REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINSTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE 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 :

M^elle^ Benchadli Souad

Sur le thème

Etude Comparative Entre Les Complexes D'inclusion A Base De α Et β Cyclodextrine Avec Différents Extraits Bioactifs

Soutenu publiquement le 15 Juin 2022 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme TABET ZATLA AMINA	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen	Présidente
Mme GUENDOUZ SOUHILA	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme KENICHE ASSIA	Maitre de conférences A	Centre universitaire de Maghnia	Encadrante

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses COSNA

2021-2022

ABSTRACT:

Cyclodextrin-based inclusion complexes of plant bioactive extracts seem to be a promising approach for drug development. The aim of this work is to establish an inclusion protocol for two different plant extracts and to evaluate the impact of the inclusion complexes on their biological activities. The first axis of our study concerns the characterization of inclusion complexes in solution using UV. The second strand focuses on the comparison of the antioxidant activities of free and encapsulated extracts.

Keywords: cyclodextrin, bioactive extracts, inclusion complexes, antioxydant activity

RESUME :

La formation de complexes d'inclusion à base d'extraits bioactifs constitue une voie prometteuse pour le développement de produits pharmaceutiques. Le but de ce travail est d'élaborer un protocole d'encapsulation de deux extraits différents de plante et d'évaluer l'impact des complexes d'inclusion sur l'activité biologique des extraits. Le premier axe de notre étude porte sur la caractérisation des complexes d'inclusion en solution et par spectroscopie UV. Le deuxième axe s'oriente vers la comparaison des activités anti-oxydantes des extraits libres et celles des complexes formés.

Mots clés : cyclodextrine, extraits bioactifs, complexes d'inclusion, activité antioxydante

ملخص :

تعد عملية تكوين مركبات ادراج بمستخلصات نباتية ذات فعالية بيولوجية طريقة واعدة لتطوير مواد صيدلانية. الهدف من هذه الدراسة هو انشاء بروتوكول خاص بعملية ادراج لمستخلصين نباتيين مختلفين و تقييم تأثير مركبات الادراج على النشاط المضاد للاكسدة لكل منهما. الجانب الاول يتمحور حول دراسة المركبات المتشكلة في الحالة السائلة باستعمال التحليل الطيفي بالاشعة فوق البنفسجية. الجانب الثاني يخص مقارنة الفعالية المضادة للاكسدة للمستخلصات الحرة و المركبة مع السيكلودكسترين.

كلمات مفتاحية :

سيكلودكسترين, مستخلصات ذات فعالية, مركبات الادراج, النشاط المضاد للاكسدة

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less. "

Marie Curie.

A la **mémoire de mon père**.

Puisse Allah t'avoir en Sa Sainte Miséricorde

Que ce modeste travail soit une prière pour le repos de ton âme.

A ma très chère mère,

Puisse Dieu Tout Puissant te combler de santé, de bonheur

Et te procurer une longue vie.

Que ce mémoire soit letémoignage de la profondeur de mes sentiments de reconnaissance

A mes frères et sœurs,

A mes neveux et nièces

Qu'ils trouvent dans ce travail l'expression de mon dévouement et attachement infini

REMERCIEMENTS

Louange au Bon Dieu Tout Puissant, de m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour surmonter toutes les difficultés rencontrées pendant la réalisation de ce travail et pouvoir l'achever jusqu'au bout.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) sous la direction du ***Pr DJABOU NASSIM*** *que je tiens à remercier d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.*

Mes 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 pour m'avoir alloué aux analyses UV de tous mes échantillons.*

Mes profondes reconnaissances s'adressent à ***Dr KENICHE ASSIA****, pour son encadrement, ses précieux conseils, sa serviabilité, et son aide qu'elle m'a apportée en vue de concrétiser ce travail. Merci pour votre confiance, votre patience et votre soutien permanent.*

Je remercie sincèrement ***Dr TABET ZATLA AMINA****, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Ma gratitude va également à* ***Dr GUENDOUZ SOUHILA*** *de m'avoir honorée d'accepter d'examiner et juger ce travail. Que ce travail soit l'occasion de leur exprimer le témoignage de ma reconnaissance et de mon grand respect.*

De même, Je tiens à remercier fortement les doctorantes ***Soltani Yasmine Ikram****,* ***Hammoudi Amina****,* ***Fatima Zohra Belbachir,*** *et* ***Aboura Amina*** *pour leur aide appréciable et leur disponibilité tout au long du travail. Je leur souhaite bon courage pour la suite et plein de réussite pour leurs futurs projets et carrières.*

Je souhaite exprimer mes remerciements à l'ingénieur de laboratoire au sein du Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives, Boumediene, pour sa patience et son aide à réaliser toutes les analyses UV de cette étude.

J'ai également une pensée pour tous les membres du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses, et du Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives,

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Absorbance UV

CD : cyclodextrine

Cgtase : Cyclodextrine Glycosyl Transférase

α-CD: alpha cyclodextrine

β-CD: bêta cyclodextrine

γ-CD : gamma cyclodextrine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UV : Ultra Violet

Eph: extrait ephedra

Eph/α-CD : complexe de l'extrait d'ephedra et α cyclodextrine

Eph/β-CD :complexe de l'ephedra et β cyclodextrine

Mo-f :extrait des feuilles de moringa

Mo-f/α-CD : complexe de l'extrait des feuilles de moringa et α cyclodextrine

Mo-f/β-CD: complexe de l'extrait des feuilles de moringa et β cyclodextrine

MeOH : méthanol

DPPH :2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

HP-β-CD : 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrine

IV : injection intra-veineuse

A. ascorbique : acide ascorbique

IC 50 : concentration inhibitrice médiane

Liste des illustrations

Figure 1. Divers métabolites secondaires des plantes……1
Figure 2. Structure plane des trois principales cyclodextrines natives…….....4
Figure 3. Structure tridimensionnelles des CDs naturelles (α-/β- et γ-CD de gauche à droite)……5
Figure 4. Schéma général de la formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule hôte de cyclodextrine et une molécule invitée…….7
Figure 5. Densités de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des CD……...8
Figure 6. Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion de cyclodextrine typique……..8
Figure 7. Représentation des différentes stœchiométries des complexes d'inclusion……...9
Figure 8. Spectre d'absorption de l'hespéridine à différentes concentrations de HP-β-CD (0.0–9.0 × 10−3M)……...15
Figure 9. : Courbes représentant quelques stœchiométries possibles du complexe d'inclusion……16
Figure 10. Les feuilles Moringa (région Beni Abass Algérie) et la plante Ephédra Alata (région Taghit Algérie)……22
Figure 11. Spectre d'absorption de l'ephedra et du complexe Eph/β-CD……...23
Figure 12. Spectre d'absorption de l'ephedra et du complexe Eph/α-CD……...24
Figure 13. Spectre d'absorption de moringa et du complexe Mo-f/β-CD……...24
Figure 14. Spectre d'absorption de moringa et du complexe Mo-f/α-CD……...25
Figure 15. Courbe de Job pour le complexe Eph/β-CD……..26
Figure 16. Courbe de Job pour le complexe Eph/α-CD……..26
Figure 17. Courbe de Job pour le complexe Mo-f/β-CD……27
Figure 18. Courbe de Job pour le complexe Mo-f/α-CD……27
Figure 19. Courbe de Ka pour le complexe Eph/β-CD……...28
Figure 20. Courbe de Ka pour le complexe Eph/α-CD……...29
Figure 21. Courbe de Ka pour le complexe Mo-f/β-CD……29
Figure 22. Courbe de Ka pour le complexe Mo-f/α-CD……30
Figure 23. Réduction du radical DPPH……..31
Figure 24. Histogramme des valeurs d'IC 50 par rapport à l'acide ascorbique (mg/ml)…….....32

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications……10
Tableau 2. Produits pharmaceutiques commercialisés à base de cyclodextrines….....11
Tableau 3. Caractéristiques des produis utilisés……....21
Tableau 4. Aspect, couleur, poids sec et rendement des extraits préparés…….....22

Table des matières

Dédicace
Remerciements
Liste des abréviations
Liste des illustrations
Liste des tableaux
Sommaire

Introduction……1

Problématique et objectif…….2

Partie bibliographique

Chapitre I : Les Cyclodextrines et leurs Complexes d'inclusion…….4

Introduction……4

I. Généralité sur les cyclodextrines…….5

I.1 Caractéristiques structurales des cyclodextrines……...5

I.2 Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines ……..6

II. Complexes d'inclusion …….....6

II.1.Définition...…….....6

II.2. Principe de formation des complexes d'inclusion …….7

II.3. Préparation des complexes d'inclusion …….....9

II.4.Stœchiométrie du complexe d'inclusion ……9

III. Applications des CDs……..10

Conclusion Partielle chapitre I……..11

Chapitre II : Etude des complexes d'inclusion à base de α et β cyclodextrine avec des extraits bioactifs……..……13

Introduction …….…….13

I. Etude des complexes d'inclusions …….....13

I.1 Techniques de détection des complexes d'inclusions ……13

I.1.1 Méthode spectrophotométrie UV-visible ……14

I.2 Méthodes de caractérisation des complexes d'inclusions ……..15

I.2.1 Détermination de la stoechiométrie par Méthode de Job ……15

I.2.2 Détermination de la constante de stabilité par la méthode de Benesi-Hildebrand……16

II. Encapsulation des extraits bioactifs par les cyclodextrines ……17

II.1 Effet de complexation sur les propriétés des composés bioactifs……..17

II.2 Travaux antérieurs sur la plante Moringa et les CD ……..18

II.3 Travaux antérieurs sur la plante Ephédra et les CD ……..18

Conclusion partielle chapitre II ……19

Conclusion ……20

Partie pratique

Chapitre III : Travail effectué……21

I. Indication générale ……21

II. Appareillage et produits …… ……..21

1. Appareils …… ……21

2. Produits …… ……...21

III. Matériel végétal ……..21

IV. Préparation des extraits …… .22

1. Protocole ……..22

2. Détermination du rendement …… ..22

V. Étude des complexes d'inclusion par spectroscopie UV……23

1. Détermination de la complexation ……..23

a. Extrait d'éphédra ……23

b. Extrait des feuilles de moringa ……...24

2. Détermination de la stœchiométrie (courbe de Job)……....25

a. Extrait d'éphédra ……25

b. Extrait des feuilles de moringa ……27

3. Détermination de la constante de stabilité Ka ……27

a. Extrait d'éphèdra……..28

b. Extrait de moringa ……...29

VI. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits et leurs complexes par DPPH……...30

1. Principe ……30

2. Protocole ……..31

3. Résultats ……..31

Conclusion Générale et Perspective…….34

Partie expérimentale……..35

Références bibliographiques…….37

Annexe …….....43

Introduction

Ces dernières années, les extraits à base de plantes riches en composés bioactifs et possédant des propriétés antioxydante ne cessent de susciter l'intérêt de la société scientifique et de faire l'objet de plusieurs recherches, visant l'élargissement de leur champ d'applications notamment en tant de principes actifs majeurs dans les formulations de produits pharmaceutiques, pour la prévention de nombreuses pathologies[1] causés par les radicaux libres[2] tels que les arthroses, l'asthme, le cancer[3], le diabète, les maladies cardiovasculaires[4].



Figure 1. *Divers métabolites secondaires des plantes*[5]

Cette activité est généralement liée à des métabolites secondaires[6] des plantes comprenant une large gamme de familles de composés, dont les plus importantes sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes…), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques.

En plus de leur utilisation en médecine traditionnelle, de nombreuses études ont prouvé les effets bénéfiques des extraits de plantes sur la santé humaine. Les polyphénols

[1]K. Rashid, K. Sinha, PC. Sil, An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology, *Food Chem. Toxico*, **2013**, 62, 584-600.
[2]GP. Novelli, Role of free radicals in septic shock, *J. Physiol. Pharmacol*, **1997**, 48(4), 517-527.
[3] B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?,*Biochem. J,* **2007**, 401(1).
[4] P. Codoñer-Franch, V.Valls-Bellés, A. Arilla-Codoñer, E. Alonso-Iglesias, Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress, *Translational Res*, **2011**, 158(6), 369-384.
[5] M. Wink, Phytochemistry, **2003**. 64, 4.
[6] J. Bruneton, Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales, *Tec & Doc Lavoisier*, **2009**.

sont considérés actuellement le groupe d'intérêt majeur et constituent de bons candidats pour la recherche de médicaments[7]compte tenu de leurs propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes[8], anti-oxydantes[9] et antivirales[10], ainsi de leur disponibilité dans l'alimentation humaine.

Cependant, ces composés présentent une faible stabilité à long terme ce qui augmente leur sensibilité à la lumière et à la chaleur, ainsi qu'une faible solubilité aqueuse qui est souvent à l'origine de leur mauvaise biodisponibilité[11]. De plus, beaucoup de ces composés possèdent un goût désagréable. Des inconvénients qui restent un défi à contourner et limitent l'utilisation pharmaceutique de ces composés.

L'encapsulation des composés bioactifs avec les cyclodextrines constitue une solution prometteuse à cette problématique grâce à la capacité unique des cyclodextrines de protéger ces composés vis-à-vis les phénomènes de dégradation et d'oxydation, et d'accroitre leur solubilité dans l'eau.

Problématique et objectifs:

L'utilisation de cyclodextrines s'est avérée améliorer les propriétés physicochimiques des molécules bioactives encapsulées. En fait, une complexation efficace dépend du choix de la meilleure cyclodextrine à utiliser et des critères à prendre en considération pour faire ce choix. Tel est l'intérêt de notre travail dont l'objectif est de comparer l'impact des cyclodextrines sur l'activité biologique des extraits bioactifs.

Pour notre étude nous avons choisis comme molécules hôtes les deux cyclodextrines alpha et béta, et comme molécules invitées les extraits des feuilles de moringa (Algérie) et les extraits d'éphédra (Algérie).

La caractérisation des complexes est faite par UV-Visible accompagnée par une étude de l'impact des deux cyclodextrines sur les activités anti-oxydantes des différents extraits.

---

[7] C. Manach, A.Scalbert, C.Morand, C.Re´me´sy, L. Jime´nez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*,**2004**, 79, 727-747.

[8] B.C. Aridogan, H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbasar, E. Mumcu, Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils, *Arch. Pharm. Res*, **2002**, 25, 860-864.

[9] A. Belščak-Cvitanović, R. Stojanović, V. Manojlović, D. Komes, I. Cindrić, V. Nedović, B. Branko, Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion, *Food Research International*, **2011**, 44, 1094-1101.

[10] (a) A. Munin, F. Edwards-Lévy, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds A Review. *Pharmaceutics*, **2011**, 3, 793-829; (b) A. Scalbert, I.T. Johnson, M. Saltmarsh, Polyphenols: antioxidants and beyond, *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81, 215-217.

[11]Z. Fang, B. Bhandari, Encapsulation of polyphenols: A review, *Trends in Food Science & Technology*, **2010**, 510-523.

Ce manuscrit est divisé en deux parties:

La partie bibliographique s'étendra sur deux chapitres, le premier donne une vue générale sur les cyclodextrines et les complexes d'inclusion, et le deuxième est consacré à l'étude des complexes avec un bref aperçu de quelques travaux antérieurs concernant l'encapsulation des composés bioactifs.

La partie pratique comprend un chapitre intitulé Travail effectué qui détaillera nos résultats obtenus ainsi que les protocoles suivis lors de notre étude.

Partie bibliographique

Chapitre I : Les Cyclodextrines et leurs Complexes d'inclusion

Introduction :

Découvertes depuis plus d'un siècle, les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques obtenus de la dégradation enzymatique de l'amidon, plus précisément de l'amylose, par une enzyme la Cyclodextrine Glycosyl Transférase (**Cgtase**). Elles sont constituées par l'assemblage d'unités α-D-glucopyranose en conformation chaise, reliés par des liaisons glycosidiques α-(1-4). Une lettre grecque indique le nombre de motifs de glucoses entrant dans leur composition: α pour 6, β pour 7, γ pour 8, δ pour 9 et ainsi de suite jusqu'à μ pour 12[12].

La capacité des CD à former des complexes d'inclusion d'une manière non covalente et réversible est à l'origine de leur intérêt. Ainsi; on trouve dans la littérature une multitude d'applications industrielles utilisant les propriétés de ces complexes telles que: augmentation de la solubilité, diminution de la volatilité et augmentation de la stabilité de la molécule complexée[13].

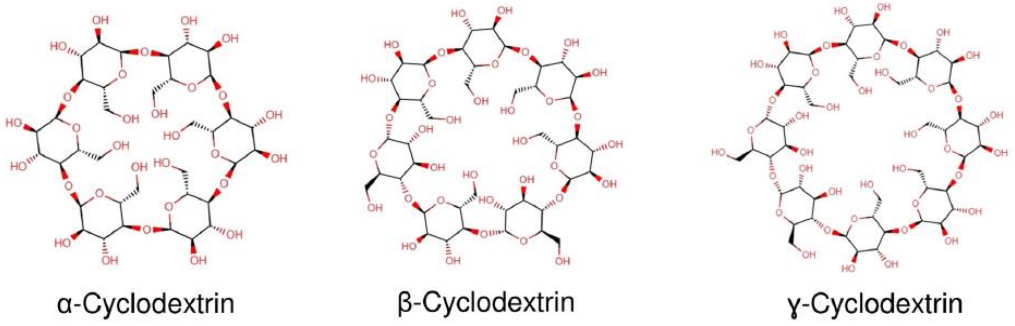


Figure 2. *Structure plane des trois principales cyclodextrines natives*[14]**.**

[12] L. Janus, Utilisations de molécules cages pour la dépollution et l'analyse chimique, **2003,** *Lille 1*.

[13]T. Loftsson, ME. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 1.Drug solubilization and stabilization, *Journal of Pharmaceutical Science,* **1996**, 85(10), 1017-1025.

[14]G. Crini, S. Fourmentin, E. Fenyvesi, G. Torri, M., Fourmentin, N. Morin-Crini, Fundamentals and applications of cyclodextrins, *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis. Springer*,**2018**.

