



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET

MOLECULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Evaluation in vitro et in silico de l'activité
antidiabétique des dérivés de
ferrocénylméthylacétylaniline**

Présenté par:

M^{elle} Fouhma Maria.

M^{elle} Merabet Malak Errahmane.

M^{elle} Sedrati Nahla.

Devant le jury composé de :

Président : Dr. Ghania Ahmed.

M.A.A, Université d'El Oued.

Examinatrice : Dr. ADAIKA Aicha.

M.C.B, Université d'El Oued.

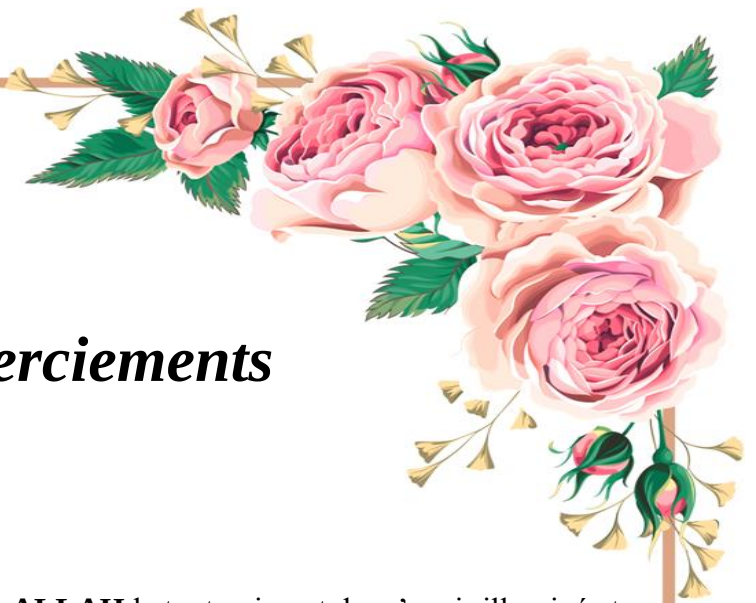
Promotrice: Dr. Lanez Elhafnaoui.

M.C.B, Université d'El Oued.

Année universitaire: 2021/2022.



Remerciements



Je remercie tout d'abord Le Plus Puissant **ALLAH** le tout puissant de m'avoir illuminé et ouvert les portes de savoir, et de m'avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.

Toutes les expressions de l'estime et de gratitude du monde sont insuffisantes pour exprimer nos remerciements à nos parents qui nous ont accompagnés tout au long de notre étude.

Au terme de ce travail nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements à notre promoteur **Dr: LANEZ Elhafnaoui** pour avoir accepté l'encadrement de ce travail, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de nous avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail.

Nous remercions tous les membres de jury (**Dr Ghania Ahmed et Dr ADAIKA Aicha**), qui ont accepté de juger notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences de la nature et la vie de l'université Echahid Hamma Lakhdar El Oued.

Une grande pensée pour tous mes amis (es) qui m'ont soutenue au cours de ces années.

Enfin, je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.





إهداء



بعد بسم الله الرحمن الرحيم والحمد لله الذي أنار طريقي وكان لي خير عون أهدي هذا العمل المتواضع إلى: إلى اليد الطاهرة التي أزلت من أمامنا أشواك الطريق ورسمت المستقبل بخطوط من الأمل والثقة، إلى الذي لا تفيه كلمات الشكر والعرفان إلى مثالي الأعلى وقدوتي في الحياة أبي الحبيب. إلى ملاكي في الحياة إلى معنى الحب والحنان إلى بسمه الحياة وسر الوجود إليك أُمي الغالية. إلى سندي العظيم إلى من لا تحلو الحياة إلا به أخي: عادل.

