

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En GENIE DES PROCEDES

Option : Science et technologie du médicament

Par Melissa Taous ZAIDI

Thème

**Amélioration de la solubilité d'un
anticancéreux :
La camptothécine par complexation
avec les cyclodextrines**

Soutenu devant le jury composé de:

Président : Mr M. IGUER-OUADA

Examineur : Mme N. BELHADJ

Encadreur : Mr S. FATMI

Promotion 2011/2012

A ma mère

A mon père

A mes sœurs

A toute ma famille

Et à tous ceux et celles qui ont été là

REMERCIEMENTS

Arrivée au terme de ce travail, il m'est tout naturel de remercier en premier lieu, mon promoteur Mr S. FATMI, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements.

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

J'adresse également mes remerciements aux techniciens et techniciennes de laboratoire, pour leur aide mainte fois renouvelée.

Un spécial remerciement à ma mère qui m'a toujours poussé à donner le meilleur de moi-même, sans qui tout aurait été de l'ordre de l'impossible.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin, à l'élaboration de ce modeste travail.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure I-01 : « Présentation schématique des cyclodextrines ».....	05
Figure I-02 : « Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine ».....	05
Figure I-03 : « Tailles des trois cyclodextrines naturelles et de leurs cavités respectives »....	06
Figure I-04 : « Représentation schématique de complexes d'inclusion de stœchiométries différentes ».....	12
Figure I-05 : « Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion »...	14
Figure I-06 : « Types de diagramme d'inclusion selon Higuchi et Connors ».....	21
Figure II-01 : « Structure de la camptothécine ».....	26
Figure II-02 : « Forme active et inactive (carboxylée) de la camptothécine ».....	28
Figure II-03 : « schéma récapitulatif de l'action de la camptothécine sur la topoisomérase I »	29
Figure II-04 : « Quelques analogues de la camptothécine ».....	32
Figure V-01 : « Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la CPT (de 200 à 800 nm).....	48
Figure V-02 : « Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la β -CD (de 200 à 800 nm).....	49
Figure V-03 : « Courbe d'étalonnage pour le test d'Higuchi»	50
Figure V-04 : « Diagramme Higuchi de la β -CD ».....	52
Figure V-05 : « Diagramme Higuchi de l' α -CD »	53
Figure V-06 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par Kneading, obtenus par spectroscopie IR ».....	56

Figure V-07 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par mélange physique, obtenu par spectroscopie IR ».....	56
Figure V-08 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par co-évaporation, obtenus par spectroscopie IR ».....	57
Figure V-09 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par lyophilisation, obtenus par spectroscopie IR ».....	58
Figure V-10 : « Spectres de la β -CD, la CPT et le complexe formé par kneading obtenus par Spectroscopie DRX ».....	59
Figure V-11 : « Spectres de la β -CD, la CPT et le complexe formé par co-évaporation obtenus par spectroscopie DRX ».....	60
Figure V-12 : « Spectres de la β -CD, la CPT et du complexe formé par lyophilisation obtenus par spectroscopie DRX ».....	60
Figure V-13 : « Spectres de la β -CD, de la CPT et du complexe formé par mélange physique obtenus par spectroscopie DRX ».....	61
Figure V-14 : « Images obtenues par MEB de la CPT (a), la β -CD (b) et des complexes formé par Kneading (c), lyophilisation (d) et mélange physique (e) ».....	63
Figure V-15 : « Courbe d'étalonnage pour le test de dissolution ».....	66
Figure V-16 : « Profil de dissolution obtenu avec la méthode du Kneading ».....	67
Figure V-17 : « Profil de dissolution obtenu par lyophilisation ».....	67
Figure V-18 : « Profils de dissolution obtenus par mélange physique et par co-évaporation »	68

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-01 : « Propriétés structurales des cyclodextrines ».....	06
Tableau I-02 : « La solubilité de la β -CD dans différents solvants ».....	08
Tableau I-03 : « Quelques caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines.....	08
Tableau I-04 : « Doses létales des cyclodextrines natives selon leurs modes d'administration chez le rat ».....	10
Tableau II-01 : « Solubilité de la camptothécine dans différents solvants ».....	28
Tableau IV-01 : « Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec la β -CD »41	
Tableau IV-02 : « Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec l' α -CD »..41	
Tableau IV-03 : « Concentrations en camptothécine utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage pour le test d'Higuchi ».....	42
Tableau IV-04 : « Concentrations en camptothécine utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage pour le test de dissolution ».....	47
Tableau V-01 : « Quantification par UV-Visible des solutions étalons pour le test d'Higuchi ».....	50
Tableau V-02 : « Quantification par UV-Visible des solutions du test d'Higuchi sur la β -CD ».....	51
Tableau V-03 : « Concentration en camptothécine correspondant aux absorbances obtenues avec le test d'Higuchi sur la β -CD ».....	51
Tableau V-04 : « Quantification par UV-Visible des solutions du test d'Higuchi sur l' α -CD ».....	52
Tableau V-05 : « Absorbances obtenues avec les différents complexes d'inclusion ».....	64
Tableau V-06 : « Les différents rendements de complexation ».....	65

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATG : Analyse thermogravimétrique

CD : Cyclodextrine

CGTase : Cyclodextrin glycosyl transferase

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPT : Camptothécine

DB-67 : Silatecan-7-t-butylidiméthylsilyl-10-hydroxy-camptothécine

DL₅₀ : Dose létale médiane

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DM- γ -CD : Diméthyl-gamma-cyclodextrine

DRX : Diffraction des rayons X

DSC : Differential scanning calorimetry

FDA : Food and drug administration

HCl: Acide chlorhydrique

H-CPT: Hydroxy-camptothécine

HPLC : High performance liquid chromatography

HP- β -CD : Hydroxypropyl-béta-cyclodextrine

HP- γ -CD : Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrine

IR : Infrarouge

KBR: Bromure de potassium

MEB : Microscopie électronique à balayage

nm: Nanomètre

PA: Principe actif

PBS : Sulfate buffered saline

PEG : Polyéthylène glycol

RDM- β -CD: Randomly-methylated-beta-cyclodextrin

RMN: Résonance magnétique nucléaire

SB- β -CD: Sulfobutyl-béta-cyclodextrine

SBE- β -CD: Sulfobutyl-éther-béta-cyclodextrine

UV: Ultra violet

α -CD: Alpha-cyclodextrine

β -CD: Beta-cyclodextrine

γ -CD: Gamma-cyclodextrine

μm : Micromètre

9-NC : 9-nitro-camptothécine

NOMENCLATURE

NOMENCLATURE

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

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

m : Nombre de molécule de cyclodextrine (nombre entier)

n : Nombre de molécule de camptothécine (nombre entier)

$n : m$: Nombres entiers indiquant le ratio moléculaire de complexation

R^2 : Coefficient de corrélation ou d'ajustement

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

T : Température ($^{\circ}C$)

α : Pente

λ : Longueur d'onde (nm)

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE I LES CYCLODEXTRINES

I-1 INTRODUCTION.....	3
I-2 HISTORIQUE.....	3
I-3 STRUCTURE ET NOMENCLATURE.....	4
I-4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	7
I-4-1 Caractère hydrophile et hydrophobe.....	7
I-4-2 Caractère basique.....	7
I-4-3 Solubilité.....	7
I-4-4 Stabilité et toxicité.....	9
I-4-4-1 Les cyclodextrines naturelles.....	9
I-4-4-2 Les cyclodextrines modifiées.....	11
I-5 PROPRIETE DE COMPLEXATION.....	11
I-5-1 Mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion.....	13
I-5-2 Techniques de préparation des complexes d'inclusion.....	15
I-5-2-1 Le mélange physique.....	15
I-5-2-2 Le kneading.....	16
I-5-2-3 La Co-précipitation.....	16
I-5-2-4 La lyophilisation.....	16
I-6- CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION.....	16
I-6-1 L'analyse thermogravimétrique (ATG).....	16
I-6-2 La Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	17

I-6-3 La Diffraction des Rayons X (DRX).....	17
I-6-4 La Spectroscopie Infrarouge.....	18
I-6-5 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	18
I-6-6 Le test de dissolution	19
I-7 DIAGRAMME DE PHASE	19
I-7-1 Le profil A	20
I-7-2 Le profil B	21
I-8 INTERETS ET APPLICATIONS DES CYCLODEXTRINES.....	22
I-8-1 Dans le domaine pharmaceutique.....	22
I-8-2 Dans le domaine agroalimentaire	23
I-8-3 Dans le domaine de la cosmétologie et du textile	23
I-8-4 Dans le domaine de la chimie catalytique et analytique.....	23
I-8-5 Dans le domaine environnemental	24
I-9 CONCLUSION	24

CHAPITRE II LE TRACEUR : LA CAMPTOTHECINE

II-1 INTRODUCTION.....	25
II-2 HISTORIQUE.....	25
II-3 STRUCTURE.....	26
II-4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	27
II-4-1 Propriétés physique et chimique	27
II-4-2 Solubilité	27
II-4-3 Instabilité.....	27
II-5 LA TOPOISOMERASE I ET LE MECANISME D’ACTION DE LA CAMPTOTHECINE	28
II-6 PROBLEME DE FORMULATION	30
II-7 ANALOGUES DE LA CAMPTOTHECINE.....	30

II-7-1 Première génération : analogues plus hydrosolubles	31
II-7-2 Deuxièmes génération : les analogues lipophiles et les homocamptothécines	33
II-7-3 Troisième génération : les analogues non lactoniques	33
II-8 CONCLUSION	33

CHAPITRE III TRAVAUX ANTERIEURS

III-1 INTRODUCTION	34
III-2 TRAVAUX ANTERIEURS	34

CHAPITRE IV MATERIELS ET METHODES

IV-1 PREDEVELOPPEMENT	39
IV-1-1 Matériels et réactifs.....	39
IV-1-2 Méthodes.....	39
IV-2 TEST D'HIGUCHI.....	40
IV-2-1 Matériels et méthodes	40
IV-2-2 Méthodes.....	40
IV-3 PREPARATION DES COMPLEXES D'INCLUSION.....	42
IV-3-1 Matériels et réactifs.....	42
a) Le kneading	43
b) Le mélange physique	43
c) La Co-évaporation	43
d) La lyophilisation	43
IV-4 CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION	43
IV-4-1 Spectroscopie Infrarouge	43
a) Matériels et réactifs	43
b) Méthode.....	44
IV-4-2 Spectroscopie par diffraction de rayons X.....	44

a) Matériels et réactifs	44
b) Méthode	45
IV-4-3 Microscopie électronique à balayage.....	45
a) Matériels et réactifs	45
b) Méthode	45
IV-4-4 Dosage de la camptothécine	45
a) Matériels et réactifs	45
b) Méthode	46
IV-4-5 Test de dissolution	46
a) Matériels et réactifs	46
b) Méthode	46

CHAPITRE V RESULTATS ET DISCUSSION

V-1 PREDEVELOPPEMENT	48
V-1-1 Résultats	48
V-1-2 Observations.....	49
V-1-3 Interprétation des résultats	49
V-2 TEST D'HIGUCHI	50
V-2-1 Résultats	50
a) Réalisation de la gamme étalon	50
b) Test d'Higuchi avec la β -CD	51
c) Test d'Higuchi avec l' α -CD	52
V-2-2 Observations.....	53
V-2-3 Interprétation des résultats	53
a) Diagramme d'Higuchi de la β -CD.....	53
b) Diagramme d'Higuchi de la α -CD	54
V-3 CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION	55

V-3-1 Résultats obtenus avec la Spectroscopie Infrarouge	55
a) Complexes obtenus par la méthode du Kneading	55
b) Complexes obtenus par la méthode du mélange physique	56
c) Complexes obtenus par la méthode de la co-évaporation	57
d) Complexes obtenus par la méthode de la lyophilisation	57
V-3-1-1 Observations	58
V-3-1-2 Interprétation des résultats.....	58
V-3-2 Résultats obtenus avec la spectroscopie par diffraction des rayons X.....	59
a) Complexes obtenus par la méthode du Kneading	59
b) Complexes obtenus par la méthode de la Co-évaporation	59
c) Complexes obtenus par la méthode de la Lyophilisation	60
d) Complexes obtenus par la méthode du mélange physique	60
V-3-2-1 Observations	61
V-3-2-2 Interprétation des résultats.....	62
V-3-3 Résultats obtenus avec la Microscopie électronique à balayage.....	63
V-3-3-1 Observations	63
V-3-3-2 Interprétation des résultats.....	64
V-3-4 Résultats obtenus pour le dosage de la Camptothécine Dans les complexes formés.....	64
V-3-4-1 Observations	65
V-3-4-2 Interprétation des résultats.....	65
V-3-5 Résultats obtenus avec le Test de dissolution	66
a) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par Kneading.....	67
b) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par lyophilisation	67
c) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par co-évaporation et mélange physique.....	68
V-3-5-1 Observations	68
V-3-5-2 Interprétation des résultats.....	69

II- CONCLUSION GENERALE.....70

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

L'histoire de la médication est très ancienne, l'homme a toujours veillé à être au meilleur de sa forme physique et mentale et sa première source de médication fut la nature ; en effet, les premiers médicaments étaient des extraits naturels de plantes présentant des propriétés curatives, de minéraux ou de substances extraites d'animaux. [1]

Ainsi, de siècle en siècle, après avoir traversé et surmonté des épidémies ravageuses telles que la peste, le choléra ou encore la diphtérie et des maladies carencielles telles que le scorbut ou le palègre, l'homme continue, malgré tout le confort que lui apporte le monde moderne, à faire face à des maladies lourdes et mortelles telles que le SIDA et le Cancer. [1]

Le cancer représente la maladie du 21^{ème} siècle par excellence. Il s'agit d'une prolifération cellulaire anormale à l'intérieur d'un tissu sain de l'organisme, il est nécessaire de le détecter très tôt et de trouver de nouveaux agents thérapeutiques, de nouveaux protocoles et de nouvelles stratégies.

La majorité des agents anti-cancéreux sont principalement isolés à partir de plantes, de micro-organismes marins ou d'animaux. Il en existe plusieurs familles, chacune d'entre elles agissant d'une manière spécifique. Parmi elles, les inhibiteurs de la topoisomérase I et II qui interviennent dans la réplication de l'ADN comme c'est le cas des agents anti-cancéreux de la famille des camptothécines ; la camptothécine étant un alcaloïde penta-cyclique. [2]

Malgré une activité thérapeutique prometteuse, la camptothécine s'est révélée très hydrophobe et beaucoup trop instable et toxique dès les premières études et essais cliniques. Plusieurs solutions à ce problème ont été envisagées, telles que la synthèse d'analogues présentant moins d'effets indésirables. [3]

Les cyclodextrines sont des polysaccharides de forme tronconique possédant une cavité hydrophobe, largement utilisées dans le domaine pharmaceutique, principalement comme adjuvant de solubilisation afin d'améliorer la biodisponibilité des molécules actives. Leur capacité à former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules hydrophobes a été le sujet d'un bon nombre d'investigations et d'études. [4]

Compte tenu de l'originalité de leur structure et de leurs caractéristiques, nous nous sommes proposés d'étudier leur association avec la camptothécine ; les cyclodextrines en tant

que transporteur et vecteur pourrait améliorer et augmenter la solubilité voire la biodisponibilité de la camptothécine et ainsi exploiter toutes ses possibilités thérapeutiques.

Dans ce mémoire, il sera question en premier lieu, d'une étude théorique sur les cyclodextrines, leurs propriétés physico-chimiques, les différentes manières de préparer et de caractériser les complexes d'inclusion formés avec elles ainsi que leurs divers domaines d'applications.

Ensuite, il s'agira de se pencher sur la molécule active « la camptothécine », ses propriétés physico-chimiques, son mécanisme d'action au tant qu'agent anti-cancéreux ainsi que son principal problème de formulation.

Les différents tests et essais seront résumés par la suite ; détermination du ratio molaire de complexation, choix de la β -CD pour la préparation de complexes d'inclusion selon quatre méthodes différentes (kneading, lyophilisation, mélange physique, co-évaporation), dosage du rendement de complexation et enfin caractérisation des complexes d'inclusion par diverses techniques (spectroscopie IR, spectroscopie par diffraction des rayons X, microscopie électronique à balayage et test de dissolution).

Enfin, il sera question de traiter les données récoltées grâce aux essais planifiés et de les interpréter.

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

CHAPITRE

I

LES CYCLODEXTRINES

I-1 INTRODUCTION

De nombreuses molécules organiques et minérales (zéolithes) présentent une sorte de « cavité » leur permettant de former des complexes d'inclusion ; la molécule « hôte » admet à l'intérieur de sa cavité une ou plusieurs autres molécules dites molécules invitées.

Les cyclodextrines sont des molécules « hôtes » naturelles issues de la dégradation enzymatique de l'amidon. Possédant une cavité de nature hydrophobe, leur propriété de « piège moléculaire » est mise au profit de plusieurs domaines et les prédispose à d'importantes applications dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique ; en effet, les cyclodextrines sont couramment utilisées pour protéger des molécules fragiles, assurer leur libération, améliorer leur solubilité et leur stabilité.

I-2 HISTORIQUE

Les cyclodextrines, également nommées cycloheptaamylose ou celluloses, ont été isolées et découvertes pour la première fois en 1891 par un scientifique Français du nom de Villiers, à partir de produits de dégradation de l'amidon. Ce n'est que bien plus tard, en 1903, que Shardinger ; un microbiologiste Australien, identifie la souche microbienne responsable de la formation de ces celluloses (*bacillus macerans*) et décrit leur mode de préparation et de purification. Elles sont alors aussi désignées sous le nom de sucres de Shardinger. [5, 6]

Toutefois, leur structure chimique ne fut parfaitement élucidée qu'en 1938 grâce aux travaux de Freudenberg et de son équipe et c'est dix ans plus tard qu'ils rapportent pour la première fois, la possibilité pour ces composés de former des complexes d'inclusion. Néanmoins, le développement pionnier fut surtout réalisé par les groupes de Cramer et French, dans les années 50, qui travaillèrent sur la synthèse et la purification des premiers complexes d'inclusion à base de cyclodextrines. [6, 7]

Le premier brevet concernant l'utilisation des cyclodextrines pour la conception de composés possédant une activité biologique a été déposé en 1953 par Freudenberg et son équipe, ce dernier marquera le début de l'essor de l'étude des cyclodextrines. [6]

Dans les années 70/80, Szejtli apporte une importante contribution dans le domaine avec une étude poussée des complexes d'inclusion formés à partir des cyclodextrines et leur développement en chromatographie. [7]

I-3 STRUCTURE ET NOMENCLATURE

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation de l'amidon par une enzyme ; la CGTase (Cyclodextrin Glycosyl Transferase) présente dans de nombreux organismes. Cette enzyme n'étant pas spécifique, il se forme en même temps des cyclodextrines comprenant de 6 à 12 chaînes de motifs de glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,4. [5]

Grâce à la conformation de type chaise des unités glucopyranoses, les molécules de cyclodextrines ont la forme d'un cône tronqué dont l'extrémité la plus large est bordée par les groupements hydroxyles secondaire et tertiaire et la plus étroite par le groupement hydroxyle primaire (OH6). La partie extérieure est donc hautement hydrophile.

