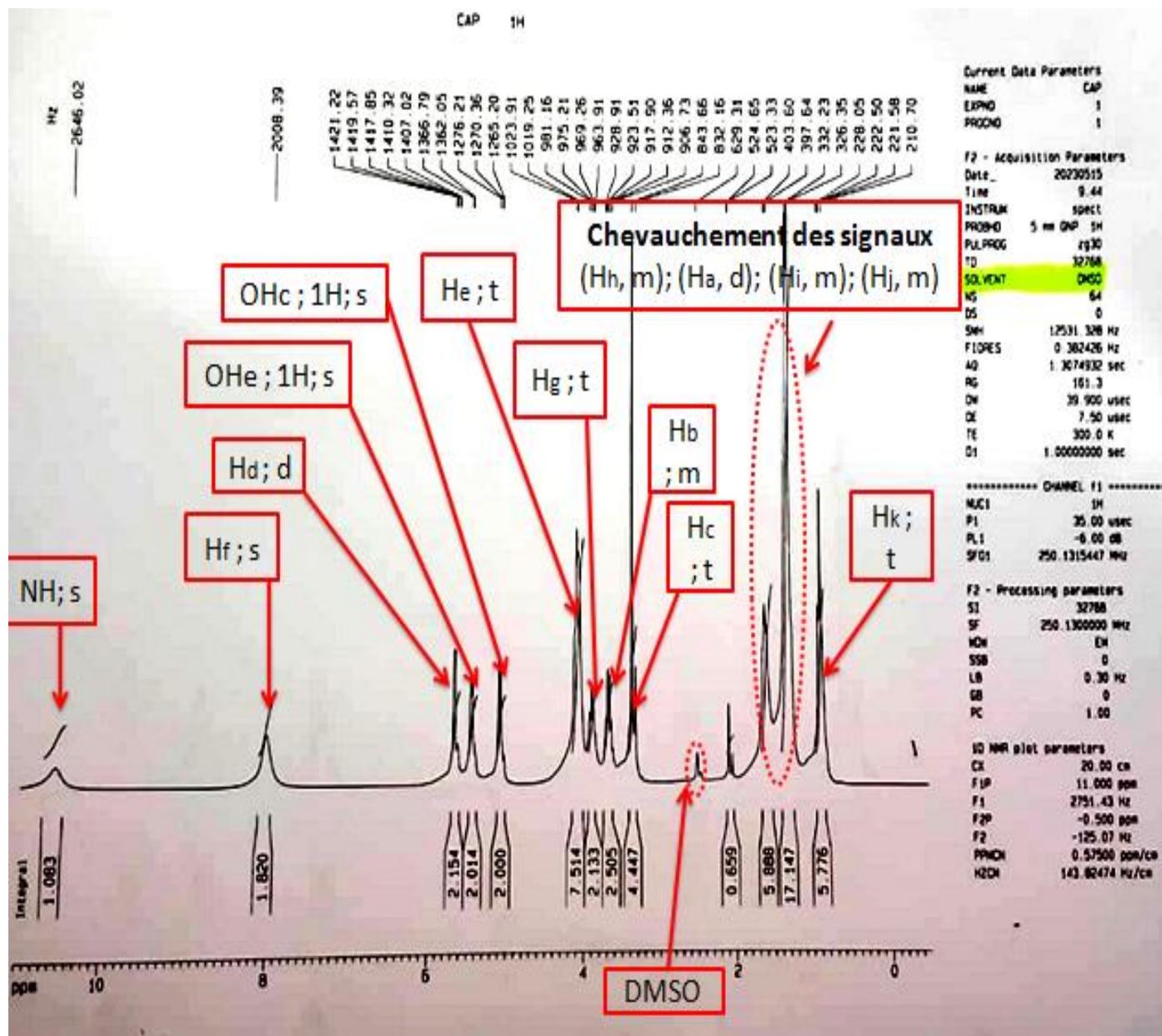
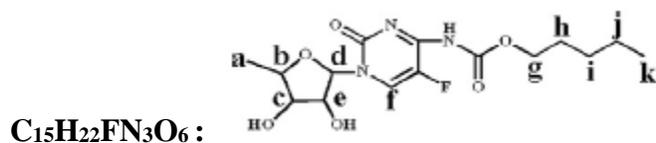


Figure V. 19: Le spectre de RMN 1H de CAP.

RMN 1H (250 MHz, DMSO δ) : 10,6 (s, 1H) ; 8 (s, 1H) ; 5,7(d, 1H) ; 5,49 (s, 1H) ; 5,10 (s, 1H) ; 4,1 (t, 1H) ; 3,9 (t, 2H) ; 3,6 (m,1H) ; 3,4 (t,1H) ; 1,6 (m, 2H) ; 1,4 (d, 3H) ; 1,3 (m, 2H) ; 1,2 (m, 2H) ; 0,9 (t, 3H).

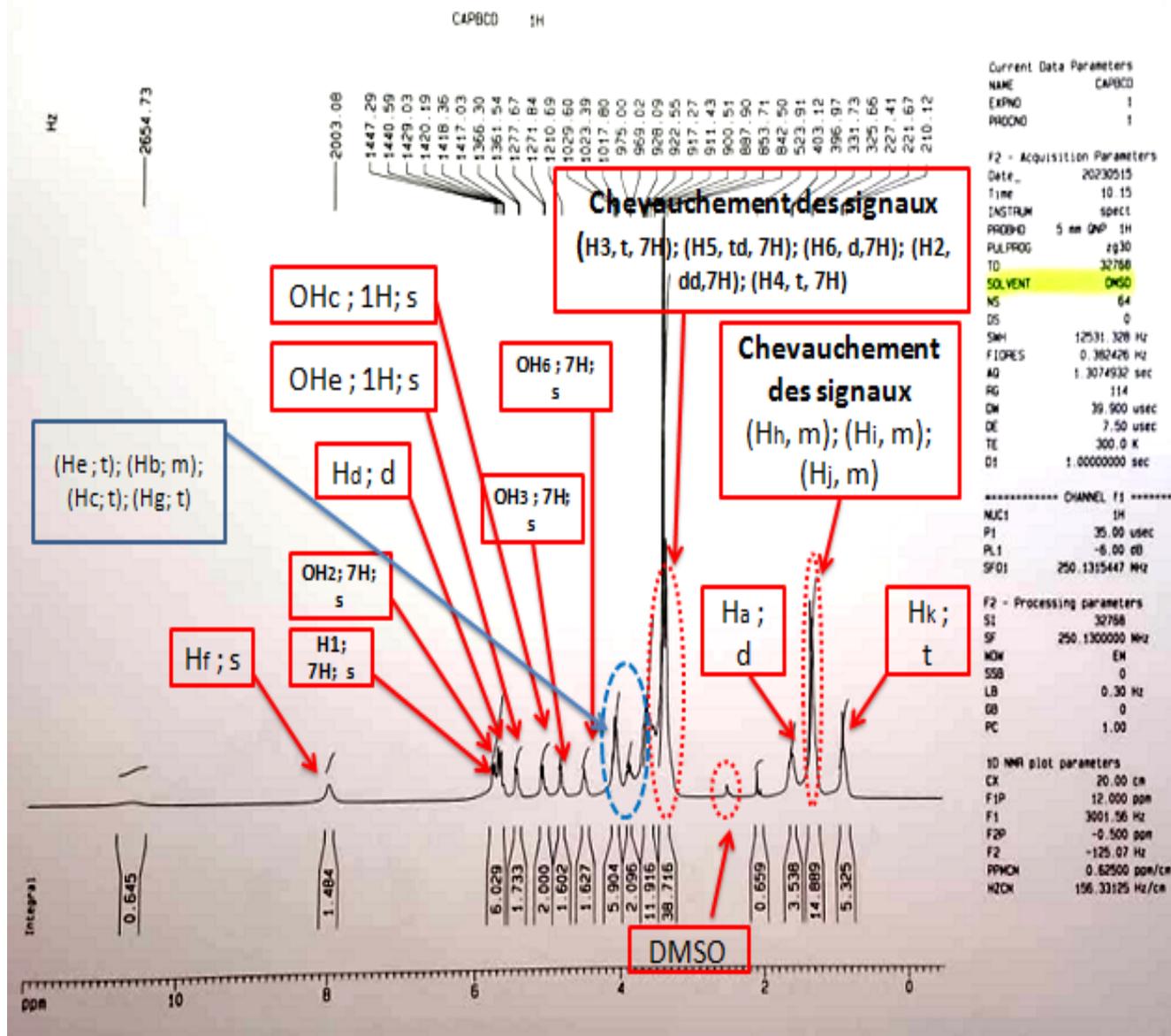


Figure V. 20: Le spectre de RMN ¹H de complexe inclusion (β-CD/ CAP).

RMN ¹H(250 MHz, DMSO δ) : 8 (s, 1H) ; 5,8 (s,7H) ; 5,77 (s,7H);5,70 (d, 1H) ;5,44 (s, 1H) ;5,10 (s, 1H) ; 4,82 (s, 7H) ; 4,50 (s, 7H) ; 4,1 (t, 1H) ; 4,09 (m, 1H) ;4,07 (t,1H) ; 3,9 (t, 2H) ;3,70 (t, 7H) ; 3,6 (t d, 7H) ; 3,5 (d, 7H) ; 3,4 (d d, 7H) ; 3,3 (t,7H) ; 1,6 (d, 3H) ; 1,4 (m, 2H) ; 1,3 (m, 2H) ; 1,2 (m, 2H) ; 0,8 (t, 3H).

Tableau 3: L'interprétation des spectres RMN ^1H de complexe $\beta\text{-CD/CAP}$

$\beta\text{-CD}$	CAP	$\beta\text{-CD/CAP}$
5,80 (s, H1, 7H)		5,8 (s, 7H)
5,70 (s, OH2)		5,77 (bosse, 7H)
4,82 (s, OH3)		4,82 (s, 7H)
4,50 (s, OH6)		4,50 (s, 7H)
3,2-3,8 (m)	(7H) (H3)	3,70 (t, 7H)
	(7H) (H5)	3,6 (t d, 7H)
	(7H) (H6)	3,5 (d, 7H)
	(7H) (H2)	3,4 (d d, 7H)
	(7H) (H4)	3,3 (t, 1H)
	10,6 (s, 1H) (NH)	10,6 (s, 1H) (NH)
	8 (s, 1H) (Hf)	8 (s, 1H)
	5,7(d, 1H) (Hd)	5,7(d, 1H)
	5,49 (s, 1H) (OHe)	5,44 (s, 1H)
	5,10 (s, 1H) (OHc)	5,10 (s, 1H)
	4,1 (t, 1H) (He)	4,1 (t, 1H)
	3,9 (t, 2H) (Hg)	3,9 (t, 2H)
	3,6 (m, 1H) (Hb)	4,09 (m, 1H)
	3,4 (t, 1H) (Hc)	4,07 (t, 1H)
	1,6 (m, 2H) (Hh)	1,4 (m, 2H)
	1,4 (d, 3H) (Ha)	1,6 (d, 3H)
	1,3 (m, 2H) (Hi)	1,3(m, 2H)
	1,2 (m, 2H) (Hj)	1,2 (m, 2H)
	0,9 (t, 3H) (Hk)	0,8 (t, 3H)

D'après l'interprétation des (*figures 18; 19; 20*) on a remarqué un déplacement des signaux (H3; H5; Hb; Hc; Hh; Ha), indique il y a une formation de complexe inclusion.