إلى كل أفراد عائلتي دون إستثناء

إلى كل الأرواح التي غادرتنا "رحمهم الله"

إلى صديقاتي الغاليات

إلى أساتذتي الأعزاء

إلى كل من وسعهم قلبي ولم يسعهم قلبي

نحلة



BONTONTV



إهداء



أهدي هذا العمل المتواضع

إلى:

الوالدين الكريمين حفظهما الله

إلى كل أفراد أسرتي

إلى روح أخوتي ميسرة و طلال و ابنة خالي أسماء " رحمهم الله "

إلى كل الأصدقاء ، و من كانوا برفقتي

إلى كل من لم يدخر جهدا في مساعدتي

إلى كل من ساهم في تلقيني و لو بحرف في حياتي الدراسية

ملاك رحمان



BONTONTV



إهداء



وصلت رحلتي الجامعية إلى نهايتها بعد تعب ومشقة
وها أنا إذ أختتم بحث تخرجي بكل همة ونشاط
وأمتن لكل من كان له فضل في مسيرتي، وساعدني ولو باليسير
إلى بطلي الأوحد و استقامة ظهري ... ذلك الذي اطلب منه نجمتين.. فيعود حاملا السماء
والذي الحبيب
إلى تلك المرأة الصبورة.. التي علمتني أنا لا حاجة لي عند مخلوق و أن الله معي دائما
أحد أقداري السعيدة أُمي الغالية
إلى ذلك الذي يشبهني صديقي ورفيقي ونصفي الآخر.... أخي التوأم ..نضال
ودون أن أنسى مدلل البيت .. اخي الصغير .. سفيان
إلى صديقاتي .. و عائلتي.. وأساتذتي .. و احب الناس الي قلبي
و السلام على الذين كلما ذبلت ملامحنا ، أعادوها بكلمة لطيفة
شكرا لكم

ملريا



BONTONTV

Résumé

Reconnaître les mécanismes de maintien de l'équilibre glucidique le développement de nouvelles molécules d'importance thérapeutique combattre le diabète. Cette dernière nécessite plusieurs étapes pour s'améliorer, entre l'identification et la proposition d'une molécule efficace pour un médicament approuvé.

Nos travaux visent à évaluer l'étendue des composé organométalliques, qui sont principalement basés sur l'inhibition de la puissance enzymatique de l'alpha Amylase participant à la régulation enzymatique du métabolisme des glucides chez les personnes diabétiques.

Au début de nos travaux, nous sommes appuyés sur la prédiction in silico des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et toxiques des 3 dérivés ferrocéniques à l'aide des serveurs : swissADME, admetSAR et Protox.

Les résultats obtenus indiquent que tous les composés ont de bonnes caractéristiques de ressemblance aux médicaments et non toxiques pour les 5 types de toxicités. Selon ce qui précède, les paramètres de liaisons et la concentration inhibitrice 50 sont déterminés on utilise le logiciel d'amarrage moléculaire à partir duquel nous sommes arrivés à l'efficacité biologique des composés étudiés par rapport à l'acarbose.

Les résultats obtenus par l'amarrage moléculaire (Docking) confirmé ensuite par des études in Vitro ; qui donnent des valeurs de ΔG et IC50 peut traduit la bonne affinité des ligands avec la cible biologique (alpha-amylase).

La formation des liaisons électrostatiques soit hydrogène, soit hydrophobes, entre tous les dérivés ferrocéniques et l'enzyme, confirme l'efficacité de ces dérivés et permet de nous concluez la bonne candidature d'être Comme de futurs médicaments antidiabétiques.

Mots clés: Diabète, dérivés ferrocéniques, alpha Amylase, Amarrage moléculaire, SwissADME, Protox, admetSAR, ΔG , IC50.

Abstract

Recognize the mechanisms of maintaining the carbohydrate balance the development of new molecules of therapeutic importance fight diabetes. The latter requires several steps to improve, between the identification and the proposal of an effective molecule for an approved drug.

Our work aims to assess the extent of organometallic compounds, which are mainly based on the inhibition of the enzymatic potency of alpha Amylase involved in the enzymatic regulation of carbohydrate metabolism in people with diabetes.

At the beginning of our work, we relied on the in silico prediction of the physicochemical, pharmacokinetic and toxic properties of the three ferrocenic derivatives using servers: swissADME, admetSAR and Protox.

The results obtained indicate that all compounds have good drug-like and non-toxic characteristics for all 5 types of toxicities. Based on the above, the binding parameters and the inhibitory concentration 50 are determined using the molecular docking software from which we arrived at the biological efficacy of the studied compounds in relation to acarbose.

The results obtained by molecular docking (Docking) then confirmed by in vitro studies; which give values of ΔG and IC_{50} can reflect the good affinity of ligands with the biological target (alpha-amylase).

The formation of either hydrogen or hydrophobic electrostatic bonds between all ferrocenic derivatives and the enzyme confirms the effectiveness of these derivatives and allows us to conclude the right application of beings as future antidiabetic drugs.