L'intérieur de la cavité est constitué d'atomes d'hydrogène (portés par les carbones C3 et C5) ainsi que d'atomes d'oxygène participant à la liaison glucidique ; ce qui confère aux cyclodextrines un caractère hydrophobe. [8]

La structure cyclique des cyclodextrines est stabilisée par un enchaînement de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupements hydroxyles OH2 et OH3 des unités glucopyranoses [4]. (Voir figure I-01 et figure I-02)

Les trois cyclodextrines naturelles sont les α , β et γ - cyclodextrine comprenant respectivement 6, 7 et 8 unités glucopyranoses [7]. (Voir figure I-03 et tableau I-01)

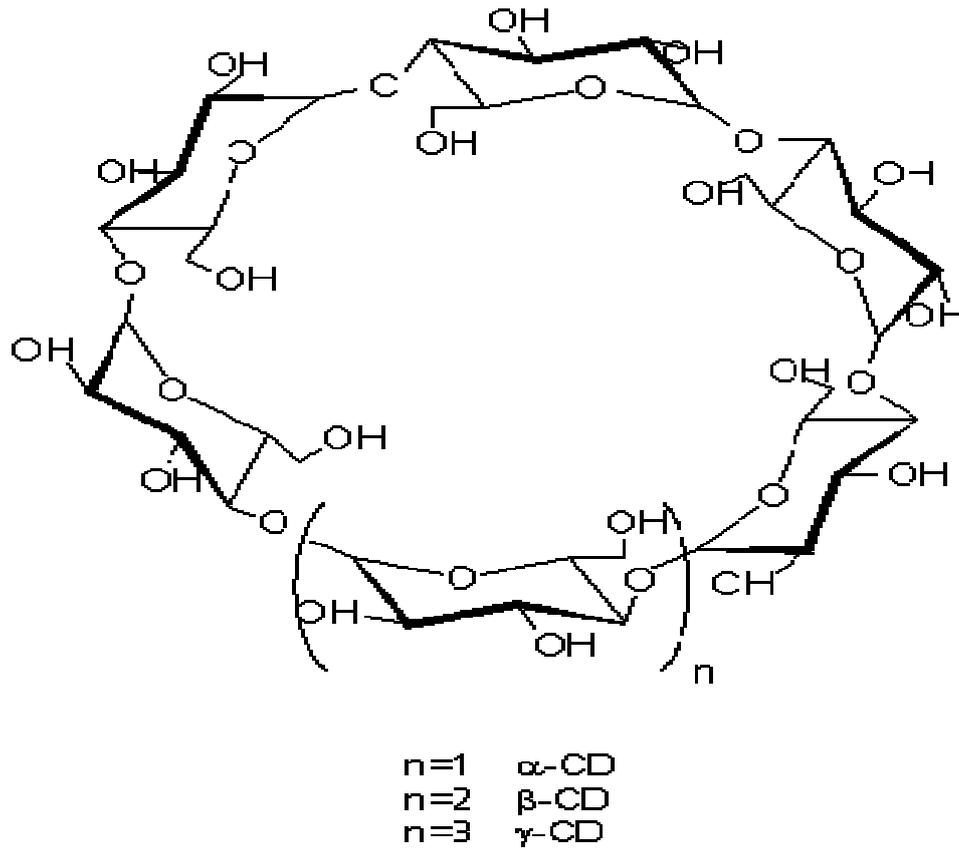


Figure I-01 : « Présentation schématique des cyclodextrines » [9]

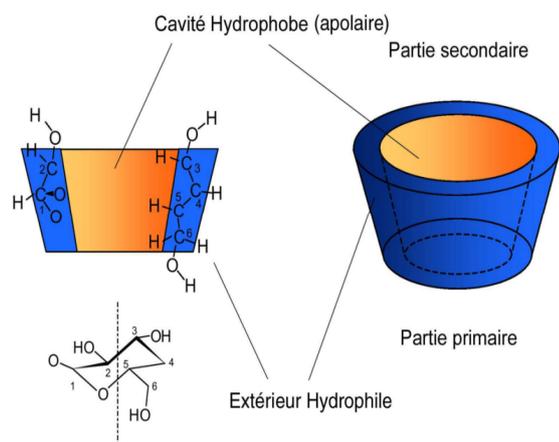


Figure I- 02 : « Structure tridimensionnelle de la cyclodextrine » [10]

Il existe de nombreuses dérivées de ces dernières qui sont synthétisées par greffage de différents groupements sur leurs fonctions alcooliques ; en effet les groupements hydroxyles peuvent être aminés, étherifiés ou estérifiés, souvent pour but d'améliorer la solubilité. Les dérivées les plus fréquemment rencontrées dans le domaine pharmaceutique sont la β ou γ -hydroxypropyl cyclodextrine, la méthyl- β cyclodextrine et la sulfobutyléther- β cyclodextrine [9].

Tableau I-01 : « Propriétés structurales des cyclodextrines » [5]

CD	Nombre d'unités glucose	Masse molaire (g/mol)	Diamètre interne (Å°)	Diamètre externe (Å°)	Hauteur de la cavité (Å°)
α	6	972	5,1 +/- 0,6	14,2 +/- 0,4	7,9 +/- 0,1
β	7	1135	7,8 +/- 0,9	15,3 +/- 0,4	7,9 +/- 0,1
γ	8	1297	8,5 +/- 1,0	17,2 +/- 0,3	7,9 +/- 0,1

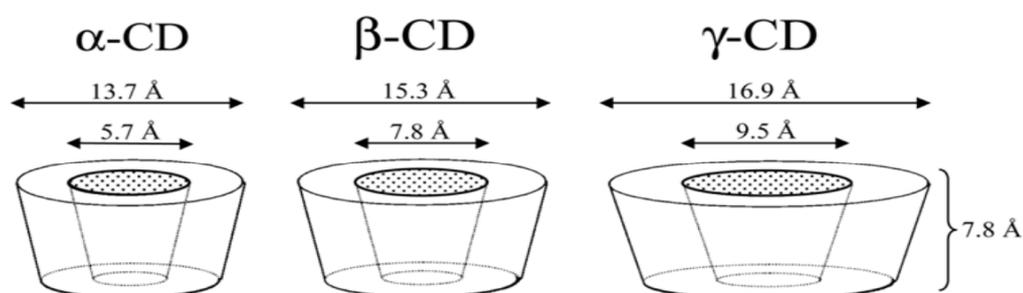


Figure I-03 : « Tailles des trois cyclodextrines naturelles et de leurs cavités respectives » [11]

I-4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

I-4-1 Caractère hydrophile et hydrophobe

En raison de la conformation de type chaise des unités glucopyranoses et de l'orientation équatoriale des fonctions hydroxyles, la cavité de la cyclodextrine est tapissée de liaison C-H qui lui confèrent un caractère hydrophobe, tandis que ces faces externes sont hydrophiles [5].

I-4-2 Caractère basique

Les paires d'électrons libres non liants portées par les atomes d'oxygène glucidique sont dirigées vers l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, ce qui donne une densité électronique élevée qui lui confère un caractère de base de Lewis [5].

I-4-3 Solubilité

Les cyclodextrines se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. La teneur en eau à l'équilibre dépend des conditions de cristallisation et de la nature des cyclodextrines.

Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau est comme suite : $\beta < \alpha < \gamma$ [6]. La faible solubilité de la β -cyclodextrine semble être due au réseau de liaisons hydrogène très fort dans le cas des cyclodextrines à sept unités (molécules rigides). Elles sont également solubles dans les solvants polaires aprotiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF) et la pyridine. [4, 5]

La capacité des cyclodextrines à former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une ou plusieurs molécules invitées est régie par leur caractère amphiphile lui-même lié à leur structure tridimensionnelle. La solubilité de ces complexes d'inclusion peut varier considérablement en fonction de la molécule invitée. L'ordre de solubilité peut être très différent de celui des cyclodextrines non complexées, ainsi quelques molécules forment des complexes peu ou même insolubles dans l'eau, tandis que d'autres complexes sont parfois plus solubles que les cyclodextrines non complexées. [10]. (Voir tableau I-02)

Tableau I-02 : « Les solubilités de la β -CD dans différents solvants » [10]

Solvants	Solubilité %
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	41.0
Diméthylformamide (DMF)	28.3
Ethylène glycol	14.8
Pyridine	7.0
Propylène glycol	3.5
Tetrahydrofurane	0.5
Méthyl isobutyl cétone	0
Méthyl isopropyl cétone	0
Acétone / Alcools	0

Tableau I-03 : « Quelques caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines naturelles » [12, 13]

Caractéristiques	α - CD	β - CD	γ - CD
Formule brute	$C_{36} H_{60} O_{30}$	$C_{42} H_{70} O_{35}$	$C_{48} H_{80} O_{40}$
Solubilité dans l'eau (25°C) g/100ml	14,5	1,85	23,2
pKa (par potentiométrie à 25°C)	12,33	12,20	12,08
Pouvoir rotatoire 25°C	+150	+163	+177

I-4-4 Stabilité et toxicité

I-4-4-1 Les cyclodextrines naturelles

Les cyclodextrines sont stables en milieu alcalin mais peuvent subir une hydrolyse partielle à un pH < 3.5 et à une température supérieure à 60°C, produisant du glucose et une série de maltosaccharides acycliques détruisant ainsi leur structure. [5]

L'innocuité des trois cyclodextrines naturelles et de leurs dérivés a été très largement étudiée. De manière générale, elles traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles et présentent très peu de toxicité lors de leur administration par voie orale (elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal). [11]

In vivo, la α et la β -cyclodextrine, contrairement à la γ -CD, ne peuvent pas être hydrolysées par la salive humaine et les amylases d'origine pancréatique. Cela dit, elles peuvent se fermenter au contact de la flore intestinale. [11, 14]

Les cyclodextrines et leurs dérivés hydrophiles sont considérés comme étant non toxiques ou présentant une faible cytotoxicité qui peut être éliminée par modifications chimiques. Cette cytotoxicité, pour de hautes concentrations, entraîne une hémolyse dans l'ordre $\beta > \alpha > \gamma$, et ce par absorption des molécules de cholestérol et de phospholipide présentes dans la membrane cellulaire, ce qui conduit à la destruction de la cellule. Cette différence dans l'ordre repose sur la capacité de chaque cyclodextrine à solubiliser les composants de la membrane cellulaire. [7, 11, 12]

- **L' α -cyclodextrine**

La prise orale de l' α -CD est bien tolérée et n'induit aucun effet notoire, elle ne présente également aucune absorption par le tractus intestinal haut. Cela dit, son administration par voie parentérale peut provoquer des irritations après une injection en intramusculaire. Lors d'une administration par voie intraveineuse, elle est éliminée pour 90 % par la voie rénale et ce, sans dégradation majeure. [11]

- **La β -cyclodextrine**

Après son administration par voie orale, la β -CD se lie avec le cholestérol et une infime quantité est absorbée par le tractus intestinal haut. Son utilisation en concentration élevée n'est pas recommandée car sa dégradation par la flore bactérienne et sa fermentation dans le colon peut provoquer des diarrhées et la production de gaz. [15]

Cela dit, toute administration par voie parentérale est exclue car elle peut provoquer une néphrotoxicité. Cette dernière peut être due à la cristallisation de la β -CD (solubilité aqueuse basse = 1.85 mg/ml) ou à la formation de complexes avec le cholestérol dans les tissus rénaux. [6, 11]

La β -CD est incluse dans des médicaments à prise orale, des formulations orales, buccales et rectales ainsi que dans des applications topiques. La FDA a autorisé son utilisation comme additif alimentaire à hauteur 0,5 à 2% selon les produits. [11]

- **La γ -cyclodextrine**

Après administration par voie orale, l'absorption intestinale de la γ -CD est négligeable. Chez le rat, sa DL_{50} est supérieure à 8000 mg/kg (voir tableau I-04) par voie orale et de 4000 mg/kg par voie intraveineuse, et elle est très peu métabolisée par injection intraveineuse. Cette cyclodextrine est probablement la moins toxique et semble être l'additif alimentaire de choix, mais ses capacités de complexation sont les moins intéressantes. [6, 11, 15]

Tableau I-04 : « Doses létales des CD natives selon leurs modes d'administration chez le rat » [11]

Voie d'administration	Cyclodextrines	Dose létale 50 (mg/kg)
Orale	α - CD	>10 000
Orale	β -CD	>5000
Orale	γ -CD	>>8000
Intra-veineuse	α - CD	500-750

I-4-4-2 Les cyclodextrines modifiées

Les dérivés des cyclodextrines sont généralement obtenus par substitution d'un ou plusieurs groupements hydroxyles par des halogènes, des groupements alkyles ou amines, par oxydation des alcools primaires ou encore par substitution nucléophile interne. Cette modification a pour objectif l'amélioration de la solubilité de la CD et de sa capacité de complexation, elle peut également aider à la fixation d'un groupe spécifique (pour la modélisation enzymatique) ou encore pour la formation de polymères de CD.

Des études consacrées à la toxicité de l'HP- β -CD lors d'une administration intraveineuse et intramusculaire à des rats ont montré que cette molécule pouvait être utilisée sans risque.

Parmi les cyclodextrines modifiées hydrophiles, seules les 2-HP- β -CD, la sulfobutyl- β -CD et la β -CD sulfaté sont désignées comme étant sans danger et aucun effet secondaire n'a été observé chez l'homme lors de leur administration par voie parentérale. [6], [11]

Les études toxicologiques concernant l'HP- γ -CD et SBE β -CD sont très rares ; cela dit cette dernière est présentée comme étant non toxique à des doses intraveineuses et orales modérées, et l'HP- γ -CD est commercialisée dans deux produits (une solution ophtalmique et un produit de diagnostic parentéral). [11]

I-5 PROPRIETE DE COMPLEXATION

L'une des plus importantes caractéristiques des cyclodextrines est leur bipolarité ; hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur. Elles peuvent donc être considérées comme des capsules vides de taille variable pouvant accueillir différentes molécules, formant ainsi un complexe. Le terme « complexe d'inclusion » a été introduit pour la première fois par Schlenk en 1950 ; il désigne l'association de deux ou plusieurs composés dont l'un (la molécule invitée) est entièrement ou partiellement inclus dans la cavité formée par la molécule hôte (la cyclodextrine). Par contre, si la molécule invitée interagit avec la molécule hôte à l'extérieur de la cavité, on parle plutôt de complexe d'association. [12]

Les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution avec une grande variété de substances allant des composés organiques ou inorganiques, neutres ou ioniques, polaires ou apolaires et gaz nobles. [5]

On parle de complexe 1 : 1 lorsqu'une molécule invitée interagit avec une seule molécule de cyclodextrine, un complexe 1 : 2 voir 1 : 3 si la molécule invitée est de grande taille et si plusieurs molécules de cyclodextrine peuvent interagir avec elle. Par contre, un rapport 2 : 1 décrit le cas où la cavité de la cyclodextrine est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules [4]. (Voir figure I-04)

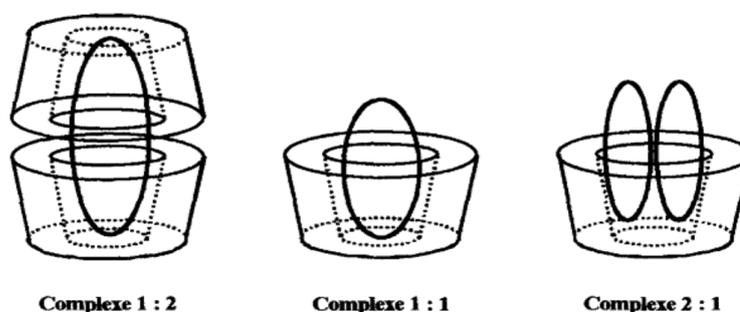


Figure I-04 : « Représentation schématique de complexes d'inclusion de stoechiométries différentes » [12]

Les facteurs influençant le phénomène d'inclusion :

- La taille : en effet, les molécules invitées doivent être de taille adaptée aux dimensions de la cavité de la cyclodextrine ; des molécules trop petites passeraient au travers de cette dernière.
- La polarité : les molécules invitées doivent comporter un groupement moins polaire que l'eau ; des molécules trop hydrophiles ne pourraient être complexées. [5]

Ainsi, une molécule invitée d'un groupement relativement hydrophobe et de taille proche de celle de la cavité de la cyclodextrine, permet d'obtenir un complexe d'inclusion stable.

I-5-1 Mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion

En solution aqueuse, la cavité apolaire de la cyclodextrine est occupée par des molécules d'eau qui se trouvent dans un état énergétique défavorable, du fait des interactions polaires/apolaires. Ces molécules, possédant une énergie enthalpique plus importante que les autres molécules en solution sont par conséquent, facilement exclues de la cavité en faveur de composés moins polaires que l'eau. [7]

La complexation de molécules hydrophobes est énergétiquement favorable ($\Delta H < 0$) puisqu'elle s'accompagne d'une augmentation des interactions solvant-solvant au détriment des interactions solvant-molécule hôte et solvant-molécule invitée. D'autre part, les molécules d'eau expulsées acquièrent un degré de liberté plus élevé qu'à l'intérieur de la cavité, et donc d'un gain d'entropie ($\Delta S > 0$) peut également favoriser la complexation. [5, 7]

Cela dit, il a été montré que le processus de complexation s'accompagne d'un gain d'enthalpie ($\Delta H > 0$) et d'une perte d'entropie ($\Delta S < 0$) indiquant alors que le phénomène de complexation ne se limite pas à un processus hydrophobe classique. En effet, d'autres phénomènes seraient responsables de l'inclusion des molécules invitées dans les cyclodextrines [5, 4] :

- Des interactions hydrophobes entre l'hôte et l'invitée
- Des interactions de Van Der Waals (liaison faible de type dipôle/dipôle)
- Des liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles des cyclodextrines et les groupements polaires de la molécule invitée. (Voir figure I-05)

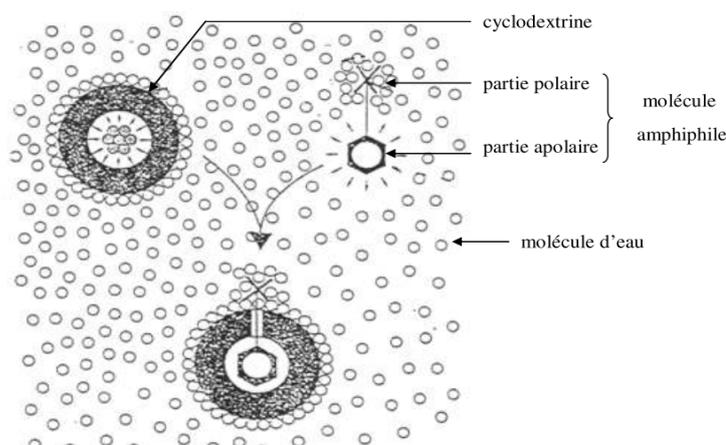


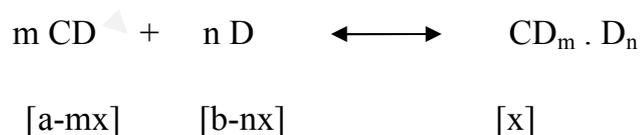
Figure I-05 : « Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion » [5]

Ce phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente, et influence un bon nombre de propriétés physico-chimiques de la molécule invitée qui se trouvent modifiées du fait de la formation du complexe [4] :

- Le déplacement chimique en RMN est modifié du fait de ce changement d'environnement anisotrope.
- Parfois le maximum en UV est déplacé de plusieurs nm.
- La fluorescence est aussi très influencée car la molécule fluorescente passe d'un milieu aqueux à un milieu apolaire.
- La réactivité chimique des molécules incluses est aussi modifiée lors de l'inclusion. Le plus souvent elle est diminuée car l'invité se trouve stabilisé, mais la cyclodextrine peut aussi agir comme catalyseur.

Ce processus réversible (les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution) peut être quantifié par la mesure de la stabilité (constante d'équilibre K_c) ou de son contraire (constante de dissociation K_d). La détermination de ces

deux constantes est cruciale, car ces deux valeurs nous renseignent sur le changement des propriétés physico-chimiques du complexe formé lors de sa solubilisation. [14]



$$K_{n:m} = [x] / ([a-mx]^m [b-nx]^n)$$

$$\text{Et : } K_d = ([a-mx]^m [b-nx]^n) / [x] = 1 / K_c$$

Avec :

CD : Cyclodextrine ; D : molécule invitée

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

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

x : quantité de complexe formé

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

I-5-2 Techniques de préparation des complexes d'inclusion

Plusieurs méthodes permettent la formation de complexes avec la cyclodextrine. Le paramètre à prendre en compte alors est l'adéquation de la molécule invitée (le principe actif) avec la molécule hôte (la cyclodextrine) ; la dimension de la cavité de la CD doit correspondre à la taille du PA.

I-5-2-1 Le mélange physique

Il s'agit ici d'un simple mélange de deux poudres jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Généralement ce protocole se réalise à température ambiante. Son principal avantage est qu'il n'utilise pas d'eau et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes de poudres et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante [11]

I-5-2-2 Le kneading

Cette méthode consiste à obtenir un complexe en malaxant la cyclodextrine avec le PA en présence d'un peu d'eau ou de quelques gouttes d'une solution tampon. On obtient alors une pâte dont la viscosité augmente au fur et à mesure de la formation des complexes d'inclusion.

I-5-2-3 La Co-précipitation

C'est la méthode la plus couramment utilisée. Après dissolution de la CD dans de l'eau sous agitation, le PA ou sa solution est ajoutée. Le PA doit être dissout dans un solvant commun et miscible à la cyclodextrine. Le précipité formé peut être recueilli par décantation, filtration ou centrifugation. Afin d'obtenir un produit sous forme de poudre, les solvants peuvent être éliminés par évaporation ou lyophilisation.

I-5-2-4 La lyophilisation

La lyophilisation, appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans le produit par sublimation [16].

La molécule invitée est ajoutée à la solution aqueuse de CD, après mélange sous agitation, la substance obtenue est congelée puis lyophilisée dans un lyophilisateur.

I-6- CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION

La plus grande et plus intéressante propriété des cyclodextrines est leur aptitude à former des complexes d'inclusion avec une assez large palette de molécules. Ces complexes d'inclusion peuvent se former sous forme solide ou en solution, induisant des changements potentiels dans les propriétés physico-chimiques de la molécule invitée. Ces derniers peuvent être quantifiés et les complexes caractérisés par différentes méthodes d'analyse.

I-6-1 L'analyse thermogravimétrique (ATG)

Le principe de l'analyse thermogravimétrique repose sur le suivi et l'analyse de l'évolution de la masse de l'échantillon lors d'une montée en température. Cette méthode permet de constater si la substance invitée subit certains changements avant la dégradation

thermique de la CD. Ces changements peuvent être la fonte, l'évaporation, la décomposition ou l'oxydation ; ils indiquent la formation du complexe et correspondent à une diminution de la masse. [17, 18]

De façon plus détaillée, l'ATG présente des points caractéristiques en fonction de la température ; point de fusion, d'ébullition et de sublimation, qui représentant le passage du produit à différentes états (amorphe, cristallin, état de fusion). Lors de formation de complexes, on observe le déplacement de ces points vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors une disparition dans l'intervalle de température où la cyclodextrine est décomposée.