I. Généralité sur les cyclodextrines

I.1 Caractéristiques structurales des cyclodextrines:

La structure tridimensionnelle des CDs natives apparait sous forme d'un cône tronqué délimitant une cavité centrale dont les dimensions varient selon le nombre d'unités de glucose. L'étude des monocristaux des CDs par diffraction des rayons X (et même, de quelques monocristaux de complexes CD-invité) a permis de mettre en évidence leur structure tronconique et de déterminer les dimensions des cavités[15].

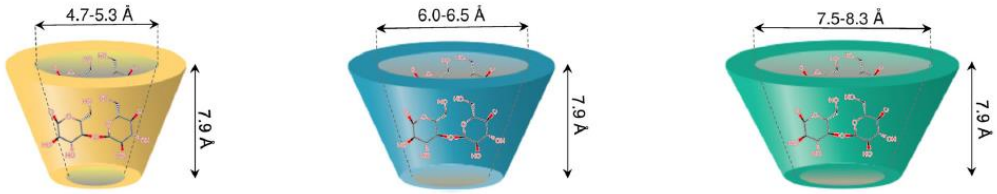


Figure 3. *Structure tridimensionnelles des CDs naturelles (α-/β- et γ-CD de gauche à droite)*[16]

De plus, une étude RMN a montré que cette structure particulière de tronc de cône est conséquence de la conformation chaise adoptée par chaque unité glucose et des liaisons glycosidiques dutype α-1,4 qui les relient[17]. Grâce à cette conformation, tous les groupements hydroxyles tapissent l'extérieur du cône, les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le bord le plus large; appelé face secondaire. Tandis que, les hydroxyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit; dit face primaire. L'intérieur de la cavité est garni par les atomes d'hydrogène portés par les carbones C3 et C5 ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique[18].

---

[15]W. Saenger, J. Jcob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, T. Takaha,Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut, *Chem. Rev*, **1998**, *98*, 1787.

[16]S. Saffarionpour, Nano encapsulation of Hydrophobic Food Flavor Ingredients and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Food and Bioprocess Technology*, **2019**, 12, 1157–1173.

[17]J. Szejtli: Cyclodextrins and their Inclusion Complexe pluses, *AkademiaiKiado*, **1982**, 100-109.

[18] D. Armspach, D. Matt, Metal-capped α-cyclodextrins: the crowning of the oligosaccharide torus with precious metals, *Chemical Communications*, **1999**.

I.2 Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines :

La structure spatiale remarquable des CDs et la distribution particulière des diverses fonctions hydroxyles des unités glucopyranose le long des surfaces interne et externe, confèrent aux CDs un caractère amphiphile caractéristique qui permet aux CDs d'y inclure des molécules hydrophobes pour former des complexes d'inclusion de type hôte – invité[19] et favorise leur solubilisation dans les solvants très polaire[20].

La solubilité des CDs dans l'eau varie d'une façon moins régulière. On observe en effet que la β-cyclodextrine possède la plus faible solubilité (18.5 g/L à 20 °C) que α-cyclodextrine (145 g/L) et γ-cyclodextrine (232 g/L)[21]. Cela est dû à sa géométrie qui favorise la formation d'une ceinture complète de liaisons hydrogène intramoléculaires au niveau du col secondaire de sorte d'avoir une structure rigide et une forte stabilisation, diminuant ainsi ses interactions favorables avec l'eau[22].

Au sein de l'α-CD, cette ceinture est incomplète car l'une des unités glucopyranose est dans une position distordue. La γ-CD est non planaire et plus flexible, et possède la plus grande solubilité dans l'eau.

Notons que des modifications chimiques et enzymatiques ont été développées afin de surmonter au défaut de solubilité des CDs dans l'eau, et notamment de la β-CD[23].

II. Complexes d'inclusion :

II.1 Définition :

Cramer fut l'un des premiers à étudier intensément les propriétés complexantes des CDs[24]. Il observa le caractère hydrophobe que présentait la cavité de la CD et lui permettant d'interagir favorablement avec des molécules apolaires en milieu aqueux[25]. Il introduisit alors la notion de complexe d'inclusion désignant la résultante de

[19] J. Szejtli , Cyclodextrins in biotechnology, *Die Stärke*, **1986,**38 (11), 388-390.

[20] W.C.E.Schofield, J.P.S.Badyal, *ACS Appl.Mater.Interfaces*, **2011**, *3*, 2051.

[21]J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev*, **1998**, *98*, 1743–1754.

[22]K.J. Naidoo, J. Y-J. Chen, J. L. M. Jansson, G. Widmalm, A.J. Maliniak, Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of β-Cyclodextrin, *Phys. Chem*, **2004**,*108*, 4236–4238.

[23] B. Gidwani, A. Vyas, Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin-β-cyclodextrin polymer, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*,**2014**.

[24] F. Cramer, W. Saenger, H-C. Spatz, J. Am. *Chem. Soc*, **1967**, 89, 14–20.

[25] G. Crini, Review: A History of Cyclodextrins,*Chem. Rev*, **2014,** 114, 10940–10975.

l'incorporation d'une molécule dans la cavité de la CD, de manière non covalente et réversible et conduisant à l'état thermodynamique le plus stable.

II.2 Principe de formation des complexes d'inclusion :

La formation des complexes d'inclusion peut se produire aussi bien en solution qu'à l'état solide. Le principe d'inclusion est régi par un gain énergétique[26]du système hôte-invité provoqué par le remplacement, dans la cavité du CD, des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes[27]sans formation ou rupture d'aucun lien covalent.

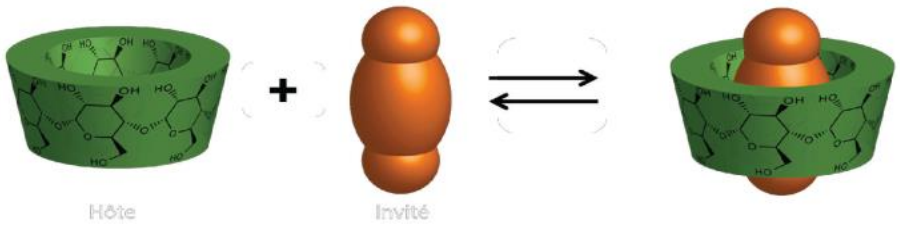


Figure 4. *Schéma général de la formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule hôte de CD et une molécule invitée*[28]

En solution aqueuse, la cavité de la CD est occupée par des molécules d'eau. Cela engendre des interactions énergétiques polaire-apolaire défavorables[29]. Des molécules moins polaires pourront donc facilement remplacer ces molécules d'eau[30].

[26] L. Liu, O.X. Guo, The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins,*Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2002**, 42, 1-14.

[27] M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, Process Biochemistry, 2004, 1033-1046.

[28]M.Kfoury, N. Gabriela Hădărugă, D. IoanHădărugă, S. Fourmentin, 4 - Cyclodextrins as encapsulation material for flavors and aroma, *Nanotechnology in the Agri-Food Industry*,**2016**, 127-192.

[29] S. Muñoz-Botella, B. Del Castillo, M. A. Martyn, Cyclodetrin properties and applications of inclusion complex formation, *ARS Pharmaceutica*, **1995**, 36 (2), 187–198.

[30]R.Yang, J-B.Chen, X-Y.Dai, R.Huang, C-F.Xiao, Z-Y.Gao, B.Yang, L-J.Yang, S-J.Yan, H-B.Zhang, C.Qing, J.Lin, *Carb.Polymers*, **2012**, *89*, 89.

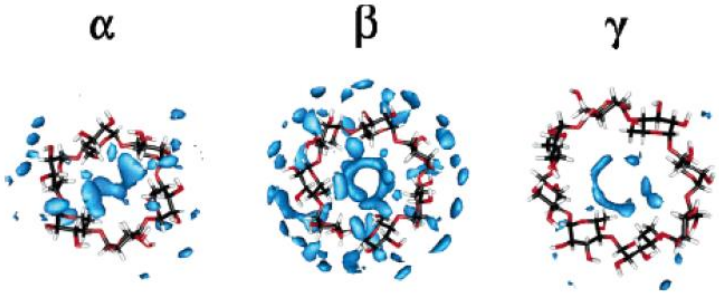


Figure 5. *Densités de probabilité de présence des molécules d'eau au voisinage des CDs*[31]

Suite au rapprochement de l'invité de la CD, les molécules d'eau sont expulsées de la cavité du fait de la diminution des interactions et du nombre de liaisons hydrogène avec la cavité. En se débarrassant de la couche d'hydratation qui l'enveloppe, l'invité hydrophobe pénètre et occupe la cavité de la CD formant ainsi un complexe d'inclusion[32].

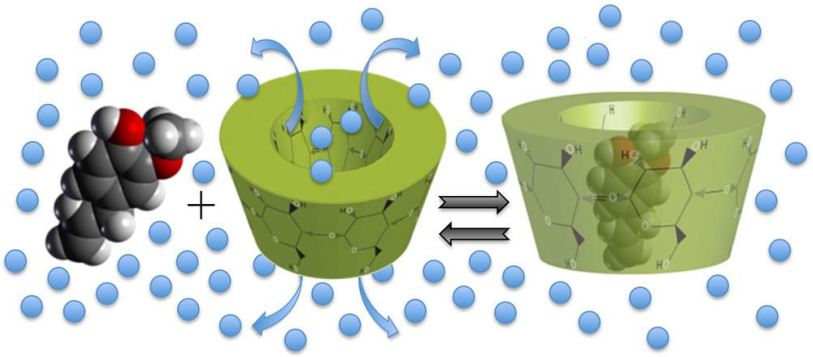


Figure 6. *Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion de CD typique*[33]

Les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution. Ce processus réversible peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité (Ks). Dans le cas le plus simple, l'équation d'équilibre peut s'écrire de manière suivante:

$$CD + I \rightleftarrows CD:I \qquad K = \frac{[CD:I]}{[CD][I]} \qquad \text{..... (1)}$$

[31]K.J.Naidoo, J.Chen, J.L.M.Jansson, G.Wildmalm, A.Maliiak, *J.Phys.Chem B*, **2004**. *108*, 4236.

[32] H. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatile, *Flavour and Fragrance Journal*, **2010**.

[33]P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2014**.

Où:

- CD représente la molécule hôte soit la cyclodextrine,
- I la molécule invitée
- K est la constante de stabilité du complexe.

II.3 Préparation des complexes d'inclusion :

La préparation peut s'effectuer en phase liquide ou en phase solide dont le principe consiste généralement à dissoudre la CD en présence de la molécule invitée et laisser un équilibre s'établir. La méthode courante repose sur l'agitation d'une solution aqueuse de CD avec la molécule invitée ou sa solution. L'équilibre est atteint par agitation intense et refroidissement lent pendant quelques heures.

II.4 Stœchiométrie du complexe d'inclusion :

Le phénomène d'encapsulation d'une substance invitée dans la cavité de CDs peut avoir lieu partiellement ou en totalité.

De nombreux exemples de divers arrangements structuraux des complexes CD-invité, sont décrits dans la littérature[34]. La figure suivante regroupe les structures des principaux complexes ayant fait l'objet de publications.

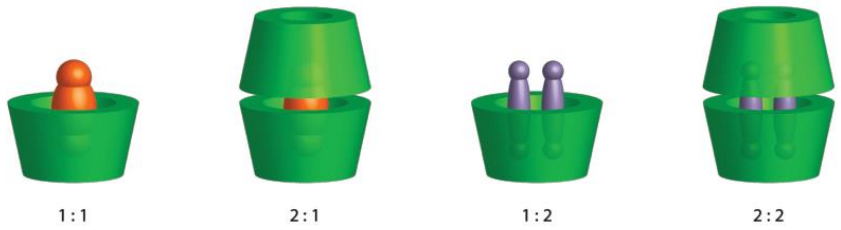


Figure 7. Représentation des différentes stœchiométries des complexes d'inclusion[35].

L'exemple le plus simple et le plus fréquent est l'obtention d'un complexe d'inclusion de stœchiométrie 1:1 indiquant qu'une molécule de CD interagit avec une molécule invitée. La taille de la cavité et de la molécule invitée jouent donc un rôle

[34]A.Douhal, Chemical, physical and biological aspects of confined systems*Cyclodextrine Materials, PhtochemstryPhotophysics and photobiolog , Elesevier*,**2006**, 5.

[35] D. Landy, F. Tetart, E. Truant, P. Blach, S. Fourmentin, G. Surpateanu, Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry, *J. Incl. Phenom. Macro*, **2007**, 57, 409–413.

important dans le processus de complexation[36].

III. Applications des CDs:

Les applications des CDs tirent partie de leurs propriétés complexantes en milieu aqueux avec un large éventail de molécules invitées. Par la formation de complexe d'inclusion, la stabilité, la solubilité, la biodisponibilité, la durée de vie, la toxicité et l'odeur de la molécule invitée se trouvent favorablement modifiées[37]. Ces propriétés sont mises à profit dans divers domaines : pharmaceutique, agrochimique, analytique, catalytique et alimentaire[38].

Tableau 1. Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications[39].

Exemples de propriétés	Produits ou substances concernés
Applications pharmaceutiques	
Augmentation de la solubilité	Prostaglandines, vitamines A, D, E, K
Amélioration de la biodisponibilité	Indométacine
Diminution des effets secondaires	Phénylbutazone
Augmentation de la stabilité	Vitamines A, E, acide acétylsalicylique
Applications alimentaires	
Stabilité des produits volatils	Menthol, moutarde, confiseries
Extraction de composants indésirables	Cholestérol (beurre, lait, oeuf)
Résistance à l'oxydation	Framboise, miel
Resistance à l'hydrolyse	Aspartame
Masquage d'odeurs indésirables	Café, thé, limonène
Prolongation des arômes	Bonbons, chewing-gum, épices
Applications cosmétologiques	
Masquage d'odeurs désagréables	Mercaptans
Stabilité des parfums	Essence de citron
Diminution de l'effet irritant	Acide rétinoïque
Amélioration du pouvoir moussant	Savons, mousses
Applications agrochimiques	
Diminution de la toxicité	Herbicides, fongicides

[36] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, *Kluwer Academic Publishers*,**1988**, 146-147.

[37] T. Loftsson, Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug biovailability through addition of water-soluble polymers, *Pharmazie*, **1998**, 53(11), 733-40.

[38] L, Szente, J. Szejtli, Cyclodextrins as food ingredients, Trends in Food Science & Technology, **2004**, 15, 137-142.

[39]G. Crini, M. Morcellet, N. Morin, L'actualité chimique 247, **2001**, 18-25.

Les CDs sont couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique pour la formulation de médicaments. Leur capacité à former des complexes d'inclusion permet d'augmenter la solubilité des principes actifs en milieux aqueux, d'améliorer potentiellement leur biodisponibilité in vivo[40].

Le Tableau 2[41] regroupe quelques exemples de produits pharmaceutiques à base de CDs mis sur le marché.

Tableau 2. Produits pharmaceutiques commercialisés à base de cyclodextrines.

Principe actif	Formulation	Nom commercial	Marché
		α-CD	
Alprostadil	IV	Caverject, Dual	EU. (Pfizer)
PGE1	Parentérale	Prostavastin	EU.(Schwarz)/JPN.(Ono)
		β-CD	
Cetirzine	Comprimé	Cetrizin	DEU.(Losan Pharma)
Dexamethasone	Pommade	Glymesason	JPN. (Fujinaga)
Nicotine	Comprimé	Nicorette	EU. (Pfizer)
Omeprazole	Comprimé	Omebeta	EU. (Betafarm)
Piroxicam	Comprimé	Brexin	EU. (Chiesi)
Acide tiaprofénique	Comprimé	Surgamyl	EU. (Roussel-Maestrelli)
		HP-β-CD	
Itraconazol	Orale et I.V.	Sporanox	EU., É-U. (Janssen)
Cisapride	Suppositoire	Propulsid	EU. (Janssen)
Hydrocortisone	Solution	Dexocort	EU. (Actavis)
Indomethacin	Goutte oculaire	Indocid	EU. (Chauvin)

DEU : Allemagne; EU : Europe; É-U : Etats-Unis; JPN : Japon.

Conclusion Partielle chapitre I:

Au travers de ce premier chapitre, nous avons donné un aperçu général sur les CDs et leurs propriétés, notamment leur affinité remarquable à accueillir un large éventail de molécules hydrophobes à l'intérieur de leur cavité. Ces propriétés ont fait des CDs l'objet de nombreuses études et sont actuellement mises à profit dans divers domaines dont la

[40] (a) H. Brøndsted, L. Hovgaard, L. Simonsen, Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. II: Synthesis and characterization, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1995**; (b) L. Matilainen, K. Lambertsen Larsen, R. Wimmer, P. Keski-Rahkonen, S. Auriola, T. Järvinen, P. Jarho, The effect of cyclodextrins on chemical and physical stability of glucagon and characterization of glucagon/γ-CD inclusion complexes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*,**2008**.

[41]M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers,*Advanced Drug Delivery Reviews*,**2007**.

formulation de médicaments dû à l'impact que peut avoir l'encapsulation sur les caractéristiques physicochimiques et les activités biologiques des molécules invitées.

<u>Chapitre II</u> : Etude des complexes d'inclusion à base de α et β cyclodextrine avec des extraits bioactifs

Introduction :

Dans l'industrie pharmaceutique, les CDs sont utilisées comme excipients de médicaments pour améliorer la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité des molécules bioactives[42].Nous focaliseront dans ce chapitre sur les complexes d'inclusion à base de produits naturels.

I. Etude des complexes d'inclusions :

L'évaluation de la formation d'un complexe d'inclusion nécessite souvent l'utilisation de différentes techniques analytiques adéquates pour une caractérisation appropriée selon le type de la molécule invitée[43].

I.1 Techniques de détection des complexes d'inclusions :

L'encapsulation des molécules bioactives par les CDs induit des modifications sur les caractéristiques physico-chimiques[44] des deux espèces. En théorie, toute technique analytique permettant de mettre en évidence ces changements peut être employée pour l'étude et la caractérisation des complexes[45] tels que la spectroscopie RMN, la spectroscopie UV-visible, la spectrométrie de fluorescence, l'analyse cristallographique, la spectrométrie de masse, la potentiométrie[46].

Seul le principe de la technique courante utilisée pour l'étude du phénomène d'inclusion dans ce travail, à savoir la spectrophotométrie UV-visible sera exposé dans cette partie de ce chapitre.