Keywords: Diabetes, ferrocenic derivatives, alpha Amylase, Molecular docking, SwissADME, Protox, admits SAR, ΔG , IC_{50} .

الملخص

للتعريف بآليات الحفاظ على توازن الكربوهيدرات في مجال تطوير جزيئات جديدة ذات أهمية علاجية لمكافحة مرض السكري. يتطلب هذا الأخير عدة خطوات للتحسين، بين تحديد واقتراح جزيء فعال لعقار معتمد. يهدف عملنا إلى تقييم مدى المركبات العضوية المعدنية، والتي تعتمد بشكل أساسي على تثبيط الفاعلية الإنزيمية لألفا أميلاز المشاركة في التنظيم الإنزيمي لاستقلاب الكربوهيدرات لدى مرضى السكري. في بداية عملنا، إعتدنا على التنبؤ في السيليكو بالخصائص الفيزيائية الكيميائية والصيدلانية والسامة للمشتقات الفيروسيينية الثلاثة باستخدام الخوادم: admet SAR، Protox ، swiss ADME. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن جميع المركبات لها خصائص جيدة شبيهة بالعقاقير وغير سامة لجميع أنواع السميات الخمسة باستخدام برنامج الالتحام الجزيئي الذي وصلنا منه إلى IC50 . بناءً على ما سبق، يتم تحديد المؤشرات: الفعالية البيولوجية للمركبات المدروسة فيما يتعلق بالأكاربوز. النتائج المتحصل عليها عن طريق الالتحام الجزيئي (Docking) ثم أكدت الدراسات المختبرية، التي تعطي قيم ΔG و IC50 يمكن أن تعكس التقارب الجيد للربيطات مع الهدف البيولوجي (ألفا أميلاز). يؤكد تكوين الروابط الكهروستاتيكية الهيدروجينية أو الكارهة للماء بين جميع المشتقات الفيروسيينية والإنزيم فعالية هذه المشتقات ويسمح لنا بإنهاء التطبيق الصحيح للكائنات كأدوية مضادة للسكري في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: مرض السكري ، ألفا أميلاز ، المشتقات الفيروسيينية ، الالتحام الجزيئي (Docking) ،
IC50 ، ΔG ، Protox ، admetSAR ، swissADME.

Liste d'abréviation

α : Alpha.
 β : Bêta.
 ΔE : Différence de énergie.
 ΔG : énergie libre de liaison.
Å : Ångström.
AA: Acide aminé.
ADME: Absorption, D: Distribution, M: Métabolisme.
ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.
ADO : Anti diabétiques Auroux
ADP : Adénosine diphosphate.
AG: Acides gras.
ALA: Alanine.
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique.
ASN : Asparagine.
ASP: Aspartique.
ATP : Adénosine triphosphate.
C° : Degrés Celsius.
CV: Voltamétrie cyclique.
CYP : Cytochromes P450.
DG: Diabète gestationnel.
DMF : N,N-diméthylformamide.
DMSO: Diméthylsulfoxyde.
DNID: Diabète non insulino-dépendant.
DNSA: Réactif 3,5-dinitrosalicylique.
DT1: Diabète type 1.
DT2: Diabète type 2.
E : énergie.
Fc2A: N-ferrocenylmethyl-2-aminoacetophenone .
Fc3A: N-ferrocenylmethyl-3-aminoacetophenone.
Fc4A: N-ferrocenylmethyl-4-aminoacetophenone.
FID: Federation internationale du diabete
G6Pase : Glucose-6-Phosphatase.
GH: Growth hormone.
GLN: Glutamine.
GLU: Glutamique.
GLUT: Transporteur au glucose.
GLY: Glycine.
HbA1c : Hémoglobine glyquée.
HGPO: Hyperglycémie provoquée par voie orale.
HIS: Histidine.
HLA : Human leukocyte antigen.

HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 alpha.
HNF4 α : Insulin Promotor Factor-1 .
IC50 : Concentration causant une inhibition de 50% d'une activité.
INS : Insuffisante de l'insuline.
Ipa : Densités de courant anodique.
Ipc : Densités de courant cathodiques.
IUBMB:International Union of biochemistry and molecular biology.
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.
K : constant de liaison.
KDa : kilo dalton.
KJ : Kilojoule.
LGA : L'algorithme génétique lamarckien.
LYS: Lysine .
M: Mole.
MGAM: Maltase-glucoamylase.
NADH⁺ : Nicotinamide adénine di nucléotide.
OX: Oxydant.
PDB: Protein Data Bank.
pH : potentiel Hydrogène.
PKA : Protéines kinases A.
PLC: Phospholipase C.
PLIP : Protéine-Ligand Interaction Profiler.
RCPG: Récepteur couplé aux protéines G.
Réd: Réducteur.
RX: Rayons X.
SGLT : Co-transporteur glucose/sodium.
SHC : Src Homologous and Collagen protein.
SNC : Système Nerveux Central.
TPSA: Topological Polar Surface Area.
UDP- glucoses : Uri dine di phosphate glucose.
UTP: Uri dine triphosphate.
V: Volt.
Vis :Visible.
VTRS : Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
I – 1	Physiopathologie du diabète de type 2.	9
I – 2	Sécrétion biphasique de l'insuline en réponse à un stimulus constant en glucose.	12
I – 3	Structure moléculaire.	15
I – 4	L'inhibition de l'acarbose.	15
II- 1	La glycolyse.	21
II- 2	Lipogenèse de novo et régulations transcriptionnelles.	23
II- 3	Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules β pancréatiques.	25
II- 4	Rôles physiologiques du glucagon.	26
II- 5	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase.	28
II- 6	La digestion enzymatique de l'amidon.	30
II- 7	Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques.	31
II- 8	Représentations en ruban des repliements du domaine catalytique chez les différentes familles de GH où sont retrouvées les α -glucosidases (EC 3.2.1.20).	32
III- 1	Ferrocène sous forme de poudre orange.	34
III- 2	Structure électronique du ferrocène.	35
III- 3	Mécanisme (I) de réactions de substitution sur l'anneau pentadiénylique (formation d'un complexe sigma).	37
III- 4	Mécanisme (II) des réactions de substitution sur l'anneau pentadiénylique (formation d'un complexe sigma).	37
III- 5	Principales réactions électrophiles de ferrocène.	38
III- 6	Structure de ferrocénylméthyltriméthylamonium.	38
III- 7	Réactivités du sel ferrocénylméthyltriméthylamonium.	39
III- 8	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène.	39
III- 9	Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10^{-3} M en présence de tétrabutylammonium perchlorate 10^{-1} M à $V = 100$ mV/s.	40
III- 10	Structure cristalline de ferrocène.	41
III- 11	Les structures chimiques des DFC- méthylacétyléneline.	44

IV- 1	Variation du potentiel en fonction du temps pour un cycle CV.	46
IV- 2	Voltammogramme cyclique pour un système réversible.	47
IV- 3	Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible.	51
IV- 4	Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile dans l'acétonitrile.	52
IV- 5	Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques.	53
IV- 6	Structure de β -carotène.	54
IV- 7	Schéma du protocole général de docking.	56
IV- 8	Les étapes clés du docking moléculaire.	58
IV- 9	Page d'accueil du serveur SwissADME.	63
IV- 10	Page d'accueil du serveur admetSAR.	64
IV- 11	Page d'accueil du serveur Protox.	65
V- 1	Aminométhylation de ferrocène.	71
V- 2	Synthèse de la N-ferrocenylmethyl-aminoacetophenone.	71
V- 3	Différentes étapes d'amarrage.	76
VI-1	Voltammogramme cyclique de l'amidon 2% en présence de l' α -amylase enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 10 ⁻¹ M à pH = 7, avec une vitesse de balayage de potentiel égale à 0.1 V/s.	81
VI-2	Voltammogramme cyclique d'une solution d' α -amylase en présence de différentes concentrations de : Fc2A(a), Fc3A(b), Fc4A(c) et Acarbose(d) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 10 ⁻¹ M à pH = 7, avec une vitesse de balayage de potentiel égale à 0.1 V/s.	82
VI-3	Courbes exponentiels des pourcentages d'inhibition obtenu à partir des données électrochimiques en fonction des concentrations des composés étudiées.	84
VI- 4	Tracés de $\log \frac{1}{[Fc]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec l' α -amylase.	86