Toutes modifications structurales de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation de la cyclodextrine peuvent être évaluées grâce à cette méthode. [13]

I-6-2 La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Cette méthode fournit des informations sous forme d'images lumineuses résultant de l'interaction d'un faisceau d'électrons avec un volume microscopique de l'échantillon étudié. Elle consiste à balayer ligne par ligne, la surface de cet échantillon avec un faisceau lumineux puis à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau incident [19].

Cette technique est utilisée pour étudier les aspects microscopiques de la CD et de la molécule invitée d'une part et du produit obtenu par complexation. L'état de cristallisation des molécules brutes (CD + molécule invitée) et du produit obtenu n'est pas le même ; cette différence indique la formation d'un complexe d'inclusion. [7, 18]

I-6-3 La Diffraction des Rayons X (DRX)

Cette méthode d'analyse est utilisée pour détecter un complexe d'inclusion à l'état solide. Une comparaison est faite entre les diffractogrammes du composé formé et celui de la CD et de la molécule invitée. Ceci reste possible que si ces dernières ont été traitées dans les mêmes conditions que le complexe formé. La formation d'un complexe CD-molécule invitée altère les modèles de diffraction et change la nature cristalline de la molécule invitée. La

diffraction aux rayons X permet non seulement de prouver l'inclusion mais aussi d'obtenir des informations sur la structure du complexe formé. [7, 18]

I-6-4 La Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge est utilisée afin d'estimer l'interaction entre la cyclodextrine et la molécule invitée à l'état solide. Elle mesure l'excitation vibrationnelle des atomes autours des liaisons qui les unissent suite à l'exposition à des radiations électromagnétiques. [7, 11]

La position des bandes d'absorption dépend de la nature des groupes fonctionnels présents dans une molécule. Les spectres des complexes présentent généralement un léger déplacement des pics, ce qui indique qu'il n'y a pas de liaison chimique forte (liaison covalente) entre les composés mais juste une interaction. Chaque bande du spectre caractérise un groupe fonctionnel de la molécule et son déplacement permet de désigner quelle partie de la molécule invitée interagit avec la cyclodextrine. [11]

Cela dit, les groupements de la cyclodextrine changent très peu au cours de l'inclusion, et si la molécule invitée ne représente que le quart du complexe formé, les groupements de cette dernière seront masqués par ceux de la CD. C'est pourquoi cette technique n'est généralement pas adéquate pour la détection de complexe d'inclusion, sauf dans le cas où la molécule invitée possède quelques groupements caractéristiques (tels que les groupements carbonyle ou sulfonyl). [7]

I-6-5 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire représente la méthode la plus importante dans l'élucidation de la structure tridimensionnelle des composés organiques, particulièrement à l'état liquide. Il s'agit d'une technique basée sur l'étude des noyaux atomiques possédant des propriétés magnétiques (spin-actif) dans un champ magnétique extérieur puissant (H^1 , C^{13}). [10, 13]

Le spectre du proton (RMN H^1) renseigne sur la direction de pénétration de la molécule invitée dans la cavité de la cyclodextrine par identification de la position de ces protons et

celui du carbone 13. Il donne des informations concernant les propriétés dynamiques du complexe. [11]

L'utilisation de cette méthode pour l'étude des complexes d'inclusion repose sur l'idée suivante : si la molécule invitée a pénétré dans la cavité de la cyclodextrine, les atomes d'hydrogène situés à l'intérieur de (H3 et H5) seront considérablement perturbés, tandis que ceux se trouvant à la surface (H2, H4, H6) ne sentent pas d'influence, ou alors un très faible décalage du fait de leur très faible interaction avec la molécule invitée. [7, 10]

I-6-6 Le test de dissolution

Le test de dissolution est effectué dans l'intention de déterminer la quantité et le profil de libération de la molécule invitée et d'observer ainsi concrètement l'amélioration de sa solubilité.

Le test de dissolution le plus utilisé est celui du disc rotatif. Pour ce faire, les complexes sont mis sous forme pulvérulente ou bien comprimés afin d'obtenir des comprimés de surface exactement identique. Les comprimés sont ensuite placés dans les bacs de l'appareil contenant une solution aqueuse, gastrique ou basique maintenue à 37°C grâce à un bain thermostaté.

A intervalles réguliers, des échantillons de 4 à 5 ml sont prélevés, filtrés de préférence puis analysés. [13]

I-7 DIAGRAMME DE PHASE

L'analyse de la solubilité est une approche traditionnelle afin d'évaluer la stabilité mais aussi pour donner un aperçu de la stœchiométrie de l'équilibre. Expérimentalement, un excès d'une substance peu soluble dans l'eau est introduit dans différentes fioles auxquelles un véhicule aqueux contenant de cyclodextrines de concentrations croissantes est ajouté. [14]

Les fioles sont agitées à température constante jusqu'à ce que l'équilibre de complexation soit établi (plusieurs heures à plusieurs jours). Les suspensions sont alors filtrées et la quantité de substance solubilisée est déterminée par une méthode de dosage appropriée. [12, 14]

Le diagramme de phase ou isotherme de solubilité est alors construit en évaluant l'effet de la cyclodextrine sur la solubilité apparente des molécules invitées ; on reporte sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe des abscisses et la concentration molaire de l'agent complexant (les cyclodextrines) sur l'axe des ordonnées.

Les implications pratiques et phénoménologiques de ce diagramme ont été développées par Higuchi et Connors dans leurs travaux publiés en 1964. Ces derniers ont classé les différents types d'isothermes caractérisant les interactions substrat-ligand aux quelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrine-molécule invitée. On distingue deux profils majeurs ; le profil A et le profil B [12, 14]. (Voir figure I-06)

I-7-1 Le profil A

Le profil A est obtenu lorsque la solubilité du substrat augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrine. Trois sous-types ont été définis : le type A_L , A_P et le type A_N .

Les profils de type A_L indiquent que la solubilité apparente de la substance augmente de façon linéaire en fonction de la concentration de cyclodextrine. Ces profils sont généralement attribués à la formation de complexes 1 : 1. [15]

Les profils de type A_P indiquent un isotherme qui dévie positivement la linéarité ; c'est-à-dire que la cyclodextrine est proportionnellement plus effective à de haute concentration. Ces profils traduisent la formation simultanée de complexes à stœchiométrie différente (1 : 1 à l'origine, puis 1 : 2, 1 : 3 ... etc). [14]

Les profils de type A_N indiquent une déviation négative par rapport à la linéarité, en d'autres termes, la cyclodextrine est proportionnellement moins effective à de haute concentration. Cependant, ces profils peuvent être difficiles à interpréter. La chute de solubilité par rapport au profil linéaire peut être liée à des modifications de la solubilité du complexe (cyclodextrine agissant comme choatropes, kosmotropes ou changeant la viscosité), de la constante diélectrique du milieu ou à l'association de cyclodextrines entre elles à de hautes concentrations. [12, 14]

I-7-2 Le profil B

Le profil de type B indique la formation d'un complexe à solubilité limitée. On distingue deux sous-types.

Le profil de type B_s suit au départ le profil de type A_L puis à partir d'un certain point, tout ajout de cyclodextrines entraîne une précipitation du complexe (au fur et à mesure que le complexe précipite, le principe actif non encore dissout se solubilise sous forme libre). La courbe décroît ensuite (tout l'excès de principe actif est dissout, et cette fraction est progressivement complexée et précipitée).

Le profil de type B_I peut être interprété de la même manière sauf que dans ce cas, le complexe est tellement insoluble que l'augmentation initiale de la solubilité ne peut être détectée. [12, 14, 15]

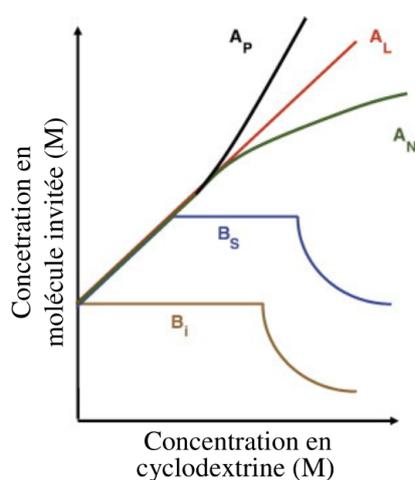


Figure I- 06 : « Types de diagrammes de solubilité selon Higuchi et Connors » [12]

L'établissement de ces diagrammes de solubilité permet de calculer, à partir de la pente de la droite, une constante de stabilité apparente K_c , en se basant sur l'équation d'Higuchi.

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

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

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

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

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

I-8 INTERETS ET APPLICATIONS DES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines ont connu un bond considérable à partir des années 70 et cet essor n'a pas cessé de croître au fil des années. En effet, la palette de molécules complexées n'a pas arrêté de se diversifier et ce dans plusieurs domaines.

I-8-1 Dans le domaine pharmaceutique

La complexation est mise à profit dans le domaine pharmaceutique et ce dans le but de:

- Augmentation de la stabilité d'une molécule (PA) et protection de cette dernière contre la lumière et la photo-décomposition (amélioration de la photo-stabilité), contre la chaleur et la déshydratation (amélioration de la stabilité thermique et renforcement de la stabilité structurale), contre l'hydrolyse et l'oxydation.
- Augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité du principe actif.
- Amélioration de l'effet et de l'intensité thérapeutique du principe actif complexé
- Diminution des effets secondaires de certains PA ; la réduction de la dose effective due à une augmentation de la solubilité par complexation, entraîne une diminution de la toxicité.
- Ciblage thérapeutique ; les CD jouent ici le rôle de vecteur sur lequel sont chimiquement greffées des antennes stratégiquement choisies en fonction du site

d'action afin d'assurer la fonction de ciblage. L'apparition des CD modifiées ont permis d'élargir la possibilité de ciblage moléculaire des médicaments. [4, 6, 11]

I-8-2 Dans le domaine agroalimentaire

Les cyclodextrines sont utilisées dans ce domaine en tant qu'exhausteurs de goût (ajout facile de composés gustatifs), de stabilisants d'arôme et de conservateurs par action anti-oxydante. Elles sont appliquées afin de supprimer et masquer les composants indésirables et pour relarguer avec le temps les composés désirés. Elles permettent également la protection de vitamines et l'extraction du cholestérol. [4, 11, 13]

I-8-3 Dans le domaine de la cosmétologie et du textile

Les cyclodextrine sont encore employées dans les industries cosmétiques et parfumeries. Elles sont utilisées pour diminuer la volatilité de certains parfums et les relarguer instantanément (controled release). Les principaux avantages des CD dans ce domaine sont la stabilisation, le relargage, la protection et la livraison des arômes. [11, 13]

Dans l'industrie du textile, les cyclodextrines sont de plus en plus utilisées ; greffées sur les textiles, elles ont pour but d'éliminer ou de masquer les odeurs indésirables (odeur de cigarette, sueur...) elles permettent également de renforcer la prise de colorants par le tissu et réduire ainsi, la quantité de colorant perdue lors du lavage. [11, 13]

I-8-4 Dans le domaine de la chimie catalytique et analytique

En plus de la complexation, les cyclodextrines possèdent des propriétés catalytiques proches de celles des enzymes. Elles sont utilisées en tant que catalyseur dans différentes réactions ; réduction céto-acide, halogénéation, oxydation de sulfures...etc. [4]

Elles sont également utilisées dans le domaine des méthodes séparatives comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ; les cyclodextrines sont greffées sur la phase stationnaire et permettent de changer l'affinité des composés à analyser vis-à-vis de cette phase et modifier ainsi le temps de rétention. On les retrouve aussi dans l'électrophorèse capillaire. [4, 5, 11]

I-8-5 Dans le domaine environnemental

Les cyclodextrines jouent un rôle important dans les sciences environnementales, en effet, elles permettent la solubilisation des contaminants organiques, l'enrichissement et le déplacement des polluants organiques et des métaux lourds du sol, de l'eau et de l'atmosphère. Les cyclodextrines sont également utilisées dans le traitement des eaux et cela en augmentant l'encapsulation et l'adsorption de contaminants organiques, on les retrouve aussi dans la formulation d'insecticides. [11, 13]

I-9 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons introduit les cyclodextrines et leurs différentes propriétés physico-chimiques. Leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes fait qu'elles sont très intéressantes pour la pharmacie galénique et la formulation de médicaments. Les techniques de formation de ces complexes sont faciles à réaliser et leur caractérisation peut se faire de différentes manières.

CHAPITRE

II

LA CAMPTOTHECINE

II-1 INTRODUCTION

Le cancer est un fléau qui menace de plus en plus notre société ; il s'agit d'une prolifération cellulaire anormale à l'intérieur d'un tissu sain de l'organisme. Afin de le combattre, il est nécessaire de le détecter très tôt et de trouver de nouveaux agents thérapeutiques de plus en plus efficaces, de nouveaux protocoles et de nouvelles stratégies.

Certains agents anticancéreux ont pour cible la topoisomérase I et II ; enzyme intervenant dans la réplication de l'ADN. C'est le cas de la camptothécine.

II-2 HISTORIQUE

La camptothécine (CPT) a été initialement isolée en 1966 par M.E. Wall d'une plante d'origine chinoise nommée *Camptotheca acuminata*, qui produit cette toxine pour se défendre vis-à-vis des herbivores. Cette découverte résultait d'un vaste programme de criblage de produits naturels et d'extraits à l'initiative du National Cancer Institute. Toutes les parties de la plante contiennent de la CPT (racines, graines...) mais elle est plus abondante et plus facile à extraire dans l'écorce et les jeunes pousses. [21, 22]

On la retrouve également dans d'autres plantes, elle est par exemple extraite de la tige de *Pyrenacantha klaineana*, arbre de la famille des Icacinaceae. La CPT a rapidement suscité un grand intérêt en raison de ses propriétés anti-tumorales et anti-leucémiques remarquables. [22]

Entrée en clinique dès les années 70, les premiers essais avec la CPT ont été effectués sur le sel sodique à cause de sa faible hydrosolubilité. Cela dit, on n'observa qu'une rémission partielle et des effets secondaires nombreux et sévères (cystite hémorragique due à l'ouverture du cycle lactone). En raison de ces résultats, la CPT ne connut alors qu'un intérêt marginal. [21, 22]

Deux découvertes ravivèrent cet intérêt ; en 1980, Mr Wall et ses collaborateurs ont démontré que l'activité de la CPT était dépendante du motif lactonique intact et en 1985, l'équipe de Mr Liu a découvert sa cible moléculaire essentielle, voire unique ; la topoisomérase I, enzyme primordiale pour la réplication et la transcription de l'ADN sur lequel la

CPT agirait comme inhibiteur, mécanisme d'action jusqu'alors inconnu pour un agent anticancéreux. [21, 22]

Aujourd'hui, seuls deux dérivés de la CPT sont prescrits en clinique, l'Irinotécan (CPT 11, Campto^R) et le Topotécan (Hycamptin^R). L'Irinotécan a reçu en premier l'autorisation de mise sur le marché (AMM) ; c'est un traitement de choix pour les cancers colorectaux métastatiques en première ligne thérapeutique (en association ou en monothérapie) sous couvert d'anti-émétiques et antispasmodiques pour pallier les troubles gastro-intestinaux. Des études ont montré qu'il pourrait jouer un rôle dans le traitement des tumeurs solides. Le Topotécan quant à lui, a une activité thérapeutique plus modeste pour un coût plus élevé et est prescrit en deuxième ligne thérapeutique dans le cancer de l'ovaire. [21]

II-3 STRUCTURE

La CPT est un alcaloïde qui se compose de cinq cycles (A B C D E) déclinés en trois éléments adjacents ; la partie quinoline A-B reliée au chaînon lactone E par l'intermédiaire d'un fragment indolizine C-D. [23]

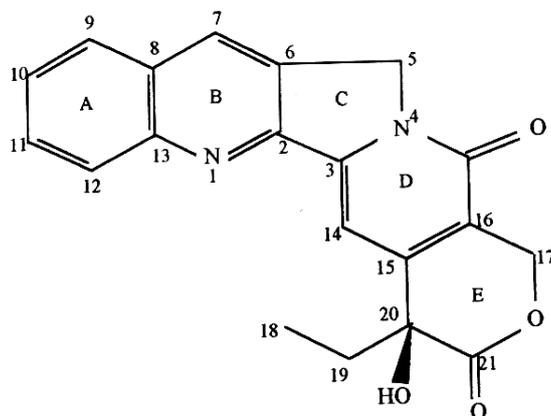


Figure II- 01 : « Structure de la camptothécine » [23]

La CPT est une molécule électriquement neutre, de structure quasiment plane. Cette molécule très insaturée, présente une configuration S au niveau du centre asymétrique en C₂₀, cruciale pour l'activité antitumorale. [22]

II-4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

II-4-1 Propriétés physique et chimique

De formule brute $C_{20}H_{16}N_2O_4$ et de masse relative 348.111 g/mol, la Camptothécine est une poudre cristalline jaune pâle. Le haut degré de conjugaison entre les quatre cycles ABCD explique la fluorescence bleue intense de la molécule sous rayons UV. [21]

C'est également une molécule faiblement basique, qui ne forme pas de sels stables avec les acides minéraux, par conséquent, elle ne peut pas être considérée comme étant un alcaloïde au sens strict du terme. [23]

II-4-2 Solubilité

La CPT est insoluble dans l'eau (cette propriété est à l'origine des problèmes de formulation pharmaceutique) et très peu soluble dans les solvants polaires et apolaires. Sa dissolution n'est obtenue que dans le DMSO. [24]

II-4-3 Instabilité

La Camptothécine est instable en milieu aqueux neutre et dans les liquides biologiques. Le cycle C-D central est toujours préservé dans les différentes familles d'analogues de la CPT et sa substitution est difficile, à l'inverse des parties extrêmes A-B et E qui s'aménagent et s'accommodent facilement. Le cycle hydroxylactone s'hydrolyse facilement pour donner la forme carboxylée. Cette hydrolyse conduit à la perte d'activité de la molécule. Cette réaction est très dépendante du pH de la solution. A l'équilibre, la forme lactone est prédominante pour des valeurs de pH acides. En milieu neutre et alcalin, c'est la forme carboxylée qui est majoritaire [22, 23]. (Voir figure II-02 et tableau II-01)

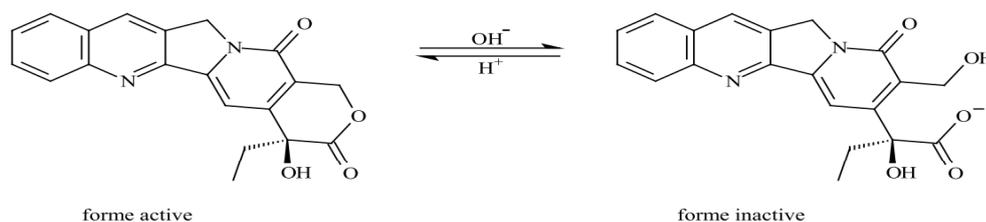


Figure II-02 : « Formes active et inactive (carboxylée) de la CTP » [21]

Tableau II- 01 : « Solubilité de la CPT dans différents milieux » [23]

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

II-5 LA TOPOISOMERASE I ET LE MECANISME D'ACTION DE LA CAMPTOTHECINE

La topoisomérase I est une protéine nucléaire (enzyme) présente chez tous les organismes vivants et essentielle à leur viabilité. Elle joue un rôle primordial dans le métabolisme de l'ADN ; réplication, recombinaison, transcription et réparation. [23]

De façon simplifiée, le processus d'action de la topoisomérase I se déroule en trois grandes étapes [22] :

- Formation d'une complexe enzyme-ADN et coupure d'un brin d'ADN.
- Despiralisation de l'ADN rendue possible par la présence de la coupure.
- Nouvelle ligation de l'ADN, libération de la topoisomérase I et reprise de la réplication.