B. Pour le complexe α -CD/CAP :

1-Détermination de la complexation par UV-Visible :

- On a suivi les mêmes procédures que le complexe de β -CD/CAP

A travers les spectres suivants, le choix de la longueur d'onde max dépend de l'absorbance maximale :

[a]: $A = 3,94$; $\lambda = 240,50 \text{ nm}$; [b]: *Aucune absorbance de α -CD* ; [c]: $A = 1,71$; $\lambda = 303 \text{ nm}$

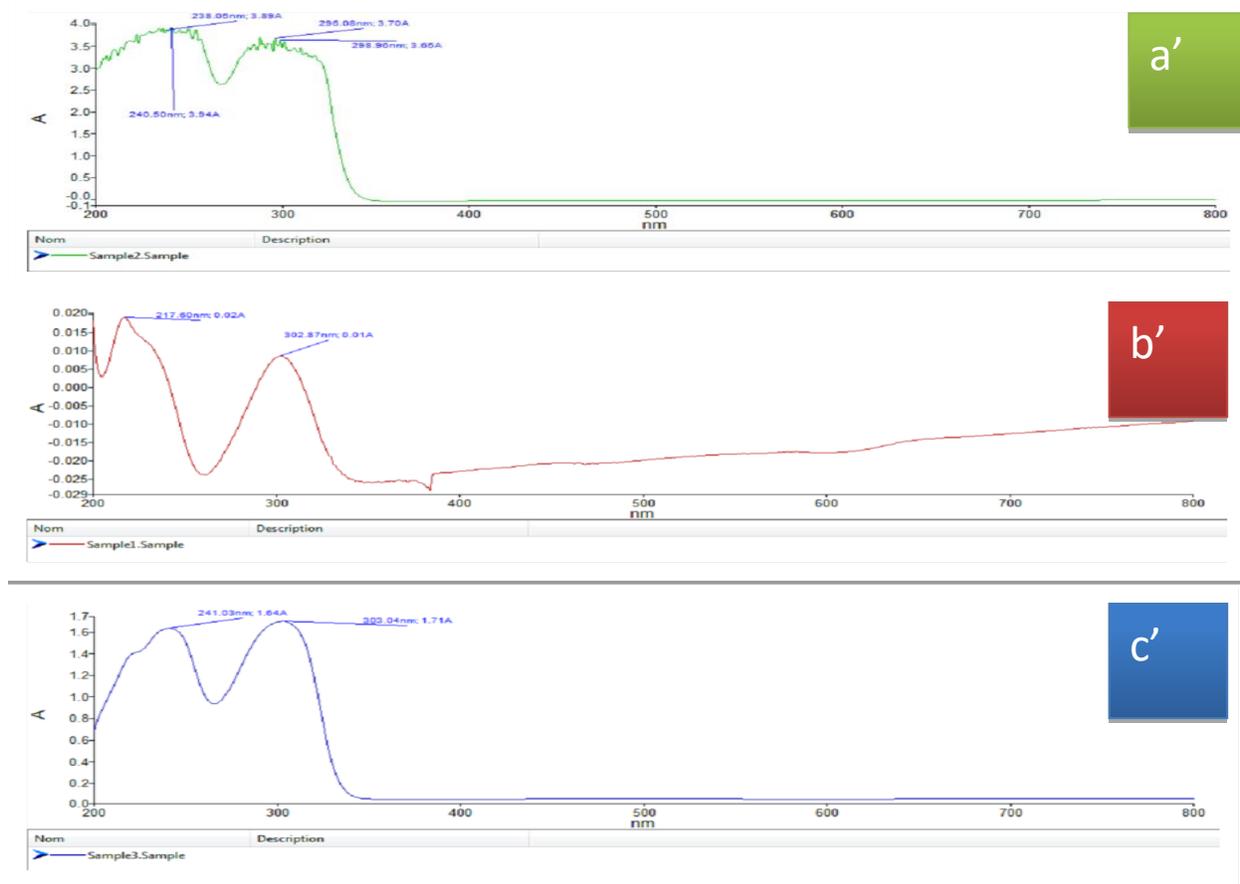


Figure V. 21: Les spectres d'absorbances UV-Visible.

[a']: le spectre d'absorbance de CAP

[b']: le spectre d'absorbance de α -CD

[c']: le spectre d'absorbance de complexe α -CD/CAP

❖ On a choisir $\lambda_{max}=241 \text{ nm}$:

a. 1^{er} essai :

1) La courbe de job : (Tableau 09 ; page 76)

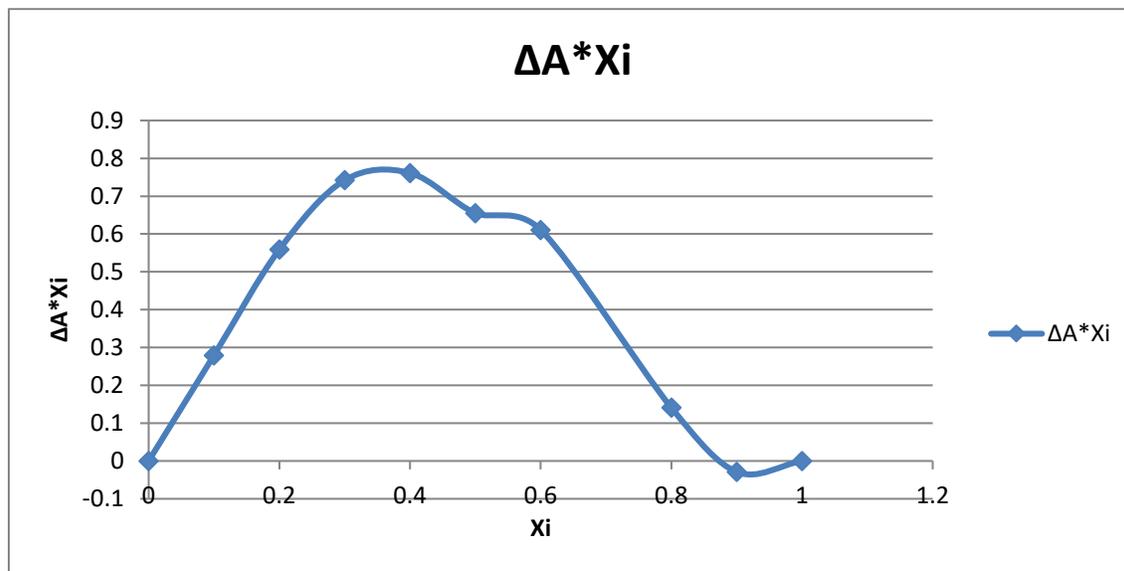


Figure V. 22: La courbe de Job de complexe α -CD/CAP.

- On a observé que $\text{Xi} = 0,4$ correspond à la valeur maximale. On a suggéré, que le temps d'équilibre de complexation n'est pas atteint encore.

2) Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand :
(Tableau 10 ; page 76)

$$Y_1 = -6 \times 10^{-5} x + 6,541 \quad ; \quad \Delta \varepsilon = 549,93 \quad ; \quad K_{a1} = 1,09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

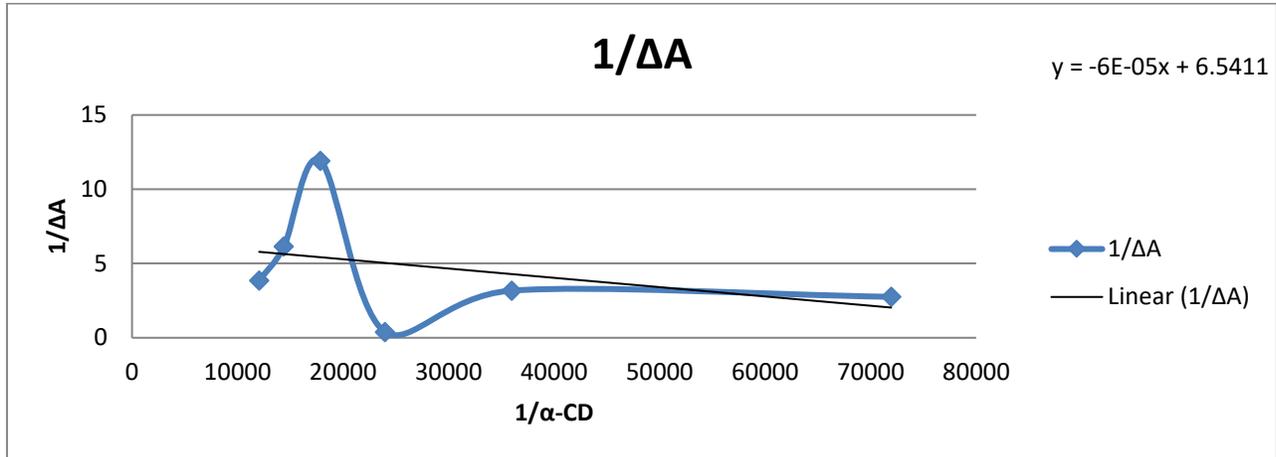


Figure V. 23: La courbe de K_a de complexe α -CD/CAP.

- Dans ce cas on a vu que les points sont d'une certaine linéarité, ce qui implique le processus dynamique de la complexation de $K_{a1} = 1,09 \times 10^5 M^{-1}$ est important.

b. 2^{ème} essai : (après une durée de " 15 jours ") :

1. La courbe de job : (Tableau 11 ; page 77)

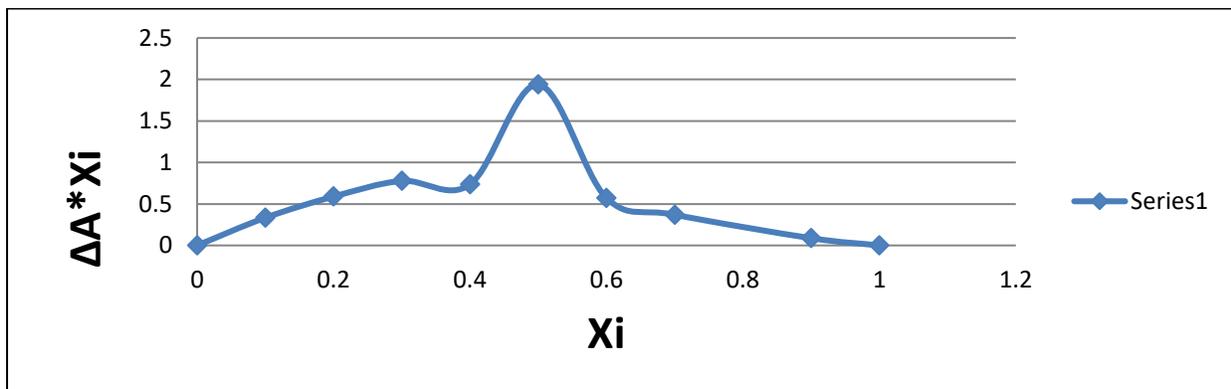


Figure V. 24: La courbe de Job de complexe α -CD/CAP.

- On a vu que $X_i = 0,5$ correspond à la valeur maximale, ce qui implique la formation d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1

La stœchiométrie de complexe a une relation avec le temps c. à. d plus on a laissé le complexe pendant une longue période, plus l'équilibre est élevé. Et l'obtention d'une courbe homogène est obtenue. Ce qui est en accord avec la littérature.

2. Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand :
 (Tableau12 ; page.77)

$Y_2 = 1 \times 10^{-5} x + 2.427$; $\Delta \epsilon = 1482,13$; $K_{a2} = 2,43 \times 10^5 M^{-1}$

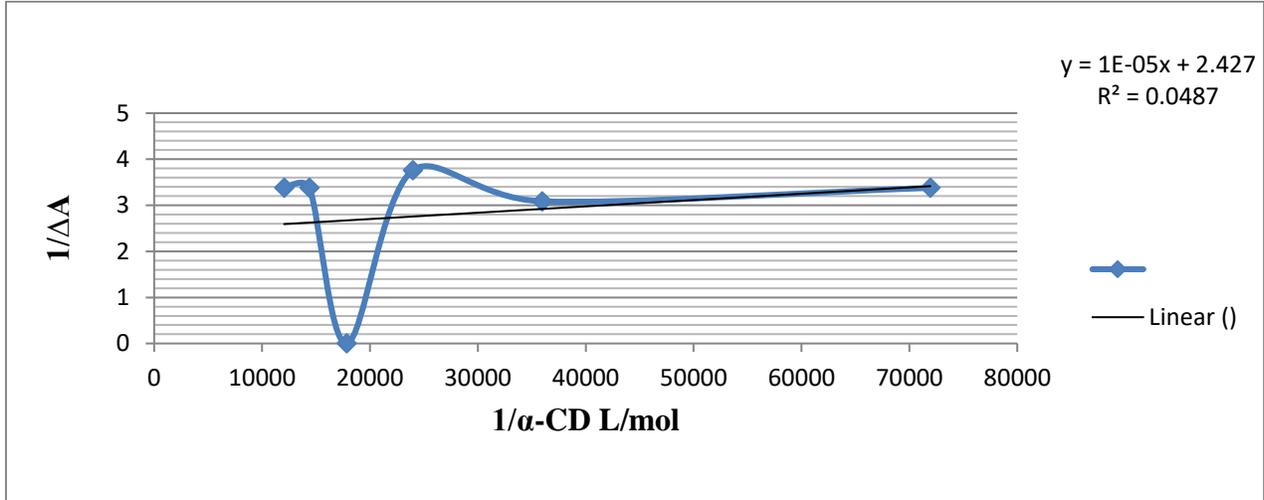


Figure V. 25: La courbe de K_a pour le complexe α -CD/CAP à $\lambda = 241$ nm.