---

[42]K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems, *Chemical Reviews*, **1998**, 98 (5), 2045-2076.

[43]P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2014**.

[44]K. Hirose, A Practical Guide for the Determination of Binding Constants, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, ***2001***, 39, 193-209.

[45] T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, Cyclodextrins in drug delivery. Expert Opin, *Drug Deliv*, **2005**, 2, 335–351.

[46] G. Piel, S. Moutard, B. Perly, S. Henry De Hassonville, P. Bertholet, V. Barillaro, M. Piette, L. Delattre, B. Evrard, Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy, *J. Drug Deliv. Sci. Tec*,**2004**, 14(1), 87–91.

I.1.1 Méthode spectrophotométrie UV-visible :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance d'une substance chimique donnée en solution. C'est une méthode simple, économique, rapide pour la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion en solution.

En effet, le transfert de la molécule invitée d'un milieu aqueux vers la cavité de cyclodextrine peut apporter des modifications de son spectre d'absorption UV d'origine, en raison du remplacement partiel ou total de son environnement ce qui entraine de nouvelles interactions soluté-environnement[47]. Par conséquent, des déplacements hypsochromes ou bathochromes du spectre UV de l'invité, et/ou une augmentation ou une diminution de son intensité peuvent être observés[48].

A titre d'exemple, des déplacements bathochromiques dûs à la formation de complexes d'inclusion avec des CDs ont été rapportés pour Naproxène[49,50], Itraconazole[51], Rutine[52], Génistéine[53] et Erythromycine[54]. En outre, des déplacements vers des longueurs d'onde plus petites ont été rapportés lors de la complexation d'acide salicylique, d'acide nicotinique, d'Hydrocortisone[55] avec des CDs.

[47] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands*, **1988**.

[48]P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2014**.

[49] G.P. Bettinetti, P. Mura, A. Liguori, G. Bramanti, F. Giordano, Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrins in aqueous solution and inthe solid state,*Farmaco 44*, **1989**, 195-213.

[50]G.P. Bettinetti, F. Melani, P. Mura, M. Monnanni, F. Giordano, Carbon-13 NMR study of naproxen interaction with cyclodextrins in solution, *J. Pharm. Sci*, **1991**, 1162-1170.

[51] K. Miyake, T. Irie, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, M. Hirano, Y. Okamoto, Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- β-cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution, *Int. J. Pharm*, **1999**, 179, 237-245.

[52] M.L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, R. Stancanelli, D. Raneri, S. Catania, C.Costa, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, The rutin/ β-cyclodextrin interactions infully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays, *J. Pharm.Biomed. Anal*, **2005**, 1019-1027.

[53]Cannavà, V. Crupi, P. Ficarra, M. Guardo, D. Majolino, A. Mazza-glia, R. Stancanelli, V. Venuti, Physico-chemical characterization of anamphiphilic cyclodextrin-genistein complex, *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2010**, 1064-1068.

[54] W. Song, X. Yu, S. Wang, R. Blasier, D.C. Markel, G. Mao, T. Shi, W. Ren, Cyclodextrin–erythromycin complexes as a drug delivery device for ortho-pedic application, *Int. J. Nanomed*, **2011**, 3173-3186.

[55] I.K. Chun, D.S. Yun, Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β-cyclodextrin in aqueous solution and in solidstate, *Int. J. Pharm*, **1993**. 91-103.

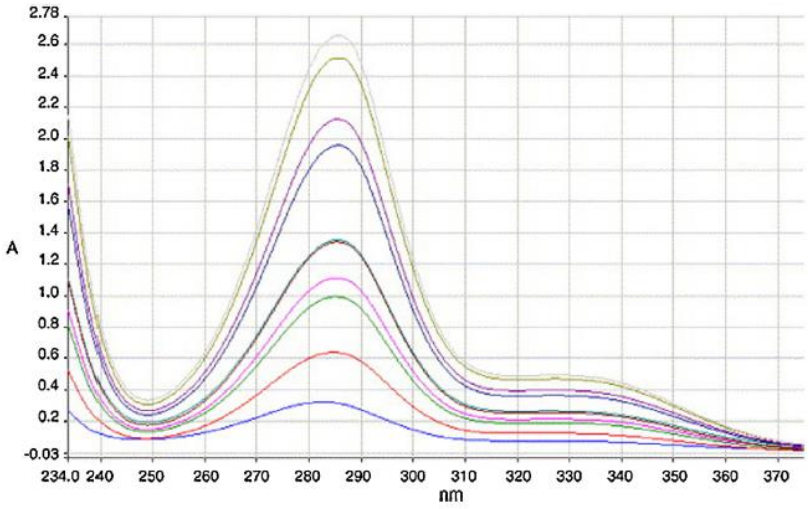


Figure 8. *Spectre d'absorption de l'hespéridine à différentes concentrations de HP-β-CD (0.0–9.0 × 10−3M)*[56].

I.2 Méthodes de caractérisation des complexes d'inclusions :

La stœchiométrie et la constante de stabilité du complexe peuvent être évaluées en analysant les changements du spectre d'absorption UV-Visible ou le déplacement chimique en RMN[57]. L'évaluation se fait en utilisant des méthodes expérimentales comme la Méthode de Job[58] et l'équation de Benesi-Hildebrand[59].

Nous présentons par la suite l'importance et le rôle de ces deux paramètres dans la caractérisation des complexes d'inclusion ainsi que les deux méthodes employées dans notre travail pour les déterminer.

I.2.1 Détermination de la stœchiométrie par Méthode de Job :

La méthode de Job, appelée aussi méthode des variations continues, pour la détermination de la stœchiométrie d'un complexe est basée sur des expériences de titrations[60]. Le principe consiste à préparer une série de mélanges en proportions variables, de la molécule invitée par rapport à la molécule hôte et suivre l'évolution d'une variable physico-chimique P de chaque mélange (ex : absorbance…etc.). Deux conditions sont à considérer en appliquant cette méthode :

---

[56] S, Tommasini, D. Raneri, R. Ficarra, M.L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Ficarra, Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β-cyclodextrin, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **2004**, 35, 379-387.

[57] P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2014**.

[58] K.A. Connors, Binding Constants, *Wiley*, **1987**.

[59] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, *KluwerAcademic Publishers, Dordrecht,The Netherlands*, **1988**.

[60] P. Job, *Compt.Rend, Acad.Sci.Paris*, **1925**, *180*, 928.

- Les concentrations initiales des solutions mères utilisées doivent être identiques.
- Le volume du mélange des deux solutions doit rester constant.

Un rapport r, compris entre 0 et 1, est calculé pour chaque mélange préparé :

$$\mathbf{r = [PA] / ([PA] + [CD])} \ldots\ldots (2)$$

Avec :

[PA] : Concentration en principe actif,

[CD] : Concentration en CD.

Une courbe en cloche est obtenue en traçant la quantité $\Delta P * r$ en fonction du rapport r et la valeur de r au maximum de la courbe indique la stœchiométrie du complexe.

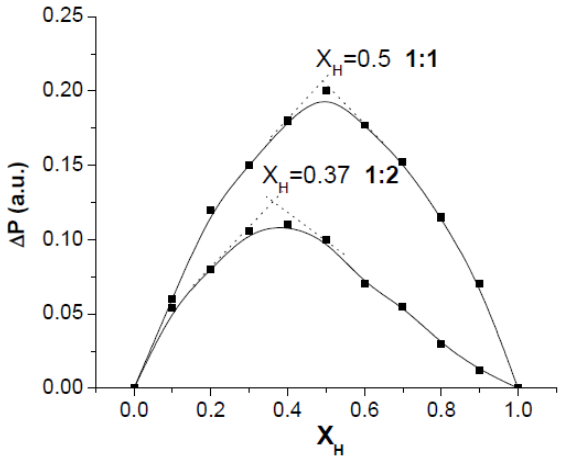


Figure 9. *Courbes représentant quelques stœchiométries possibles du complexe d'inclusion*[61].

I.2.2 Détermination de la constante de stabilité par la méthode de Benesi-Hildebrand:

Développée par Benesi et Hildebrand pour étudier les complexes, cette méthode consiste à observer les variations d'une propriété physico-chimique de la molécule invitée en question et son complexe tout en maintenant sa concentration constante et variant celle de la cyclodextrine ajoutée. Dans l'analyse UV, la variable observable au cours des titrations est l'absorbance.

[61]C. Tablet, I. Matei, M. Hillebrand, The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations, The Importance of Quantity in Biomedicine, Dr Alessio Innocenti (Ed.), *InTech*, **2012.**

La constante de stabilité ou d'association Ka est déterminée graphiquement en traçant 1/ΔA en fonction de 1/ [PA] qui nous permis d'établir la relation qui correspond à l'équation d'une droite de type :

$$\frac{\mathbf{1}}{\Delta \boldsymbol{A}} = \frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{PA}]\times \boldsymbol{ka}\times \Delta\boldsymbol{\varepsilon}\times[\boldsymbol{CD}]} + \frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{PA}]\times\Delta\boldsymbol{\varepsilon}} \text{.....(3)}$$

Avec :

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

Δε : 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 Δε et la constante d'association Ka est calculée à partir de la pente de la droite.

II. Encapsulation des extraits bioactifs par les cyclodextrines :

L'utilisation des composés bioactifs dans l'industrie pharmaceutique au lieu de composés synthétiques offre de nombreux avantages tel que : un haut niveau de biocompatibilité et une faible toxicité. Cependant, leur application en tant que produits pharmaceutiques reste limitée en raison de leur faible solubilité dans l'eau, leur mauvaise biodisponibilité et leur dégradation rapide vis-à-vis les facteurs environnementaux (la température, le pH, la lumière…)[62].

Dans ce qui suit, nous allons mettre en évidence l'utilisation des CDs, notamment l'α- et β-CDs, comme agents d'encapsulation des composés bioactifs des extraits de plantes.

II.1 Effet de complexation sur les propriétés des composés bioactifs:

De nombreuses études rapportent le piégeage d'un large éventail de composés bioactifs faiblement hydrosolubles au sein des CDs: Resvératrol en β-CD et maltosyl-β-

[62] (a) Z. Fang, B. Bhandari, Encapsulation of polyphenols: A review, *Trends in Food Science & Technology*, **2010,** 21(10), 510–523; (b) H. M. C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour and Fragrance Journal*, **2010**, 25(5), 313–326; (c) A.Munin, F. Edwards-Lévy, Encapsulation of natural poly-phenolic compounds: A review, *Pharmaceutics*, **2011**,3(4), 793–829.

CD[63], extrait de feuille d'olivier en β-CD[64], kaempférol, quercétine et myricétine en 2-(hydroxy-propyl)-ß-CD (HP-β-CD)[65], rutine dans les β-CD[66], hespérétine dans les HP-ß CD[67], 3-hydroxyflavone dans les α- et β-CD[68]. L'inclusion a eu pour effet l'augmentation de leur solubilité dans l'eau ainsi que de leur capacité antioxydante.

II.2 Travaux antérieurs sur la plante Moringa et les CD :

Les feuilles de Moringa Oleifera présente plusieurs bienfaits pour la santé humaine[69]et sont riches en composés polyphénoliques bioactifs[70].

Il a été illustré que ces polyphénols présentaient une stabilité plus élevées quand la HP-β-CD a été incorporée dans le solvant pour leur extraction à partir des feuilles de moringa. La HP-β-CD a également joué un rôle dans la protection de ces composés de la dégradation lors du stockage à 50°C[71].

II.3 Travaux antérieurs sur la plante Ephédra et les CD :

Plusieurs études rapportent les multiples propriétés pharmacologiques de l'éphédra[72]'[73]dues principalement à sa composition riche en flavonoïdes, alcaloïdes et

---

[63] C. Lucas-Abellán, I.Fortea, J.M. López-Nicolás, E. Núñez-Delicado, Cyclodextrins as resveratrol carrier system, *Food Chem*, **200**7, *104*, 39–44.

[64] I. Mourtzinos, F. Salta, K. Yannakopoulou, A. Chiou, V.T. Karathanos, Encapsulation of olive leaf extract in β-cyclodextrin, *J. Agric. Food Chem*, **2007**, *55*, 8088–8094.

[65] M.T. Mercader-Ros, C. Lucas-Abellán, M.I. Fortea, J.A. Gabaldón, E. Núñez-Delicado, Effect of HP-β-cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols, *Food Chem*, **2010**, *118*, 769–773.

[66] D. Haiyun, C. Jianbin, Z. Guomei, S. Shaomin, P. Jinhao, Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β-cyclodextrin with rutin, *Spectrochim. Acta A*, **2003**, *59*, 3421–3429.

[67] S. Tommasini, M.L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Donato, C. Costa, S. Catania, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2005**, *39*, 572–580.

[68] M.L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, D. Raneri, R. Stancanelli, P. Ficarra, R. Ficarra, C. Costa, S. Catania, C. Rustichelli, G.Gamberini, Effects of α- and β-cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **2004**, *35*, 365–377.

[69] M. Farooq, M. Hussain, A. Wahid, K. Siddique, Drought Stress in Plants: An Overview, **2012**.

[70]S. Lalas, V. Athanasiadis, I. Karageorgou, G. Batra, G.D. Nanos, D. P. Makris, Nutritional Characterization of Leaves and Herbal Tea of *Moringa oleifera* Cultivated in Greece. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **2017**, 23(4), 320-333.

[71] I. Karageorgou, S. Grigorakis, S. Lalas, D, Makris, The effect of 2-hydroxypropyl β-cyclodextrin on the stability of polyphenolic compounds from Moringa oleifera Lam leaf extracts in a natural low-transition temperature mixture, *Nova Biotechnologica et Chimica*.**2018**, 17, 29-37.

[72]I.Yamada, T. Goto, S. Takeuchi, S. Ohshima, K. Yoneyama, T. Shibuya, E. Kataoka, D. Segawa, W. Sato,T. Dohmen, (Ephedra sinicaStapf) Protects against d-Galactosamine and Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Failure, *Cytokine*, **2008**, 41,293-301.

[73]C.Danciu, D.Muntean, E. Alexa, C. Farcas, C. Oprean, I. Zupko, A. Bor, D. Minda, M. Proks, V. Buda, Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of Ephedra alataDecne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line, *Molecules*, **2018**, 24, 13.

acides phénoliques[74].

Une étude a montré que les CD natives augmentent la teneur en éphédrine dans les extraits aqueux d'éphédra en augmentant sa solubilité dans l'eau, avec la β-CD prouvant plus d'efficacité d'extraction en formant le complexe d'inclusion le plus stable[75].

Conclusion partielle chapitre 2 :

Dans ce chapitre, nous avons donné un bref résumé des travaux publiés sur les complexes d'inclusion à base des CD et les composés bioactifs des extraits naturelles, illustrant l'impact que peut apporter l'utilisation des CD sur les propriétés de ces composés

[74] B.-M. Zhang, Z.-M. Wang, P. Xin, Q.-H. Wang, H. Bu, H.-X. Kuang, Phytochemistry and Pharmacology of Genus Ephedra. *Chin. J. Nat. Med*. **2018**. 16, 811-828.

[75] M. Kamigauchi, K. Kawanishi, H. Ohishi, T. Ishida, Inclusion effect and structural basis of cyclodextrins for increased extraction of medicinal alkaloids from natural medicines. *Chem Pharm Bull*. **2007**. 55(5):729-33.

Conclusion

Comme il a été démontré au cours de cette partie bibliographique, l'application des CDs présente un choix viable afin de surmonter les inconvénients rencontrés lors de l'utilisation des composés bioactifs grâce à leur structure supramoléculaire de forme de cage.

Les différents résultats rapportés dans cette partie ont révélé que les complexes d'inclusion permettent de préserver les molécules actives naturelles encapsulées contre l'oxydation et la dégradation thermique, prolongeant par conséquent leur durée de conservation. En outre, il a également été démontré que ces complexes améliorent favorablement leurs propriétés physiques et organoleptiques. Ces facteurs influencent considérablement les activités biologiques de ces molécules.

Néanmoins, vu la diversité des structures de ces molécules, leur encapsulation est régie primordialement de la taille de la cavité de la CD utilisée.

Partie pratique

Chapitre III : Travail effectué

I. Indication générale :

Au cours de notre travail, toutes les manipulations ont été réalisées dans le laboratoire de **C**himie Organique, **S**ubstances **N**aturelles et **A**nalyses **COSNA.** Tandis que les analyses ont été effectuées au niveau du **La**boratoire **S**ubstances **Na**turelles et **Bio**actives **LASNABIO.**

II. Appareillage et produits :

1. Appareils :

- Les différentes mesures d'absorption ana UV-visible des complexes sont réalisées a l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible **Perkin Elmer Lambda 25** a double faisceaux.
- Les différentes pesées de ont été faites en utilisant une balance analytique de marque **Kern 870**.
- L'évaporation des solvants a été faite à l'aide d'un rotavapor de la marque **Heidolph.**

2. Produits :

Le tableau suivant regroupe les différents produits utilisés dans notre travail et leurs origines.

Tableau 3 : Caractéristiques des produis utilisés

Produit	Origine	Pureté
MeOH	Sigma Aldrich	≥ 99,7%
α-CD	Sigma Aldrich	98%
β-CD	Sigma Aldrich	≥ 97%
Acideascorbique	Sigma Aldrich	99%
DPPH	Sigma Aldrich	90%

III. Matériel végétal :

Le matériel végétal faisant l'objet de notre étude est la partie feuilles du Moringa Oleifera et de la plante Ephedra Alata.



Figure 10.*Les feuilles* ***MoringaOleifera*** *(région Beniabass Algérie) et la plante* ***Ephédra Alata*** *(région Taghit Algérie).*

IV. Préparation des extraits :

1. Protocole :

Dans un erlenmeyer de 500 ml emballé de papier aluminium, on introduit la plante auxquelles on a ajouté 200 ml de méthanol 97°. Le macérât est récupéré après 7 jours, filtré puis évaporé.

2. Détermination du rendement :

Le rendement d'extraction exprimé en % et calculé par rapport au poids de la matière sèche initiale suivant la relation:

$$\mathbf{R}(\%) = \left(\frac{\mathbf{Pf}}{\mathbf{Pi}}\right) \times \mathbf{100} \ldots\ldots (4)$$

Avec

Pf : Poids de l'extrait sec (g).