La camptothécine agit comme poison de la topoisomérase I. elle n'inhibe pas la formation du complexe de la topoisomérase I avec l'ADN, mais se fixe sur ce dernier pour former un complexe ternaire enzyme-ADN-CPT stable. Ce complexe va saboter et empêcher la réalisation de la réplication et retarder ou arrêter le déplacement de la topoisomérase I le long du brin d'ADN ; l'enzyme va alors couper l'ADN de manière irréversible en de multiples endroits ce qui va entraîner la perturbation du mécanisme de division cellulaire et donc la mort de la cellule. [22, 23]

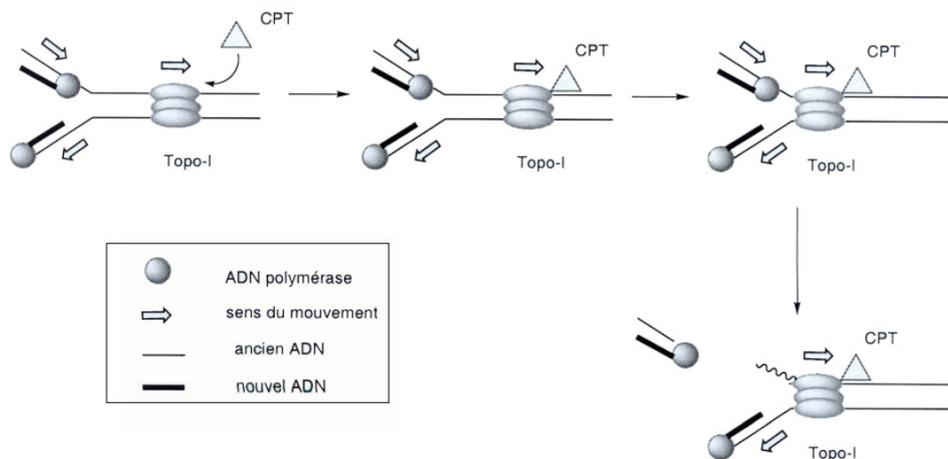


Figure II-03 : « Schéma récapitulatif de l'action de la CPT sur la topoisomérase I » [22]

II-6 PROBLEME DE FORMULATION

Bien qu'utilisée depuis des siècles en médecine traditionnelle chinoise et malgré des propriétés anti-tumorales remarquables et prometteuses, la CPT n'est pas un principe actif viable. Sa faible hydrosolubilité, son instabilité (son efficacité reposant sur le motif lactonique intact) et son assez grande toxicité causent de grands problèmes de formulation. Beaucoup de sociétés pharmaceutiques et de laboratoires académiques s'intéressent et se penchent de plus en plus sur cette problématique (synthèse de nouveaux analogues, optimisation de la solubilité et de la stabilité du cycle lactonique...).

Des travaux consacrés à la synthèse d'analogues de la CPT ont permis de déterminer les caractéristiques indispensables à l'activité anti-tumorale:

- La structure entière pentacyclique de la CPT est absolument nécessaire. Les analogues tétras cycliques, tricycliques ou bi cycliques sont inactifs.
- L'activité anti-tumorale varie aussi selon la fonctionnalisation des cycles A et B. les substituants en position C₇, C₉ et C₁₀ augmentent souvent l'activité, tandis que des substituants en position 11 et 12 la diminuent généralement.
- La substitution du C en position 5 entraîne une diminution de l'activité
- Le cycle E : la configuration S du C₂₀ est indispensable de même, très longtemps, le motif lactonique à six chaînons était considéré comme indispensable. La substitution par un azote, ou un soufre de l'alcool ou de l'oxygène de la lactone rend le composé inactif, en revanche, les analogues possédant une lactone à sept chaînons (homoCPT) se sont révélés intéressants du point de vue pharmaceutique. De même pour les composés possédant un cycle E sans l'oxygène de la lactone (cycle E à cinq chaînons).

[22]

II-7 ANALOGUES DE LA CAMPTOTHECINE

Suite à la nécessité de remédier au problème de formulation de la camptothécine, une génération d'analogues plus solubles et possédant un meilleur profil thérapeutique a vu le jour (voir figure II-04)

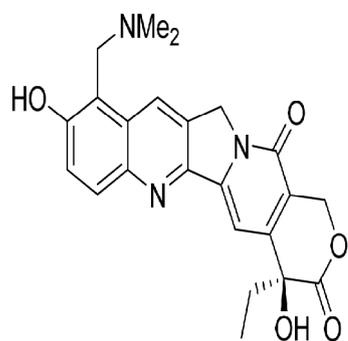
II-7-1 Première génération : analogues plus hydrosolubles

Le Topotécan et l'Irinotécan font partie de la première génération d'analogues de la camptothécine. Ils ont tous deux reçu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) en 1996. [22]

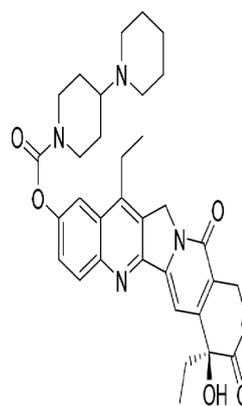
Le Topotécan commercialisé par Glaxo-Smith Kline sous le nom d'Hycamptin, est actuellement utilisé pour le traitement du cancer des ovaires et du poumon à petites cellules. La structure cristalline du complexe ternaire topoisomères I-ADN-Topotécan découverte récemment, montre que le principe actif est à la fois présent sous sa forme fermée et ouverte, ce qui suggère que la forme ouverte du Topotécan, est par extension celle d'autres analogues, pourrait être active biologiquement. [23]

L'Irinotécan commercialisé par Pfizer sous le nom de Camptosar, qui est utilisé pour le traitement du cancer colorectal, est en réalité une prodrogue dont le métabolite actif est le SN-38. Dernièrement, des essais ont montré que cette molécule pourrait être également efficace dans le traitement d'autres tumeurs solides, comme les cancers du poumon, des ovaires et de l'estomac. [22, 23]

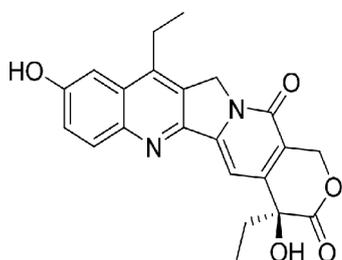
Le SN-2310 (80), une autre prodrogue ayant le même métabolite actif que l'Irinotécan a été développée. Il s'agit d'une émulsion huile dans eau conjuguant le SN-38 au succinate de la vitamine E, augmentant ainsi la solubilité de la molécule et lui permettant d'être administré sans dilution. Ce composé fait actuellement l'objet de tests cliniques de phase I depuis 2006. [23]



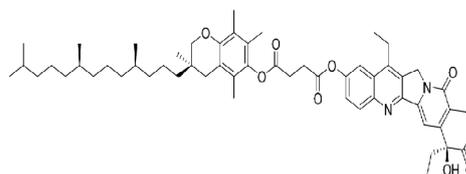
Topotécán



Irinotécán



SN-38



SN-2310

Figure II-04 : « Quelques analogues de la CPT » [23]

II-7-2 Deuxième génération : les analogues lipophiles et les homocamptothécines

L'un des objectifs des équipes de recherche a été de trouver des analogues de CPT moins sensibles à l'hydrolyse de la CPT. L'Homocamptothécine possédant un méthylène supplémentaire au niveau du cycle E semble répondre à cette exigence.

Un autre moyen de contourner ce problème de la lactone dans le sang est de rendre le composé plus lipophile. L'incorporation de substituants lipophiles à la structure de la CPT induit à une augmentation de sa solubilité dans le sang et également une pénétration plus rapide dans les cellules. [23]

II-7-3 Troisième génération : les analogues non lactoniques

En 2003, les équipes de C.Bailly et G.Lavielle ont démontré que les analogues de la CPT dépourvus de la fonction lactone au niveau du cycle E, étaient aussi de puissants inhibiteurs de la relaxation de l'ADN. Ainsi, les analyses du cycle E montrent une cytotoxicité pour les cellules tumorales comparables à celle du Topotécan et à celle du SN-38. [21, 22]

II-8 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons introduit la camptothécine et ses différentes propriétés physico-chimiques. Le principal inconvénient de cette molécule est son instabilité et sa faible hydrosolubilité qui lui causent de grands problèmes de formulation malgré une activité anti-cancéreuse prometteuse, d'où l'utilité d'étudier la combinaison CD/CPT et voir l'effet de cette dernière sur cette problématique.

CHAPITRE

III

TRAVAUX ANTERIEURS

III-1 INTRODUCTION

Dans ce chapitre, il sera question de résumer les différentes études faites auparavant concernant l'association des cyclodextrines et de la camptothécine (inclusion, complexation), les différentes formulations du complexe CPT-CD, et d'analyser les divers résultats obtenus.

III-2 TRAVAUX ANTERIEURS

En octobre 2001, Dichao KANG, Dong YANG et *collaborateurs*, ont étudié la solubilité de la CPT complexée avec différents types de CD (α -CD, β -CD, γ -CD, RDM- β -CD, DM- γ -CD), ainsi que sa toxicité. Les résultats ont montré une amélioration linéaire de la solubilité de la CPT proportionnelle à des concentrations de plus en plus élevées en CD. Avec un K_c (constante de stabilité) de 910 M^{-1} , le complexe formé avec la RDM- β -CD fut le plus stable [19]. Il a été conclu que les cyclodextrines en générale et en particulier la RDM- β -CD sont des agents complexant très efficaces qui peuvent être utilisés pour améliorer la solubilité et la stabilité de la camptothécine. [24]

En 2002, XIANG TX et ANDERSON BD se sont donnés pour but de développer une méthode pour l'obtention d'une solution aqueuse claire et super saturée du Silatecan 7-t-butyl-diméthylsilyl-10-hydroxyCPT (DB-67) destinée à une administration parentérale. La solubilité du DB-67 a été déterminée dans différents solvants, à différentes valeurs de pH et en présence de la β -CD chimiquement modifiée. La stoechiométrie du complexe et la stabilité du cycle β -lactone avec la SBE-CD et la 2-HP- β -CD ont été étudiées.

Les solubilités de la DB-67 dans différents solvants injectables se sont avérées être basses et inférieures à la concentration thérapeutique cible. Il en va de même pour la solubilité des complexes d'inclusion formés. [25]

En octobre 2002, FERMEGLIA M, FERRONE M. et *collaborateurs* ont analysé lors de leur étude la possibilité de former des complexes d'inclusion hôte-invité entre la β -CD et plusieurs principes actifs anti-cancéreux, caractérisé par différents mécanismes d'action. Les trajectoires des angles d'insertion, la rotation des parties non polaires du PA à l'intérieur du macrocycle ainsi que d'autres caractéristiques géométriques donnent des informations détaillées sur la dynamique des complexes. Cette étude a montré que toutes les forces

engagées étaient des forces de faible énergie, elle a également permis de constater la formation de complexes d'inclusion entre le β -CD et des PA anti-cancéreux avec un ratio de 1 : 1 ou 2 : 2. [26]

En 2004, CHENG J, DAVIS ME et *collaborateurs* ont évalué l'activité antitumorale du complexe β -CD avec différents dérivés de la CPT et ce sur des souris inoculées avec des cellules cancéreuses humaines (colon et carcinome). Les dérivés furent différents entre eux au niveau de la masse moléculaire et de la structure du liant CD-CPT (glycine, triglycine). Aucun effet significatif de la masse de la CPT ou de la structure du liant sur la croissance des cellules cancéreuses n'a été observé. Cela dit, les conjugués contenant de la glycine apparaissent comme étant moins toxiques que ceux contenant de la triglycine.

Ces études ont démontré que le complexe β -CD/dérivés de CPT avait une activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance des tumeurs supérieure à celle de la CPT seule ou de l'Irinotecan. [27]

En octobre 2004, SAETERN A, BRANDL M et *collaborateurs* ont étudié l'influence du pH et de la complexation par l'HP- β -CD sur la solubilité de la CPT, avec un intérêt particulier pour l'équilibre entre sa forme active (lactonique) et sa forme inactive (étude de stabilité). Des études de solubilité de phase à différents pH (5, 7) avec des concentrations physiologiques acceptables ont été menées. Les quantités de CPT solubilisées ont été quantifiées par HPLC.

Les résultats ont montré que la solubilité de la CPT a augmenté proportionnellement avec le pH et la concentration de l'HP- β -CD, mais que la constante de stabilité K_c a diminué avec l'augmentation du pH. Cette étude a permis de montrer que la CPT (sous forme active et carboxylée) se solubilise à n'importe quelle concentration de l'HP- β -CD et à n'importe quel pH. [28]

En 2006, SCHLUEP T, HWANG J et *collaborateurs* ont étudié l'efficacité préclinique de l'IT-101 (conjugué de la CPT) complexé avec le CD, sur des souris inoculées avec différentes cellules cancéreuses.

Il a été observé que l'IT-101 était efficace avec un nombre de tumeurs qui sont résistantes au traitement avec l'Irinotécan. L'IT-101 montrerait une bonne tolérance et une activité antitumorale vis-à-vis d'une large palette de tumeurs. [29]

En 2008, ANDERSON BD, JOQUPARTHI V ont étudié l'effet de l'HP- β -CD sur la Silatecan 7-t-butyldiméthylsilyl-10-hydroxyCPT (DB-67). La complexation avec l'HP- β -CD n'a pas altéré de manière significative la perméabilité de la DB-67. [30]

En novembre 2009, PASTERO L, SERPE L et *collaborateurs* ont travaillé dans le but de formuler des complexes de la CPT avec trois types de nanosphère de β -CD afin de protéger le cycle lactone de l'hydrolyse et de prolonger la libération de la CPT. Des formulations cristallines de nanosphère ont été préparées et des analyses par spectroscopie IR et DSC ont confirmé l'interaction de la CPT avec ces nanosphères. Les études *in vitro* ont montré une libération lente mais prolongé de la CPT (pendant 24h) et une protection plus efficace du cycle lactonique (80% de cycle lactone intact comparé à 20% pour la CPT seule). Les études de cytotoxicité ont montré que les nanosphères étaient plus cytotoxiques après 24h d'incubation que la CPT seule. [31]

En 2010, Chengying XIE, Xiaohong LIE et *collaborateurs*, se sont donné comme objectif de formuler l'hydroxy-CPT Sous forme de fibres avec de la 2-hydroxypropyl- β -CD et ce afin de moduler la libération de la camptothécine ainsi que sa dégradation, et d'améliorer la cytotoxicité de la camptothécine libérée. L'HP- β -CD a servi d'agent de solubilisation afin de maintenir un gradient de concentration assez large entre la saturation et la diffusion de l'H-CPT. Les microstructures ont permis une libération plus rapide. Les tests de cytotoxicité établis ont montré que l'activité inhibitrice contre les cellules cancéreuses était 7 fois plus élevée avec le complexe que pour la camptothécine seule.

Ces résultats ont indiqué que le complexe H-CPT/HP- β -CD sous forme fibreuse implanté en tant qu'agent anticancéreux locaux avait de grands potentiels thérapeutiques. [32]

En juin 2010, Ye DIANG, Xianyi SHA et *collaborateurs* ont étudié l'effet de l'HP- β -CD sur la solubilité aqueuse et la stabilité chimique de la 9-nitro-CPT (9-NC) et ce dans la perspective de la préparation d'une formulation parentérale stable et efficace [17]. Le complexe a été obtenu par lyophilisation, sa solubilité aqueuse fut augmentée et l'hydrolyse

de la 9-NC fut décéléré et diminuée en présence de l'HP- β -CD (sous conditions physiologiques).

Ces résultats ont démontré que le complexe 9NC- HP- β -CD est une formulation très attractive et très prometteuse pour le traitement des cancers. [33]

En octobre 2010, Yasmin CIRPANLI, Emilie ALLARD et *collaborateurs* ont utilisé des cyclodextrines amphiphiles et des analogues polymériques pour la formation de complexes sous forme de nanoparticules et ce afin de maintenir la forme lactone active et empêcher ainsi l'hydrolyse de la camptothécine. Cette formulation a été testée sur des rats atteints d'une tumeur primitive du système nerveux central et a montré une nette amélioration et une prolongation du temps de survie des rats ; en effet, ce dernier fut de 26 jours pour les rats non traités et d'entre 27 et 33 jours pour les rats ayant reçu la formulation.

Les résultats ont donc montré que la formulation CPT- CD amphiphiles sous forme de nanoparticules permettrait d'obtenir un meilleur profil de distribution et donc une action plus efficace en comparaison avec ses analogues polymériques. [34]

En 2011, LI C, CUI J et *collaborateurs* ont travaillé dans le but d'améliorer la formulation de l'Irinotécan et d'optimiser son activité sur les cellules cancéreuses. L'Irinotécan a été encapsulé dans des liposomes grâce à la sulfobutyl- éther- β -CD. L'effet du ratio PA-lipides et la densité du polyéthylène glycol (PEG) de la membrane biologique ont été évalués. Une étude pharmacocinétique a également été menée et ce avec différentes formulations du complexe. La comparaison de l'effet antitumorale a été effectuée sur des cellules prostatiques cancéreuses et une minutieuse étude de toxicité a été menée sur des cellules femelles de souris saines.

Les résultats ont montré que l'utilisation de la SBE β -CD a augmenté la rétention de l'Irinotécan. Cela dit, elle a également permis une libération plus efficace de ce dernier. [35]

En octobre 2011, Gaur S, Chen L et *collaborateurs* ont effectué une étude préclinique du complexe CD- CPT IT-101 sur le cancer gastrique. La cytotoxicité des nanoparticules de complexes ont été évaluées *in vitro* sur des cellules gastriques cancéreuses, et leur effet anti tumoral sur des cellules gastriques humaines *in vivo*. Les cellules cancéreuses ont montré *in*

vitro, une haute toxicité vis-à-vis de la CPT IT-101. Cette dernière quant à elle, a montré une forte activité antitumorale *in vivo*.

Ces résultats sont restés des données précliniques de bases dans le traitement du cancer du carcinome. [36]

En janvier 2012, BALASUBRAMANIAN J, NARAYANAN N et *collaborateurs* ont donné à travers leur étude des informations concernant la formulation de nanosphères de β -CD par la méthode émulsion/évaporation ; en effet, ils ont montré qu'il était possible de préparer des nanosphères de β -CD et ce, en utilisant une méthode basée sur l'émulsion d'une phase organique contenant la β -CD dans une phase aqueuse de Pluronic F68 comme surfactant. Les nanosphères ont été chargées d'un principe actif hydrophobe l'Irinotecan (CPT-11) et une étude de la libération de ces dernières *in-vitro* a été menée.

Ils ont donc montré que la formation des complexes d'inclusion a hautement modifié les propriétés physico-chimiques de la molécule invitée (Irinotecan), surtout en ce qui concerne l'hydrosolubilité. La formulation « nanosphère » a permis une meilleure libération tout en réduisant les effets toxicologiques. Leur étude a montré la capacité de ces nanosphères à s'associer avec des PA hydrophobes ; elles représentent donc selon les auteurs, le meilleur modèle de support de ce type de PA. [37]

CHAPITRE

IV

MATERIELS ET METHODES

IV-1 PREDEVELOPPEMENT

IV-1-1 Matériels et réactifs

- β cyclodextrine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate di-sodique (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate mono-potassique (BIOCHEM Pharma)
- Acide phosphorique (BIOCHEM Pharma)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- pH-mètre (HANNA Instrument pH 209)
- Spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

IV-1-2 Méthodes

Nous avons préparé une solution de concentration égale à 4 mg/ml de camptothécine dans un mélange méthanol/DMSO (9 :1) et l'avons mise sous agitation jusqu'à dissolution complète. Nous avons effectué par la suite un scan par spectroscopie UV-Visible, en balayant un intervalle allant de 200 à 800 nm et déterminé l'absorbance maximale et la longueur d'onde correspondante.

Nous avons également préparé une solution de β -CD dans du PBS pH 2 et l'avons mise sous agitation jusqu'à dissolution complète. Puis, nous avons effectué un scan par spectroscopie UV-Visible de cette solution (même balayage de 200 à 800 nm).

IV-2 TEST D'HIGUCHI

IV-2-1 Matériels et méthodes

- β et α cyclodextrines fournies généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Phosphate di-sodique (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate mono-potassique (BIOCHEM Pharma)
- Acide phosphorique (BIOCHEM Pharma)
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- pH-mètre (HANNA Instrument pH 209)
- spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

IV-2-2 Méthodes

La mise en évidence de l'effet des cyclodextrines sur la camptothécine se fait essentiellement par l'observation du passage en solution de ce principe actif.

Les diagrammes de solubilité de la β -CD et de l' α -CD sont chacun réalisés selon la méthode d'Higuchi et Connors ; nous avons préparé des solutions de (7 ml) de concentrations croissantes en CD dans une solution tampon PBS à un pH= 2. Nous avons ensuite ajouté un excès de camptothécine (20 mg) à ces solutions. Ces dernières sont placées à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation pendant sept jours. (Voir les tableaux IV-01 et IV-02).

Tableau IV-01 : « Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec la β -CD »

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07
Concentration CD (mM)	16,3	9,78	3,412	3,26	2,72	2,04	1,63
Quantités théoriques (mg) CD à peser dans 7 ml	129,5	77,7	31,1	25,9	21,58	16,19	12,95
Quantité pratiques (mg) CD pesées	129,7	77,2	31,2	25,6	21,3	16,3	12,95

Tableau IV-02 : « Masses et concentrations utilisées pour le test d'Higuchi avec l' α -CD »

Echantillon N°	01	02	03	04
Concentrations CD (mM)	99	74	49	24
Quantités (g) CD pesées dans 7 ml	0,675	0,5036	0,333	0,163

Après sept jours, les solutions sont décantées et filtrées avec des micro-filtres (0.45 μ m). La CPT dissoute par la formation de complexes avec les CD est quantifiée. La méthode de dosage utilisée est la spectroscopie UV-Visible et le milieu utilisé est le PBS à un pH= 2. La lecture ce fait à une longueur d'onde λ égale à 365 nm.

Nous avons par la suite réalisé une courbe d'étalonnage, ce en préparant des solutions de CPT à différentes concentration dans un mélange méthanol / DMSO (9 :1). Ces dernières sont ensuite quantifiées par spectroscopie UV-Visible.