- On a bien vu que les points ne sont pas bien linéaires. La valeur de $K_{a2} = 2,43 \times 10^5 M^{-1}$.

c. 3^{ème} essai:

❖ On a choisit $\lambda_{max} = 303$ nm :

1. La courbe de job : (Tableau 13 ; page 78)

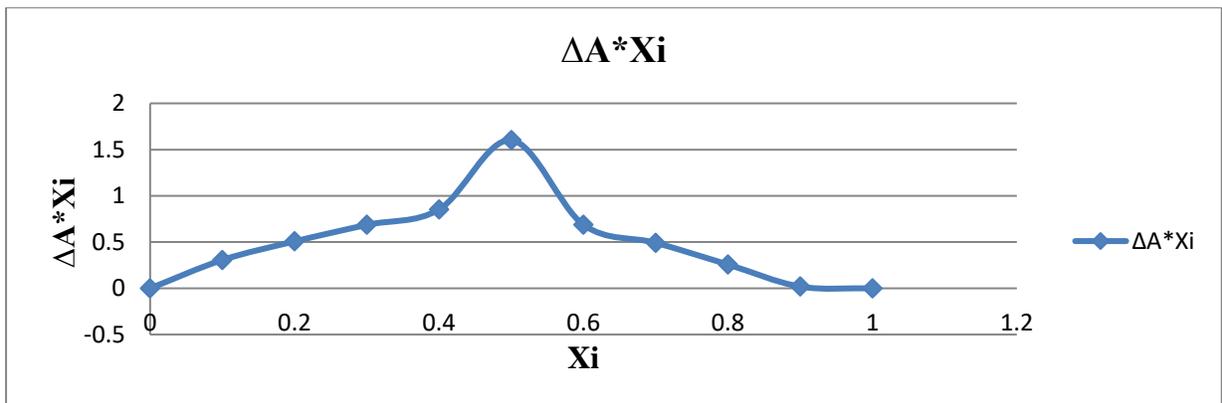


Figure V. 26: La courbe de Job de complexe α -CD/CAP.

- On a remarqué que la valeur maximale de $X_i = 0,5$; ce qui a impliqué la formation d'un complexe de stœchiométrie 1 :1.

❖ On a vu que les résultats du 2^{ème} essai sont les meilleurs et même pour la valeur de K_a .

2-Détermination de la complexation par FTIR :

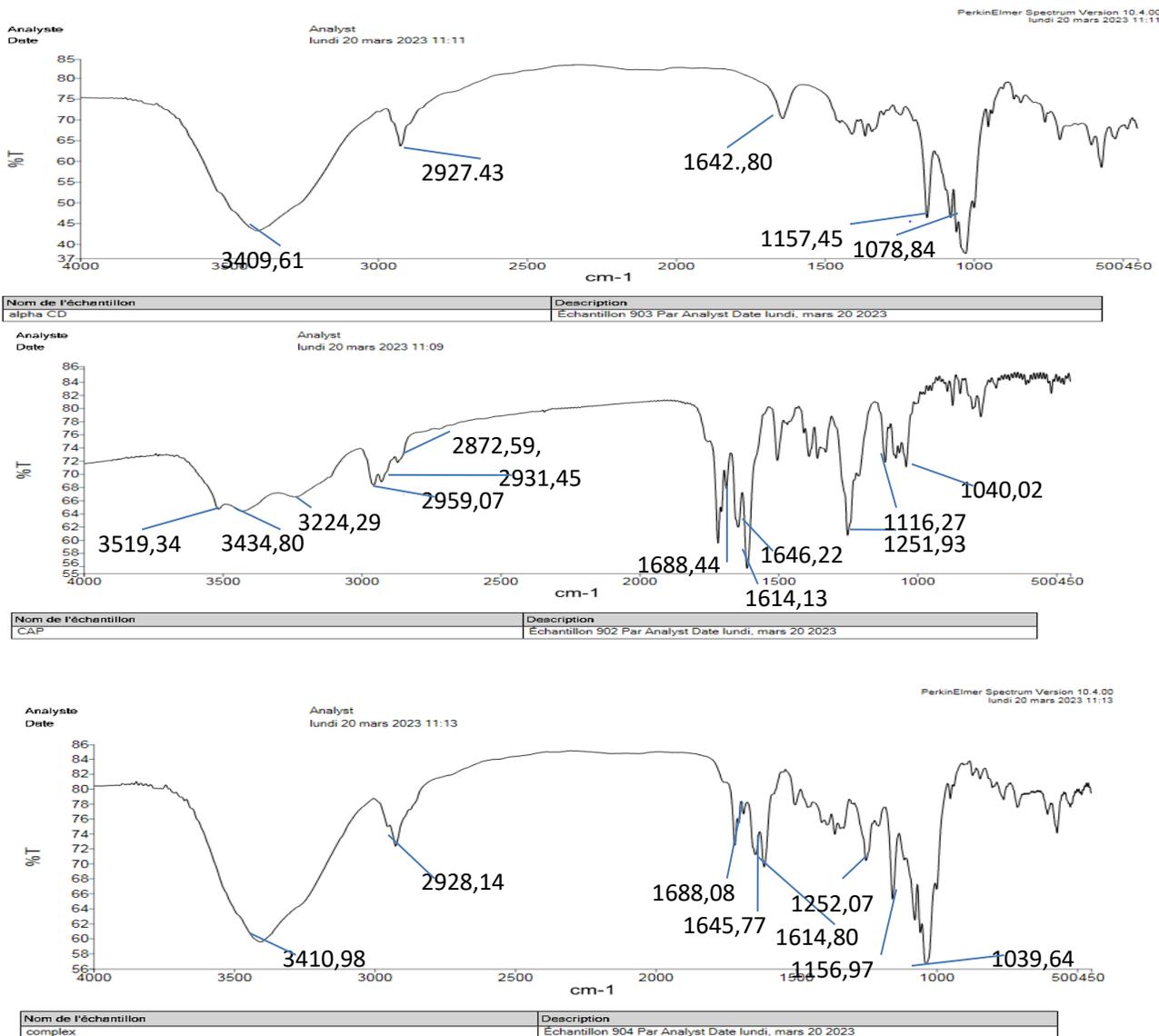


Figure V. 27: Les spectres de FTIR pour (α -CD; CAP; α -CD/CAP).

Tableau 4: L'interprétation des spectres de FTIR de complexe β -CD/CAP

Liaisons	Nombre d'onde (cm^{-1}) α -CD	Nombre d'onde (cm^{-1}) CAP	Nombre d'onde (cm^{-1}) α -CD / CAP
Alcool O-H	3409,61	3224,29	3410,95
Alcane $-\text{CH}_2$	2927 ,43		2928,14
H-O-H	1642,80		1614,80
C-O-C	1157,45	1116,27	1156,97
C-O	1078,84		
N-H Amine secondaire ou amides		3519,34	
C-H ₃		2959 ,07	
-C=O Amide (carbonyle de pyrimidine)		1688,44	1688,08
-C-H alcanes cycloalcanes		2931,45 et 2958,12	
-C=C		1646,22	1645,77
C-N		1251,93	1252,07
C-F		1040,02	1039,64

Le résultat de l'étude IR, prouve bien la formation du complexe, vue le changement dans l'intensité et la forme des bandes. Cependant, seule la RMN 2D, peut nous confirmer quelle est la partie exacte du CAP incluse à l'intérieur de la cavité.

3-Vérification de l'encapsulation de complexe α -CD/CAP :

Les mêmes étapes de complexe β -CD /CAP

Tableau 5: Les différents essais pour tracer la courbe d'étalonnage

Essais	V (CAP) mL	[CAP]mol /L ($\times 10^{-4}$)	A ($\lambda_{\max}=309$ nm)
1	0,25	0,465	0,753
2	0,5	0,93	1,232
3	0,75	1,395	0,695
4	1	1,86	0,038
5	1,25	2,325	2,793
6	1,5	2,79	2,353
7	1,75	3,255	3,168
8	2	3,72	3,344
9	2,25	4,185	3,52

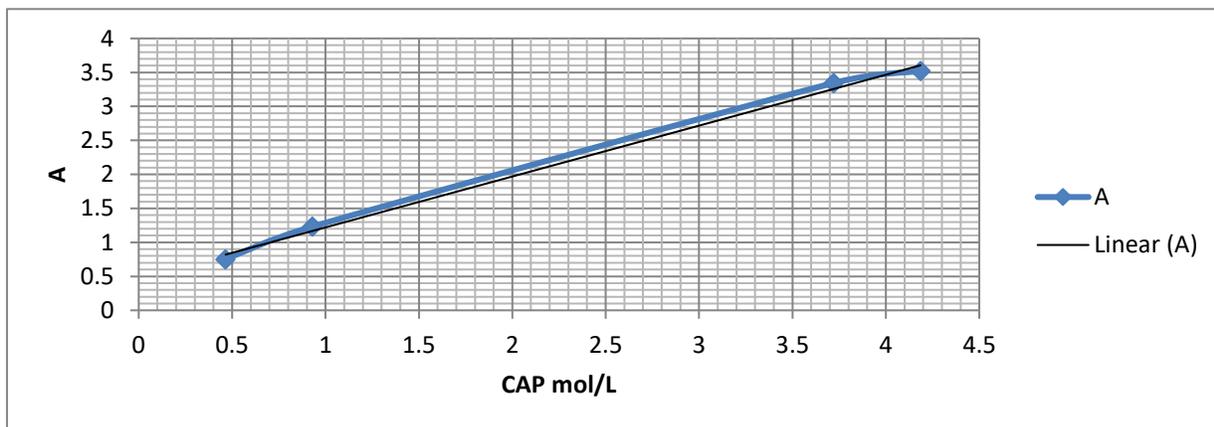


Figure V. 28: La Courbe d'étalonnage absorbance en fonction de [CAP] à $\lambda_{\max}=309$ nm.

$$EE\% = \frac{C_e}{C_i} \times 100 = \frac{3,98 \times 10^{-4}}{7,45 \times 10^{-4}} \times 100 ; EE\% = 53,42 \%$$

4-Détermination de complexation par la fluorescence :

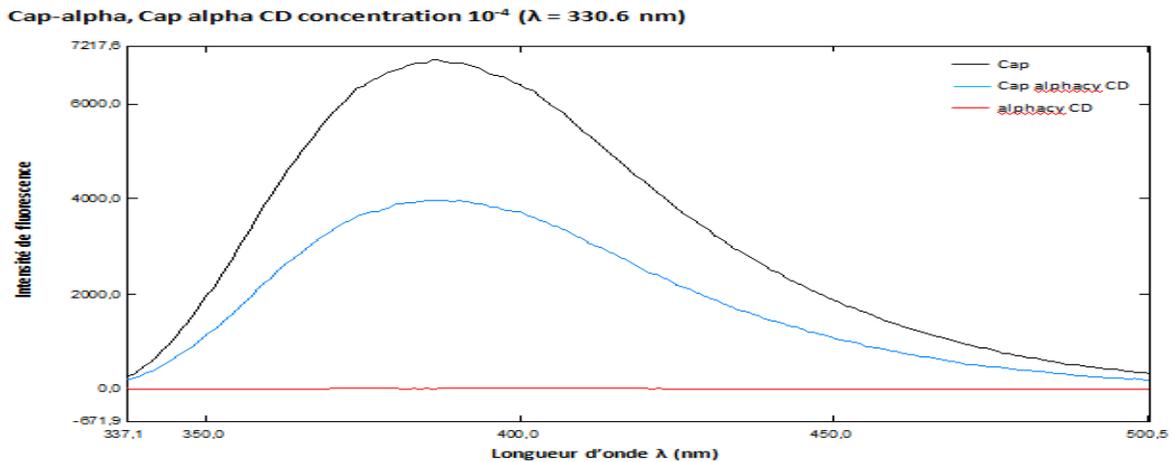


Figure V. 29: Les spectres de fluorescence de CAP; α -CD; Complexe inclusion.

- On a remarqué une diminution de l'intensité de CAP, après avoir été encapsulé par la α -CD. Ce qui prouve bien la formation du complexe d'inclusion.

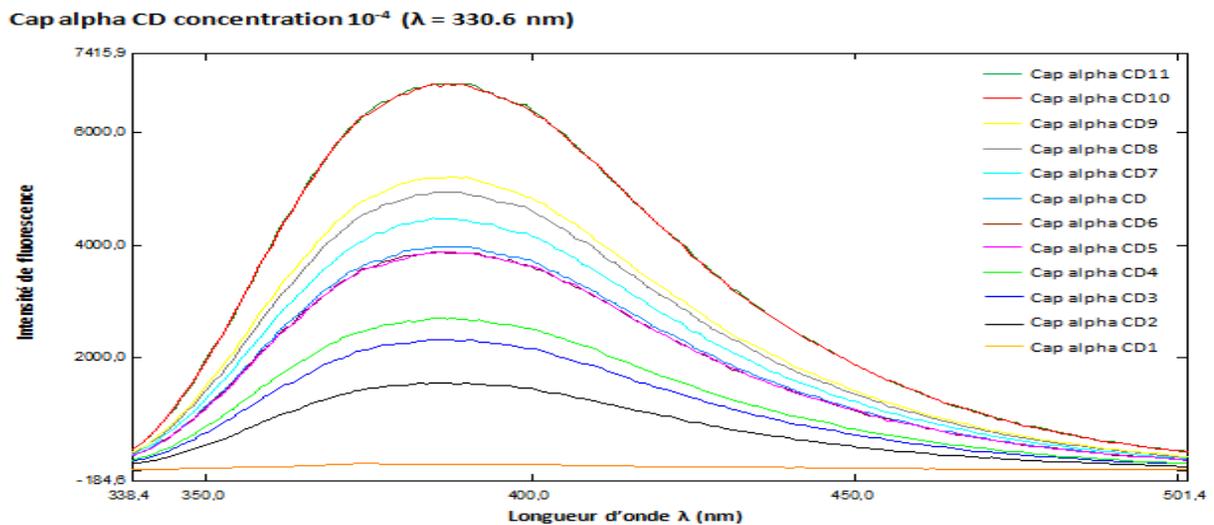


Figure V. 30: Les spectres de fluorescence de Complexe inclusion des différentes concentrations.