VI- 5	Courbes exponentiels des pourcentages d'inhibition obtenu à partir des données spectroscopiques en fonction des concentrations des composés étudiées.	89
VI-6	Tracés de $\frac{1}{[Fc]}$ en fonction de $\frac{A}{A_0} - A$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec l' α -amylase.	91
VI- 7	Représentation ORTEP de Fc2A (a), Fc3A (b) et Fc4A (c).	92
VI- 8	Structure tridimensionnelle de l'acarbose téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès DrugBank : DB00284.	93
VI- 9	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase pancréatique (PDB ID : 1OSE) téléchargé depuis Protein Data Bank.	93
VI- 10	Poses d'amarrage de Fc4A (a), Fc3A (b), Fc2A (c) et l'acarbose avec l' α -amylase (PDB ID : 1OSE) illustrant l'interaction de tous les ligands.	95
VI-11	Liaisons électrostatiques entre les ligands étudiés et les acides aminés de l' α -amylase (PDB ID : 1OSE). (Les lignes en gris montrent les liaisons hydrophobiques, les lignes bleu indiquent les liaisons hydrogènes).	96

Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
I.1	Différents types de diabète MODY.	8
II.1	Différentes nomenclatures d' α -amylase.	27
III.1	Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène.	40
IV.1	Ordres de grandeurs de quelques chromophores.	54
IV.2	Les principaux programmes de docking moléculaire, le nom de leur éditeur et le site Internet.	62
V.1	Les formes SMILES et les identifiants des molécules testées.	74
V.2	Informations sur les récepteurs cibles choisies pour les études d'amarrage.	75
V.3	Paramètres d'amarrage sélectionnés pour l' α -amylase.	77
VI.1	Propriétés physicochimiques des composés étudiés et du l'acarbose.	79
VI.2	Propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés et du l'acarbose.	80
VI.3	Prédiction de la toxicité des composés étudiés et de l'acarbose	81
VI.4	Paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la Figure VI.2.	83
VI.5	Valeurs de la IC ₅₀ des composés étudiés et de l'acarbose obtenu à partir de la voltammétrie cyclique.	85
VI.6	Valeurs des K et ΔG des composés étudiés obtenues par des données de la voltammétrie cyclique.	87
VI.7	Valeurs de l'absorbance des dérivés ferrocéniques étudiés et de l'acarbose obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis.	88
VI.8	Valeurs de la IC ₅₀ des composés étudiés et de l'acarbose obtenu à partir d'UV-Visible.	89
VI.9	Valeurs des K et ΔG des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques.	91

VI.10	Constantes de liaisons, les énergies libres de liaisons et les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour les complexes étudiés par approche d'amarrage moléculaire.	94
VI.11	Longueur des liaisons hydrogène formées entre les ligands étudiés et les acides aminés de l' α -amylase.	97
VI.12	Comparaison des constants (M^{-1}), énergies libres de liaison ($KJ.mol^{-1}$) et les concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) obtenues expérimentalement avec celles obtenues par amarrages moléculaires.	98

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicace	
Résumés	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des Tableaux	
Introduction :	1
<i>PREMIÈRE PARTIE: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	

Chapitre I : Diabète

I.1. Définition :	6
I.2. Classification :	6
I.2.1. Diabète Type1(DT1):	6
I.2.2. Diabète Type 2(DT2) :	6
I.2.3. Diabète Type gestationnel:	7
I.2.4. Diabète Type MODY:	7
I.3. Physiopathologie :	8
I.3.1. Diabète Type 1(DT1):	8
I.3.2. Diabète Type 2(DT2):	9
I.3.3. Diabète Type gestationnel (DG) :	10
I.3.4. Diabète Type MODY:	10
I.4.Facteurs influençant :	10
I.4.1. Facteurs influençant le DT1 :	10
I.4.2. Facteurs influençant le DT2 :	11
I.5. Traitements du diabète:	13
I.5.1. Traitements non médicamenteux:	13
I.5.2. Traitements médicamenteux :	13
I.5.2.1. Antidiabétiques oraux (ADO) :	13
I.5.2.2. Insulinothérapie :	15

Chapitre II: Métabolisme glucidique

II.1. Définition :	18
II.2. Régulation glycémique :	18
II.3. Mécanismes de régulation glycémique postprandiale :	19