Les concentrations de CPT utilisées sont résumées dans le tableau IV-03.

Tableau IV-03 : « Concentrations en CPT utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage pour le test d'Higuchi »

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07	08
Concentration (mg/ml)	0.02	0.01	0.014	0.007	0.005	0.0036	0.0025	0.002

IV-3 PREPARATION DES COMPLEXES D'INCLUSION

IV-3-1 Matériels et réactifs

- β cyclodextrine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Phosphate di-sodique (BIOCHEM Pharma)
- Phosphate mono-potassique (BIOCHEM Pharma)
- Acide phosphorique (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- pH-mètre (HANNA Instrument pH 209)
- Etuve (BINDER)
- Appareil de lyophilisation (Christ Alpha 1-4 LO plu)

IV-3-2 Méthodes

a) Le kneading

Nous avons mélangé dans un mortier une quantité de CD (2 g) avec une quantité correspondante de CPT (0,613 g), en ajoutant quelques gouttes de la solution tampon PBS à pH= 2. Nous avons malaxé jusqu'à l'obtention d'une pâte et mis ensuite la composition à sécher à l'étuve (70 à 90°C). Nous avons ensuite récupéré le complexe sous forme pulvérulente et conservé dans un dessiccateur.

b) Le mélange physique

Nous avons mélangé dans un mortier les mêmes quantités de CD et de CPT citées précédemment. Nous avons ensuite conservé le mélange dans un dessiccateur.

c) La Co-évaporation

Nous avons dissout une quantité de cyclodextrine (2 g) dans 100 ml d'éthanol. Nous y avons ensuite ajouté la quantité de CPT équivalente (c.-à-d. 0,613 g) et mis le tout sous agitation pendant 30 minutes environs. La solution est alors mise à l'étuve jusqu'à évaporation totale du solvant. Le produit est par la suite récupéré sous forme de poudre et conservé dans un dessiccateur.

d) La lyophilisation

Nous avons préparé une solution contenant de la CD (2 g) et de la CPT (0,613 g) dans un volume de 108,1 ml d'une solution tampon PBS pH = 2, puis transvasé cette dernière en petite quantité dans des boites de pétri, ces dernières furent lyophilisées. Le produit est par la suite récupéré sous forme de lyophilisat et conservé dans un dessiccateur.

IV-4 CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION

IV-4-1 Spectroscopie Infrarouge

a) Matériels et réactifs

- β cyclodextrine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen préalablement étuvée.

- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Quelques milligrammes de complexes obtenus avec chacune des quatre méthodes citées précédemment.
- Quelques milligrammes de KBR.
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Appareil de réalisation de pastille (SHIMADZU)
- Spectrophotomètre Infrarouge (IRAffinity-1 SHIMADZU)

b) Méthode

Grâce à un appareillage approprié, nous avons préalablement réalisé une pastille pour la β -CD, la CPT et pour chacun des complexes obtenus, soit en tout six échantillons que nous avons ensuite analysé par spectroscopie Infrarouge.

IV-4-2 Spectroscopie par diffraction de rayons X

a) Matériels et réactifs

- β cyclodextrine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen préalablement étuvée.
- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Quelques milligrammes de complexes obtenus avec chacune des quatre méthodes citées précédemment.
- Spectrophotomètre de diffraction de rayons X (EXPERT Pro PANalytical theta II theta, système vertical, mode automatique); plate forme pour échantillons (SPENER) ; détecteur (excellerator 2 x 128)

b) Méthode

Les six échantillons sont directement analysés un à un par l'appareil de spectroscopie par diffraction de rayons X.

IV-4-3 Microscopie électronique à balayage**a) Matériels et réactifs**

- β cyclodextrine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen préalablement étuvée.
- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Quelques milligrammes de complexes obtenus avec chacune des quatre méthodes citées précédemment.
- Microscope électronique à balayage (FEI QUANTA 200)

b) Méthode

Les six échantillons sont directement analysés un à un par le microscope électronique à balayage en mode environnemental avec des grossissements allant de 20 à 50 μ m.

IV-4-4 Dosage de la camptothécine**a) Matériels et réactifs**

- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Complexes obtenus avec chacune des quatre méthodes citées précédemment.
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (BIOCHEM Pharma)
- Méthanol (BIOCHEM Pharma)
- plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)

- spectrophotomètre UV-Visible (Optizen)

b) Méthode

Afin de déterminer le rendement de la complexation, et s'assurer ainsi de la quantité de CPT réellement complexée, nous effectuons un dosage des complexes préparés. A partir de chacun d'entre eux, des solutions de concentration en CPT égale à 0.011 mg/ml (soit 2,36 mg de chaque complexe) sont préparées dans un mélange méthanol/DMSO (sous agitation). Une solution témoin de CPT (seule, non complexée) de concentration 0.011 mg/ml est également préparée.

Toutes les solutions sont ensuite quantifiées par spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde $\lambda = 365$ nm.

IV-4-5 Test de dissolution

a) Matériels et réactifs

- Camptothécine fournie généreusement par le laboratoire de pharmacie galénique de l'université de Rouen.
- Les complexes d'inclusion obtenus avec chacune des quatre méthodes citées précédemment
- Acide chlorhydrique HCL (BIOCHEM Pharma)
- Balance analytique (DENVER Instrument)
- Plaque agitatrice magnétique (VELP Scientifica)
- Dissolutest et accessoires (PharmaTest DT70)
- Spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZEN)

b) Méthode

Pour réaliser le test de dissolution et suivre l'évolution de la quantité de CPT dissoute en fonction du temps, nous commençons d'abord par faire une courbe d'étalonnage ; nous

préparons sept solutions de différentes concentrations en CPT en utilisant comme solvant un mélange méthanol / DMSO (9 : 1).

Les sept solutions sont obtenues par dilution à partir d'une solution mère de concentration égale à 0.0166 mg/ml (voir tableau IV-04)

Tableau IV-04 Concentrations en CPT utilisées pour l'élaboration de la droite d'étalonnage pour le test de dissolution

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07
Concentration en CPT (mg/ml)	0,0166	0,0066	0,00332	0,00166	0,00111	0,00083	0,000461

Ces solutions sont analysées par spectroscopie UV-Visible et les différentes absorbances sont récoltées.

Par la suite, nous préparons le milieu de dissolution ; milieu acide à pH = 1,2 (Hcl 0,1N) afin de simuler le milieu physiologique gastrique. Après avoir rempli tous les bacs avec le milieu (900 ml), ces derniers sont chauffés à 37°C grâce à un bain thermostaté et des quantités de complexe égales à 42,6 mg (correspondant à 10 mg de CPT) sont incorporées dans chacun des six bacs, le septième bac contenant uniquement la CPT (10mg). L'agitation est mise en marche (75 tours/minute) et des prélèvements de 4 à 5 ml sont effectués dès la cinquième minute et par la suite à intervalles réguliers.

Les échantillons prélevés sont filtrés puis quantifiés par spectroscopie UV /Visible.

Etant donné que nous avons préparé des complexes d'inclusion de quatre manières différentes (Kneading, mélange physique, co-évaporation et lyophilisation), quatre tests de dissolution sont alors effectués selon le même protocole.

CHAPITRE

V

RESULTATS ET DISCUSSION

V-1 PREDEVELOPPEMENT

V-1-1 Résultats

Le scan effectué sur une solution de CPT dans un mélange méthanol/DMSO de concentration égale à 4mg/ml a l'allure suivante :

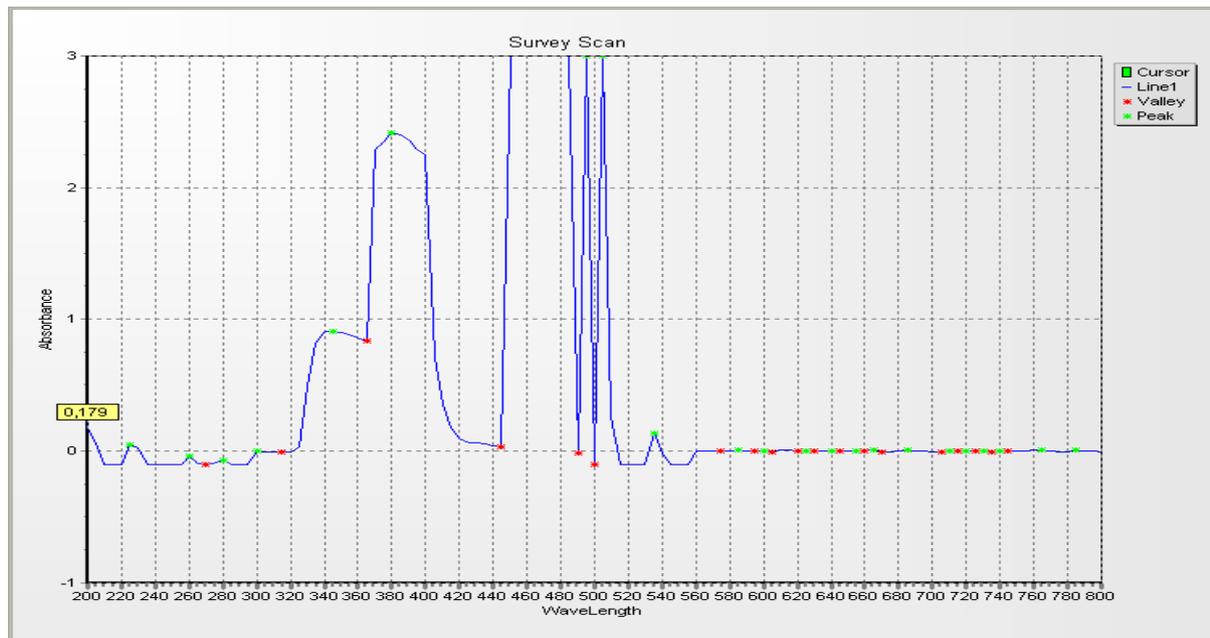


Figure V-01 : « Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la CPT (de 200 à 800 nm) »

Le scan effectué sur une solution de β -CD dans une solution tampon phosphate pH=2 a l'allure suivante :

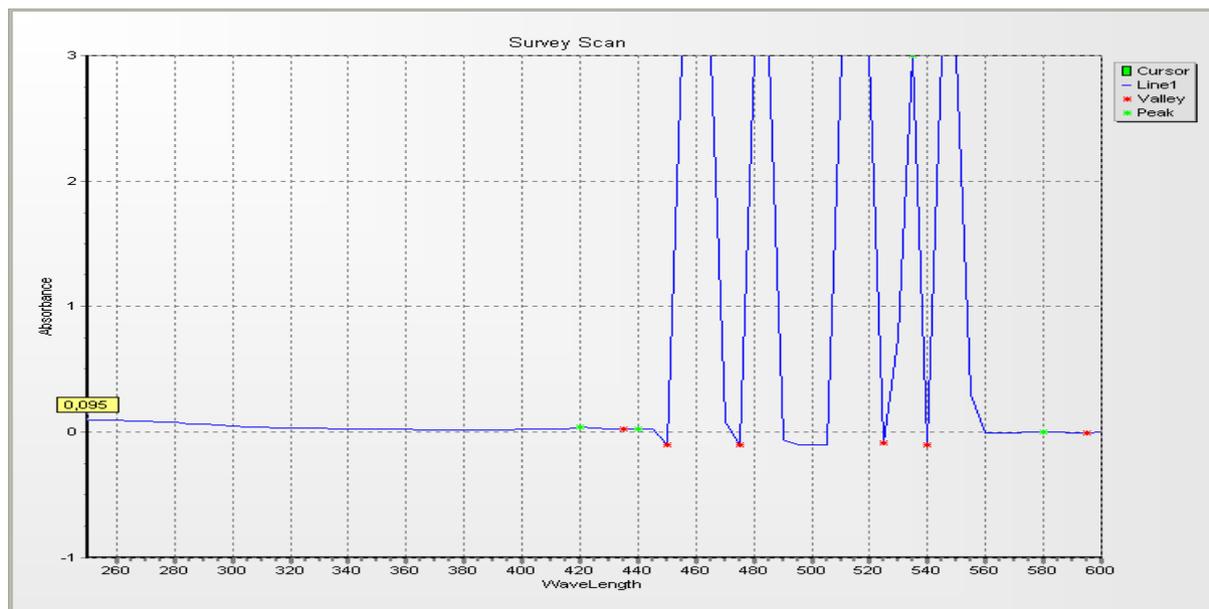


Figure V-02 : « Scan obtenu par spectroscopie UV-Visible après balayage de la β -CD (de 200 à 800 nm) »

V-1-2 Observations

Le balayage effectué sur la solution de camptothécine et sur la solution de β -CD a donné deux courbes gaussiennes représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Nous observons clairement dans chacune des deux courbes, deux pics correspondant à une absorbance maximale en CPT et en β -CD respectivement. La longueur d'onde correspondant au pic d'absorbance maximal (λ_{\max}) est égale à 365 nm et 460 nm pour la CPT et la β -CD respectivement.

V-1-3 Interprétation des résultats

Nous voyons bien d'après les résultats obtenus que la camptothécine et la β -CD n'absorbent pas à la même longueur d'onde. Nous pourrions alors analyser nos complexes d'inclusion à la longueur d'onde λ_{\max} correspondant à la camptothécine, c'est-à-dire 365 nm et quantifier ainsi la solubilité de la CPT sans craindre d'interférences de la part de la cyclodextrine.

V-2 TEST D'HIGUCHI

V-2-1 Résultats

a) Réalisation de la gamme étalon

L'analyse des huit solutions par spectroscopie UV-Visible ($\lambda = 365 \text{ nm}$) a donné les résultats suivants (Voir tableau V-01)

Tableau V-01 : « Quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions étalons pour le test d'Higuchi »

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07	08
Concentration en CPT (mg/ml)	0,02	0,014	0,01	0,007	0,005	0,0036	0,0025	0,002
Absorbance (abs)	0,975	0,489	0,733	0,370	0,251	0,179	0,120	0,09

Le tableau V-01 nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage qui donne l'absorbance en fonction de la concentration en CPT. (Voir figure V-03)

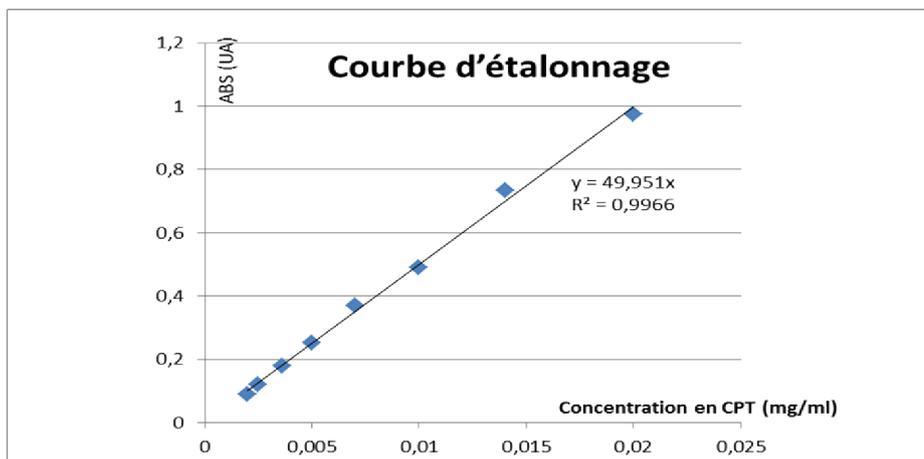


Figure V-03 : « Courbe d'étalonnage pour le test d'Higuchi »

b) Test d'Higuchi avec la β -CD

Après sept jours d'agitation à l'abri de la lumière et à température ambiante, les solutions sont quantifiées par spectroscopie UV-Visible à $\lambda = 365$ nm. (Voir tableau V-02)

Tableau V-02 : « Quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions du test d'Higuchi avec la β -CD »

Echantillon N°	01	02	03	04	05	06	07	CPT seule
ABS (UA)	0.603	0.437	0.296	0.270	0.260	0.232	0.228	0.200

Grâce à la courbe d'étalonnage, nous avons déterminé les concentrations en CPT correspondant aux absorbances obtenues après les sept jours d'agitation. (Voir tableau V-03)

Tableau V-03 : « Concentrations en CPT correspondant aux absorbances obtenues par le test d'Higuchi avec la β -CD »

Echantillon N°	1	2	3	4	5	6	7	CPT seule
ABS (UA)	0.603	0.437	0.296	0.270	0.260	0.232	0.228	0.200
Concentrations en CPT (10^{-3} mM)	34,471	25,129	17,024	15,526	15,081	13,340	13,110	11,490

Nous pouvons maintenant tracer le diagramme d'Higuchi qui donne la concentration en molécule invitée (CPT) en fonction de la concentration de la molécule hôte (CD). (Voir Figure V-04)

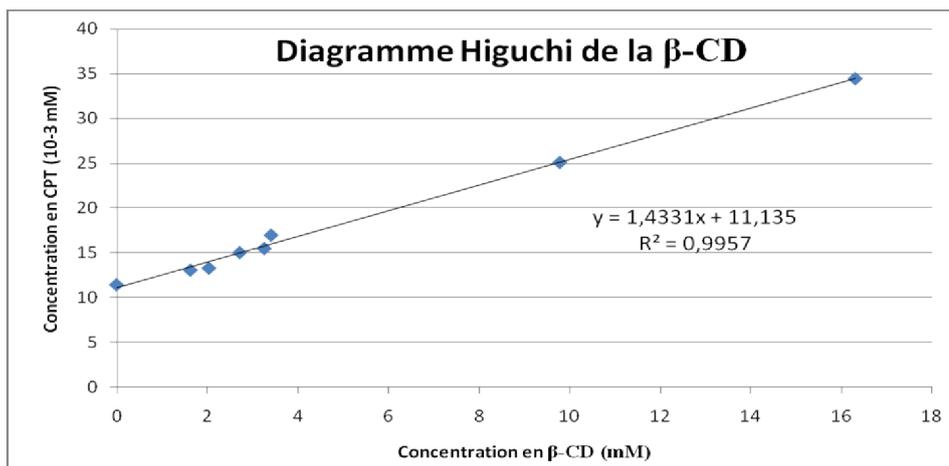


Figure V-04 : « Diagramme Higuchi de la β -CD »

c) Test d'Higuchi avec l' α -CD

Après sept jours d'agitation à l'abri de la lumière et à température ambiante, les solutions sont quantifiées par spectroscopie UV-Visible à $\lambda = 365$ nm. (Voir tableau V-05)

Tableau V-04 : « Quantification par spectroscopie UV-Visible des solutions du test d'Higuchi avec l' α -CD »

Echantillon N°	01	02	03	04	CPT seule
ABS (UA)	1,49	1,14	0,819	0,436	0.200
Concentrations en CPT (10^{-3} mM)	85,689	65,56	47,100	25,074	11,490

Nous avons ensuite tracé le diagramme d'Higuchi correspondant (voir figure V-05).

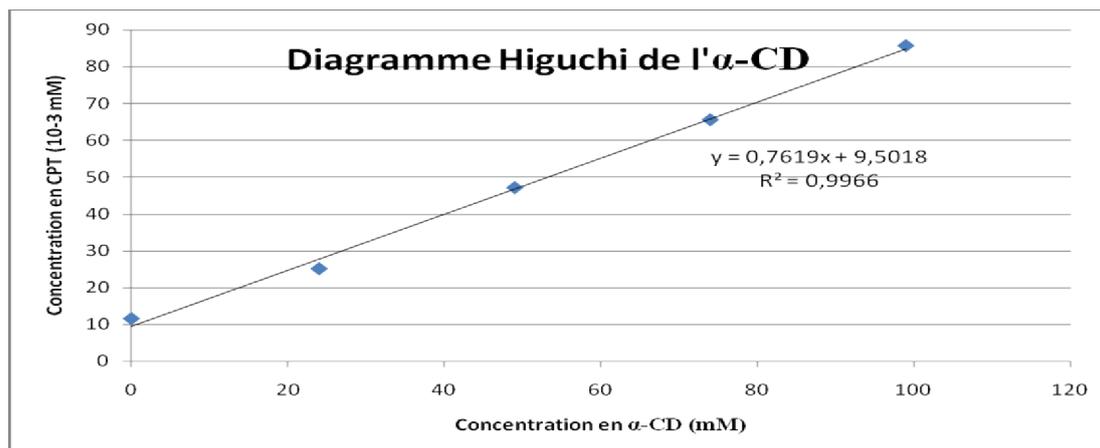


Figure V-05 : « Diagramme d'Higuchi de l' α -CD »

V-2-2 Observations

Le diagramme Higuchi de la β -CD qui représente la concentration de la CPT en fonction de la concentration en β -CD, est une droite ne passant pas par l'origine ayant pour équation $y = 1,4331 x + 11,135$ avec un coefficient de corrélation équivalent à $R^2 = 0,9957$. Cela indique que la concentration en CPT augmente proportionnellement avec des concentrations croissantes en β -CD.