Pi: Poids de l'échantillon initial(g).

Tableau 4. Aspect, couleur, poids sec et rendement des extraits préparés.

Extrait	Aspect	Couleur	Pi (g)	Pf (g)	R (%)
Moringa (Mo-f)	Visqueux	Vert foncé	15.21	4.17	27.42
Ephedra (Eph)	Visqueux	Vert clair	15.20	3.81	25.26

V. Étude des complexes d'inclusion par spectroscopie UV:

Le but de la présente étude est d'établir un protocole d'inclusion à base d'extrait de plante et de déterminer la CD appropriée, pour la complexation des extraits bioactifs et de comparer l'impact des complexes d'inclusion sur l'activité antioxydante des extraits.

1. Détermination de la complexation :

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans un intervalle [190-400nm] en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible avec des cellules en quartz de 1 cm.

L'étude est faite en préparant quatre solutions mères à concentration identique de 0,227mg/ml ; à savoir deux solutions pour les deux extraits en question, l'extrait d'éphédra et l'extrait des feuilles de moringa, ainsi que deux solutions mères pour les deux molécules hôtes choisies α-CD et β-CD.

En premier lieu, les spectres UV de chaque solution mère ont été enregistrés. Ensuite, ceux de chaque complexe 1 :1 ; obtenu en mélangeant 2 ml de la solution mère de chaque extrait avec 2 ml de la solution mère de chaque cyclodextrine.

La formation des complexes est confirmée en suivant le changement dans les spectres d'absorption des extraits libres et des extraits complexés avec les CD.

Notons que la transparence des CD fait qu'elles n'absorbent pas dans l'UV.

a. Extrait d'éphédra :

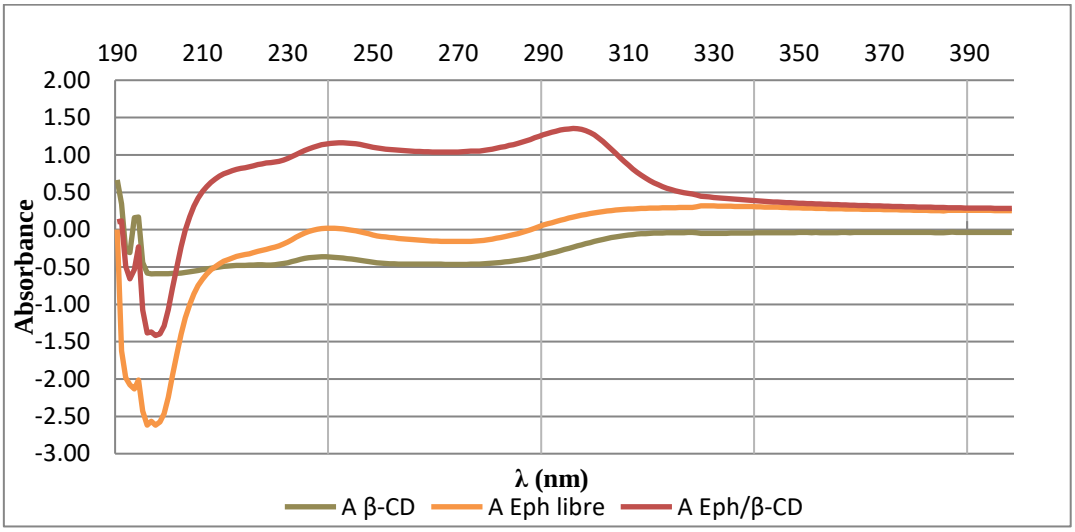


Figure 11.*Spectre d'absorption de l'ephedra et du complexe Eph/β-CD.*

D'après les résultats des spectres UV, on constate une augmentation de l'intensité de l'absorption du complexe par rapport à l'extrait libre dans l'intervalle [290-310nm] due à un effet hyperchrome. Ensuite, une diminution attribuée à un effet hypochrome. L'absorbance maximale est enregistrée à 297 nm (Voir annexe).Ces changements prouvent que le phénomène de complexation a eu lieu.

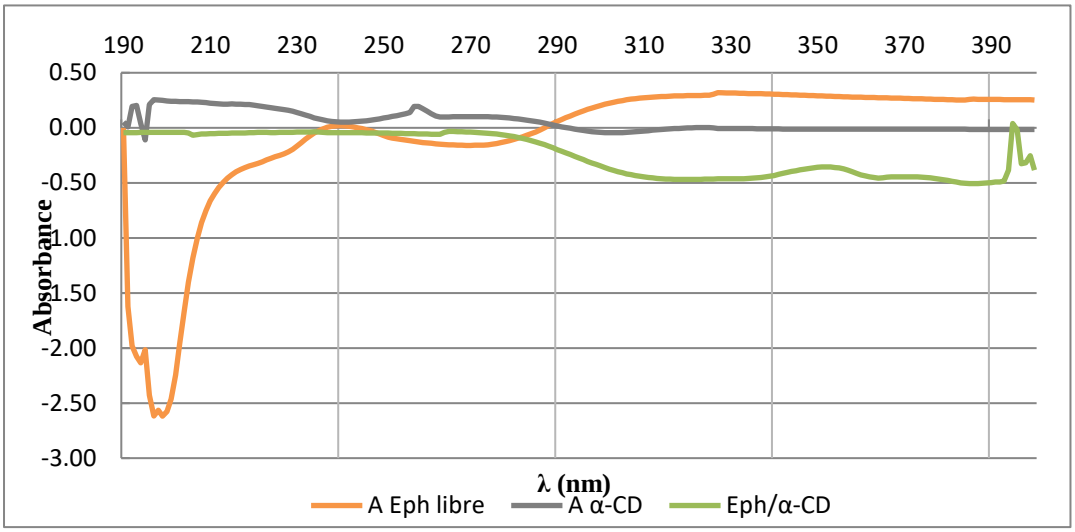


Figure 12.*Spectre d'absorption de l'ephedra et du complexe Eph/α-CD.*

Ici, on voit clairement des variations prononcées dans les intervalles [190-230 nm] et [290-390nm] avec la longueur d'onde maximale du complexe enregistrée à 195 nm. (Voir l'annexe).

b. Extrait des feuilles de moringa :

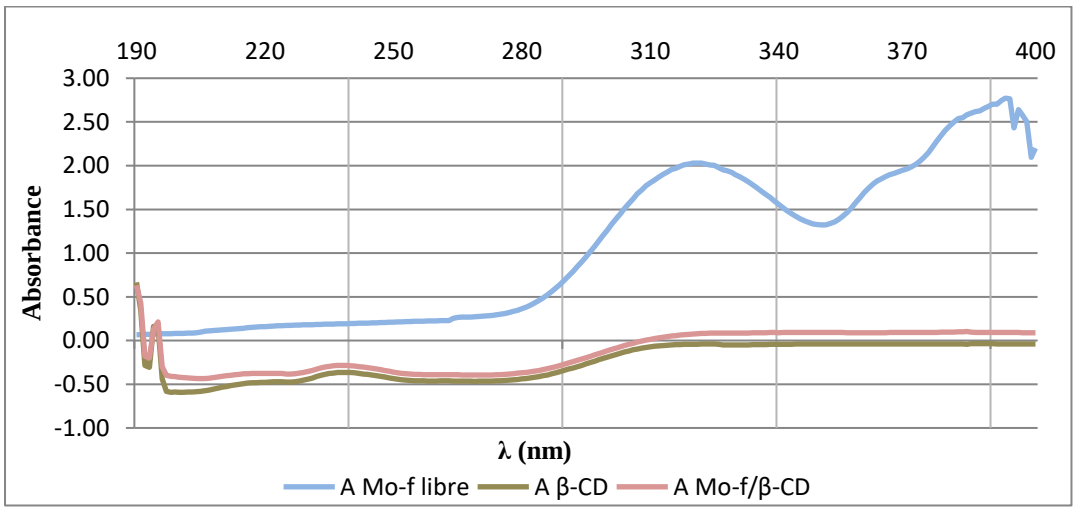


Figure 13.*Spectre d'absorption de moringa et du complexe Mo-f/β-CD*

Dans le cas du complexe Mo-f/β-CD, un effet hypochrome (diminution de l'intensité d'absorption) est à constater, ce qui prouve que la complexation a eu lieu. Les valeurs d'absorbance montrent une absorbance maximal à λ_{max} = 190 nm. (Voir l'annexe).

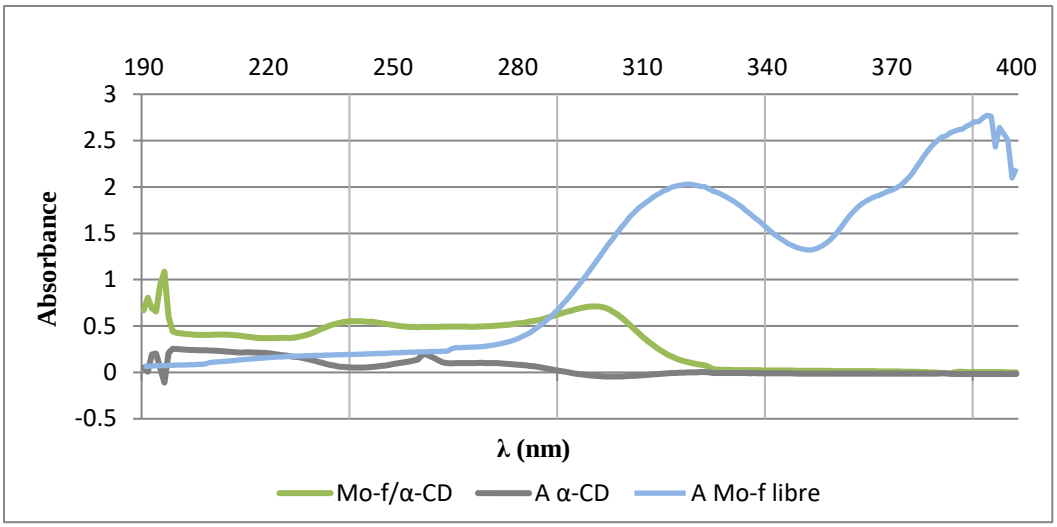


Figure 14.*Spectre d'absorption de moringa et du complexe Mo-f/α-CD*

Du même pour le complexe Mo-f/α-CD, on remarque une diminution de l'intensité d'absorption avec une λ_{max} = 195 nm. Ce qui explique l'inclusion des molécules de l'extrait.

2. Détermination de la stœchiométrie (courbe de Job):

L'étude d'un complexe commence d'abord par la détermination de sa stœchiométrie. Dans le cas des complexes d'inclusion à base de cyclodextrine, la méthode appliquée est la méthode des variations continues ou méthode de Job.

A partir des solutions mères préparées précédemment, nous avons préparés 11 mélanges pour chaque complexe, en différentes proportions pour atteindre un volume final constant de 2 ml. Les mesures d'absorbance des différents mélanges ont été à λ_{max} de chaque complexe.

Comme les extraits naturels sont des mélanges complexes de plusieurs molécules. Le phénomène de complexation compétitive entre les différentes molécules a lieu.

a. Extrait d'éphédra :

La figure suivante représente la courbe de Job pour le de complexe Eph/β-CD. On observe un maximum de Xi = 0,3, ce qui implique la formation d'un complexe de

stœchiométrie 2:1, c'est dire que deux molécules de β-CD ont interagit avec une seule molécule invitée. De plus, on remarque la formation d'autres complexes de stœchiométrie 1:1 ; 1:2 et 1:3correspondant aux rapports 0,5 ; 0,7 et 0,9 respectivement sur la courbe de job. La formation de plusieurs complexes de nature différente est logique vu que l'extrait d'éphédra contient plusieurs molécules invitées compétitives.

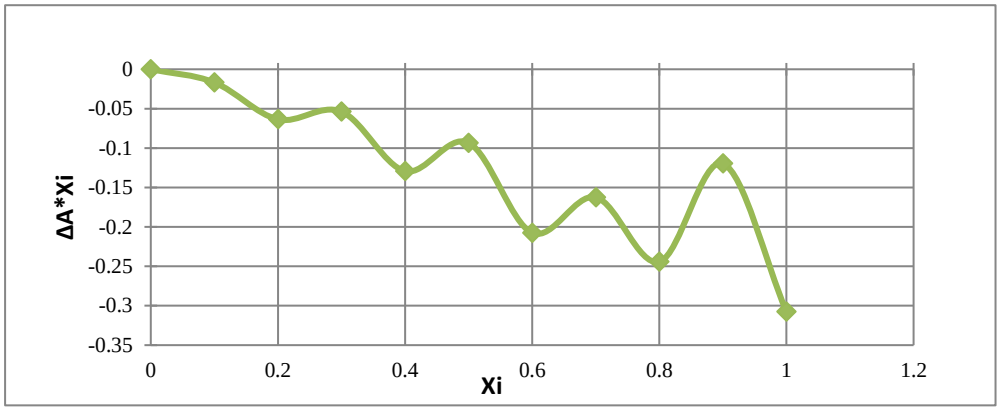


Figure 15. Courbe de Job pour le complexe Eph/β-CD

Pour le complexe Eph/α-CD, l'allure de la courbe de Job ne donne aucune indication sur la stœchiométrie et peut être expliquée par le fait que l'équilibre de la complexation n'est pas encore atteint.

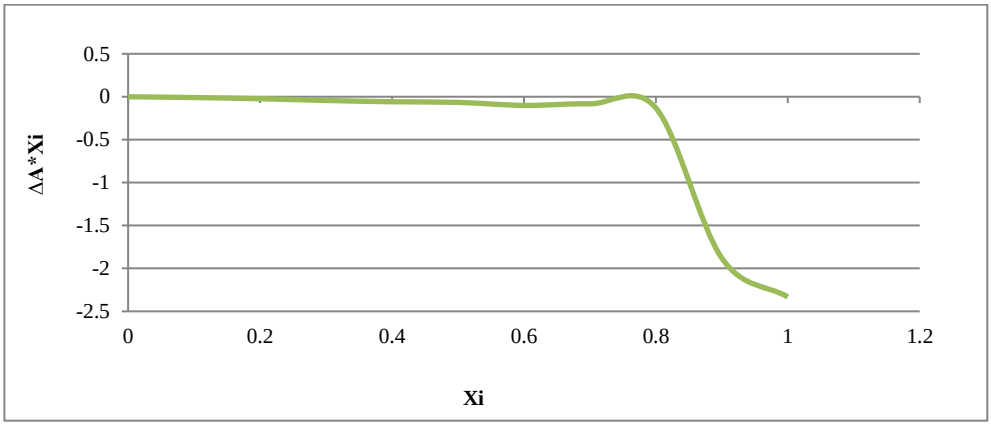


Figure 16. Courbe de Job pour le complexe Eph/α-CD

b. Extrait des feuilles de moringa :

D'après la courbe de Job, on remarque que le complexe le prédominant est de type 1 :4 correspondant au rapport 0,8 avec la formation d'un autre complexe à 0,6 de stœchiométrie 3 : 2.

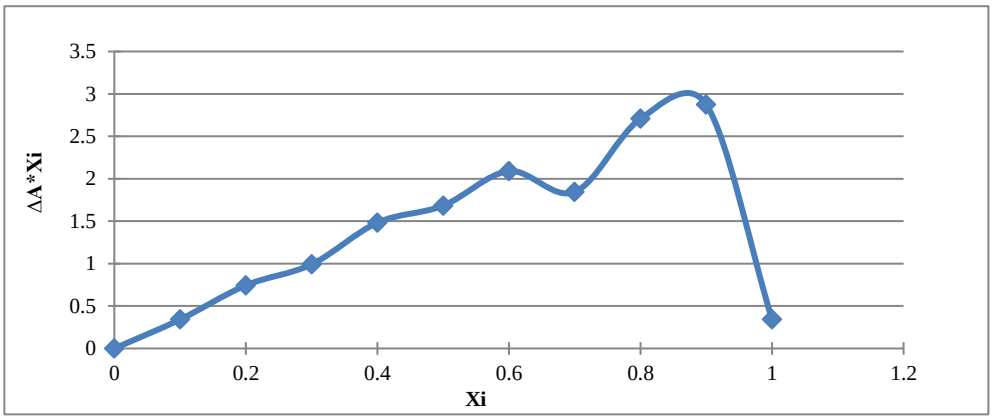


Figure 17. Courbe de Job pour le complexe Mo-f/β-CD

Pour le de complexe Mo-f/α-CD un seul type de complexe s'est formé de stœchiométrie 1:3. La CD avec trois molécules invitées différentes.

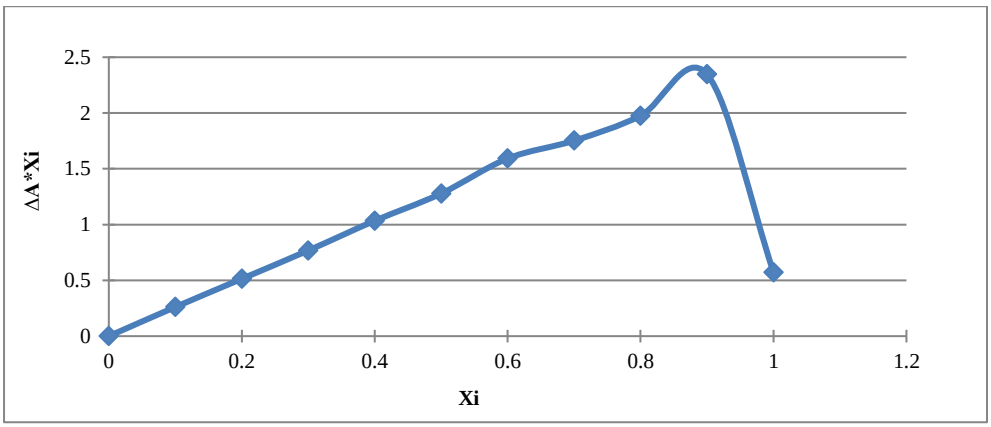


Figure 18. Courbe de Job pour le complexe Mo-f/α-CD

En comparant les différentes stœchiométries des différents complexes formés par les deux CDs, on constate a formation de plusieurs complexes de différentes stœchiométries, cela est dû au phénomène de complexation compétitive vu que les extraits sont des mélanges complexes de plusieurs molécules invitées.