- On a observé une augmentation fluorescence en fonction de l'augmentation de la concentration du CAP dans les solutions.

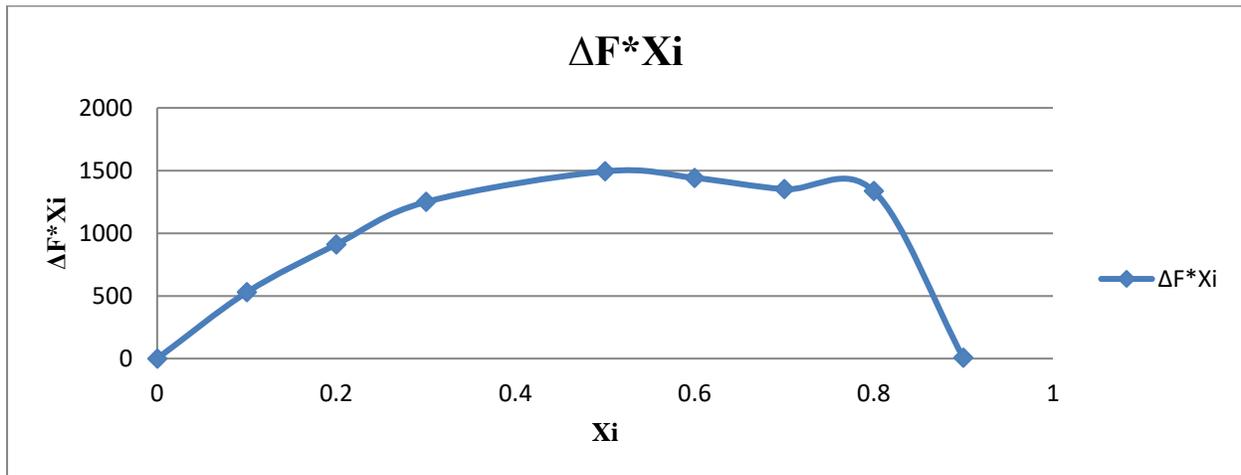
i. La courbe de job : (Tableau 14 ; page 78)

Figure V. 31: La courbe de job du complexe α -CD/CAP par la fluorescence.

- On a observé que $X_i=0,5$ correspond la valeur maximale de la courbe de Job, donc la stœchiométrie de ce complexe est 1:1.

Cap alphacyclo Ka concentration 10^{-4} ($\lambda = 330.6$ nm)

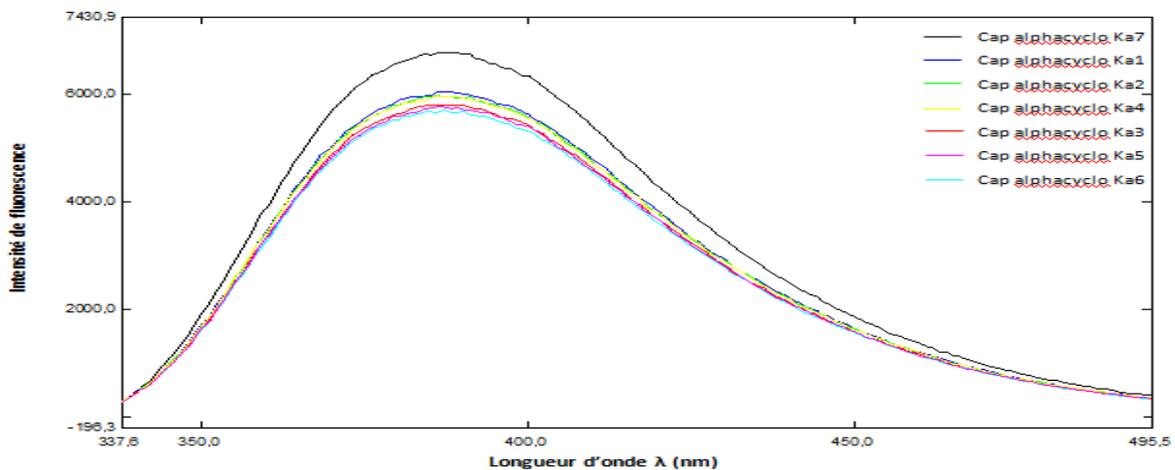


Figure V. 32: Les spectres de fluorescence le CAP ($2,78 \times 10^{-5} M$) avec des solutions de α -CD des différentes concentrations ($1,39 ; 2,78 ; 4,17 ; 5,6 ; 6,9 ; 8,3 ; 0$) $\times 10^{-5} M$.

- Quand on a augmenté la quantité de α -CD dans les tubes l'intensité de fluorescence diminue, ce qui prouve la formation du complexe.

ii. La constante de stabilité K_a : (Tableau 15 ; page 79)

$$Y = 6 \times 10^{-9}x + 0,001 \quad ; \quad \Delta\varepsilon = 35,971 \times 10^5 \quad ; \quad K_a = 16,66 \times 10^4 \text{M}^{-1}$$

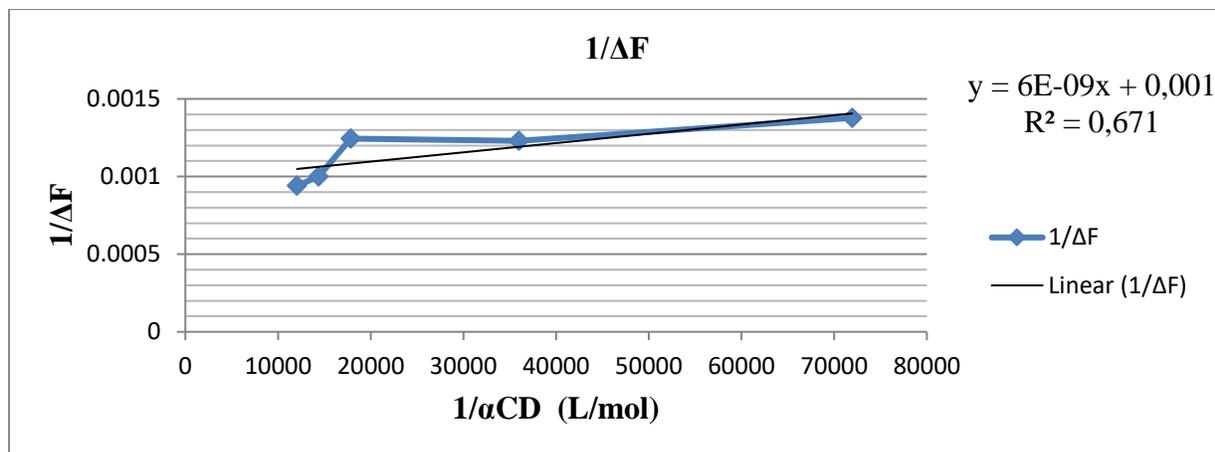


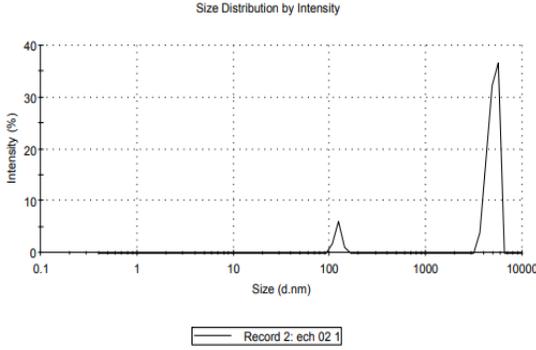
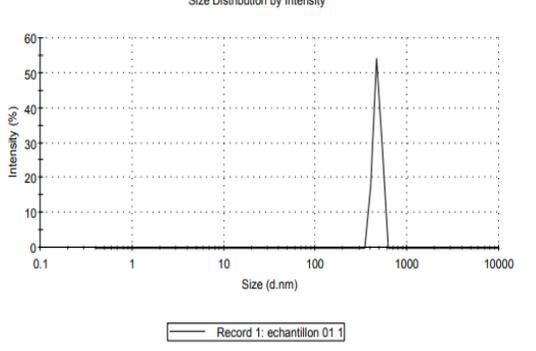
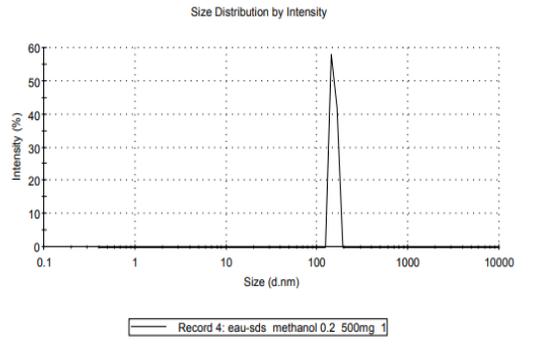
Figure V. 33: La courbe de K_a de complexe $\alpha\text{-CD/CAP}$.

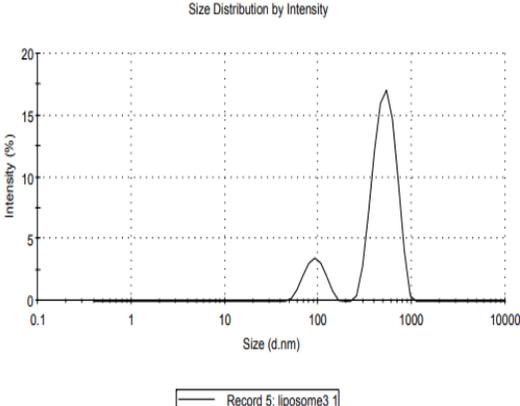
- On a remarqué que les points presque linéaires et la valeur de K_a est importante.

C. Etude de capacité d'analogie du CAP de former des liposomes à base de CD :

Comme étape d'analyse finale, on a choisi l'analyse de ZETASIZER pour s'assurer que les nanoparticules se forment et déterminant leurs types. Ce tableau résume tous les résultats :

Tableau 6: Détermination de la forme et le type des nanoparticules.

Nombre et temps d'analyse	Le solvant de l'analyse	Résultats de l'analyse ZETASIZER : rapport de distribution de taille par intensité	Taille (nm) / potentiel (%) des pics obtenus	Observations
La 1 ^{ère} Prise après 4jours	CH ₃ CN	 <p>Record 2: ech 02 1</p>	<p>Pic 1: 4923/90,9</p> <p>Pic2 : 121 ,4/9,1</p>	<p>Les vésicules multilamellaires (MLV)</p> <p>Grandes vésicules unilamellaires (LUV)</p>
	CHCl ₃	 <p>Record 1: echantillon 01 1</p>	<p>Pic3 :468,1/100,0</p>	<p>Grandes vésicules unilamellaires (LUV)</p>
La 2 ^{ème} Prise après 4jours	CH ₃ Cl	 <p>Record 4: eau-sds methanol 0.2 500mg 1</p>	<p>Pic 1:151 ,2/100,0</p>	<p>Grandes vésicules unilamellaires (LUV)</p>

La 3 ^{ème} prise après 4 jours	L'eau		<p>Pic 1: 93,07 /15,6</p> <p>Pic2 :524,4/84,4</p>	<p>Petites vésicules unilamellaires (SUV)</p> <p>Les vésicules multilamellaires (MLV)</p>
---	-------	--	---	---

D'après la première analyse de ZETASIZER qui a été faite, on a obtenu deux pics de taille **4923 nm** , **121,4 nm** avec le solvant **CH₃CN**, c'est à dire l'existence des vésicules nanométriques et ça confirme encore une fois à la réussite de formation des liposomes qui ont incorporé le complexe β -CD/CAP. La première taille supérieure à 500 nm est la prédominant prouve la formation des vésicules multilamellaires (MLV), et la deuxième supérieure à 100nm ce qui implique la formation des grandes vésicules unilamellaires (LUV). Aussi on a obtenu un seul pic de taille **468,1nm** quand on a utilisé le **CHCl₃** comme un solvant correspond à une grande vésicule unilamellaire (LUV).

L'analyse a été répétée une deuxième fois, on a observé un nouveau pic de taille 151,2 nm et d'intensité différente avec le même solvant (**CHCl₃**), ce qui indique une grande vésicule unilamellaire (LUV), ceci est le meilleur résultat.