Le diagramme Higuchi de l' α -CD est aussi une droite qui ne passe pas par l'origine d'équation $y = 0,7619 x + 9,5019$, avec un coefficient de corrélation égal à $R^2 = 0,9966$ et qui traduit également une augmentation proportionnelle de la concentration en CPT en fonction des concentrations croissantes en α -CD

V-2-3 Interprétation des résultats

a) Diagramme d'Higuchi de la β -CD

Le diagramme Higuchi de l' β -CD montre que :

- La solubilité de la CPT augmente avec des concentrations croissantes en β -CD. Selon Higuchi et Connors, il s'agit d'un isotherme de type A.

- Etant donné que la solubilité apparente de la CPT augmente de façon linéaire en fonction de la concentration en β -CD, il s'agit d'un profil de type A_L . Ces profils sont généralement attribués à la formation de complexes 1 : 1.

- Calcul de la constante de stabilité K_c :

La CPT a une solubilité maximale, au bout de sept jours d'agitation de $11,135 * 10^{-3}$ mM.

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

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

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

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

Donc, en utilisant les données obtenus nous trouvons : $K_c = 128,7 M^{-1}$

Selon la littérature, la valeur de cette constante avec la β -CD serait de $245 M^{-1}$ à pH= 5,5 et de $266 M^{-1}$ à pH acide (HCl 0.02 N) [24, 28]. La différence observée peut être attribuée au pH du milieu utilisé (nous avons utilisée une solution tampon PBS pH=2).

b) Diagramme d'Higuchi de la α -CD

Le diagramme Higuchi de l' α -CD montre que :

- La solubilité de la CPT augmente avec des concentrations croissantes en l' α -CD et ce de façon linéaire. Selon Higuchi et Connors, il s'agit d'un isotherme de type A_L , qui traduirait la formation probable de complexes de type 1 :1 (α -CD : CPT).

- Calcul de la constante de stabilité K_c :

La CPT a une solubilité maximale, au bout de sept jours d'agitation de $9,5018 * 10^{-3}$ mM.

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

Donc, en utilisant les données obtenus nous trouvons : $K_c = 80 \text{ M}^{-1}$

Selon la littérature, la valeur de cette constante avec l' α -CD serait de $61,2 \text{ M}^{-1}$ à pH = 5 et 188 M^{-1} à pH acide (HCl 0.02 N) [24, 33]. La différence observée peut être attribuée au pH du milieu utilisée (pH = 2).

Nous voyons bien que la constante de stabilité du complexe formé avec la β -CD est supérieure à celle obtenue avec l' α -CD. En d'autres termes, le complexe CPT / β -CD est plus stable que le complexe CPT / α -CD. On peut sous-entendre alors que les interactions entre la CPT et la β -CD sont plus importantes et donc qu'il y a plus de complexes formés avec la β -CD qu'avec l' α -CD. On peut expliquer ce résultat en mettant en avant le fait que :

- Le diamètre de la cavité de la β -CD est plus important que celui de l' α -CD.
- Aussi, comme on a pu le voir dans la partie théorique le nombre d'unité de glucose et leur agencement différent entre ces deux molécules fait intervenir des interactions de puissance différente.

C'est pour cette raison que la β -CD a été choisie dans ce qui suit pour la préparation des complexes d'inclusion. Par ailleurs ce résultat se rapproche beaucoup des données trouvées dans la littérature, effectivement, la majorité des articles étudiés parlent de complexation CPT- β -CD. [18, 27]

V-3 CARACTERISATION DES COMPLEXES D'INCLUSION

V-3-1 Résultats obtenus avec la Spectroscopie Infrarouge

a) Complexes obtenus par la méthode du Kneading

Les résultats obtenus pour les complexes d'inclusion formés par la méthode du kneading sont donnés par le spectre suivant (figure V-06) :

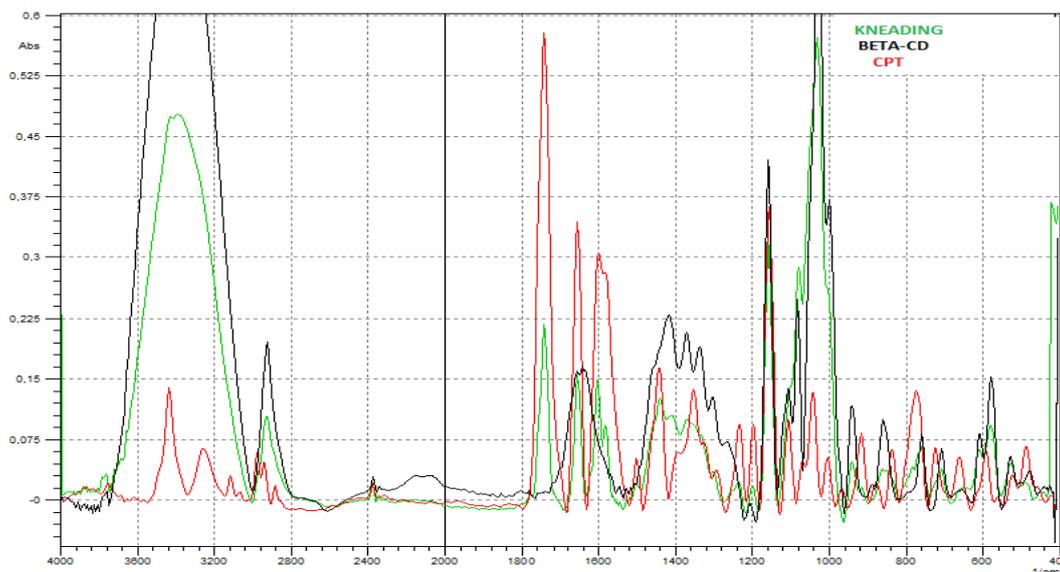


Figure V-06 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par Kneading, obtenus par spectroscopie IR »

b) Complexes obtenus par la méthode du mélange physique

Les résultats obtenus pour les complexes d'inclusion formés par la méthode du mélange physique sont donnés par le spectre suivant (figure V-07) :

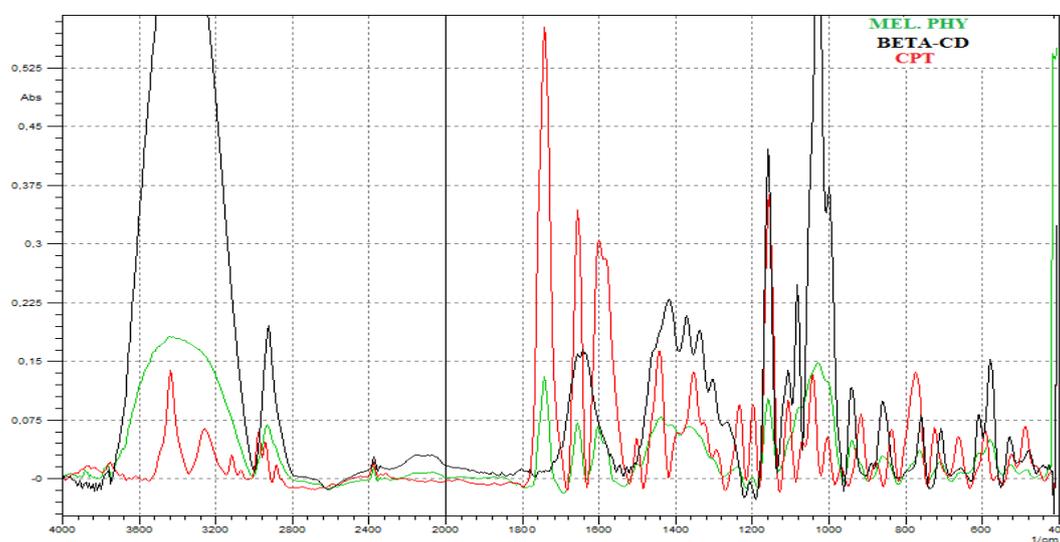


Figure V-07 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par mélange physique, obtenu par spectroscopie IR »

c) Complexes obtenus par la méthode de la co-évaporation

Les résultats obtenus pour les complexes d'inclusion formés par la méthode de la co-évaporation sont donnés par le spectre suivant (figure V-08):

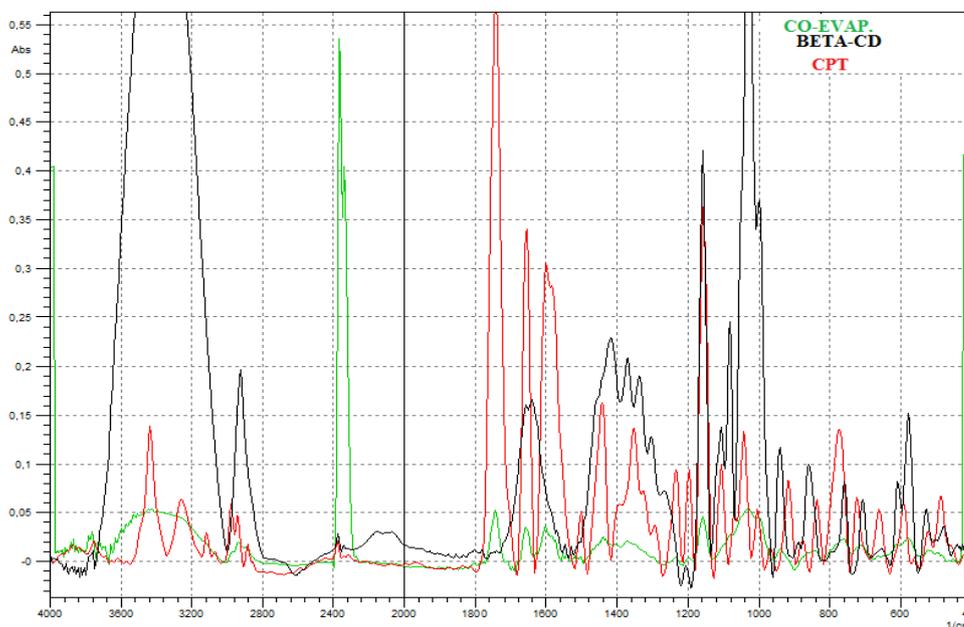


Figure V-08 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par co-évaporation, obtenus par spectroscopie IR »

d) Complexes obtenus par la méthode de la lyophilisation

Les résultats obtenus pour les complexes d'inclusion formés par la méthode de la co-évaporation sont donnés par le spectre suivant (figure V-09) :

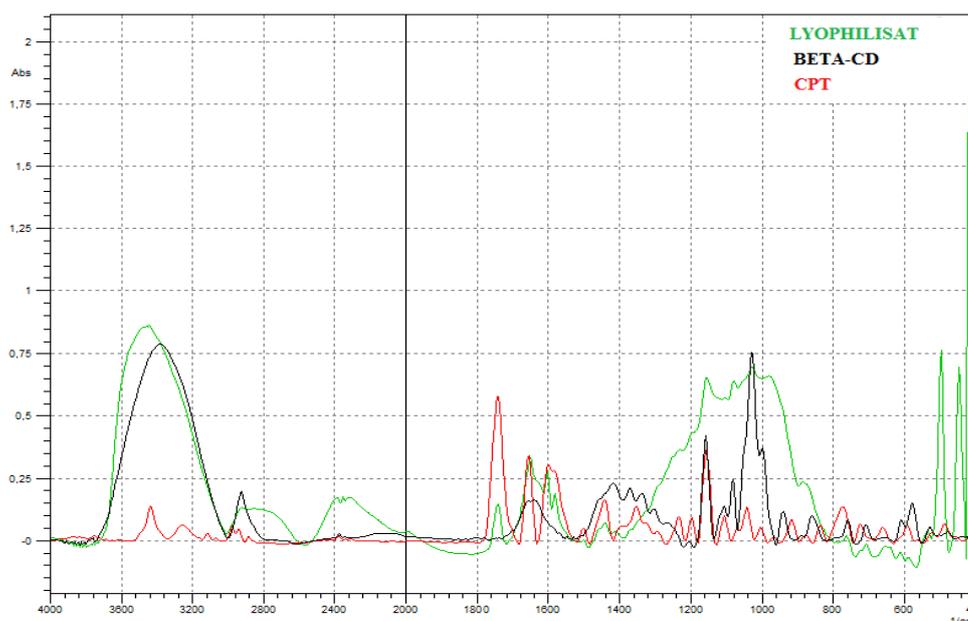


Figure V-09 : « Spectres superposés de la β -CD, la CPT et le complexe formé par lyophilisation, obtenus par spectroscopie IR »

V-3-1-1 Observations

Le spectre IR-TF de la CPT présente 4 pics principaux. A chaque pic correspond une fonction de la molécule de CPT.

- 3440 cm^{-1} = OH libre
- 2960 cm^{-1} = cycles aromatiques
- 1740 cm^{-1} = $\text{CH}_2\text{-CH}_3$
- 1650 cm^{-1} = C=O

Nous remarquons que le spectre de la β -CD contient, aux mêmes longueurs d'onde, les mêmes pics.

V-3-1-2 Interprétation des résultats

Selon la littérature, les pics caractéristiques de la CPT devraient être élargis ou masqués au sein des spectres des complexes, suggérant et prouvant qu'il y a bien des interactions entre la CPT et la β -CD [31]. Or, nous ne remarquons pas de disparition de pics caractéristiques de la CPT au sein des quatre complexes mais nous observons par contre, un faible élargissement du pic correspondant au OH libre ($\lambda = 3440\text{ cm}^{-1}$), plus important avec le complexe obtenu par Kneading.

Cela dit, étant donné que la CPT et la β -CD semblent présenter des pics pratiquement aux mêmes longueurs d'onde, les bandes pouvant être assignées à la partie encapsulée de la molécule invitée sont donc masquées par les bandes du spectre de la β -CD.

Cette technique (spectroscopie IR) comme le confirme la littérature, n'est alors pas adaptée dans ce cas, pour détecter ces complexes d'inclusion. [18]

V-3-2 Résultats obtenus avec la spectroscopie par diffraction des rayons X

a) Complexes obtenus par la méthode du Kneading

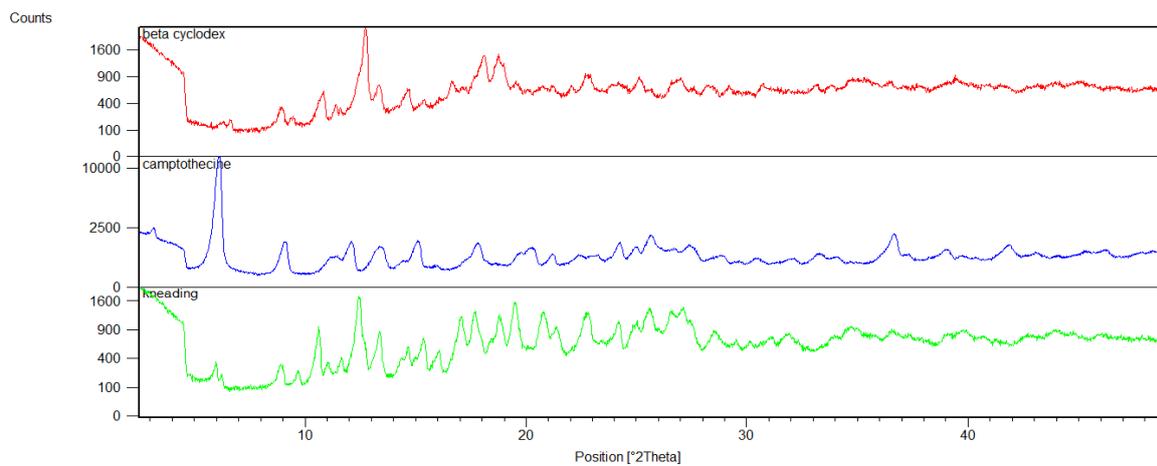


Figure V-10 : « Diffractogramme de la β -CD, la CPT et le complexe formé par kneading obtenus par Spectroscopie DRX »

b) Complexes obtenus par la méthode de la Co-évaporation

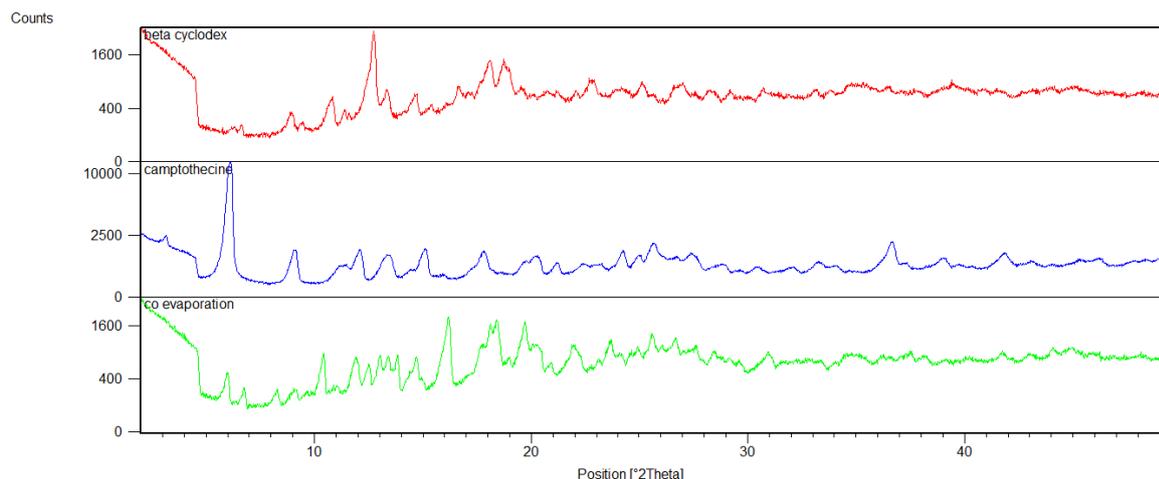


Figure V-11 : « Diffractogramme de la β -CD, la CPT et le complexe formé par co-évaporation obtenus par spectroscopie DRX »

c) Complexes obtenus par la méthode de la Lyophilisation

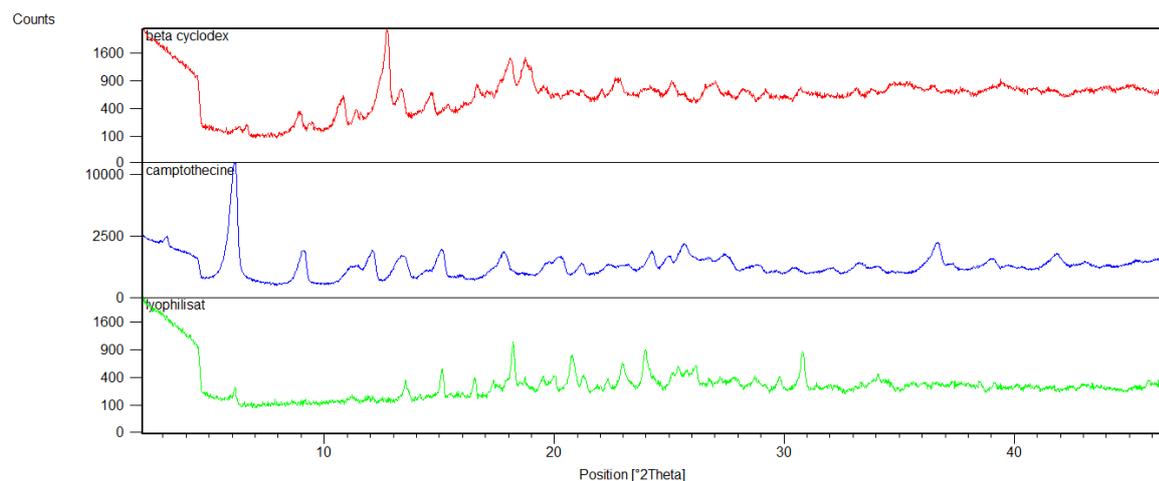


Figure V-12 : « Diffractogramme de la β -CD, la CPT et du complexe formé par lyophilisation obtenus par spectroscopie DRX »

d) Complexes obtenus par la méthode du mélange physique

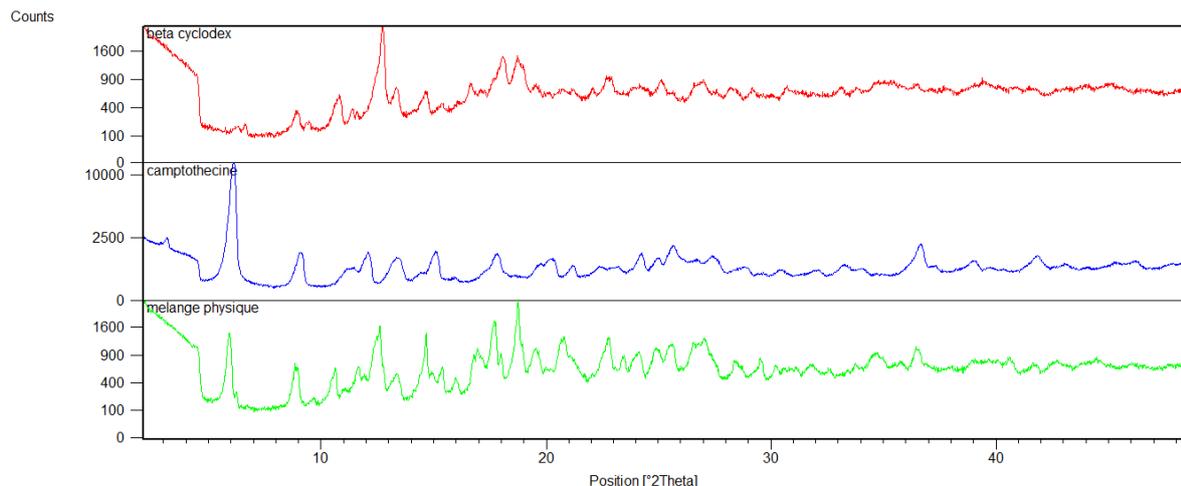


Figure V-13 : « Diffractogramme de la β -CD, de la CPT et du complexe formé par mélange physique obtenus par spectroscopie DRX »

V-3-2-1 Observations

- a) L'analyse du complexe obtenu avec la méthode du Kneading par spectroscopie de diffraction des rayons X, montre qu'il s'agit pratiquement d'une combinaison des deux spectres de la CPT et de la β -CD, avec une prédominance de la part de la CD. Les pics caractéristiques de la CPT au sein du complexe apparaissent avec une intensité moins importante par rapport au spectre de la CPT seule, ou bien ont relativement disparus.
- b) L'analyse du complexe obtenu avec la méthode de co-évaporation montre pratiquement la même chose ; apparition de pics caractéristiques de la CPT avec une intensité moins importante par rapport au spectre de la CPT seule, mais plus importante vis-vis du spectre du complexe obtenu par Kneading. Nous remarquons également l'apparition de quelques nouveaux pics.
- c) En ce qui concerne le complexe obtenu par lyophilisation, nous observons toujours une combinaison des deux spectres de la CPT et de la β -CD avec une disparition plus importante des pics caractéristiques de la CPT et de la β -CD dans une moindre mesure. Nous observons également l'apparition de nouveaux pics.