On remarque aussi que la β-CD a formé plus de complexes que la α-CD, cela peut être attribué à la taille de sa cavité qui a été convenablement adéquates pour encapsuler plusieurs composés. La taille de la cavité du CD joue un rôle primordial dans la formation des complexes.

1. Détermination de la constante de stabilité Ka :

La seconde étape dans l'étude des complexes d'inclusion consiste à évaluer sa constante d'association (ou de stabilité) qui donne une indication sur les force d'interactions entre la molécule invitée et son hôte. A cet effet, la technique de Benesi-Hildebrand a été employée dans notre étude.

En gardant les concentrations des extraits constante à 0,227 mg/ml, les concentrations des CD ont été modifiées à chaque fois, allant de 0 M, 3×10^{-5} M, 4×10^{-5}M, 5×10^{-5} M et 6×10^{-5} M. L'absorbance des solutions a été mesurée à λ max de chaque complexe.

La constante d'association peut alors être déterminée en traçant 1/ΔA en fonction de 1/[PA]. Avec PA: Principe actif ou molécule invitée.

En appliquant la technique de Benesi-Hildebrand expliquée auparavant et par analogie avec l'équation linéaire du graphe on obtient :

L'ordonnée à l'origine est égale à $\frac{1}{[PA]\times \Delta\varepsilon}$ et la constante d'association Ka est calculée à partir de la pente de la droite qui est égale à $\frac{1}{[PA]\times Ka\times\Delta\varepsilon}$.

a. Extrait d'ephedra

Pour le complexe Eph/β-CD, on constate bien que les points sont d'une certaine linéarité, ce qui s'explique par la formation d'un complexe d'une stabilité faible. Cela est confirmé par la petite valeur de Ka estimée de 0,7221 M^{-1}.

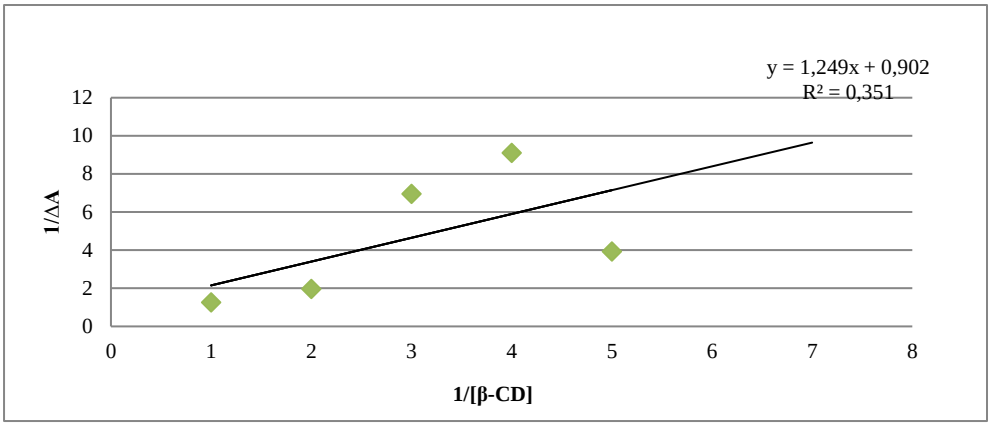


Figure 19. Courbe de Ka pour le complexe Eph/β-CD

Dans le cas du complexe Eph/α-CD, on voit également que les points sont d'une certaine linéarité. Ceci s'explique par le fait que le complexe formé est d'une faible stabilité avec une valeur de Ka de 30,621M^{-1}.

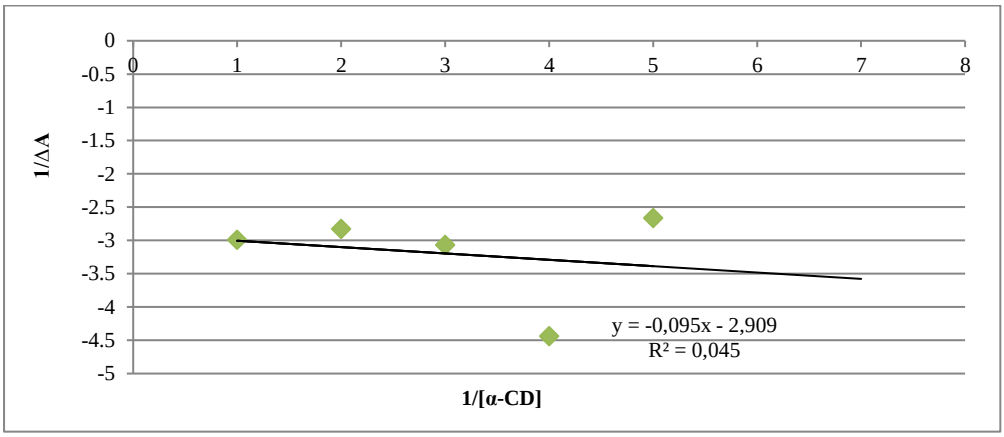


Figure 20. Courbe de Ka pour le complexe Eph/α-CD

b. Extrait de moringa :

Du même pour le complexe Mo-f/β-CD, la linéarité des points n'est pas obtenue indiquant une stabilité faible du complexe. Une valeur négative de Ka est calculée et vaut 5,37 M^{-1} qu'une erreur dans la mesure peut en être à l'origine.

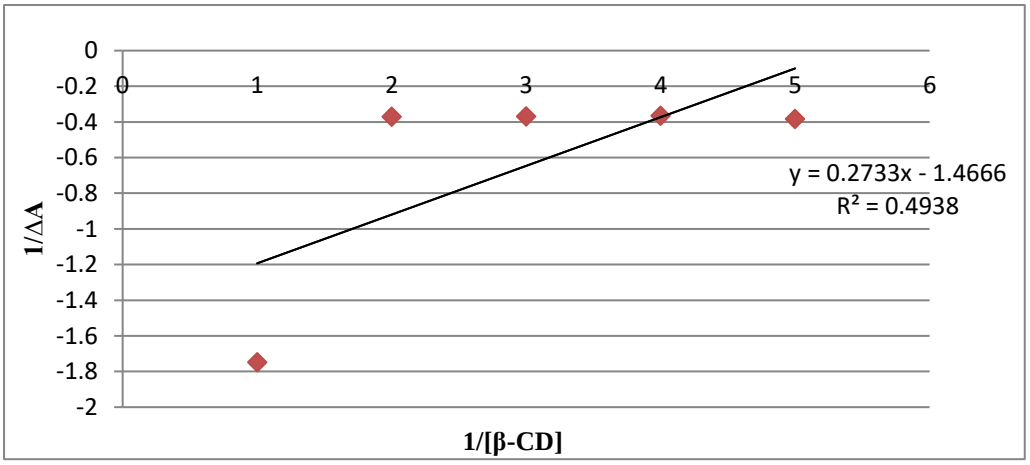


Figure 21. Courbe de Ka pour le complexe Mo-f/β-CD

Pour le complexe Mo-f/α-CD, les points ne sont pas linaires du fait que les molécules invitées sont en échange rapide entre les deux formes libre et encapsulée. La valeur de Ka est estimée de 4,44 M^{-1}.

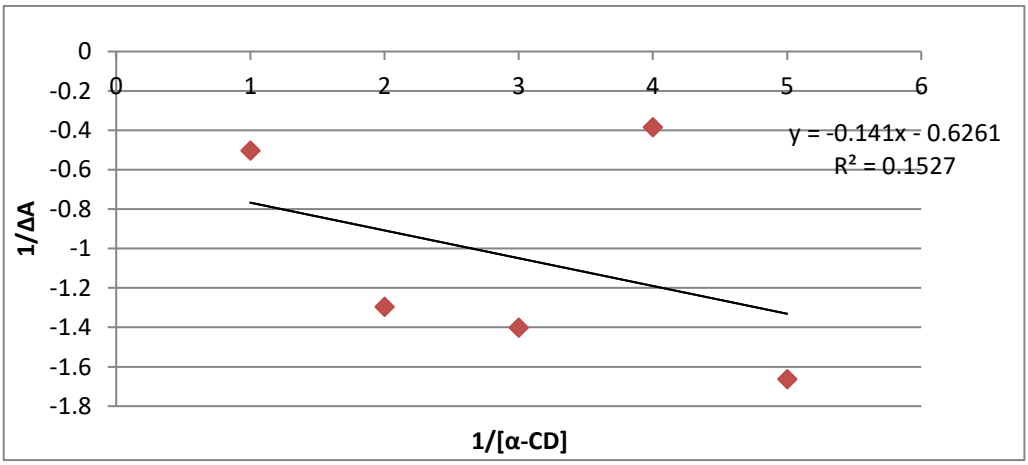


Figure 22. Courbe de Ka pour le complexe Mo-f/α-CD

La comparaison des différentes valeurs de Ka montre que les complexes formés sont de faible stabilité. À noter que la α-CD a donné les meilleures valeurs pour les deux extraits.

VI. Evaluation des activités anti oxydantes des extraits et leurs complexes par DPPH:

En raison de la complexité des composés actifs naturels et de la diversité de leurs modes d'action, il est insuffisant d'évaluer le potentiel antioxydant global uniquement par une

seule méthode. Malheureusement, pour notre étude seul le DPPH était disponible dans le laboratoire.

1. Principe :

Cette méthode est basée sur la réduction du 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), un radical libre de couleur violette foncée, relativement stable à température ambiante qui possède un électron non apparié porté par l'atome d'azote dans son centre . En présence d'une substance antioxydante qui peut céder un atome hydrogène ou un électron, il se forme la forme réduite DPPH-H coloré en jaune qui donne une absorption forte à 517 nm[76].

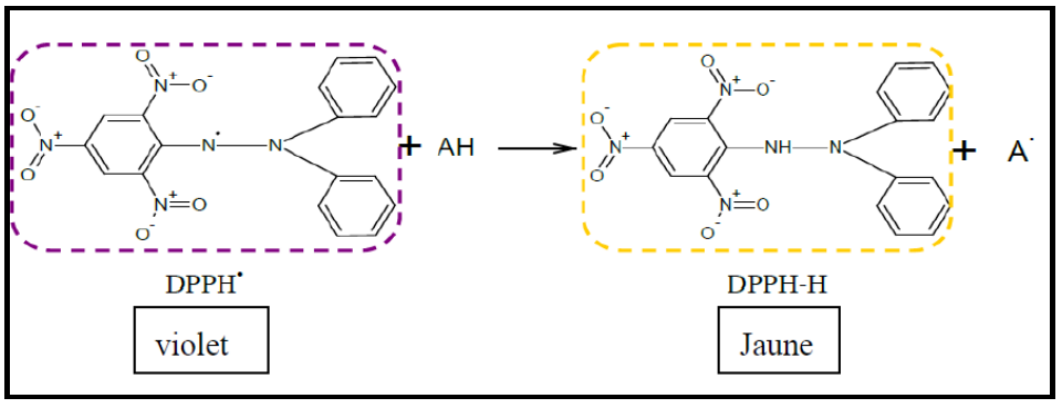


Figure 23.Réduction du radical DPPH[77]

2. Protocole :

2 mg du radical libre DPPH est solubilisé dans 50 ml de méthanol. La solution est ensuite conservé dans le frigo et à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

Les extraits, leurs complexes ainsi que la référence (acide ascorbique) sont testés à différentes concentrations en ajoutant 1ml de la solution de DPPH à 1 ml de chaque échantillon. Puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml, après 30 minutes d'incubation à l'obscurité à température ambiante.

---

[76] (a) G. Akowuah, Z. Ismail, I. Norhayati, A. Sadikun, The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity, *Food Chemistry*, **2005**, 93, 311-317; (b) A. Kumaran, R. Karunakaran, Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus Aromaticus*, *Food Chemistry*, **2006**, 97, 109-114; (c) A, Amrouche, K. Yaya, Teneurencomposésphénolique et activitéantioxydanted'extraitaqueux de feuilles de *Moringa Oleifera*, *Mémoire de Master*, **2017,** Université de Bejaïa.

[77] N. Chelghoum, Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante d'extrait de fleurs de *Moringa oleifera*, *Mémoire de Master*, **2016**, 37, Université A. MIRA de Bejaia.

3. Résultats :

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits et de leurs complexes de vis-à-vis du radical DPPH a été faite en suivant sa réduction qui s'accompagne par la variation de sa couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon la relation:

$$\%\ \textbf{inhibition} = (\textbf{A contrôl} - \textbf{A test/Acontrôl}) \times \textbf{100} \ldots\ldots(5)$$

Soit :

A contrôl : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm de la solution MeOH +DPPH

A test: Absorbance a 517nm de l'échantillon.

En représentant la concentration de chaque échantillon en fonction du % d'inhibition (voir l'annexe), on peut déterminer la valeur de l'IC_{50} qui est définie comme étant la concentration exigée qui fait diminuer l'activité de DPPH par 50%.

Les différents résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante. Il est important de mentionner que les CD ne présentent qu'une activité antioxydante très faible.

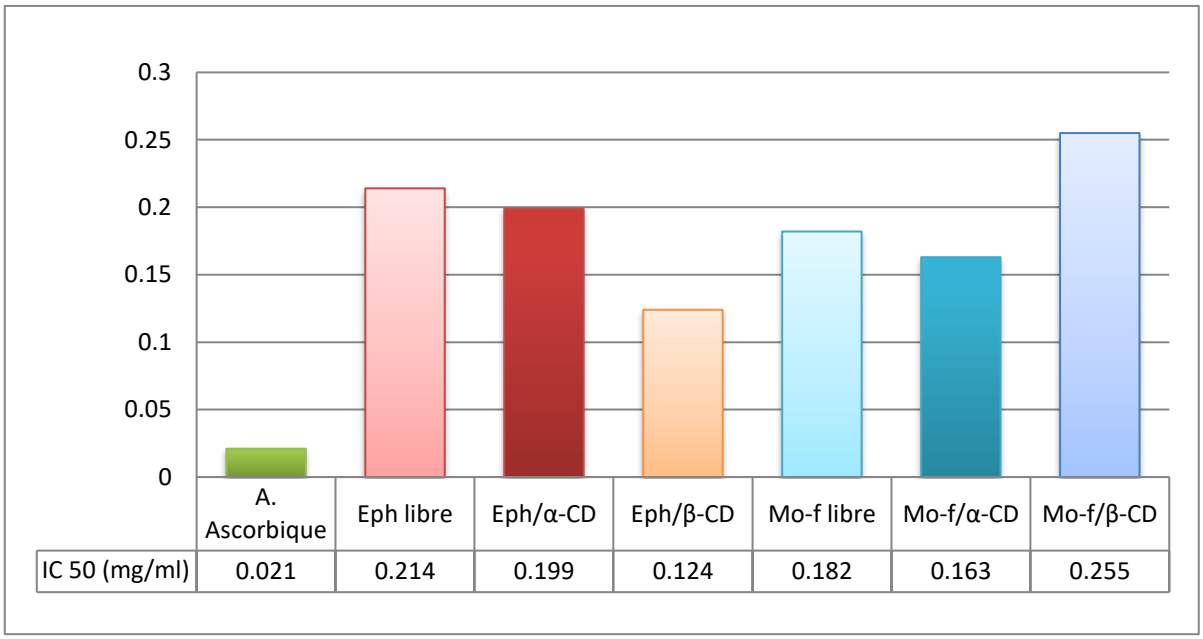


Figure 24. Histogramme des valeurs d'IC 50 par rapport à l'acide ascorbique (mg/ml)

La figure montre bien que l'encapsulation avec les CD a amélioré d'avantage l'activité antioxydante de l'extrait d'éphédra par rapport à sa forme libre, avec la meilleure

amélioration remarquée avec la β-CD. Cela peut être du au fait que la β-CD a pu formée des complexes avec un nombre important des composés bioactifs contenus dans cet extrait ce qui a permet d'augmenter leur solubilité et par conséquent leur contact avec le radical DPPH.

Quant à l'extrait des feuilles de moringa, seule l'activité antioxydante du complexe avec l'α-CD a connu une amélioration par rapport à l'extrait libre, Cela peut être attribué aux fortes interactions entre les composés encapsulés et la CD en question ce qui a donné une stabilité au complexe limitant la dissociation de l'extrait à sa forme libre. Une dégradation de l'extrait peut en être la cause de la détérioration de son activité antioxydante lorsqu'il a été complexé avec la β-CD.

Conclusion Générale et Perspective

Le but de cette étude est déterminé la meilleure cyclodextrine pour la complexation des composés bioactifs. Ce choix ne se peut se faire qu'en se basant sur les trois critères : solubilité, stabilité et résultat de l'activité antioxydante.

Dans notre travail nous avons pu évaluer la stabilité et l'activité antioxydante de deux extraits différents riches en composés bioactifs. Les résultats obtenus ont montré que la taille de la cyclodextrine joue un rôle important dans le phénomène d'inclusion, en comparant les résultats des courbes de Job, indiquant la formation de plusieurs complexes.

Cependant, la valeur de la constante de ka calculé par la méthode graphique, n'est pas précise pour le cas des extraits naturels car on ne peut pas savoir quelle est la molécule invitée exacte.

Comme perspective de ce travail, la formulation des extraits de plante de Moringa et d'Ephedra à base de cyclodextrine est à réaliser dans le futur proche en choisissant ou bien l'alpha ou la beta selon nos résultats obtenus.

Partie expérimentale

Préparation des solutions mères des extraits :

50mg (0,05g) de chaque extrait est solubilisée dans 50 ml de MeOH. Ensuite, 11.35 ml est prélevé de chacune de ces solutions et dilué à 50 ml pour obtenir une concentration de 0,227 mg/ml (Sm solution mère).

Préparation des solutions des CDs :

11,35 mg (0,01135g) de CD (2×10^{-4} M) est dissoute dans 50 ml de MeOH. Pour la β-CD est nécessaire pour la solubiliser complètement.

Préparation des solutions diluées de CD pour la détermination de ka :

A partir des solutions mères de CD (2×10^{-4} M), on prélève 3, 4, 5 et 6 ml pour préparer des solutions filles de 20 ml de concentrations 3×10^{-5}M, 4×10^{-5}M, 5×10^{-5}M et 6×10^{-5}M respectivement.

Protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antioxydante par DPPH:

- **Préparation de la solution DPPH :**

2mg (0,0020g) de DPPH est solubilisée dans 50 ml de MeOH, La solution est conservée dans le frigo et à l'abri de la lumière.

- **Préparation des solutions filles:**

A partir de chaque solution mère C_{SM}= 0,227 mg/ml on fait les dilutions suivantes :

Solution fille 1 S1: en prenant 0.5 ml de la solution mère et ajoutant 1 ml de MeOH

Solution fille 2 S2 : en prenant 0.5 ml de la solution S1 et ajoutant 1ml de MeOH

Solution fille 3 S3 : en prenant 0.5 ml de la solution S2 et ajoutant 1 ml de MeOH

Solution fille 4 S4 : en prenant 0.5 ml de la solution S3 et ajoutant 1ml de MeOH

Le calcul des concentrations se fait en appliquant :

$C_i.V_i=C_f.V_f$

Alors $C_f = (C_i.V_i)/V_f$

Avec $V_{i=}$ 0.5 ml et V_f= 1.5 ml (Vf est le volume total).

- **Incubation :**

Dans des tubes à essai secs et propres, 1 ml de la solution de DPPH est ajouté à 1ml de chaque solution fille suivie d'une incubation à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante.

On a travaillé avec les mêmes concentrations pour tous les extraits et complexes étudiés, Du même pour notre référence qui est l'acide ascorbique.

- **Contrôle négatif :**

Dans une cuve, 1ml de MeOH est ajouté à 1ml de la solution de DPPH ce qu'on appelle le contrôle négatif ou bien le témoin négatif.

- **Mesure de l'absorbance :**

Les absorbances sont mesuré à 517 nm.

- **Calcul du pourcentage d'inhibition** :

Le pourcentage d'inhibition %= ((Absorbance du contrôle négatif- Absorbance de la solution)/Absorbance du contrôle négatif)*100 (voir l'annexe).

- **Concentration inhibitrice IC_{50}:**

IC_{50} la concentration inhibitrice c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH.

L'équation du graphe : y = ax+b

Pour calculer IC50 50 = ax+b

En déterminant x = (50-b)/a on trouve la concentration inhibitrice à 50%.

Références bibliographiques

[1]. K. Rashid, K. Sinha, PC. Sil, An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology,*Food Chem. Toxicol*, **2013**, 62, 584-600.

[2]. GP. Novelli. Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol,Pharmacol*, **1997**, 48(4), 517-527.

[3]. B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?,*Biochem,***2007**, 401(1).

[4]. P. Codoñer-Franch, V. Valls-Bellés, A. Arilla-Codoñer, E. Alonso-Iglesias, Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress,*Translational Res*,**2011**, 158(6), 369-384.

[5]. J. Bruneton, Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales,*Tec & Doc Lavoisier*,**2009**.

[6]. M. Wink, *Phytochemistry*,**2003**, 64, 4.

[7]. C. Manach, A.Scalbert, C.Morand, C.Re´me´sy, L. Jime´nez, Polyphenols: food sources and bioavailability,*American Journal of Clinical Nutrition*,**2004**, 79, 727-747.

[8]. B.C. Aridogan, H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbasar, E. Mumcu, Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils,*Arch. Pharm. Res*,**2002**, 25, 860-864.

[9]. A. Belščak-Cvitanović, R. Stojanović, V. Manojlović, D. Komes, I. Cindrić, V. Nedović, B. Branko, Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion,*Food Research International*,**2011**, 44. 1094-1101.

[10]. (a) A. Munin, F. Edwards-Lévy, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds A Review,*Pharmaceutics*,**2011**, 3, 793-829; (b) A. Scalbert, I.T. Johnson, M. Saltmarsh, Polyphenols: antioxidants and beyond,*American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81,215-217.

[11]. Z. Fang, B. Bhandari, Encapsulation of polyphenols A review. *Trends in Food Science &Technology*,**2010**, 510-523.

[12]. L. Janus, Utilisations de molécules cages pour la dépollution et l'analyse chimique,**2003,** Lille 1.

[13]. T. Loftsson, ME. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization,*Journal of Pharmaceutical Science*,**1996**, 85(10), 1017-1025.

[14]. G. Crini, S. Fourmentin, E. Fenyvesi, G. Torri, M., Fourmentin, N. Morin-Crini, Fundamentals and applications of cyclodextrins, *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis. Springer*,**2018**.

[15]. W. Saenger, J. Jcob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, T. Takaha, Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut,*Chem. Rev*,**1998**, 98, 1787.

[16]. S. Saffarionpour, Nano encapsulation of Hydrophobic Food Flavor Ingredients and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Food and Bioprocess Technology*, **2019**, 12, 1157–1173.

[17]. J. Szejtli: Cyclodextrins and their Inclusion Complexe pluses,*AkademiaiKiado*, **1982**, 100-109.

[18]. D. Armspach, D. Matt, Metal-capped α-cyclodextrins: the crowning of the oligosaccharide torus with precious metals,*Chemical Communications*,**1999.**

[19]. J. Szejtli , Cyclodextrins in biotechnology,*Die Stärke*, **1986**, 38 (11), 388-390.

[20]. W.C.E.Schofield, J.P.S.Badyal, ACS Appl,*Mater.Interfaces*,**2011**, 3, 2051.

[21]. J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev*,**1998**, 98, 1743–1754.

[22]. K.J. Naidoo, J. Y-J. Chen, J. L. M. Jansson, G. Widmalm, A.J. Maliniak, Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of β-Cyclodextrin,*Phys. Chem*,**2004**, 108, 4236–4238.

[23]. B. Gidwani, A. Vyas, Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin-β-cyclodextrin polymer,*Colloids and surfaces B: Biointerfaces*,**2014**.

[24]. F. Cramer, W. Saenger, H-C. 2002Spatz, J. Am. Chem. Soc,**1967**, 89, 14–20.

[25]. G. Crini, Review: A History of Cyclodextrins,*Chem. Rev*,**2014**, 114, 10940–10975.

[26]. L. Liu, O.X. Guo, The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 42,1-14.

[27]. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review,*Process Biochemistry*, **2004**, 1033-1046.

[28]. M.Kfoury, N. Gabriela Hădărugă, D. IoanHădărugă, S. Fourmentin, 4 - Cyclodextrins as encapsulation material for flavors and aroma,*Nanotechnology in the Agri-Food Industry*,**2016**, 127-192.

[29]. S. Muñoz-Botella, B. Del Castillo, M. A. Martyn, Cyclodetrin properties and applications of inclusion complex formation, *ARS Pharmaceutica*,**1995**, 36 (2), 187–198.

[30]. R.Yang, J-B.Chen, X-Y.Dai, R.Huang, C-F.Xiao, Z-Y.Gao, B.Yang, L-J.Yang, S-J.Yan, H-B.Zhang, C.Qing, J.Lin,*Carb.Polymers*,**2012**, 89, 89.

[31]. K.J.Naidoo, J.Chen, J.L.M.Jansson, G.Wildmalm, A.Maliiak,*J.Phys.Chem B*, **2004**, 108, 4236.

[32]. H. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatile,*Flavour and Fragrance Journal*, **2010**.

[33]. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2014**.

[34]. A.Douhal, Chemical, physical and biological aspects of confined systems. *Cyclodextrine Materials, PhtochemstryPhotophysics and photobiology,Elesevier*, **2006**, 5.

[35]. D. Landy, F. Tetart, E. Truant, P. Blach, S. Fourmentin, G. Surpateanu, Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry,*J. Incl. Phenom. Macro*,**2007**, 57, 409–413.

[36]. J. Szejtli, Cyclodextrin Technology,*Kluwer Academic Publishers*,**1988**, 146-147.

[37]. T. Loftsson, Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug biovailability through addition of water-soluble polymers,*Pharmazie*,**1998**, 53(11), 733-40.

[38].L, Szente, J. Szejtli, Cyclodextrins as food ingredients,*Trends in Food Science & Technology*,**2004**, 15, 137-142.

[39]. G. Crini, M. Morcellet, N. Morin, *L'actualité chimique 247*,**2001**, 18-25.

[40]. (a) H. Brøndsted, L. Hovgaard, L. Simonsen, Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. II: Synthesis and characterization,*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1995**; (b) L. Matilainen, K. Lambertsen Larsen, R. Wimmer, P. Keski-Rahkonen, S. Auriola, T. Järvinen, P. Jarho, The effect of cyclodextrins on chemical and physical stability of glucagon and characterization of glucagon/γ-CD inclusion complexes,*Journal of Pharmaceutical Sciences*,**2008**.

[41]. M.E. Brewster, T. Loftsson, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers,*Advanced Drug Delivery Reviews*,**2007**.

[42]. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems,*Chemical Reviews*,**1998**, 98(5),2045-2076.

[43].P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2014**.

[44]. K. Hirose, A Practical Guide for the Determination of Binding Constants,*Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2001**, 39, 193-209.

[45]. T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, Cyclodextrins in drug delivery,*Expert Opin. Drug Deliv*,**2005**, 2, 335–351.

[46]. G. Piel, S. Moutard, B. Perly, S. Henry De Hassonville, P. Bertholet, V. Barillaro, M. Piette, L. Delattre, B. Evrard, Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy,*J. Drug Deliv. Sci. Tec*,**2004**, 14(1), 87–91.

[47]. J. Szejtli, Cyclodextrin Technology,*Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,The Netherlands*,**1988**.

[48]. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2014**.

[49]. G.P. Bettinetti, P. Mura, A. Liguori, G. Bramanti, F. Giordano, Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state,*Farmaco 44*,**1989**. 195-213.

[50]. G.P. Bettinetti, F. Melani, P. Mura, M. Monnanni, F. Giordano, Carbon-13 NMR study of naproxen interaction with cyclodextrins in solution,*J. Pharm. Sci*,**1991**, 1162-1170.

[51]. K. Miyake, T. Irie, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, M. Hirano, Y. Okamoto,Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl- β-cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution,*Int. J. Pharm*,**1999**, 179, 237-245.

[52]. M.L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, R. Stancanelli, D. Raneri, S. Catania, C.Costa, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, The rutin/ β-cyclodextrin interactions infully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays,*J. Pharm.Biomed. Anal*, **2005**, 1019-1027.

[53]. Cannavà, V. Crupi, P. Ficarra, M. Guardo, D. Majolino, A. Mazza-glia, R. Stancanelli, V. Venuti, Physico-chemical characterization of anamphiphilic cyclodextrin-genistein complex,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2010**, 1064-1068.

[54]. W. Song, X. Yu, S. Wang, R. Blasier, D.C. Markel, G. Mao, T. Shi, W. Ren, Cyclodextrin–erythromycin complexes as a drug delivery device for ortho-pedic application, *Int. J. Nanomed*,**2011**, 3173-3186.

[55].I.K. Chun, D.S. Yun, Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β-cyclodextrin in aqueous solution and in solidstate,*Int. J. Pharm*,**1993**, 91-103.

[56]. S, Tommasini, D. Raneri, R. Ficarra, M.L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Ficarra, Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β-cyclodextrin,*Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,**2004**, 35, 379-387.

[57]. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2014**.

[58]. K.A. Connors, Binding Constants,*Wiley*,**1987**.

[59]. J. Szejtli, Cyclodextrin Technology,*Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,The Netherlands,***1988**.

[60]. P. Job. Compt.Rend.Acad.*Sci.Paris,***1925**, 180, 928-930.

[61]. C. Tablet, I. Matei, M. Hillebrand, The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations, The Importance of Quantity in Biomedicine, Dr Alessio Innocenti, *InTech,***2012**.

[62]. (a) Z. Fang, B. Bhandari, Encapsulation of polyphenols:A review,*Trends in Food Science & Technology*,**2010**, 21(10), 510–523; (b) H. M. C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles,*Flavour and Fragrance Journal*,**2010**, 25(5), 313–326; (c) A.Munin, F. Edwards-Lévy, Encapsulation of natural poly-phenolic compounds: A review,*Pharmaceutics*,**2011**, 3(4), 793–829.

[63]. C. Lucas-Abellán, I.Fortea, J.M. López-Nicolás, E. Núñez-Delicado, Cyclodextrins as resveratrol carrier system,*Food Chem,***2007**, 104, 39–44.

[64]. I. Mourtzinos, F. Salta, K. Yannakopoulou, A. Chiou, V.T. Karathanos, Encapsulation of *olive* leaf extract in β-cyclodextrin,*J. Agric. Food Chem,***2007**, 55, 8088–8094.

[65]. M.T. Mercader-Ros, C. Lucas-Abellán, M.I. Fortea, J.A. Gabaldón, E. Núñez-Delicado, Effect of HP-β-cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols,*Food Chem,***2010**, 118, 769–773.

[66]. D. Haiyun, C. Jianbin, Z. Guomei, S. Shaomin, P. Jinhao, Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β-cyclodextrin with rutin,*Spectrochim. Acta A*,**2003**, 59, 3421–3429.

[67]. S. Tommasini, M.L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Donato, C. Costa, S. Catania, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin,*J. Pharm. Biomed. Anal,***2005**,39, 572–580.

[68]. M.L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, D. Raneri, R. Stancanelli, P. Ficarra, R. Ficarra, C. Costa, S. Catania, C. Rustichelli, G.Gamberini, Effects of α- and β-cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones,*J. Pharm. Biomed. Anal*,**2004**, 35, 365–377.

[69]. M. Farooq, M. Hussain, A. Wahid, K. Siddique, Drought Stress in Plants: An Overview,**2012**.

[70]. S. Lalas, V. Athanasiadis, I. Karageorgou, G. Batra, G.D. Nanos, D. P. Makris, Nutritional Characterization of Leaves and Herbal Tea of *Moringa oleifera* Cultivated in Greece,*Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*,**2017**, 23(4), 320-333.

[71]. I. Karageorgou, S. Grigorakis, S. Lalas, D, Makris, The effect of 2-hydroxypropyl β-cyclodextrin on the stability of polyphenolic compounds from

Moringa oleifera Lam leaf extracts in a natural low-transition temperature mixture,*Nova Biotechnologica et Chimica*, **2018**, 17, 29-37.

[72]. I.Yamada, T. Goto, S. Takeuchi, S. Ohshima, K. Yoneyama, T. Shibuya, E. Kataoka, D. Segawa, W. Sato,T. Dohmen, (*Ephedra sinicaStapf*) Protects against d-Galactosamine and Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Failure,*Cytokine*, **2008**, 41,293-301.

[73]. C. Danciu, D. Muntean, E. Alexa, C. Farcas, C. Oprean, I. Zupko, A. Bor, D. Minda, M. Proks, V. Buda, Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of *Ephedra alata*Decne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line, *Molecules*,**2018**,24, 13.

[74]. B.-M. Zhang, Z.-M. Wang, P. Xin, Q.-H. Wang, H. Bu, H.-X. Kuang, Phytochemistry and Pharmacology of Genus Ephedra,*Chin. J. Nat. Med*,**2018**, 16, 811-828.

[75]. M. Kamigauchi, K. Kawanishi, H. Ohishi, T. Ishida, Inclusion effect and structural basis of cyclodextrins for increased extraction of medicinal alkaloids from natural medicines,*Chem Pharm Bull*,**2007**, 55(5):729-33.

[76]. (a) G. Akowuah, Z. Ismail, I. Norhayati, A. Sadikun, The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity,*Food Chemistry*,**2005**,93, 311-317; (b) A. Kumaran, R. Karunakaran, Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus Aromaticus*,*Food Chemistry*,**2006**, 97,109-114; (c) A, Amrouche, K. Yaya, Teneurencomposésphénolique et activitéantioxydanted'extraitaqueux de feuilles de *Moringa Oleifera*, *Mémoire de Master*,**2017**, Université de Bejaïa.

[77]. N. Chelghoum, Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante d'extrait de fleurs de *Moringa oleifera*, *Mémoire de Master*, **2016**, Université A. MIRA de Bejaia.