Dans le 3^{ème} on a utilisé d'autre méthodes de formation des liposomes, et on a obtenu deux pics de taille **93,07 nm** et **524,4 nm** ce dernier est le prédominant, et on a utilisé l'eau comme un solvant, la première taille prouve des petites vésicules unilamellaires (SUV), et la deuxième montre des vésicules multilamellaires (MLV).

D. Activités biologiques des complexes :

1- Evaluation de l'activité anti- inflammatoire :

Les résultats montrent que la CAP le pourcentage de dénaturation de l'ovalbumine est de l'ordre de 20.60mg/ml, pour le β -CAP on a un % d'inhibition estimé de 5.38 mg/ml alors que ceux du diclofénac (la molécule anti inflammatoire de références est estimé à 2.94 mg/ml).

On a noté d'après ces résultats que la complexation de la CAP avec la β cyclodextrine augmente le pouvoir anti inflammatoire de la molécule.

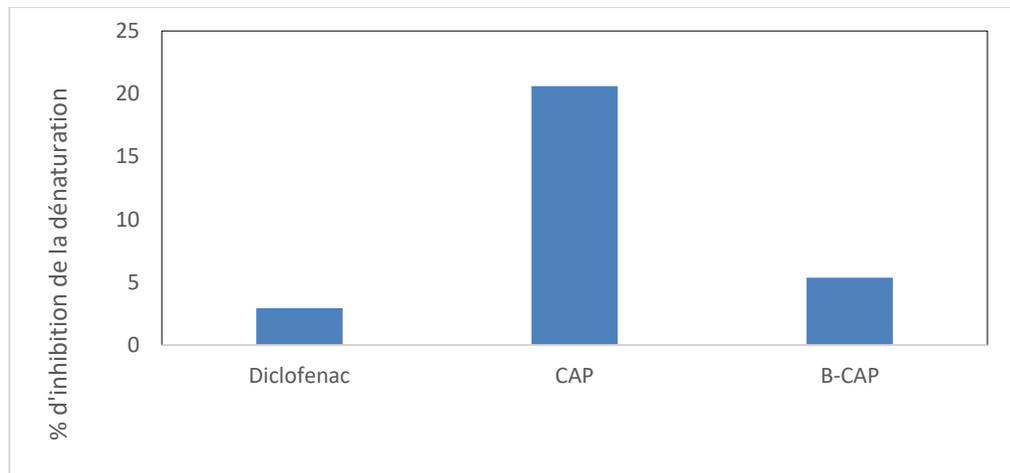
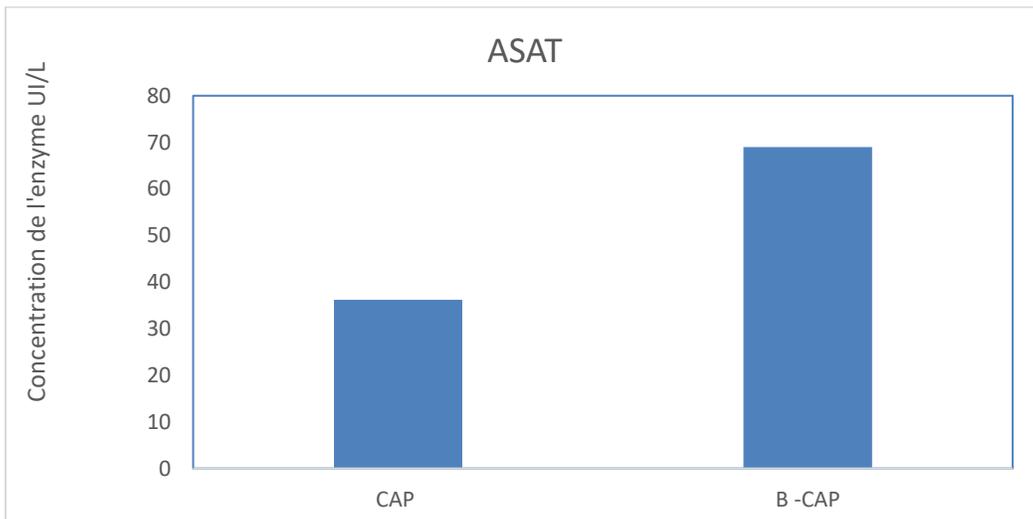
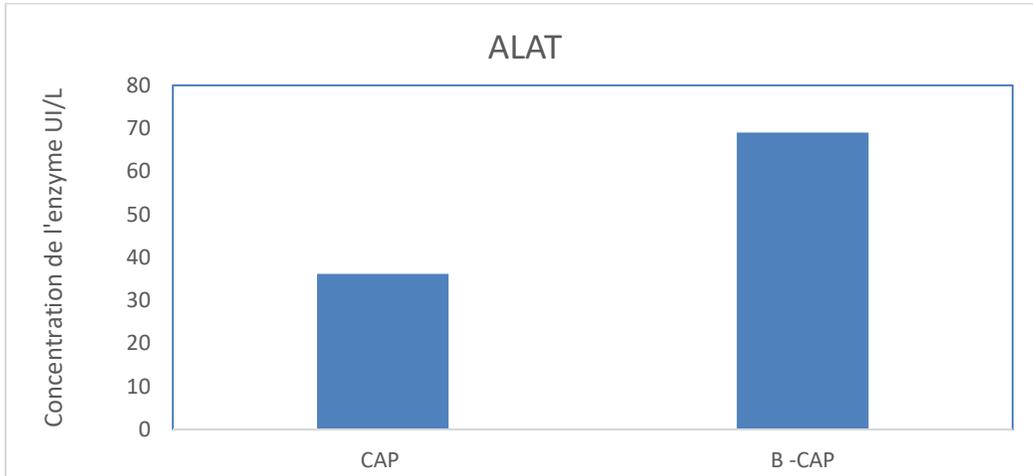


Figure V. 34: La variation du % d'inhibition de la dénaturation de BSA par CAP, β -CD/CAP et diclofénac.

2- Evaluation de la toxicité des complexes β - CAP :

Les résultats montrent que l'encapsulation de la CAP avec les β -CAP entraîne une augmentation des taux des enzymes de toxicité hépatiques ASAT, ALAT et phosphatase alcaline ce qui témoigne l'existence d'une toxicité hépatique.

Le foie est le siège du métabolisme et de dégradation de toute molécule étrangère de l'organisme et c'est le premier organe à être affecté par les lésions induites par ces composés. Dans cette partie nous avons choisi 3 enzymes indicateurs de la toxicité et de lésions hépatiques.



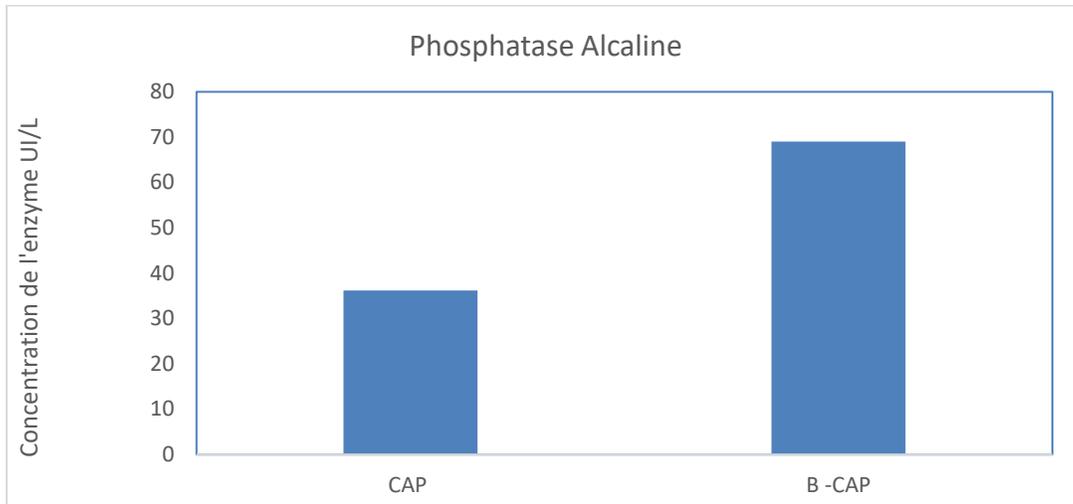


Figure V. 35: Effet d'encapsulation sur les taux des enzymes ALAT, ASAT et phosphatase alcaline.

Les résultats (*fig.36*) montrent que le traitement des œufs avec la CAP ou même avec le complexe β -CAP n'ont aucun effet sur la formation des vaisseaux sanguin.

Il est important de signaler que l'angiogenèse est le processus de formation de nouveau vaisseaux sanguins. Ces derniers se développent dans les tissus normaux mais aussi dans les tumeurs. L'inhibition de la formation des vaisseaux dans les tumeurs empêche le développement des métastases (stade avancé des développements tumoral).

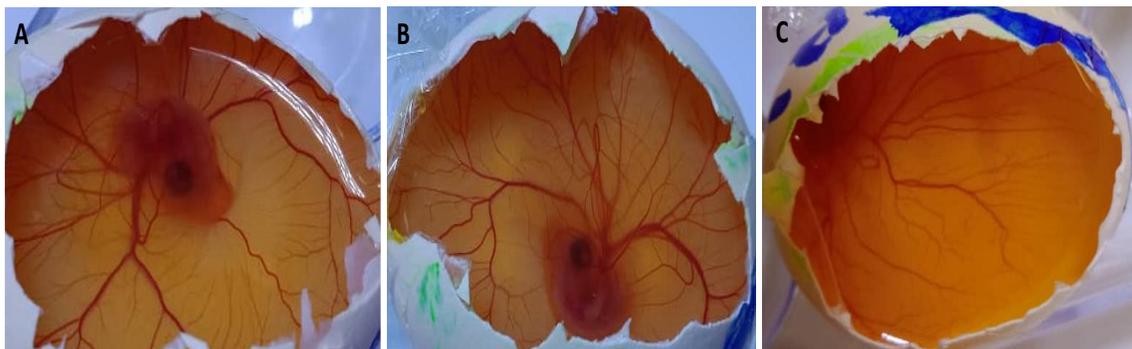


Figure V. 36: Effet d'encapsulation sur la formation des vaisseaux sanguin.

E. Analyse in-silico des complexes :

A notre démarche consiste d'abord d'étudier, les propriétés pharmacocinétiques du CAPECITABINE en utilisant le web-serveur pkCSM. Ensuite, nous nous sommes attachés à prédire le mode d'encapsulation du CAP au sein de la β -CD et voir quelles sont les interactions mises en jeu entre les deux entités.

1-Propriétés pharmacocinétiques :

Les tableaux ci-dessous résument les propriétés pharmacocinétique par le pkCSM:

a- Absorption :

Nom du modèle	Valeur prévue
Solubilité dans l'eau (log mol/L)	-3.135
Perméabilité Caco2 (log Papp en 10^{-6} cm/s)	0,255
Absorption intestinale (humaine) (% absorbé)	68.027
Perméabilité cutanée (log Kp)	-2.755
Substrat de la glycoprotéine P (Oui/Non)	Non
Inhibiteur de la P-glycoprotéine I (Oui/Non)	Non
Inhibiteur de la P-glycoprotéine II (Oui/Non)	Non

b- Distribution :

Nom du modèle	Valeur prévue
VDss (humain) (log L/kg)	-0,396
Fraction non liée (humaine) (Fu)	0,394
Perméabilité BBB (log BB)	-1.448
Perméabilité du SNC (log PS)	-3.315

c- Métabolisme :

Nom du modèle	Valeur prévue
Substrat du CYP2D6	Non
Substrat du CYP3A4	Non
Inhibiteur du CYP1A2	Non
Inhibiteur du CYP2C19	Non
Inhibiteur du CYP2C9	Non
Inhibiteur du CYP2D6	Non
Inhibiteur du CYP3A4	Non

d- Excrétion :

Nom du modèle	Valeur prévue
Liquidation totale (log mL/min/kg)	1.054
Substrat OCT2 rénal	Non

e- Toxicité :

Nom du modèle	Valeur prévue
Toxicité AMES (Oui/Non)	Non
Max. dose tolérée (humain) (log mg/kg/jour)	1.051
Inhibiteur hERG I	Non
Inhibiteur hERG II	Non
Toxicité aiguë orale chez le rat (LD50) (mol/kg)	2.459
Toxicité chronique par voie orale chez le rat (LOAEL) (log mg/kg-pc/jour)	2.401
Hépatotoxicité (Oui/Non)	Oui
Sensibilisation cutanée	Non
Toxicité de T.Pyrimis (log µg/L)	0,288
Toxicité viron (log mM)	2.893

2-Docking moléculaire :

La simulation de docking moléculaire nous montre bien que le CAP est bien docké (encapsuler) dans la β -CD. Il est à noter que le mode d'encapsulation se manifeste par l'orientation de la molécule invitée vers l'ouverture primaire de la β -CD. La partie active de cette pro-drogue est bien docké au centre de la molécule hôte. La meilleure conformation du complexe β -CD-CAP est de -5.3 kcal / mol.