- d) Avec le complexe obtenu par la méthode du mélange physique, nous observons une combinaison encore plus claire des deux spectres de la CPT et de la β -CD, avec pratiquement aucune disparition des pics caractéristiques de la CPT (juste une légère diminution en intensité).

V-3-2-2 Interprétation des résultats

La combinaison observée des deux spectres (CPT et β -CD) au sein de chacun des complexes préparés confirme qu'il n'y a pas formation d'un troisième produit, donc pas de réaction chimique propre entre la CPT et la β -CD (pas de liaison covalente).

La disparition des pics caractéristiques de la CPT ou la diminution de leur intensité, prouve qu'il y a bien eu inclusion de la CPT dans la cavité hydrophobe de la β -CD la rendant moins apparente voir inapparente. A partir de quoi, nous pouvons conclure que le meilleur complexe d'inclusion est obtenu par lyophilisation et que le moins bon serait celui obtenu par la méthode du mélange physique (cela enfaite, était attendu car dans la littérature on parle dans ce cas d'interaction surfacique et de formation de **complexe d'association**).

V-3-3 Résultats obtenus avec la Microscopie électronique à balayage

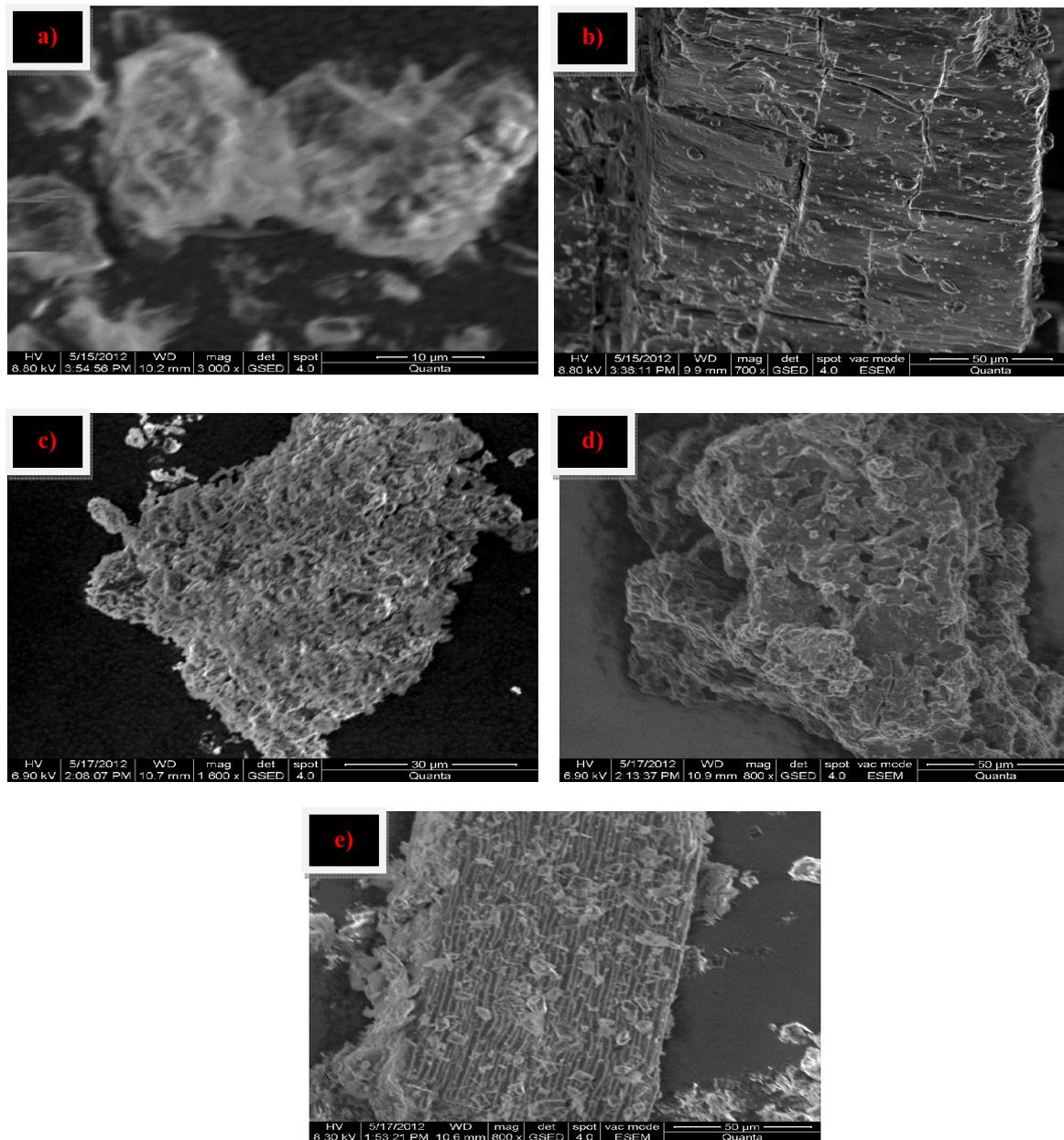


Figure V-14 : « Images obtenues par MEB de la CPT (a), de la β-CD (b) et des complexes formés par Kneading (c), lyophilisation (d) et mélange physique (e) »

V-3-3-1 Observations

Nous observons clairement à partir de la figure V-14 (a et b) que la β-CD apparaît sous forme de cristaux irréguliers et que la CPT sous forme d'agrégats.

Avec le kneading, le complexe a une structure différente de celle de la β -CD, c'est une structure plus dense formée d'agglomérats. (Figure V-14 (c))

Avec la lyophilisation, nous observons également un complexe doté d'une structure totalement différente (plus poreuse) de celle de la β -CD, de la CPT et du complexe formé par Kneading. (Figure V-14 (d))

Avec la méthode du mélange physique, nous distinguons clairement la structure de la β -CD sur laquelle sont disposés des agglomérats de CPT. (Figure V-14 (e))

V-3-3-2 Interprétation des résultats

La différence de structure et de cristallisation entre les matériaux brutes (β -CD et CPT) et les différents complexes peut aider à confirmer la formation de complexes d'inclusion.

La structure s'éloignant le plus des structure de base de la β -CD et de la CPT est celle du complexe obtenue par lyophilisation et celle se rapprochant le plus des deux structure de base est celle du complexe obtenu par mélange physique. Nous pouvons en conclure que l'inclusion est meilleure dans le complexe obtenu par lyophilisation.

De plus, la porosité apparue dans le complexe obtenu par lyophilisation peut s'expliquer par le fait que la méthode utilisée enlève non seulement l'eau adsorbé à la surface mais aussi l'eau adsorbé à l'intérieur de la molécule, laissant ainsi des espaces interstitiels qui forment des pores.

V-3-4 Résultats obtenus pour le dosage de la Camptothécine Dans les complexes formés

Les cinq solutions préparées correspondant respectivement aux Kneading, mélange physique, lyophilisat, co-évaporation et CPT seule sont quantifiées par spectroscopie UV-Visible. (Voir tableau V-05)

Tableau V-05 : « Absorbances obtenues avec les différents complexes d'inclusion »

Solution	Kneading	Mélange physique	lyophilisat	Co-évaporation	CPT seule
Absorbance (UA)	0,8	1,004	0,412	0,735	0,738

V-3-4-1 Observations

Nous observons que la solution de CPT seule avec une concentration de 0,011 mg/ml donne une absorbance égale à $Abs = 0,738$ UA. Nous voyons qu'il s'agit approximativement de la même valeur avec la solution du complexe obtenu par co-évaporation ($Abs = 0,735$ UA).

En ce qui concerne la solution du complexe obtenu par Kneading, nous remarquons une absorbance légèrement plus élevée que celle obtenue avec la CPT seule ($Abs = 0,8$ UA). La solution du complexe obtenu par mélange physique donne quant à elle, une absorbance clairement plus élevée ($Abs = 1,004$ UA).

Enfin, la solution du complexe obtenu par lyophilisation absorbe moins (environs la moitié) que la solution de CPT seule.

V-3-4-2 Interprétation des résultats

La solution de CPT seule de concentration égale à 0.011 g/ml montre une absorbance $Abs = 0,738$ UA. Cette absorbance représente l'absorbance maximale de la CPT et donc une solubilité de 100 %.

$0,738$ UA \longrightarrow 10 mg de CPT

En sachant cela, nous nous sommes attelés à calculer les pourcentages de solubilisation (rendements de l'opération de complexation). (Voir tableau V-06)

Tableau V-06 : « Les différents rendements de complexation »

Solutions	CPT seule	Kneading	Mélange physique	Co-évaporation	Lyophilisation
Masses de CPT (mg) réellement contenues	10	10,84	13,6	9,96	5,6
Rendement (%)	100	108,4	136	99,6	56

La solution correspondant au complexe obtenu par Kneading montre un rendement de complexation légèrement élevé (108,4%). Ceci peut être dû au fait que la composition ne soit pas tout à fait homogène.

Les grands écarts de résultats trouvés pour les deux complexes : lyophilisation et mélange physique peuvent être expliqués par le fait que :

- Pour la lyophilisation, il reste encore de l'eau dans le complexe, cela est d'autant plus probable car le lyophilisat récupéré à la fin de l'opération n'était pas totalement sec.
- Pour le mélange physique, la différence de granulométrie et la différence des quantités mélangées peuvent influencer directement l'homogénéité du complexe.

La solution correspondant au complexe obtenu par co-évaporation montre un rendement de complexation équivalent à 99,6 %, et représente de ce fait le meilleur rendement obtenu qui traduirait le moins de perte durant la complexation entre la CPT et la β -CD.

V-3-5 Résultats obtenus avec le test de dissolution

Les résultats bruts de tous les tests de dissolution sont joints en annexe 1.

- **Courbe d'étalonnage**

L'analyse de la gamme étalon par spectroscopie UV-Visible nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage (figure V-15) :

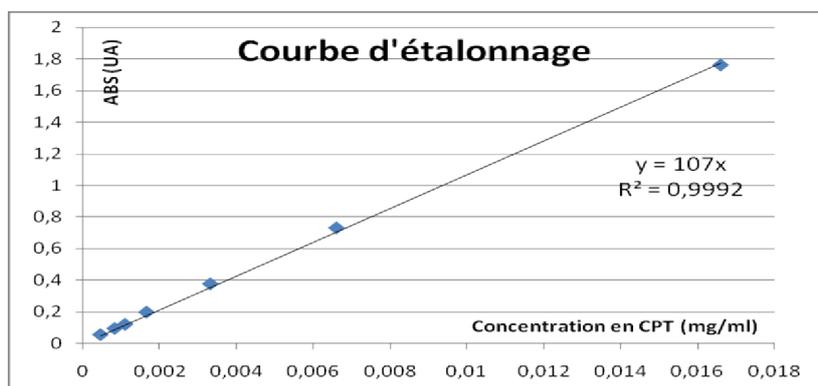


Figure V-15 : « Courbe d'étalonnage pour le test de dissolution »

a) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par Kneading

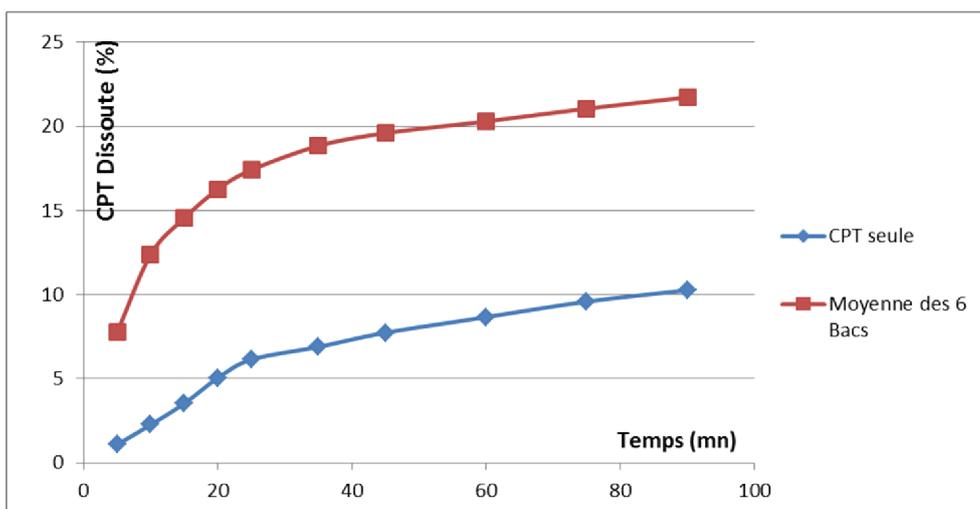


Figure V-16 : « Profil de dissolution obtenu avec la méthode du Kneading »

b) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par lyophilisation

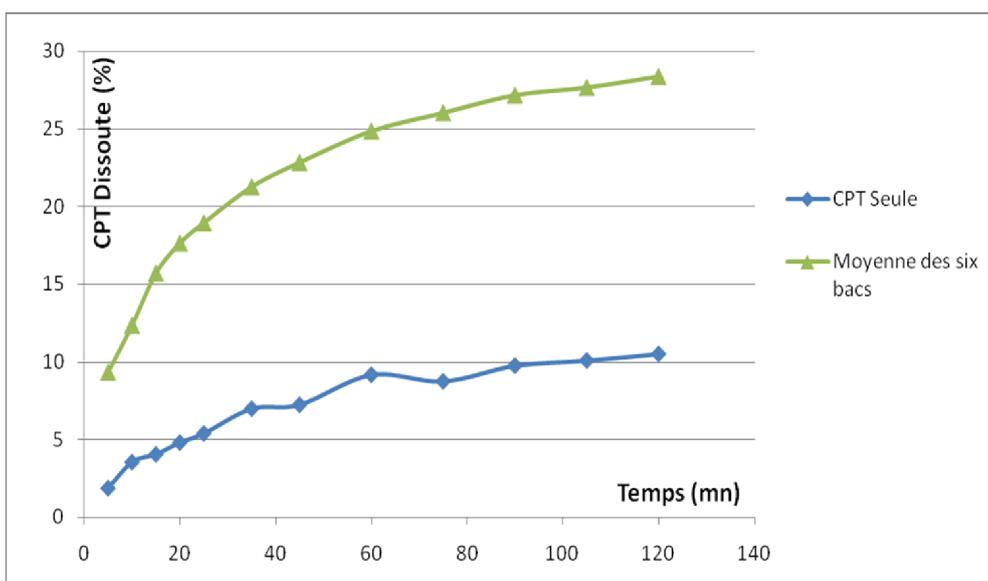


Figure V-17 : « Profil de dissolution obtenu par lyophilisation »

c) Profil de dissolution avec les complexes obtenus par co-évaporation et mélange physique

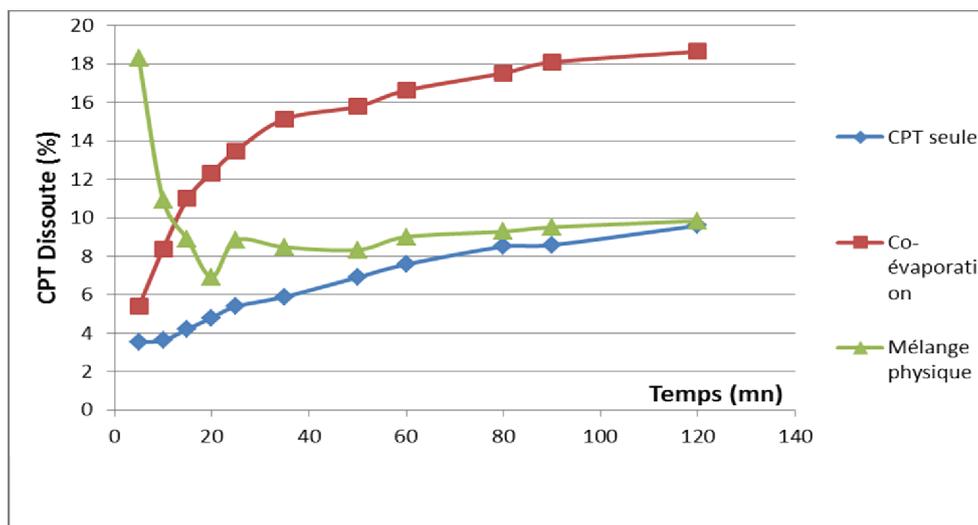


Figure V-18 : « Profils de dissolution obtenus par mélange physique et par co-évaporation »

V-3-5-1 Observations

- a) D'après la figure V-16, la quantité de CPT seule dissoute commence par augmenter de façon linéaire jusqu'à atteindre les 6 %. De là, nous avons la formation d'un palier pseudo-stable qui au bout de 90 min, atteint les 10%. La quantité de CPT dissoute à partir des complexes formés par la méthode du kneading augmente progressivement de 7% à 19% où la cinétique de dissolution devient un peu plus lente puis continue à augmenter lentement jusqu'à atteindre les 22 % au bout de 90 min.
- b) D'après la figure V-17, la quantité de CPT seule dissoute augmente progressivement de 2 % à 7 % puis connaît une augmentation plus lente jusqu'à atteindre les 10 % au bout de 120 min d'agitation. La quantité de CPT dissoute à partir des complexes formés par la méthode de lyophilisation connaît quant à elle, une augmentation progressive de 9 % à 29 %.
- c) D'après la figure V-18, la quantité de CPT seule dissoute augmente progressivement de manière quasi-linéaire et ce de 4 % à 10 % au bout de 120 min d'agitation. Le profil de dissolution des complexes obtenus par la méthode de la co-évaporation

connait une augmentation progressive de 5 à 19 %. En ce qui concerne les complexes obtenus par mélange physique, le profil de dissolution diminue de 18 % à 6% dès les premières vingt minutes, connait une légère augmentation pour atteindre les 9 % puis finit par se stabiliser à ce niveau.

V-3-5-2 Interprétation des résultats

Les trois figures (V-16, V-17 et V-18) montrent que la CPT seule atteint une solubilité maximale égale à 10% après un temps de 120 min. Ce pourcentage a doublé avec les complexes CPT/ β -CD obtenus par la méthode du Kneading et de la Co-évaporation, et a triplé avec les complexes obtenus par lyophilisation.

Cette amélioration de solubilité peut être explicitement associée à la complexation de la CPT par la β -CD ; en effet, selon la littérature, la β -CD serait la cyclodextrine qui améliorerait le mieux la solubilité de la CPT comparativement aux autres cyclodextrines naturelles. [24]

Nous remarquons que les quantités de CPT dissoutes sont directement liées et affectées par la méthode de préparation des complexes d'inclusion. La méthode qui a permis d'améliorer au mieux la solubilité de la CPT est celle de la lyophilisation (augmentation du triple). Ceci pourrait être expliqué par le fait que

- Le complexe lyophilisé est de nature poreuse et se dissout donc, d'une meilleure manière.
- Dans le procédé de préparation du complexe, nous avons mis sous agitation le système eau-cyclodextrine-CPT ce qui fait que les forces de répulsion entre la CPT et l'eau ont augmenté la force d'attraction entre la cavité de la β -CD et la CPT.

Ces résultats vont dans le sens des articles retrouvés dans la littérature. [18]

CONCLUSION GENERALE

Lors de cette étude, nous nous sommes fixés l'objectif d'améliorer la solubilité aqueuse de la camptothécine ; cet agent anti-cancéreux handicapé par son instabilité et son hydrophobicité limitant la pleine exploitation de son activité antitumorale.