Annexes

Tableau 5 : détermination de la stœchiométrie du complexe Eph/β-CD

N° Flacon	V Eph (µL)	V β-CD (µL)	[Eph]	[β-CD]	Xi	A à λ=297nm	ΔA*Xi
1	0	2000	0	0.227	0	0.1678	0
2	200	1800	0.0227	0.2043	0.1	0.1512	-0.01672
3	400	1600	0.0454	0.1816	0.2	0.0005	-0.06358
4	600	1400	0.0681	0.1589	0.3	0.1393	-0.05373
5	800	1200	0.0908	0.1362	0.4	-0.0046	-0.1292
6	1000	1000	0.1135	0.1135	0.5	0.1317	-0.09335
7	1200	800	0.1362	0.0908	0.6	-0.0275	-0.20754
8	1400	600	0.1589	0.0681	0.7	0.0864	-0.1624
9	1600	400	0.1816	0.0454	0.8	0.013	-0.24432
10	1800	200	0.2043	0.0227	0.9	0.1855	-0.11961
11	2000	0	0.227	0	1	0.0108	-0.3076

Tableau 6 : détermination de la constante de stabilité du complexe Eph/β-CD

V Eph	V β-CD	[Eph] (mg/ml)	[β-CD] (mol/l)	1/[β-CD]	A	ΔA	1/ΔA
4	0	0.227	0	∞	1.1067	0.7883	1.268553
2	2	0.1135	0.000015	66666.67	0.8268	0.5084	1.966955
2	2	0.1135	0.00002	50000	0.4621	0.1437	6.958942
2	2	0.1135	0.000025	40000	0.4282	0.1098	9.107468
2	2	0.1135	0.00003	33333.33	0.572	0.2536	3.943218

Tableau 7 : détermination de la stœchiométrie du complexe Eph/α-CD

N° Flacon	V Eph (µL)	V α-CD (µL)	[Eph] (mg/ml)	[α-CD] (mg/ml)	Xi	A à λ=395nm	ΔA*Xi
1	0	2000	0	0.227	0	0.0982	0
2	200	1800	0.0227	0.2043	0.1	0.2226	-0.00958
3	400	1600	0.0454	0.1816	0.2	0.2026	-0.02316
4	600	1400	0.0681	0.1589	0.3	0.1748	-0.04308
5	800	1200	0.0908	0.1362	0.4	0.1723	-0.05844
6	1000	1000	0.1135	0.1135	0.5	0.1871	-0.06565
7	1200	800	0.1362	0.0908	0.6	0.15	-0.10104
8	1400	600	0.1589	0.0681	0.7	0.2003	-0.08267
9	1600	400	0.1816	0.0454	0.8	0.1549	-0.1308
10	1800	200	0.2043	0.0227	0.9	-1.7702	-1.87974
11	2000	0	0.227	0	1	-2.0142	-2.3326

Tableau 8 : détermination de la constante de stabilité du complexe Eph/α-CD

V Eph	V α-CD	[Eph] (mg/ml)	[α-CD] (mol/l)	1/[α-CD]	A	ΔA	1/ΔA
4	0	0.227	0	∞	-0.016	-0.3344	-2.9904306
2	2	0.1135	0.000015	66666.67	-0.0356	-0.354	-2.8248588
2	2	0.1135	0.00002	50000	-0.0079	-0.3263	-3.0646644
2	2	0.1135	0.000025	40000	0.0929	-0.2255	-4.4345898
2	2	0.1135	0.00003	33333.33	-0.0571	-0.3755	-2.6631158

Tableau 9 : détermination de la stœchiométrie du complexe Mo-f/β-CD

N° Flacon	V Mo-f (µL)	V β-CD (µL)	[Mo-f] (mg/ml)	[β-CD] (mg/ml)	Xi	A à 190 nm	ΔA*Xi
1	0	2000	0	0.227	0	0.6653	0
2	200	1800	0.0227	0.2043	0.1	0.161	0.26113
3	400	1600	0.0454	0.1816	0.2	0.203	0.51386
4	600	1400	0.0681	0.1589	0.3	0.214	0.76749
5	800	1200	0.0908	0.1362	0.4	0.187	1.03412
6	1000	1000	0.1135	0.1135	0.5	0.216	1.27815
7	1200	800	0.1362	0.0908	0.6	0.119	1.59198
8	1400	600	0.1589	0.0681	0.7	0.269	1.75231
9	1600	400	0.1816	0.0454	0.8	0.303	1.97544
10	1800	200	0.2043	0.0227	0.9	0.165	2.34657
11	2000	0	0.227	0	1	2.1998	0.5725

Tableau 10 : détermination de la constante de stabilité du complexe Mo-f/β-CD

V Mo-f	V β-CD	[Mo-f] (mg/ml)	[β-CD] (mol/l)	1/[β-CD]	A	ΔA	1/ΔA
4	0	0.227	0	0	2.1998	-0.5725	-1.74672489
2	2	0.1135	0.000015	66666.67	0.069	-2.7033	-0.36991825
2	2	0.1135	0.00002	50000	0.06	-2.7123	-0.36869078
2	2	0.1135	0.000025	40000	0.035	-2.7373	-0.36532349
2	2	0.1135	0.00003	33333.33	0.157	-2.6153	-0.38236531

Tableau 11 : détermination de la stœchiométrie du complexe Mo-f/α-CD

N° Flacon	V Mo-f (µL)	V β-CD (µL)	[Mo-f] (mg/ml)	[α-CD] (mg/ml)	Xi	A à 195nm	ΔA*Xi
1	0	2000	0	0.227	0	0.1662	0
2	200	1800	0.0227	0.2043	0.1	-0.6466	0.34189
3	400	1600	0.0454	0.1816	0.2	-0.9481	0.74408
4	600	1400	0.0681	0.1589	0.3	-0.5333	0.99168
5	800	1200	0.0908	0.1362	0.4	-0.9357	1.4832
6	1000	1000	0.1135	0.1135	0.5	-0.5938	1.68305
7	1200	800	0.1362	0.0908	0.6	-0.7104	2.08962
8	1400	600	0.1589	0.0681	0.7	0.1377	1.84422
9	1600	400	0.1816	0.0454	0.8	-0.6119	2.70736
10	1800	200	0.2043	0.0227	0.9	-0.4206	2.87361
11	2000	0	0.227	0	1	2.4302	0.3421

Tableau 12 : détermination de la constante de stabilité du complexe Mo-f/α-CD

V Mo-f	V α-CD	[Mo-f] (mg/ml)	[α-CD] (mol/l)	1/[α-CD]	A	ΔA	1/ΔA
4	0	0.227	0	0	0.7839	-1.9884	-0.50291692
2	2	0.1135	0.000015	66666.67	1.9999	-0.7724	-1.29466598
2	2	0.1135	0.00002	50000	2.0582	-0.7141	-1.40036409
2	2	0.1135	0.000025	40000	0.169	-2.6033	-0.38412784
2	2	0.1135	0.00003	33333.33	2.171	-0.6013	-1.66306336

Tableau 13 : évaluation de l'activité anti-oxydante de l'acide ascorbique

	C (mg/ml)	A réf	% inhibition
Sm	0.227	0.1381	72.7060199
S1	0.075666667	0.3301	35.3009936
S2	0.025222222	0.2032	60.0233781
S3	0.008407407	0.2605	48.8603156
S4	0.002802469	0.2399	52.8735632

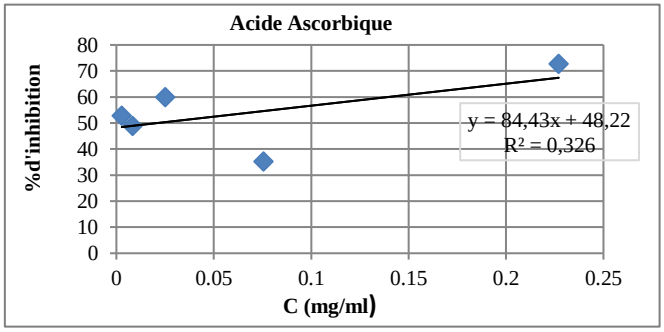


Figure 24 : courbe d'inhibition de l'acide ascorbique

Tableau 14 : évaluation de l'activité anti-oxydante de l'Eph libre

	C (mg/ml)	A Eph libre	% inhibition
Sm	0.227	0.2108	58.9323982
S1	0.075666667	0.5302	-3.29242159
S2	0.025222222	0.3405	33.6645237
S3	0.008407407	0.4426	13.7736217
S4	0.002802469	0.4927	4.01324761

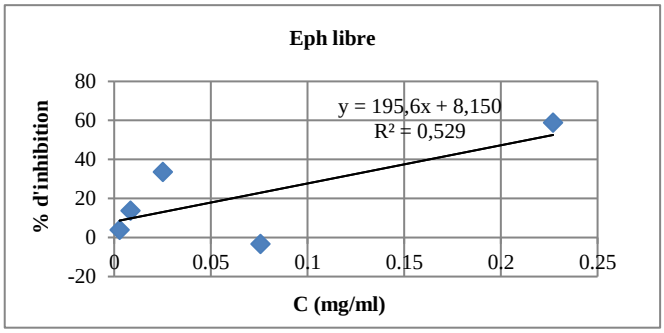


Figure 25: courbe d'inhibition de l'Eph libre

Tableau 15 : évaluation de l'activité anti-oxydante de l'Eph/β-CD

	C (mg/ml)	A Eph/β-CD	% inhibition
Sm	0.227	0.2025	60.5493863
S1	0.07566667	0.3387	34.0151958
S2	0.02522222	0.2337	54.4710695
S3	0.00840741	0.2398	53.2826807
S4	0.00280247	0.3833	25.3263199

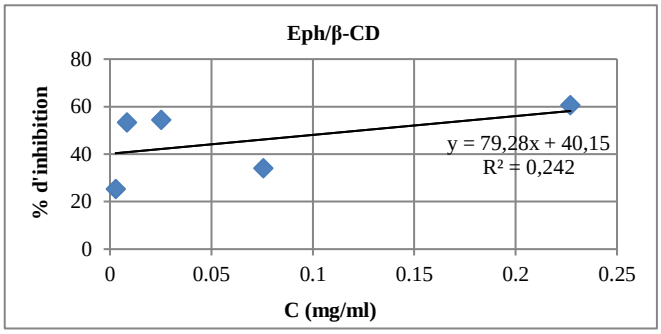


Figure 26 : courbe d'inhibition de l'Eph/β-CD

Tableau 16 : évaluation de l'activité anti-oxydante de l'Eph/α-CD

	C (mg/ml)	A Eph/α-CD	% inhibition
Sm	0.227	0.2332	54.5684785
S1	0.07566667	0.386	24.8003117
S2	0.02522222	0.3474	32.3202805
S3	0.00840741	0.4537	11.6111436
S4	0.00280247	0.4833	5.84453536

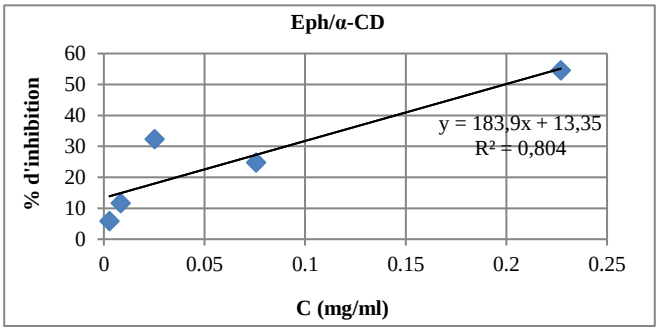


Figure 27 : courbe d'inhibition de l'Eph/α-CD

Tableau 17 : évaluation de l'activité anti-oxydante de Mo-f libre

	C (mg/ml)	A Mo-f libre	% inhibition
Sm	0.227	0.1875	64.7092038
S1	0.075666667	0.4907	7.64163373
S2	0.025222222	0.3692	30.5100696
S3	0.008407407	0.4433	16.563147
S4	0.002802469	0.408	23.2072276

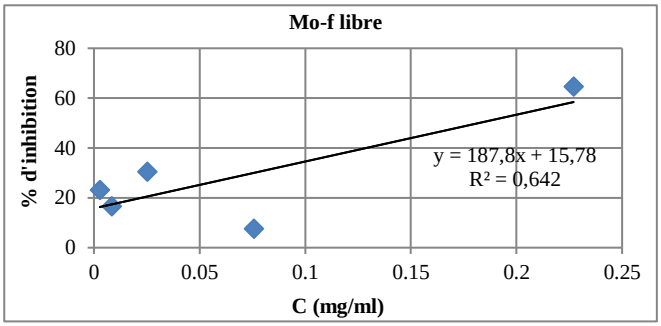


Figure 28 : courbe d'inhibition de Mo-f libre

Tableau 18 : évaluation de l'activité anti-oxydante de Mo-f/β-CD

	C (mg/ml)	A Mo-f/β-CD	% inhibition
Sm	0.227	0.2752	48.2025221
S1	0.07566667	0.4961	6.6252588
S2	0.02522222	0.4474	15.7914549
S3	0.00840741	0.4918	7.43459439
S4	0.00280247	0.4951	6.81347638

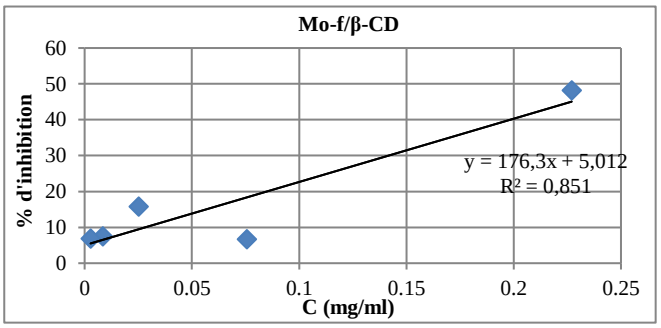


Figure 29 : courbe d'inhibition de Mo-f/β-CD

Tableau 21 : évaluation de l'activité anti-oxydante de Mo-f/α-CD

	C (mg/ml)	A Mo-f/β-CD	% inhibition
Sm	0.227	0.1701	67.9841897
S1	0.07566667	0.3969	25.2964427
S2	0.02522222	0.4679	11.9329945
S3	0.00840741	0.487	8.33803877
S4	0.00280247	0.5177	2.55975908

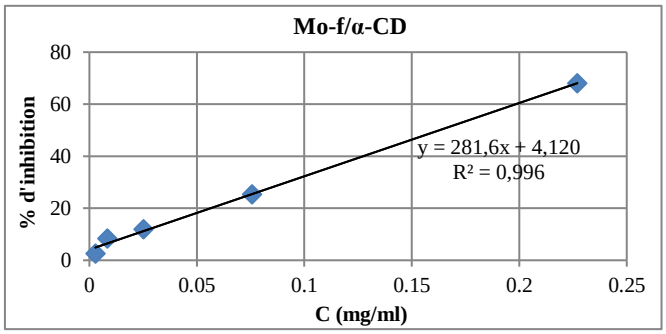


Figure 29 : courbe d'inhibition de Mo-f/α-CD

Tableau 22 : valeurs des IC 50

	IC 50 (mg/ml)
A. Ascorbique	0.021
Eph libre	0.214
Eph/α-CD	0.199
Eph/β-CD	0.124
Mo-f libre	0.182
Mo-f/α-CD	0.163
Mo-f/β-CD	0.255

Tableau23 : Valeurs des absorbances

λ (nm)	A β-CD	A α-CD	A Eph libre	A Eph/β-CD	Eph/α-CD	A Mo-f libre	A Mo-f/β-CD	Mo-f/α-CD
190	0.6653	0.0507	-1.5427	0.1049	-0.0433	0.0655	0.6311	0.669
191	0.3443	0.0087	-1.6219	0.1155	-0.0432	0.0675	0.4275	0.8043
192	-0.2843	0.193	-1.9817	-0.4929	-0.0431	0.0695	-0.1784	0.6911
193	-0.3058	0.2026	-2.0767	-0.6595	-0.0429	0.0714	-0.2014	0.6562
194	0.1616	0.0415	-2.1355	-0.5358	-0.0425	0.0731	0.1303	0.9501
195	0.1662	-0.1097	-2.0142	-0.2306	-0.0424	0.0747	0.2127	1.0868
196	-0.4385	0.2123	-2.4291	-1.0739	-0.0422	0.0763	-0.2984	0.599
197	-0.5802	0.2555	-2.6182	-1.3842	-0.0419	0.0774	-0.3981	0.444
198	-0.5926	0.2538	-2.5648	-1.3723	-0.0415	0.0786	-0.411	0.4254
199	-0.5899	0.2487	-2.6187	-1.4179	-0.0415	0.0799	-0.4138	0.4218
200	-0.5908	0.2452	-2.5757	-1.3984	-0.0413	0.0811	-0.4192	0.4162
201	-0.5916	0.2423	-2.4619	-1.2882	-0.0411	0.0824	-0.4251	0.4112
202	-0.5903	0.2405	-2.2437	-1.0727	-0.041	0.0843	-0.4291	0.4081
203	-0.5878	0.2394	-1.9534	-0.7839	-0.041	0.0859	-0.4321	0.4053
204	-0.5849	0.2382	-1.6637	-0.4956	-0.041	0.0882	-0.4341	0.4038
205	-0.5812	0.2376	-1.4007	-0.2293	-0.0469	0.0945	-0.4356	0.404
206	-0.5751	0.2363	-1.18	-0.0078	-0.0683	0.1087	-0.4342	0.4051
207	-0.5665	0.2342	-1.002	0.1715	-0.0615	0.1117	-0.4299	0.4072
208	-0.5567	0.2314	-0.8614	0.3125	-0.0569	0.1148	-0.424	0.4086
209	-0.5459	0.2281	-0.7505	0.423	-0.0551	0.1172	-0.417	0.4093
210	-0.5354	0.2242	-0.664	0.5094	-0.0534	0.1209	-0.4101	0.4077
211	-0.5253	0.2211	-0.5964	0.5768	-0.0514	0.1247	-0.4032	0.4051
212	-0.5160	0.2182	-0.541	0.6317	-0.0499	0.1293	-0.3966	0.4008
213	-0.5073	0.2151	-0.4947	0.6778	-0.0492	0.1337	-0.3907	0.3958
214	-0.4993	0.2158	-0.4559	0.7153	-0.0486	0.1374	-0.3857	0.3903
215	-0.4927	0.218	-0.4245	0.7453	-0.0479	0.1415	-0.3817	0.3849
216	-0.4879	0.2156	-0.3999	0.7695	-0.0474	0.1454	-0.3791	0.3795
217	-0.4842	0.2136	-0.379	0.7886	-0.0469	0.1496	-0.3777	0.3748
218	-0.4808	0.2125	-0.36	0.8061	-0.0467	0.1529	-0.3761	0.3712
219	-0.4783	0.2113	-0.3455	0.8198	-0.0451	0.1567	-0.3754	0.3691
220	-0.4771	0.207	-0.335	0.8292	-0.0436	0.1598	-0.3763	0.3683