La figure suivante montre l'orientation et le mode d'encapsulation du CAP au sein de la β -CD.

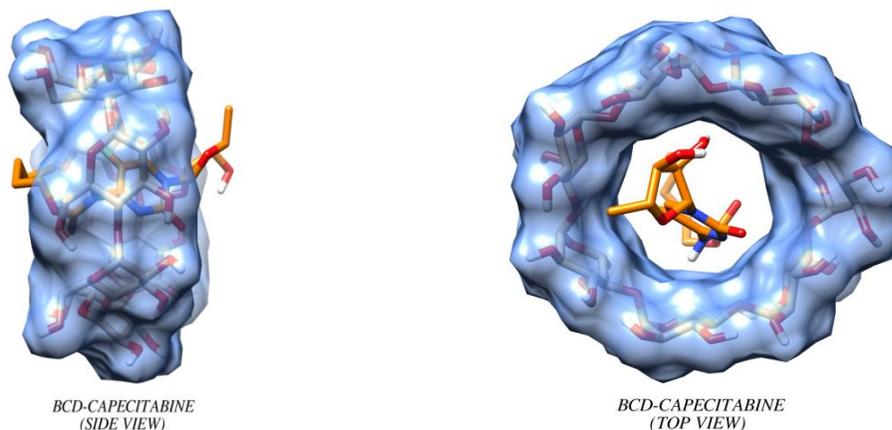


Figure V. 37: Complexe d'inclusion β -CD/CAP par docking moléculaire (top and side views).

Le logiciel Chimera a été utilisé afin de visualiser les différentes interactions (H-Bond) intermoléculaires entre les deux molécules. Une seule liaison hydrogène a été observée entre elles à une distance de 2.98 Å. La figure suivante illustre la présence de la liaison hydrogène.

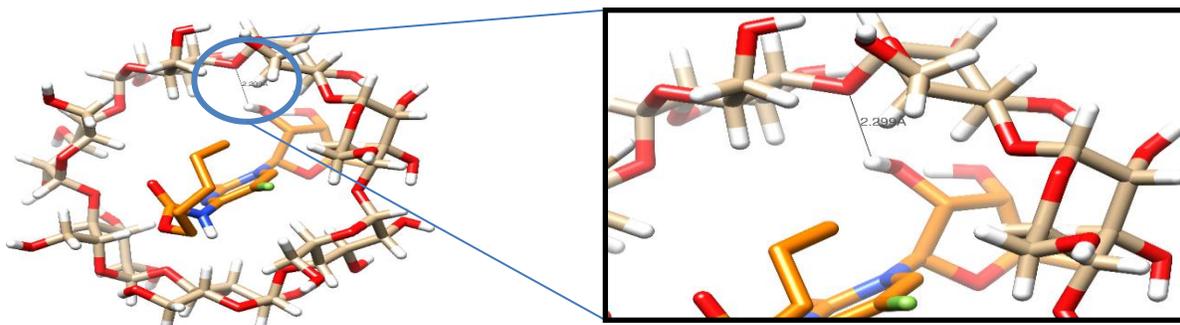


Figure V. 38: Liaison Hydrogène établie dans le complexe β -CD-CAP.

Afin de rationaliser et caractériser d'une manière approfondie les interactions non covalentes dans ce complexe, des calculs DFT sont en cours au niveau du Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutique (CRSP) à Constantine. Ces calculs nous permettront à bien étudié à l'échelle atomique les interactions non covalente (NCI) par la technique NCI-RDG.

L'image suivante représente le résultat d'un calcul dit NCI-RDG dit « promoléculaire ». C'est un calcul qui nous donne d'une manière globale les types d'interactions établies en se basant sur le gradient de la densité électronique à partir des coordonnées atomiques du système étudié.

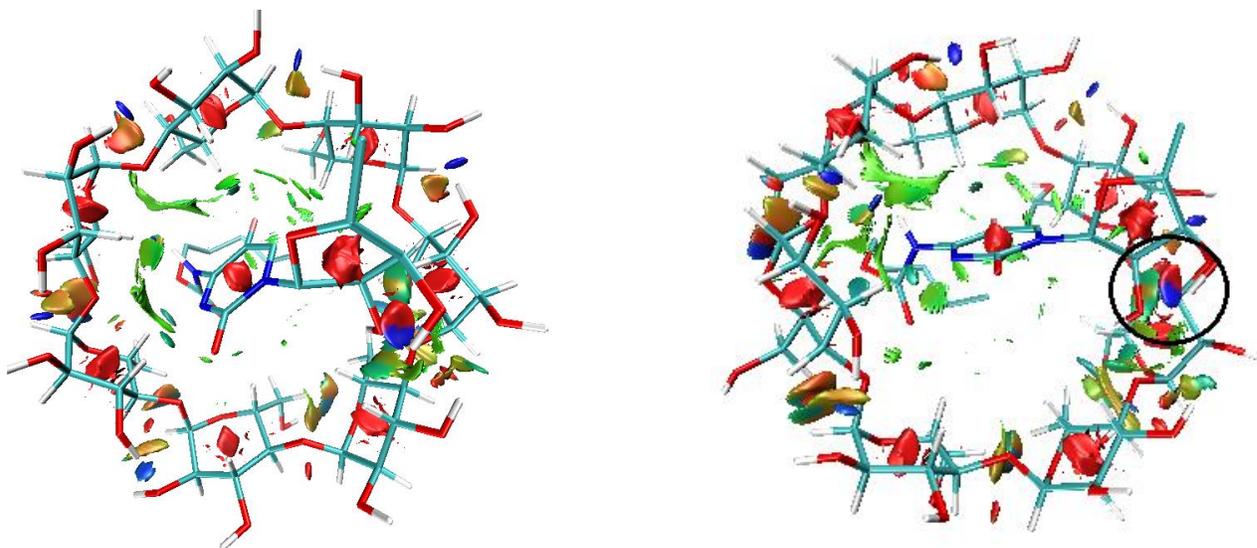


Figure V. 39: Visualisation des différents types d'interactions dans le complexe β -CD-CAP.

Les iso-surfaces en vert montrent bien la nature de type VdW. Elles sont établies essentiellement entre le CAP et la β -CD. Les iso-surface en rouge indiquent des interactions intramoléculaires stériques. Les interactions de type liaison hydrogène sont représentées par des iso-surfaces bleu.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE :

Lors de ce travail, nous avons réussi, à étudier la formation du complexe d'inclusion entre le CAP et les deux cyclodextrines α et β . Cette étude a été menée par plusieurs méthodes, à savoir : la fluorescence, Spectroscopie UV-Visible, RMN et FTIR. Nous avons utilisé la méthode de JOB pour la détermination de la stœchiométrie et la méthode graphique de Bensi-Hildbrand pour le calcul de la valeur de la constante de stabilité. Il est à noter, que le temps de laisser la complexation est primordiale pour l'obtention des résultats homogène.

Nous avons aussi réussi à formuler le CAP sous forme de liposome, en analysant par ZETASIZER, mais nous n'avons pas eu le temps d'évaluer son activité *in vivo*.

D'autre part, afin de prouver le choix de la CD à encapsuler le CAP, l'activité biologique a été évaluée sur trois plans : L'activité anti-inflammatoire; l'activité anti-angiogénique et l'activité de la toxicité sur les souris. Les résultats *in vivo* du CAP avec α -CD sont encore en cours.

Nous avons mené aussi une étude comparative de nos résultats expérimentaux sur la complexation du β -CD avec le CAP et l'étude *in-silico*, et la conclusion est une cohérence dans la formation du complexe CAP/CD.

Nous nous projetons vers l'avenir, à améliorer la formulation du CAP avec la CD, en présence de polymère afin d'atteindre la nanoformulation qui assurera une libération contrôlée *in vivo*. Autre travail à venir c'est de synthétiser des cyclodextrine sélectivement modifiées pour la nanoformulation du CAP.

REFERENCES

REFERENCES

1. Kuchekar, A.B. and A.P. Pawar, *Screening of factors using Plackett Burman design in the preparation of Capecitabine-loaded nano polymeric micelles*. Int J Pharm Pharm Sci, 2014. **6**(4): p. 489-496.
2. Chau, I., S. Legge, and P. Fumoleau, *The vital role of education and information in patients receiving capecitabine (Xeloda®)*. European Journal of Oncology Nursing, 2004. **8**: p. S41-S53.
3. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nature reviews cancer, 2003. **3**(5): p. 330-338.
4. Noordhuis, P., et al., *5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers*. Annals of oncology, 2004. **15**(7): p. 1025-1032.
5. Amstutz, U., T.K. Froehlich, and C.R. Largiadèr, *Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity*. Pharmacogenomics, 2011. **12**(9): p. 1321-1336.
6. Kuchekar, A. and A. Pawar. *Capecitabine loaded polymeric micelles: Formulation, characterization and cytotoxicity study*. in *International Conference on Advanced Nanomaterials & Emerging Engineering Technologies*. 2013. IEEE.
7. Ameli, H. and N. Alizadeh, *Targeted delivery of capecitabine to colon cancer cells using nano polymeric micelles based on beta cyclodextrin*. RSC advances, 2022. **12**(8): p. 4681-4691.
8. Desmoulin, F., et al., *Metabolism of capecitabine, an oral fluorouracil prodrug: 19F NMR studies in animal models and human urine*. Drug metabolism and disposition, 2002. **30**(11): p. 1221-1229.
9. Blum, J.L., *The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer*. The Oncologist, 2001. **6**(1): p. 56-64.
10. Straub, J.O., *Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe*. Integrated Environmental Assessment and Management, 2010. **6**(S1): p. 540-566.
11. Jang, Y.H., et al., *First principles calculation of p K a values for 5-substituted uracils*. The Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**(1): p. 274-280.

12. Del Valle, E.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process biochemistry, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.
13. Jacquet, R., *Cyclodextrines hydrophiles: caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexantes. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse*, 2006, Université d'Orléans.
14. SARRA, A., *SYNTHESE DE NOUVEAUX AGONISTES GABA ET ETUDE DE LEUR CAPACITE A FORMER DES LIPOSOMES AVEC LA CYCLODEXTRINE*, 12-04-2021.
15. Szejtli, J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical reviews, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
16. Oliva, E., *Nano-réacteurs à base de cyclodextrines amphiphiles pour la catalyse et la vectorisation*, 2019, Université de Picardie Jules Verne.
17. Di Donato, C., et al., *Alpha- and beta-cyclodextrin inclusion complexes with 5-fluorouracil: Characterization and cytotoxic activity evaluation*. Molecules, 2016. **21**(12): p. 1644.
18. Zhu, Q., et al., *Pluronic F127-modified liposome-containing tacrolimus-cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013. **65**(8): p. 1107-1117.
19. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency*. Journal of pharmaceutical sciences, 2012. **101**(9): p. 3019-3032.
20. Loftsson, T. and D. Duchêne, *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. International journal of pharmaceutics, 2007. **329**(1-2): p. 1-11.
21. Laouini, A., et al., *Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art*. Journal of colloid Science and Biotechnology, 2012. **1**(2): p. 147-168.
22. Kumbhar, S. and V. Salunkhe, *UV Spectrophotometric Method development for Capecitabine Eudragit and Chitosan based Microspheres and its Validation*. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2013. **1**(03): p. 32-38.
23. Lin, E.-Y., et al., *Liposome consolidated with cyclodextrin provides prolonged drug retention resulting in increased drug bioavailability in brain*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(12): p. 4408.

24. Honmane, S.M., et al., *Development and optimization of capecitabine loaded nanoliposomal system for cancer delivery*. Indian J. Pharm. Edu. Res, 2020. **54**: p. 376-384.
25. Dharmadeva, S., et al., *In vitro anti-inflammatory activity of Ficus racemosa L. bark using albumin denaturation method*. Ayu, 2018. **39**(4): p. 239.
26. Faihs, L., et al., *A Novel Artificial Intelligence-Based Approach for Quantitative Assessment of Angiogenesis in the Ex Ovo CAM Model*. Cancers, 2022. **14**(17): p. 4273.
27. O'Boyle, N.M., et al., *Open Babel: An open chemical toolbox*. Journal of cheminformatics, 2011. **3**(1): p. 1-14.
28. Martin, L., *Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif: une application sur la protéine kinase FAK*, 2006, Montpellier 2.
29. Schmidt, A.K., et al., *Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product β -cyclodextrin*. Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 5909-5915.