Pour atteindre ce but, notre démarche a été d'utiliser les cyclodextrines en mettant à profit leurs propriétés structurales et physico-chimiques, notamment leur propriété de complexation.

Cette démarche a nécessité le passage par plusieurs étapes aussi importantes les unes que les autres ; la première étape repose sur la détermination du ratio molaire de complexation en s'appuyant sur la méthode d'Higuchi et Connors. Selon les résultats récoltés, il s'agit d'un complexe 1 :1 aussi bien avec la β -CD qu'avec l' α -CD. La constante de stabilité K_C obtenu avec la β -CD s'est avéré plus élevée que celle obtenue avec l' α -CD (128,7 M^{-1} et 80 M^{-1} respectivement), indiquant que le complexe β -CD / CPT était plus stable et qu'il y avait une meilleure interaction entre ces deux molécules. Ce résultat fut valorisé par une comparaison avec les données théoriques et nous a orienté vers le choix de la β -CD pour le reste des travaux.

Ensuite, il était question de préparer des complexes d'inclusion CPT / β -CD et ce, selon différentes méthodes (Kneading, co-évaporation, lyophilisation et mélange physique) et de déterminer le rendement de l'opération de complexation avec chacune d'entre elles.

Enfin, nous avons entrepris de caractériser ces quatre complexes d'inclusion par spectroscopie Infrarouge, spectroscopie de diffraction des rayons X, microscopie électronique à balayage et test de dissolution.

Cette gamme d'analyse a permis de prouver la formation de complexes d'inclusion pour les complexes obtenus par les méthodes du Kneading, de la co-évaporation et de la lyophilisation. En ce qui concerne le mélange physique, les tests n'ont montré qu'une interaction surfacique indiquant la formation d'un complexe d'association. D'une autre part, ces tests ont montré que le choix de la méthode de préparation des complexes d'inclusion avait une importance capitale de par son influence sur l'amélioration de la solubilité de la CPT. Les résultats obtenus indiquent que la lyophilisation est la meilleure méthode

conformément à la littérature. En effet, selon les tests de dissolution effectués, les complexes obtenus avec cette méthode ont amélioré la solubilité de la CPT du triple (de 10 % à 30 %).

Les méthodes du Kneading et co-évaporation ont aussi amélioré la solubilité de la CPT mais de manière moins importante (d'environ le double). Le mélange physique quant à lui, n'a montré qu'une faible interaction (en surface) entre la β -CD et la CPT et de fait, n'a pratiquement pas amélioré la solubilité de la CPT.

Ce travail pourrait être consolidé par des tests de biodisponibilité *in vivo* afin de s'assurer de l'efficacité de l'amélioration de la solubilité de la CPT par la β -CD d'une part et par une étude de stabilité du cycle β lactame de la CPT d'une autre part. Par ailleurs, vu la faible solubilité de la molécule native β -CD, il serait intéressant d'étudier l'effet de plusieurs dérivés plus solubles de cette dernière, sur la solubilité et la stabilité de la camptothécine.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Pierre Tambourin, « Biotechnologie et médicaments du futur », 2008
- [2] G. M. Cragg, P. G. Grothaus, et D. J. Newman, “Impact of natural products on developing new anti-cancer agents,” *Chemical Reviews*, vol. 109, no. 7, pp. 3012–3043, 2009.
- [3] François Grillet, « Synthèse formelle de la (+/-)-camptothécine et préparation d’analogues de la 22-hydroxyacuminatine », thèse de doctorat en chimie organique, université de Grenoble, 2010.
- [4] Sandrine Weisse, « Complexes cyclodextrines/ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l’absorption cutanée », thèse de doctorat en pharmacie, université de Paris XI, 2002.
- [5] Carole Karakasyan, « Fonctionnalisation des surfaces par l’intermédiaire du couple Adamantane/ β -CD ; application du procédé pour l’élaboration d’un immunocapteur », thèse de doctorat en physico-chimie des polymère, université de Paris XII, 2005.
- [6] Siham Ben-Zirar Baya, « Optimisation de la distribution tissulaire de dérivés organoarséniés à visée antileucémique et trypanocide : exemple du mélarsoprol », thèse de doctorat en biologie, santé, environnement option bioingénierie et biomatériaux, université de Nancy I, 2007.
- [7] Guillaume Fleury, « Des polyrtaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique : les gels à points de réticulation glissants », thèse de doctorat en chimie et science des matériaux, université de Strasbourg I, 2005.
- [8] J. Szejtli, *Chemistry Review*, 1988
- [9] Francis Wilkinson and Marek Sikorski, « Triplet state decay of xanthione (XT) and 4H-1-benzopyran-4-thione (BPT) in solid β -CD complexes », *Journal Of Chemical Communication*, 1997.
- [10] Calin Gabriel Floare, « Dynamique réactionnelle dans des environnements restreints », thèse de doctorat en physique, université de Grenoble I, 2005.
- [11] Catherine Bisson-Boutelliez, « *Desulfovibriospp.* Dans la maladie parodontale : interactions avec les cellules endothéliales KB et activité de l’amoxicillin libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires », thèse de doctorat en pharmacologie, université de Nancy I, 2009.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [12] Delphine Castagne, « Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques », thèse de doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques, université de Liège, 2010.
- [13] Yussef Bakkour, « Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées », thèse de doctorat en chimie, université de Lille I, 2005.
- [14] Marcus E. Brewster and Thorsteinn Loftsson, « Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers », *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 2007.
- [15] Arun Rasheed; Ashok Kumar C.K.; Sranvanthi V. V. N. S. S., « Cyclodextrins as drug carrier molecules: a review », *Scientia Pharmaceutica Reviews*, 2008.
- [16] Zhaofeng Li; Miao Wang; Feng Wang and all, « γ -cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications », *Springer Verlag Review*, 2007.
- [17] Elodie Carsalade, « Transitions et relaxations dans les assemblages polymères à base polyester à finalité ballons stratosphérique », thèse de doctorat en science et génie des matériaux, université de Toulouse III, 2009.
- [18] Ramnik Snigh ; Nitin Bahrti ; Jyotsana Madan ; S.N. Hiermath, « Characterization of CD inclusion complexes- A review », *Journal Of Pharmaceutical Science and Technology* vol. 2 (3), 2010.
- [19] Decossas S., « Nanotribologie par microscopie à force atomique sur des nanotubes de carbone », thèse de doctorat en physique, université de Grenoble I, 2001.
- [20] A. Magnustottir ; M. Masson et Thorstein Loftsson, « Cyclodextrins », *J. Incl. phenom. Macroc. Chem.* 44.213-218, 2002.
- [21] Amélie Lansiaux ; Christian Bailly, « Symphonie pour camptothécines » *bulletin du cancer* ; 90 (3), 239-45, 2003.
- [22] Maur Neves Muniz, « Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (+/-)-camptothécine », thèse de doctorat en chimie, université de Grenoble I, 2006.
- [23] Cuendet M.; Pezzuto J. M., « Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology », *Eds Wiley-VCH, Weinheim*, 2008.

[24] Jichao Kang; Vijay Kumar; Dong Yang and all, «Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability and cytotoxicity of camptothécine, an antineoplastic agent», *European Journal Of Pharmaceutical Science* (15) 163-170, 2002.

[25] Xiang TX; Anderson BD, «Stable supersaturated aqueous solutions of Silatecan-7-t-butyltrimethylsilyl-10-hydroxy-camptothecin via chemical conversion in presence of chemical modified β -cyclodextrin», *Journal Of Biological Chemistry* (46), vol.280, 2005.

[26] Fermeglia M.; Ferrone M. ; Lodi A. ; Priol S. , «Host-guest inclusion complex between anticancer drugs and β -Cyclodextrin: computational studies», *Carbohydrate Polymers review* (53), 15-44, 2003.

[27] Cheng J.; Khin K. T. ; Davis M. E. , «Antitumor activity of β -cyclodextrin polymer-camptothecin conjugates», *Molecular Pharmacology review* (13), 183-93, 2004.

[28] Saetern A. ;Brandl M. and all, «Effect of HP- β -cyclodextrin complexation and pH on solubility of camptothécine», *International Journal Of Pharmaceutics*, 284(1-2):61-8, 2004.

[29] Thomas Schluemp; Jungyeong Hwang and all, «Preclinical efficacy of the CPT-polymer conjugate IT-101 in multiple cancer models», *Clinical Cancer Research review*, 12:1606-1614, 2006.

[30] Anderson B.D.; Joquparthi V., «Effect of cyclodextrine complexation on the liposome permeability of a model hydrophobic weak acid», *Pharmaceutical Research review*, 2505-15, 2008.

[31] Pastero L. ;Serpe L. and all, «CD-based nanosponges encapsulating CPT: physico-chemical characterization, stability and cytotoxicity», *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2): 193-201, 2010.

[32] ChengyingXie; XiaohongLi ;XiaomingLuo and all, «Release modulation and cytotoxicity of hydroxycamptothecin-loaded electrospun fibers with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusions», *International Journal Of Pharmaceutics* 391, 55-64, 2010.

[33] Ye Jiang; XianyiSha; Wei Zhang and all, «Complex of 9-nitro-camptothecin in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: In vitro and in vivo evaluation», *International Journal Of Pharmaceutics*, 397 116-121, 2010.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[34] YaseminCirpanli; Emilie Allard; Catherine Passirani and all, «Antitumoral activity of camptothécine-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model», Internation Journal Of Pharmaceutics, 403 201-206, 2011.

[35] Li C.; Wang C. and all, «Novel SBE-CD gradient leads to highly active liposomal Irintecan formulations», Journal Of Pharmacy and Pharmacology, 63 (6) 765-73, 2011.

[36] Gaur S.; Chen L. ; Yen T. and all, «Preclinical study of the cyclodextrine polymer conjugate of CPT CRLX-101 for the treatment of gastric cancer», Journal Of Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011.

GLOSSAIRE

Antiémétique : médicament agissant contre les vomissements et les nausées.

Antispasmodique : médicament permettant de lutter contre les spasmes musculaires (contractures, crampes, convulsions).

Biodisponibilité : vitesse et étendue selon lesquelles la substance active ou sa fraction active est absorbée (gagne la circulation générale) à partir de sa forme pharmaceutique et devient disponible au site d'action.

Choatropes : un agent choatropique est une molécule qui détruit la structure spatiale dans les macromolécules biologiques (ADN, ARN) ; ils interfèrent avec les interactions intramoléculaire faible (liaison hydrogène, forces de Van Der Waals et effet hydrophobe).

Constante diélectrique : ou permittivité du vide, elle décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique.

Criblage : méthode d'investigation permettant d'effectuer un tri parmi des substances naturelles ou synthétique dont on ignore les propriétés pharmacologiques éventuelles, dans la perspective de la recherche d'un médicament.

Cystite hémorragique : saignement diffus et aigu de la muqueuse vésicale suite à une inflammation de la vessie.

Electrophorèse capillaire : méthode utilisée pour séparer des espèces ioniques selon leur charge et les forces de friction qui s'exercent sur elles.

Environnement anisotropique : environnement dont les propriétés varient suivant la direction.

Hémolyse : phénomène irréversible selon lequel les globules rouges sont détruites libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguin.

Kosmotrope : un agent kosmotropique a la capacité de stabiliser la structure de l'eau.

Liposomes : particule se présentant sous forme d'une petite sphère constituée d'une double couche de lipides (glycéro-phospho-lipides) servant d'enveloppe contenant différentes substances médicamenteuses dans une substance aqueuse et ayant la capacité de traverser les membranes biologiques.

Maltosaccharide : oligosaccharide contenant trois à neuf unité de sucre liées par des liaison α -glucane.

Modélisation enzymatique : élaboration d'un modèle représentatif des aspects de l'enzyme, de son fonctionnement et de son action.

Néphrotoxicité : ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales, induite directement ou indirectement par des agents chimiques ou leurs métabolites.

Pluronic F68 : surfactant non anionique.

Prodrogue : toute molécule, destinée à un usage thérapeutique, qui doit subir une biotransformation après son administration à un organisme, pour que s'exerce son activité pharmacologique.

Solvant polaire aprotique : solvant possédant un moment dipolaire et dénué d'atomes d'hydrogène susceptible de former des liaisons hydrogènes.

Tumeur : excroissance de tissus provoquée par la prolifération anormale de certaines cellules proliférant plus rapidement que les cellules voisines.

ANNEXES

1. Absorbances (UA) obtenues avec le test de dissolution : complexe obtenu par Kneading :

Temps (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	0,059	0,098	0,103	0,112	0,096	0,087	0,013
10	0,137	0,141	0,158	0,154	0,144	0,15	0,027
15	0,177	0,172	0,176	0,178	0,164	0,171	0,042
20	0,189	0,197	0,195	0,186	0,196	0,197	0,06
25	0,198	0,199	0,211	0,224	0,206	0,204	0,073
35	0,222	0,223	0,227	0,227	0,224	0,221	0,082
45	0,234	0,229	0,237	0,236	0,233	0,229	0,092
60	0,238	0,24	0,246	0,245	0,24	0,239	0,103
75	0,251	0,249	0,249	0,253	0,249	0,251	0,114
90	0,256	0,262	0,258	0,262	0,256	0,256	0,122

Pourcentages (%) de CPT dissoute :

Temps (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	4,96261682	8,24299065	8,6635514	9,42056075	8,07476636	7,31775701	1,09345794
10	11,5233645	11,8598131	13,2897196	12,953271	12,1121495	12,6168224	2,27102804
15	14,8878505	14,4672897	14,8037383	14,9719626	13,7943925	14,3831776	3,53271028
20	15,8971963	16,5700935	16,4018692	15,6448598	16,4859813	16,5700935	5,04672897
25	16,6542056	16,7383178	17,7476636	18,8411215	17,3271028	17,1588785	6,14018692
35	18,6728972	18,7570093	19,0934579	19,0934579	18,8411215	18,588785	6,89719626
45	19,682243	19,2616822	19,9345794	19,8504673	19,5981308	19,2616822	7,73831776
60	20,0186916	20,1869159	20,6915888	20,6074766	20,1869159	20,1028037	8,6635514
75	21,1121495	20,9439252	20,9439252	21,2803738	20,9439252	21,1121495	9,58878505
90	21,5327103	22,0373832	21,7009346	22,0373832	21,5327103	21,5327103	10,2616822

2. Absorbances (UA) obtenues avec le test de dissolution : complexe obtenu par lyophilisation :

TEMPS (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	0,055	0,049	0,059	0,085	0,075	0,09	0,022
10	0,086	0,073	0,085	0,103	0,09	0,097	0,042
15	0,101	0,091	0,103	0,135	0,126	0,128	0,048
20	0,115	0,113	0,12	0,147	0,137	0,133	0,057
25	0,129	0,126	0,131	0,148	0,136	0,149	0,064
35	0,143	0,141	0,148	0,167	0,153	0,156	0,083
45	0,155	0,153	0,165	0,175	0,168	0,162	0,086
60	0,168	0,169	0,172	0,18	0,177	0,183	0,109
75	0,177	0,177	0,182	0,195	0,184	0,194	0,104
90	0,182	0,185	0,188	0,204	0,199	0,192	0,116
105	0,188	0,19	0,193	0,205	0,191	0,202	0,12
120	0,193	0,196	0,201	0,208	0,197	0,202	0,125

Pourcentages (%) de CPT dissoute :

TEMPS (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	8,2639661	7,36244253	8,86498182	12,771584	11,2690447	13,5228536	3,30558644
10	12,9218379	10,9685368	12,771584	15,4761547	13,5228536	14,5746311	6,31066502
15	15,1756468	13,6731076	15,4761547	20,2842804	18,9319951	19,2325029	7,2121886
20	17,2792019	16,978694	18,0304715	22,0873276	20,5847883	19,9837726	8,56447396
25	19,3827569	18,9319951	19,6832647	22,2375815	20,4345344	22,3878354	9,61625146
35	21,4863119	21,185804	22,2375815	25,0924062	22,9888512	23,4396129	12,4710761
45	23,289359	22,9888512	24,7918983	26,2944376	25,2426601	24,3411365	12,9218379
60	25,2426601	25,392914	25,8436758	27,0457072	26,5949455	27,496469	16,3776783
75	26,5949455	26,5949455	27,3462151	29,2995162	27,646723	29,1492623	15,6264086
90	27,3462151	27,7969769	28,2477387	30,6518015	29,9005319	28,8487544	17,4294558
105	28,2477387	28,5482465	28,9990083	30,8020555	28,6985005	30,3512937	18,0304715
120	28,9990083	29,4497701	30,2010398	31,2528173	29,600024	30,3512937	18,7817411

3. Absorbances (UA) obtenu avec le test de dissolution : complexe obtenu par mélange physique et Co-évaporation

Temps (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	0,063	0,06	0,069	0,22	0,157	0,275	0,042
10	0,096	0,094	0,109	0,121	0,124	0,144	0,043
15	0,125	0,126	0,141	0,104	0,089	0,124	0,05
20	0,147	0,145	0,148	0,098	0,069	0,08	0,057
25	0,158	0,157	0,166	0,108	0,107	0,1	0,064
35	0,177	0,177	0,186	0,114	0,088	0,1	0,07
50	0,187	0,186	0,19	0,104	0,093	0,1	0,082
60	0,196	0,197	0,2	0,117	0,096	0,108	0,09
80	0,207	0,207	0,211	0,116	0,104	0,111	0,101
90	0,214	0,212	0,219	0,118	0,103	0,118	0,102
120	0,217	0,222	0,226	0,12	0,11	0,121	0,114

Pourcentages (%) de CPT dissoute :

Temps (min) / N° de bac	01	02	03	04	05	06	07 (CPT seule)
5	5,29906542	5,04672897	5,80373832	18,5046729	13,2056075	23,1308411	3,53271028
10	8,07476636	7,90654206	9,1682243	10,1775701	10,4299065	12,1121495	3,61682243
15	10,5140187	10,5981308	11,8598131	8,74766355	7,48598131	10,4299065	4,20560748
20	12,364486	12,1962617	12,4485981	8,24299065	5,80373832	6,72897196	4,79439252
25	13,2897196	13,2056075	13,9626168	9,08411215	9	8,41121495	5,38317757
35	14,8878505	14,8878505	15,6448598	9,58878505	7,40186916	8,41121495	5,88785047
50	15,728972	15,6448598	15,9813084	8,74766355	7,82242991	8,41121495	6,89719626
60	16,4859813	16,5700935	16,8224299	9,8411215	8,07476636	9,08411215	7,57009346
80	17,411215	17,411215	17,7476636	9,75700935	8,74766355	9,3364486	8,4953271
90	18	17,8317757	18,4205607	9,92523364	8,6635514	9,92523364	8,57943925
120	18,2523364	18,6728972	19,0093458	10,0934579	9,25233645	10,1775701	9,58878505

Les bacs (01, 02, 03) correspondant au complexe obtenu par co-évaporation.

Les bacs (04, 05, 06) correspondent au complexe obtenu par mélange physique.

Résumé : La camptothécine (CPT) est un alcaloïde pentacyclique connu pour son activité anti-tumorale et ses problèmes de formulation causés par son hydrophobicité et son instabilité. Dans ce travail, il a été question d'utiliser les cyclodextrines (la β -CD) afin d'améliorer la solubilité de la CPT par formation de complexes d'inclusion en utilisant quatre méthodes de préparation ; le kneading, le mélange physique, la co-évaporation et la lyophilisation. La caractérisation de ces derniers a été effectuée par spectroscopie Infrarouge (IR), spectroscopie par diffraction des rayons X (DRX), microscopie électronique à balayage (MEB) et test de dissolution. Le ratio molaire de complexation a été déterminé selon la méthode d'Higuchi et Connors et indique la formation de complexe 1 :1 (CD : CPT) avec la β -CD et l' α -CD. La constante de stabilité des complexes (K_C) s'est avérée plus importante avec la β -CD qu'avec l' α -CD ($128,7 \text{ M}^{-1}$, 80 M^{-1} respectivement). Les résultats obtenus lors de la caractérisation ont montré que la lyophilisation était la meilleure méthode de préparation. Par suite ce résultat fut confirmé par dissolution ; où on a amélioré la solubilité de la CPT du triple (de 10 % à 30%).

Mots clés : cyclodextrine, camptothécine, complexe d'inclusion, solubilité, caractérisation

Abstract: The camptothecin (CPT) is a pentacyclic alkaloid known for its antitumor activity and its formulation problems caused by its hydrophobicity and instability. In this study, cyclodextrins (β -CD) has been used to increase the solubility of the CPT by formation of inclusion complexes using kneading, co-evaporation, lyophilisation and physical mixture techniques. Characterization of inclusion complexes was performed using Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), X ray diffraction spectroscopy (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and dissolution test. The molar ratio of complexation was determined according to Higuchi and Connors method showing the formation of 1:1 complexes with both β -CD and α -CD. The stability constant K_C obtained was higher with the β -CD than with α -CD ($128, 7 \text{ M}^{-1}$, 80 M^{-1} respectively). The results obtained by characterization revealed that the lyophilisation was the best technique for the formation of inclusion complexes. Then this result was confirmed by dissolution test; where the solubility of the CPT was improved by triple (for 10% to 30%).

Key words: cyclodextrin, camptothecin, inclusion complex, characterization