221	-0.4754	0.2004	-0.3231	0.8413	-0.0419	0.1629	-0.3762	0.3688
222	-0.4729	0.1931	-0.3073	0.855	-0.0413	0.1653	-0.375	0.371
223	-0.4713	0.1872	-0.2915	0.8693	-0.0419	0.1678	-0.3749	0.3729
224	-0.4718	0.182	-0.2776	0.8801	-0.0427	0.1703	-0.3769	0.3741
225	-0.4763	0.1764	-0.2635	0.8905	-0.0427	0.1726	-0.3827	0.3716
226	-0.4764	0.1705	-0.2498	0.8974	-0.0426	0.1743	-0.3844	0.3732
227	-0.4719	0.165	-0.2354	0.9044	-0.0419	0.1764	-0.3812	0.3795
228	-0.4635	0.1582	-0.218	0.9146	-0.0414	0.1776	-0.3743	0.3898
229	-0.4537	0.1497	-0.1941	0.9301	-0.0405	0.1794	-0.3656	0.4023
230	-0.4432	0.1397	-0.1664	0.9512	-0.0395	0.1809	-0.3561	0.4159
231	-0.4296	0.1279	-0.1353	0.9768	-0.0387	0.1818	-0.3434	0.4334
232	-0.4140	0.1153	-0.1034	1.0046	-0.0372	0.1834	-0.3287	0.4533
233	-0.3991	0.1028	-0.0734	1.0324	-0.0371	0.1843	-0.3146	0.473
234	-0.3866	0.091	-0.0469	1.058	-0.0367	0.1862	-0.3029	0.4914
235	-0.3775	0.0805	-0.0253	1.0812	-0.0394	0.1872	-0.2946	0.5071
236	-0.3710	0.0716	-0.0082	1.1021	-0.0419	0.1888	-0.2889	0.5209
237	-0.3665	0.0641	0.0048	1.1197	-0.043	0.1901	-0.2853	0.5326
238	-0.3646	0.0585	0.0137	1.1349	-0.0433	0.1913	-0.284	0.5416
239	-0.3650	0.0546	0.0184	1.1454	-0.044	0.1925	-0.285	0.548
240	-0.3669	0.0528	0.0194	1.1542	-0.0439	0.1941	-0.2876	0.5519
241	-0.3706	0.0523	0.0177	1.1593	-0.0441	0.1953	-0.292	0.5539
242	-0.3761	0.0524	0.0137	1.1616	-0.0443	0.1967	-0.2981	0.5532
243	-0.3824	0.054	0.0078	1.1617	-0.0444	0.198	-0.3048	0.5505
244	-0.3888	0.0564	0.0009	1.1592	-0.0446	0.1998	-0.3118	0.5476
245	-0.3953	0.0599	-0.0074	1.1549	-0.0455	0.2014	-0.3188	0.5446
246	-0.4022	0.0638	-0.0168	1.1486	-0.0458	0.2031	-0.326	0.5393
247	-0.4094	0.0685	-0.028	1.1406	-0.0459	0.2042	-0.3336	0.5332
248	-0.4175	0.0744	-0.0413	1.1296	-0.0468	0.2058	-0.3421	0.5269
249	-0.4269	0.081	-0.0561	1.1171	-0.047	0.208	-0.3518	0.5192
250	-0.4358	0.0887	-0.0707	1.1039	-0.0481	0.2095	-0.3609	0.5109
251	-0.4433	0.0961	-0.0835	1.0917	-0.0481	0.2114	-0.369	0.5038
252	-0.4492	0.1035	-0.0931	1.0842	-0.0486	0.2136	-0.3752	0.4989
253	-0.4536	0.1103	-0.0995	1.0777	-0.0493	0.2156	-0.3799	0.4944
254	-0.4567	0.1178	-0.1054	1.073	-0.051	0.2168	-0.3833	0.4917
255	-0.4593	0.1282	-0.1111	1.068	-0.0517	0.2195	-0.3858	0.4898
256	-0.4610	0.1398	-0.1172	1.0638	-0.0527	0.2203	-0.388	0.4889
257	-0.4620	0.1939	-0.1235	1.0585	-0.0536	0.2214	-0.3892	0.4894
258	-0.4629	0.1934	-0.1292	1.0551	-0.0544	0.2223	-0.3904	0.489
259	-0.4626	0.1734	-0.1337	1.0511	-0.0548	0.2238	-0.3904	0.4898
260	-0.4624	0.1513	-0.1376	1.0486	-0.0557	0.2253	-0.3905	0.4907
261	-0.4622	0.1287	-0.1414	1.0459	-0.0574	0.2262	-0.3904	0.4916
262	-0.4620	0.1078	-0.145	1.0444	-0.0586	0.2282	-0.3902	0.4927
263	-0.4621	0.0993	-0.1482	1.0411	-0.059	0.2291	-0.3904	0.493
264	-0.4624	0.0984	-0.1513	1.0399	-0.0419	0.2524	-0.3911	0.4933
265	-0.4632	0.0995	-0.1538	1.0389	-0.0325	0.2656	-0.3919	0.4929
266	-0.4641	0.1005	-0.1556	1.0394	-0.0336	0.2668	-0.393	0.4931
267	-0.4651	0.1015	-0.1574	1.0375	-0.0346	0.2683	-0.3942	0.4938
268	-0.4660	0.1021	-0.1589	1.0382	-0.0359	0.2698	-0.395	0.4932
269	-0.4664	0.1023	-0.1594	1.0381	-0.0377	0.2722	-0.3955	0.4921
270	-0.4660	0.1021	-0.1592	1.0401	-0.0394	0.2744	-0.3954	0.4937
271	-0.4657	0.1025	-0.1589	1.0415	-0.0411	0.2774	-0.3951	0.4953
272	-0.4651	0.1023	-0.1586	1.0475	-0.0434	0.2818	-0.3947	0.4972
273	-0.4636	0.102	-0.1566	1.0493	-0.0464	0.2869	-0.3931	0.4985
274	-0.4623	0.1009	-0.1542	1.0499	-0.0493	0.2934	-0.3918	0.5005
275	-0.4600	0.0996	-0.1495	1.0526	-0.0525	0.3009	-0.3895	0.5039
276	-0.4571	0.0973	-0.1433	1.0594	-0.0566	0.3098	-0.3866	0.5079
277	-0.4536	0.0949	-0.1353	1.0683	-0.0614	0.3201	-0.3831	0.5117
278	-0.4495	0.0917	-0.1261	1.0766	-0.0666	0.3326	-0.3789	0.5163
279	-0.4445	0.0884	-0.1161	1.0892	-0.0729	0.3466	-0.3743	0.5213
280	-0.4395	0.0846	-0.1058	1.1006	-0.0799	0.3636	-0.3693	0.5276
281	-0.4340	0.0807	-0.0943	1.1113	-0.0874	0.3831	-0.3638	0.5326
282	-0.4273	0.0759	-0.0817	1.1268	-0.0964	0.4051	-0.3572	0.54
283	-0.4201	0.0705	-0.068	1.1382	-0.1056	0.4301	-0.3502	0.5477
284	-0.4125	0.0649	-0.054	1.1541	-0.1161	0.4583	-0.3425	0.555
285	-0.4031	0.0587	-0.0385	1.1697	-0.1276	0.4895	-0.3331	0.5638
286	-0.3931	0.0513	-0.0211	1.1877	-0.1398	0.5237	-0.3231	0.5741
287	-0.3813	0.0432	-0.0015	1.2068	-0.1531	0.5616	-0.3114	0.5863
288	-0.3680	0.0343	0.0195	1.2293	-0.167	0.602	-0.2983	0.5995

289	-0.3540	0.0259	0.0399	1.2496	-0.1816	0.6463	-0.284	0.6141
290	-0.3401	0.0169	0.0591	1.2708	-0.197	0.6926	-0.2702	0.6281
291	-0.3261	0.0096	0.0763	1.286	-0.2117	0.7416	-0.2561	0.6418
292	-0.3126	0.0025	0.0919	1.3024	-0.2272	0.7922	-0.2425	0.6553
293	-0.2982	-0.0048	0.1074	1.3172	-0.2425	0.8452	-0.2279	0.6674
294	-0.2830	-0.0123	0.1243	1.3323	-0.2582	0.8999	-0.2125	0.6802
295	-0.2668	-0.0189	0.1396	1.341	-0.2736	0.9566	-0.1962	0.6924
296	-0.2514	-0.0249	0.1543	1.3484	-0.2895	1.0153	-0.1808	0.7016
297	-0.2354	-0.0297	0.1682	1.3544	-0.3046	1.077	-0.1648	0.7088
298	-0.2198	-0.0345	0.1805	1.3508	-0.319	1.1401	-0.1488	0.7131
299	-0.2043	-0.0379	0.1926	1.3415	-0.3325	1.2022	-0.133	0.7133
300	-0.1892	-0.0407	0.2038	1.325	-0.3463	1.2636	-0.1176	0.7067
301	-0.1736	-0.0428	0.2144	1.3003	-0.3601	1.3283	-0.1017	0.6962
302	-0.1587	-0.0442	0.2242	1.268	-0.3742	1.3914	-0.0863	0.6796
303	-0.1446	-0.0442	0.2331	1.2273	-0.3873	1.4484	-0.0716	0.6528
304	-0.1310	-0.0439	0.2411	1.1811	-0.3989	1.5108	-0.0572	0.6249
305	-0.1186	-0.0427	0.2481	1.1292	-0.4089	1.5677	-0.0434	0.5906
306	-0.1072	-0.0408	0.2544	1.0752	-0.4181	1.6191	-0.0305	0.5524
307	-0.0968	-0.0385	0.2602	1.0199	-0.4258	1.6768	-0.0183	0.5119
308	-0.0877	-0.0358	0.2652	0.9655	-0.4327	1.7223	-0.0073	0.47
309	-0.0795	-0.0328	0.2693	0.9119	-0.4393	1.7691	0.0035	0.4285
310	-0.0723	-0.0291	0.2731	0.8605	-0.4448	1.8021	0.0135	0.3882
311	-0.0661	-0.0258	0.2762	0.8129	-0.4497	1.8365	0.0224	0.3496
312	-0.0607	-0.022	0.2793	0.7685	-0.4543	1.8686	0.0309	0.3135
313	-0.0565	-0.0187	0.2818	0.7279	-0.4585	1.9028	0.0384	0.2797
314	-0.0530	-0.0153	0.284	0.6909	-0.4616	1.9271	0.0453	0.249
315	-0.0501	-0.0122	0.2859	0.6576	-0.4644	1.9556	0.0517	0.2207
316	-0.0483	-0.0095	0.2878	0.6271	-0.4664	1.9707	0.0569	0.1953
317	-0.0465	-0.0074	0.2891	0.5999	-0.4677	1.9942	0.0618	0.1726
318	-0.0449	-0.005	0.2906	0.5757	-0.469	2.0094	0.0667	0.1536
319	-0.0435	-0.0033	0.2916	0.5548	-0.4692	2.0182	0.0704	0.1365
320	-0.0429	-0.0012	0.2928	0.5364	-0.4696	2.0278	0.0738	0.1218
321	-0.0420	0.0001	0.2934	0.5204	-0.4695	2.0304	0.0772	0.1098
322	-0.0411	0.0014	0.2945	0.507	-0.4689	2.0275	0.0802	0.0998
323	-0.0405	0.0021	0.2946	0.4952	-0.468	2.0181	0.0822	0.0909
324	-0.0397	0.0028	0.2951	0.4852	-0.4667	2.007	0.0844	0.0837
325	-0.0389	0.0031	0.2957	0.4761	-0.4655	2.0021	0.0868	0.0774
326	-0.0434	0.0005	0.3037	0.463	-0.4647	1.9777	0.0867	0.0603
327	-0.0521	-0.006	0.3181	0.4468	-0.4638	1.9539	0.0846	0.0348
328	-0.0519	-0.0063	0.3184	0.4414	-0.4633	1.9408	0.0844	0.0323
329	-0.0515	-0.0064	0.3171	0.436	-0.4632	1.9214	0.0848	0.0298
330	-0.0499	-0.006	0.3173	0.4304	-0.4632	1.8951	0.0863	0.0286
331	-0.0496	-0.0068	0.3158	0.4246	-0.463	1.8703	0.0864	0.0276
332	-0.0490	-0.0068	0.315	0.4209	-0.4629	1.844	0.0862	0.0261
333	-0.0489	-0.0068	0.3136	0.4154	-0.4616	1.8122	0.0868	0.0253
334	-0.0481	-0.0068	0.312	0.4107	-0.4602	1.7803	0.0882	0.0247
335	-0.0471	-0.0076	0.3115	0.4067	-0.458	1.7427	0.0886	0.0249
336	-0.0462	-0.0082	0.3107	0.4028	-0.4551	1.7088	0.089	0.0237
337	-0.0450	-0.008	0.3097	0.3989	-0.4516	1.6709	0.09	0.0234
338	-0.0447	-0.0086	0.3086	0.3941	-0.4466	1.6361	0.0907	0.0233
339	-0.0444	-0.0097	0.3074	0.391	-0.4404	1.5976	0.0906	0.0223
340	-0.0438	-0.0098	0.306	0.3864	-0.4324	1.5585	0.0904	0.0216
341	-0.0428	-0.0101	0.3042	0.3828	-0.4232	1.5195	0.0913	0.0215
342	-0.0426	-0.0108	0.3028	0.379	-0.4136	1.483	0.092	0.0211
343	-0.0418	-0.0112	0.3019	0.3752	-0.4049	1.4494	0.0918	0.0206
344	-0.0411	-0.0112	0.2998	0.3713	-0.3972	1.4215	0.0923	0.0203
345	-0.0409	-0.0113	0.299	0.3684	-0.3898	1.3934	0.0924	0.02
346	-0.0406	-0.0115	0.297	0.365	-0.3826	1.3713	0.0927	0.0197
347	-0.0402	-0.0116	0.2958	0.3621	-0.3758	1.3515	0.0929	0.0192
348	-0.0400	-0.0119	0.2941	0.3594	-0.369	1.3351	0.0926	0.019
349	-0.0401	-0.0117	0.2919	0.3561	-0.3631	1.3247	0.0926	0.0183
350	-0.0398	-0.012	0.2904	0.3537	-0.3586	1.3208	0.0924	0.0181
351	-0.0398	-0.0121	0.289	0.3506	-0.356	1.3239	0.0921	0.0178
352	-0.0398	-0.0121	0.2874	0.3484	-0.3549	1.3359	0.092	0.0175
353	-0.0401	-0.0119	0.2864	0.3463	-0.3562	1.3561	0.0914	0.017
354	-0.0398	-0.0122	0.285	0.3438	-0.3596	1.3844	0.091	0.0167
355	-0.0399	-0.0123	0.2838	0.3418	-0.3653	1.4205	0.0908	0.0165
356	-0.0401	-0.012	0.2821	0.3395	-0.3735	1.4651	0.0902	0.0158

357	-0.0402	-0.0123	0.281	0.3378	-0.3853	1.5175	0.0897	0.0158
358	-0.0400	-0.0124	0.2797	0.336	-0.3993	1.5762	0.0899	0.0155
359	-0.0401	-0.0122	0.2783	0.3336	-0.4139	1.6354	0.0899	0.0152
360	-0.0398	-0.0122	0.2777	0.3321	-0.4265	1.6938	0.0899	0.0154
361	-0.0396	-0.0124	0.2768	0.3304	-0.4361	1.7435	0.0901	0.0149
362	-0.0400	-0.0122	0.2756	0.328	-0.445	1.7879	0.09	0.0144
363	-0.0396	-0.0121	0.2748	0.3267	-0.4522	1.8225	0.0897	0.0137
364	-0.0393	-0.0124	0.2735	0.3244	-0.4556	1.8502	0.0901	0.014
365	-0.0393	-0.0126	0.2729	0.3232	-0.4541	1.8767	0.0901	0.0134
366	-0.0393	-0.0125	0.2718	0.3217	-0.4477	1.8971	0.0905	0.013
367	-0.0390	-0.0125	0.2704	0.3192	-0.4452	1.9109	0.0907	0.0122
368	-0.0390	-0.0123	0.2699	0.3179	-0.4448	1.9301	0.0907	0.0114
369	-0.0391	-0.0121	0.269	0.3164	-0.4455	1.9497	0.0911	0.0111
370	-0.0393	-0.0121	0.2678	0.3142	-0.4456	1.9638	0.0911	0.0103
371	-0.0385	-0.0123	0.2666	0.313	-0.4453	1.9839	0.0921	0.0103
372	-0.0386	-0.0126	0.2655	0.3113	-0.4459	2.0139	0.092	0.0094
373	-0.0385	-0.0121	0.2646	0.3096	-0.4467	2.0518	0.0923	0.0088
374	-0.0382	-0.0124	0.2635	0.3084	-0.4478	2.0965	0.093	0.008
375	-0.0385	-0.0118	0.2621	0.3069	-0.4503	2.1492	0.0928	0.0072
376	-0.0385	-0.0124	0.261	0.3054	-0.4541	2.2158	0.093	0.0063
377	-0.0383	-0.0116	0.2594	0.304	-0.459	2.2818	0.0937	0.0051
378	-0.0385	-0.0121	0.2588	0.3027	-0.4648	2.3481	0.0947	0.0038
379	-0.0392	-0.0122	0.2575	0.3015	-0.4711	2.4057	0.0945	0.0019
380	-0.0394	-0.0121	0.256	0.3001	-0.4784	2.4573	0.0952	-0.0004
381	-0.0395	-0.0116	0.2549	0.2997	-0.4856	2.4998	0.0959	-0.0025
382	-0.0399	-0.0114	0.2535	0.2977	-0.4931	2.538	0.0984	-0.0049
383	-0.0407	-0.0115	0.2532	0.2983	-0.4994	2.5475	0.1001	-0.0097
384	-0.0415	-0.0119	0.2514	0.2969	-0.5041	2.5811	0.1047	-0.0165
385	-0.0363	-0.015	0.2586	0.2938	-0.5064	2.6002	0.0957	0.0014
386	-0.0353	-0.0161	0.2598	0.2915	-0.5059	2.6174	0.0925	0.0065
387	-0.0360	-0.016	0.2594	0.2908	-0.505	2.6244	0.0925	0.0064
388	-0.0369	-0.0157	0.259	0.2902	-0.5029	2.6554	0.092	0.0057
389	-0.0371	-0.0159	0.2585	0.2896	-0.5006	2.6766	0.0923	0.0056
390	-0.0375	-0.0156	0.2582	0.2891	-0.4965	2.703	0.0918	0.0055
391	-0.0377	-0.0155	0.2577	0.2885	-0.4932	2.7019	0.0915	0.0051
392	-0.0377	-0.0154	0.2573	0.288	-0.4925	2.7432	0.0916	0.005
393	-0.0382	-0.0153	0.2568	0.2874	-0.4821	2.7723	0.0913	0.0045
394	-0.0385	-0.0152	0.2564	0.2869	-0.3843	2.7636	0.0909	0.0041
395	-0.0385	-0.0153	0.2562	0.2864	0.0395	2.4302	0.0905	0.0036
396	-0.0386	-0.0153	0.2557	0.2856	-0.0189	2.6402	0.0905	0.003
397	-0.0386	-0.0152	0.2552	0.2851	-0.3253	2.5755	0.0903	0.0026
398	-0.0387	-0.0153	0.2548	0.2844	-0.3185	2.5017	0.0899	0.002
399	-0.0388	-0.0153	0.2542	0.2837	-0.2541	2.0965	0.0898	0.0014
400	-0.0389	-0.0154	0.2539	0.2829	-0.3832	2.1998	0.0899	0.001