ANNEXES

ANNEXES

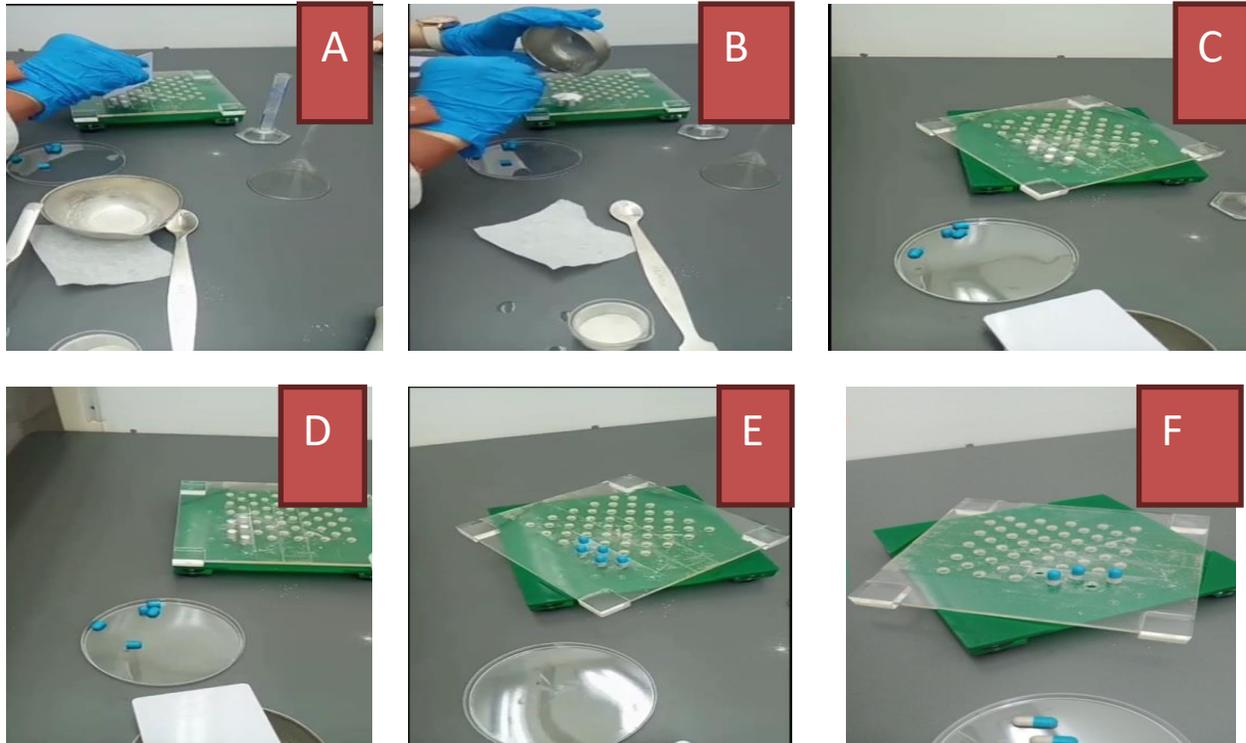


Figure 01: *Les étapes de remplissage à l'aide de gélulier manuel.*

A; B; C: Niveau supérieur : ouverture et remplissage des gélules

D; E: Niveau moyen : Fermeture des gélules

F: Niveau inférieur : les gélules fermées sont récupérées

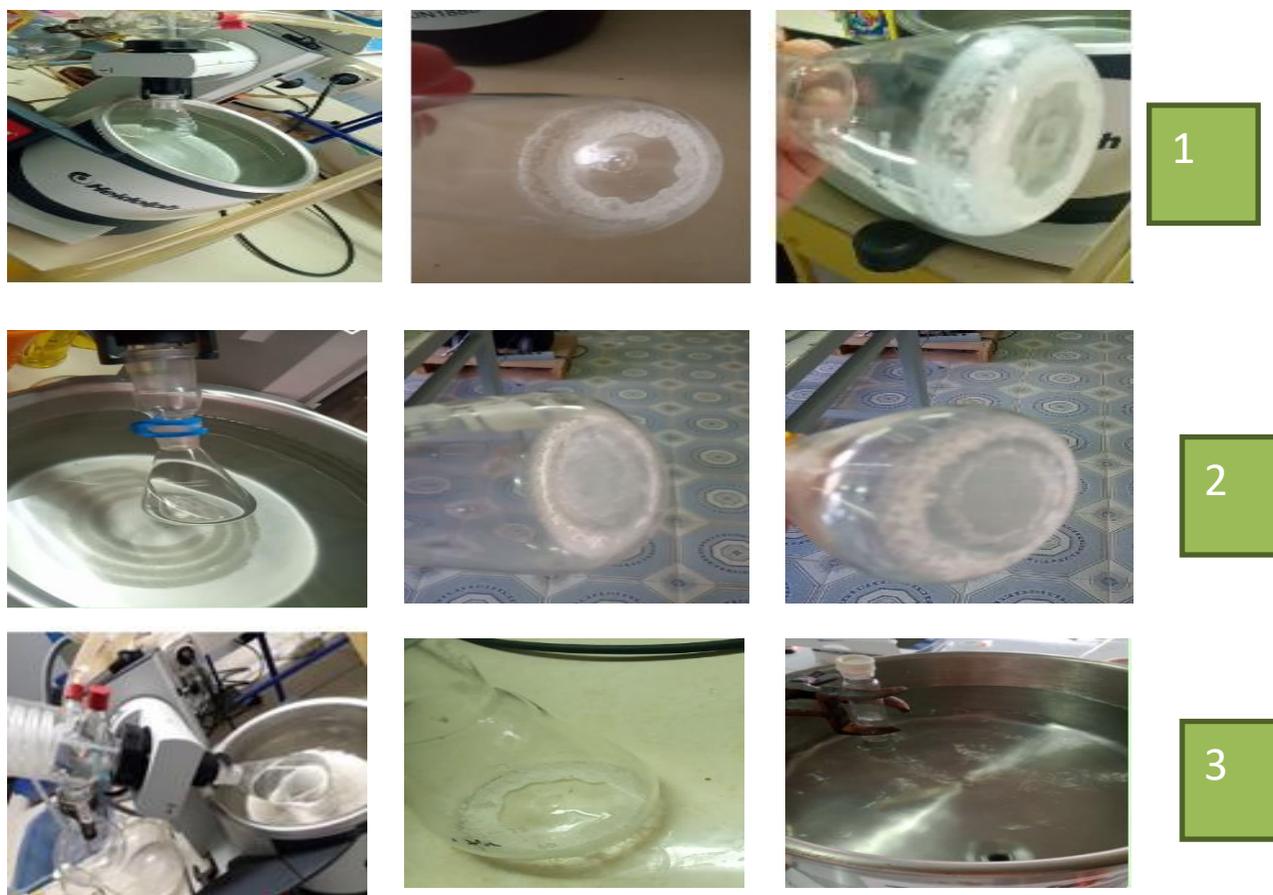


Figure 02: Les étapes de préparation des liposomes.

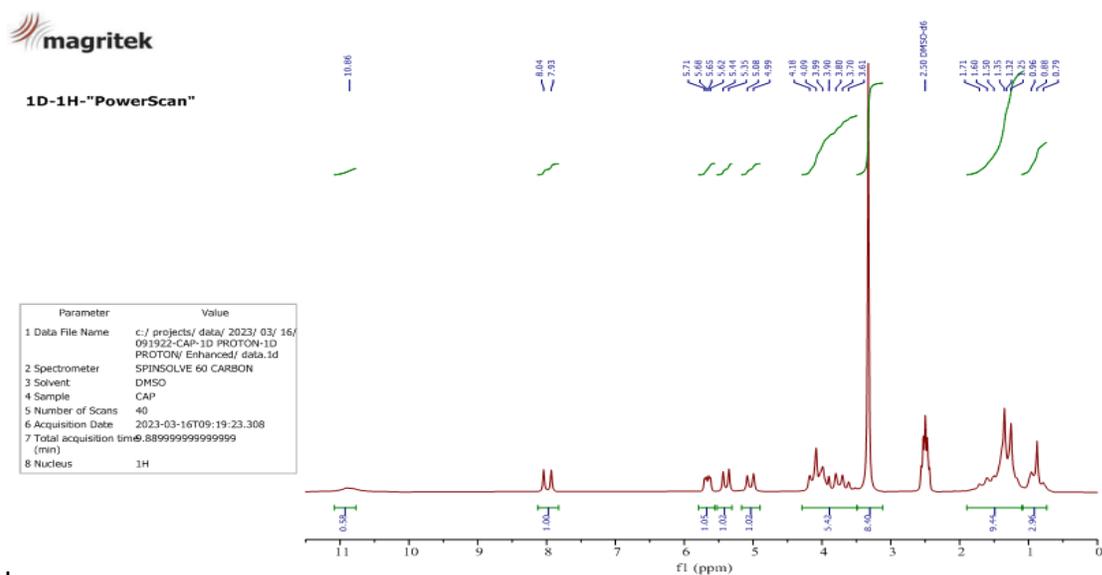


Figure 03: Le spectre de RMN ¹H 60MHz de CAP (pour confirmé la pureté de CAP).

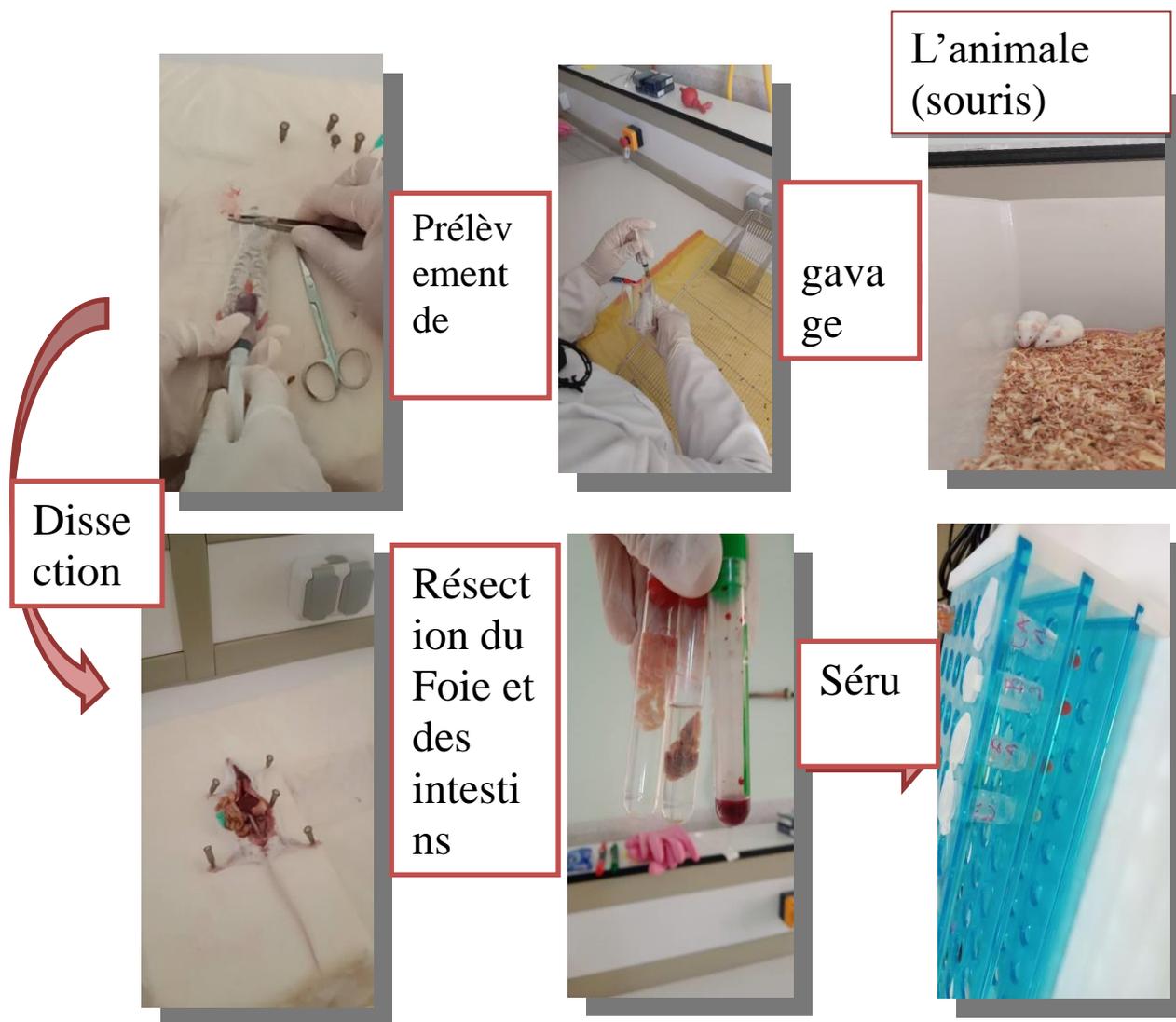


Figure 04 : Les étapes pour l'étude de la toxicité des complexes.

• **Tableaux 01:** La Courbe de Job

Essais	V (β -CD)	V(CAP)	β -CD mol/L	CAP mol/L	X_i	A	ΔA	$\Delta A \cdot X_i$
1	3000	0	0,000556	0	0	0,023	3,705	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	1,045	2,683	0,2683
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	1,373	2,355	0,471
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	1,996	1,732	0,5196
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	2,652	1,076	0,4304
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	3,189	0,539	0,2695
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	3,638	0,09	0,054
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	3,696	0,032	0,0224
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	3,696	0,032	0,0356
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	3,696	0,032	0,0288
11	0	3000	0	0,000556	1	3,728	0	0

• **Tableaux 02:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V(CAP)	V(β -CD)	CAP mol/L	β -CD mol/L	$1/\beta$ -CD L/mol	A	ΔA	$1/\Delta A$
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,44604	3,298	0,368	2,7173913
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,22302	3,48	0,186	5,37634409
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,81535	3,274	0,392	2,55102041
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,14286	3,563	0,103	9,70873786
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,48921	3,444	0,222	4,5045045
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,19277	3,728	-0,062	-16,1290323
7	4	0	0,000556	0	∞	3,666	0	∞

- **Tableaux 03:** La courbe de Job

Essais	V (β -CD)	V(CAP)	β -CD mol/L	CAP mol/L	X_i	A ($\lambda=240$ nm)	ΔA	$\Delta A * X_i$
1	3000	0	0,000185	0	0	0,014	2,416	0
2	2700	300	0,000166	0,0000185	0,1	0,317	2,113	0,2113
3	2400	600	0,000148	0,000037	0,2	0,483	1,947	0,3894
4	2100	900	0,000126	0,000038	0,3	0,701	1,729	0,5187
5	1800	1200	0,000111	0,000074	0,4	1,131	1,299	0,5196
6	1500	1500	0,0000926	0,0000926	0,5	1,227	1,203	0,6015
7	1200	1800	0,000074	0,000111	0,6	1,504	0,926	0,5556
8	900	2100	0,000038	0,000126	0,7	1,85	0,58	0,406
9	600	2400	0,000037	0,000148	0,8	2,052	0,378	0,3024
10	300	2700	0,0000185	0,000166	0,9	2,119	0,311	0,2799
11	0	3000	0	0,000185	1	2,43	0	0

- **Tableaux 04:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V (CAP)	V (β -CD)	CAP mol/L	β -CD mol/L	$1/\beta$ -CD L/mol	A	ΔA	$1/\Delta A$
1	2	2	0,000092	0,00000463	215982,7214	1,777	0,653	1,53139357
2	2	2	0,000092	0,00000926	107991,3607	1,763	0,667	1,49925037
3	2	2	0,000092	0,0000139	71942,44604	1,764	0,666	1,5015015
4	2	2	0,000092	0,0000186	53763,44086	1,687	0,743	1,34589502
5	2	2	0,000092	0,0000231	43290,04329	1,618	0,812	1,23152709
6	2	2	0,000092	0,0000276	36231,88406	1,493	0,937	1,06723586
7	4	0	0,000185	0	∞	2,43	0	∞

- **Tableaux 05 :** La courbe de Job

Essais	V (β -CD)	V(CAP)	β -CD mol/L	CAP mol/L	Xi	A	ΔA	$\Delta A * Xi$
1	3000	0	0,000556	0	0	0,12	3,608	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	0,778	2,95	0,295
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	0,888	2,84	0,568
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	1,457	2,271	0,6813
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	0,274	3,454	1,3816
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	2,309	1,419	0,7095
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	2,899	0,829	0,4974
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	3,161	0,567	0,3969
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	3,323	0,405	0,324
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	3,448	0,28	0,252
11	0	3000	0	0,000556	1	3,728	0	0

- **Tableaux 06:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V(CAP)	V(β -CD)	CAP mol/L	β -CD mol/L	$1/\beta$ -CD L/mol	A	ΔA	$1/\Delta A$
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,446	3,276	0,198	5,05050505
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,223	3,208	0,266	3,7593985
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,8153	3,345	0,129	7,75193798
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,1429	3,266	0,208	4,80769231
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,4892	3,266	0,208	4,80769231
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,1928	3,345	0,129	7,75193798
7	4	0	0,000556	0	∞	3,474	0	∞

• **Tableaux 07:** La courbe de Job

Essais	V (β -CD)	V(CAP)	β -CD mol/L	CAP mol/L	X_i	F	ΔF	$\Delta F * X_i$
1	3000	0	0,000556	0	0	5136,9	1742,1	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	2320,7	4558,3	455,83
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	3058,2	3820,8	764,16
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	3483,7	3395,3	1018,59
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	5035	1844	737,6
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	4790,7	2088,3	1044,15
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	4026,9	2852,1	1711,26
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	5670	1209	846,3
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	6203,2	675,8	540,64
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	6194,9	684,1	615,69
11	0	3000	0	0,000556	1	6879	0	0

• **Tableaux 08:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V(CAP)	V(β -CD)	CAP mol/L	α -CD mol/L	$1/\alpha$ -CD L/mol	F	ΔF	$1/\Delta F$
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,446	6264,5	906,1	0,00110363
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,223	7126,1	44,5	0,02247191
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,8153	5839,2	1331,4	0,00075109
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,1429	5901,7	1268,9	0,00078808
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,4892	7029,3	141,3	0,00707714
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,1928	6215,6	955	0,00104712
7	4	0	0,000556	0	∞	7170,6	0	∞

• **Tableaux 09:** La courbe de Job

Essais	V (α -CD)	V(CAP)	α -CD mol/L	CAP mol/L	X_i	A	ΔA	$\Delta A * X_i$
1	3000	0	0,000556	0	0	0,091	3,754	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	0,642	2,794	0,2794
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	1,051	2,794	0,5588
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	1,371	2,474	0,7422
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	1,942	1,903	0,7612
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	2,535	1,31	0,655
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	2,827	1,018	0,6108
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	2,312	1,533	1,0731
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	3,669	0,176	0,1408
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	3,877	-0,032	-0,0288
11	0	3000	0	0,000556	1	3,845	0	0

• **Tableaux 10:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V(CAP)	V(α -CD)	CAP mol/L	α -CD mol/L	$1/\alpha$ -CD L/mol	A	ΔA	$1/\Delta A$
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,446	3,712	0,363	2,75482094
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,223	3,76	0,315	3,17460317
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,8153	1,51	2,565	0,38986355
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,1429	3,991	0,084	11,9047619
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,4892	3,912	0,163	6,13496933
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,1928	3,815	0,26	3,84615385
7	4	0	0,000556	0	∞	4,075	0	∞

• **Tableaux 11:** La courbe de Job

Essais	V (α -CD)	V(CAP)	α -CD mol/L	CAP mol/L	X_i	A	ΔA	$\Delta A * X_i$
1	3000	0	0,000556	0	0	0,091	3.961	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	0.718	3.334	0,3334
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	1.109	2.943	0,5886
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	1.460	2.592	0,7776
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	2.213	1.839	0,7356
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	0.173	3.879	1.9395
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	3.098	0.954	0,5724
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	3.524	0.528	0,3696
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	2.605	1.447	1,1576
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	3.955	0.097	0,0873
11	0	3000	0	0,000556	1	4.052	0	0

• **Tableaux 12:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essais	V(CAP)	V(α -CD)	CAP mol/L	α -CD mol/L	$1/\alpha$ -CD (L/mol)	A	ΔA	$1/\Delta A$
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,446	3,779	0,296	3,37837837
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,223	3.751	0,324	3,08641975
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,8153	3.809	0.266	3,75939849
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,1429	1,577	2.498	0.40032025
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,4892	3 :779	0,296	3,37837837
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,1928	3,779	0,296	3,37837837
7	4	0	0,000556	0	∞	4,075	0	∞

- **Tableaux 13:** La courbe de Job :

Essais	V (α -CD)	V(CAP)	α -CD mol/L	CAP mol/L	Xi	A	ΔA	$\Delta A * Xi$
1	3000	0	0,000556	0	0	0,234	3,395	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	0,568	3,061	0,3061
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	1,092	2,537	0,5074
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	1,342	2,287	0,6861
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	1,498	2,131	0,8524
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	0,425	3,204	1,602
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	2,483	1,146	0,6876
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	2,926	0,703	0,4921
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	3,307	0,322	0,2576
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	3,608	0,021	0,0189
11	0	3000	0	0,000556	1	3,629	0	0

- **Tableaux 14:** La courbe de Job :

Essais	V (α -CD)	V(CAP)	α -CD mol/L	CAP mol/L	Xi	F	ΔF	$\Delta F * Xi$
1	3000	0	0,000556	0	0	121	6758	0
2	2700	300	0,0005	0,0000556	0,1	1595	5284	528,4
3	2400	600	0,000444	0,000111	0,2	2326	4553	910,6
4	2100	900	0,00038	0,000116	0,3	2714	4165	1249,5
5	1800	1200	0,000333	0,000222	0,4	3896	2983	1193,2
6	1500	1500	0,000278	0,000278	0,5	3891	2988	1494
7	1200	1800	0,000222	0,000333	0,6	4476	2403	1441,8
8	900	2100	0,000116	0,00038	0,7	4948	1931	1351,7
9	600	2400	0,000111	0,000444	0,8	5209	1670	1336
10	300	2700	0,0000556	0,0005	0,9	6873	6	5,4
11	0	3000	0	0,000556	1	6879	0	0

- **Tableaux 15:** Détermination de la constante de stabilité K_a par la méthode de Benesi-Hildebrand

Essai	V(CAP)	V(β -CD)	CAP mol/L	α -CD mol/L	1/ α -CD L/mol	F	ΔF	1/ ΔF
1	2	2	0,000278	0,0000139	71942,446	6035,1	725,9	0,0013776
2	2	2	0,000278	0,0000278	35971,223	5948	813	0,00123001
3	2	2	0,000278	0,0000417	23980,8153	5796	965	0,00103627
4	2	2	0,000278	0,000056	17857,1429	5957	804	0,00124378
5	2	2	0,000278	0,0000695	14388,4892	5761	1000	0,001
6	2	2	0,000278	0,000083	12048,1928	5698	1063	0,00094073
7	4	2	0,000556	0	∞	6761	0	∞

ملخص:

في هذه المذكرة الخاصة بنهاية دراستنا، كان علمنا قائما على تغليف عقار الكابيسيتابين المضاد للسرطان مع سيكلوديكستين، حيث استطعنا تقييم نشاطه البيولوجي لتحسين تأثيره الحيوي و للتقليل من سميته.

ثم اتجهنا لتغليف الكابيسيتابين بنوعين من السيكلودكستين ألفا و البتا لتشكيل هذا المركب، الذي خضع مرة أخرى لتحليل ألا وهيا التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية، أطياف الأشعة تحت الحمراء، الضوئي والرنين المغناطيسي النووي لمعرفة الكيمياء الفراغية الخاصة به، كما أضفنا تكوين الجسيمات الشحمية القائمة على هذا المركب.

أما فيما يخص النشاط البيولوجي فكان بثلاث اختبارات (مضاد للالتهاب، مضاد تكوين الأوعية الدموية، وتأثير سمية على الفئران. وأخيرا أكدنا نتائجنا عن طريق دراسة إنسلكو.

الكلمات المفتاحية: الكابيسيتابين، سيكلوديكستين، الجسيمات الشحمية، النشاط البيولوجي، إنسلكو.

RESUME :

Dans ce projet de fin étude nous avons encapsulé un anticancéreux Capécitabine par la cyclodextrine, et évalué son activité biologique pour améliorer leur biodisponibilité et réduire leur toxicité .

Dans notre travail nous avons fait l'encapsulation de CAP avec deux types de CD (α et β) et analysé par UV-Visible, FTIR, Fluorescence et RMN ^1H pour connaître leur stéréochimie, et ajouté la formation des liposomes à base CD, puis évalué l'activité biologique par trois tests : (anti-inflammatoire, anti-angiogenesis et effet de toxicité sur les souris)

A la fin nous avons confirmé les résultats par l'étude in-silico.

Les mots-clés : Capécitabine, Cyclodextrine, liposomes, activité biologique, in-silico.

Abstract:

In this end-of-study project we encapsulated an anti-cancer drug Capecitabine by Cyclodextrin and evaluated its biological activity to improve their bioavailability and to increase their toxicity .

In our work, we did the encapsulation of CAP by 2 types of CD (alpha and beta) and we analyzed by visible UV , FTIR, fluorescence and RMN ^1H to know their stereochemistry and we added CD- based liposome group , then evaluated the biological activity by 3 tests (anti-inflammatory, anti-angiogenesis and the toxicity effect on mice)

Finally we confirmed the results by in-silico study.

Keywords: Capecitabine, Cyclodextrin, liposomes, biological activity, in-silico.