II.3.1. La captation de glucose :.....	19
II.3.2. Le devenir du glucose:	20
II.4. La régulation hormonale de la glycémie :	23
II.5. La régulation enzymatique de la glycémie :	26
II.5.1. L'alpha amylase:	26
II.5.2. Alpha-glucosidase:.....	31

Chapitre III : Chimie de Ferrocène

III.1. Histoire :	34
III.2. Définition:.....	34
III.3. Structure électronique du ferrocène:	35
III.4. Processus chimique de synthèse de ferrocène:	35
III.4.1. Réaction du cyclopentadiénylthallium avec le chlorure ferreux:	35
III.4.2. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux:.....	35
III.5. Réactivité :	36
III.5.1 Réaction de substitution:.....	36
III.5.2. Réaction d'oxydation :	37
III.5.3. Réaction avec les électrophiles :	38
III.6. Propriétés de ferrocène:	39
III.6.1. Propriétés électrochimiques:.....	39
III.6.3. Propriétés physique:.....	41
III.6.4. Structure Cristalline:	41
III.6.5. Chimie médicinal de ferrocène:	41
III.6.5.1. Antibactériennes:.....	42
III.6.5.2. Activité antifongique:.....	42
III.6.5.3. Activité antioxydants :	42
III.6.5.4. Anti-cancéreux :	42
III.6.5.5. Anti-Toxoplasme :	43
III.6.5.6. L'activité antivirale:	43
III.6.5.7. Anti- Alzheimer:.....	43
III.6.5.8. Antipaludique:	44
III.7. Dérivé ferrocénique étudié:	44

Chapitre IV : Techniques expérimentales

IV. Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées :	46
IV.1. Voltammétrie cyclique :	46
IV.1.1. Cas d'un système réversible (rapide) :	48
IV.2. Spectroscopie électronique :	50
IV.2.1. Règles de sélection :	50

IV.2.2. Principe de la spectroscopie UV – Visible :	51
IV.2.3. Etude spectrophotométrique en UV-Visible :	51
IV.2.4. Analyse de l'absorption:	53
IV.3. Amarrage moléculaire :	54
IV.3.1. Introduction :	54
IV.3.2. Types du Docking moléculaire :	55
IV.3.3. Principes du docking moléculaire :	55
IV.3.4. Applications du docking moléculaire :	57
IV.3.5. Les étapes du docking moléculaire :	58
IV.3.6. Les outils du docking moléculaire :	58
IV.4. Prédiction du paramètre bio-informatique :	63
IV.4.1. Serveurs utilisés :	63
IV.4.2. Prédiction des propriétés ADMET :	65

DEUXIÈME PARTIE : EXPÉRIMENTALES

Matériels et Méthodes

I.1. Produits chimiques et réactifs :	70
I.1.1. Alpha Amylase :	70
I.1.2. Substrat :	70
I.1.3. Réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :	70
I.1.4. Acarbose :	70
I.1.5. Tampon phosphate (0.02 M, pH = 6.5) :	70
I.1.6. Dérivés ferrocéniques étudiés :	70
I.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-diabétique :	71
I.2.1. Mode opératoire :	71
I.2.2. Mesure voltammétriques :	72
I.2.3. Mesure spectroscopique :	73
I.3. Evaluation <i>in silico</i> de l'activité anti-diabétique :	73
I.3.1. Méthodes d'évaluation des propriétés ADMET :	73
I.3.2. Amarrage moléculaire :	74

Résultats et Discussion

II.1. Résultats et interprétation	79
II.1.1. Prédiction des propriétés ADMET :	79
II.1.1.1. Propriétés physico-chimiques :	79
II.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques :	80
II.1.1.3. Prédiction de la toxicité:	81
II.1.2. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par voltamétrie cyclique :	81

II.1.2.1. Détermination de l'efficacité inhibitrice de l'activité de l' α -amylase (IC50) :	84
II.1.2.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de l'interaction avec l' α -amylase : .	85
II.1.3. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par spectroscopie électronique :	87
II.1.3.1. Détermination de l'efficacité inhibitrice de l'activité de l' α -amylase (IC50) :	88
II.1.3.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de l'interaction avec l' α -amylase : .	90
II.1.4. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par amarrage moléculaire :	92
II.1.4.1. Optimisation structurelle :	92
II.1.4.2. Simulations d'amarrage :	93
II.2. Discussion générale	99
Conclusion	101
Références	103

Introduction générale



INTRODUCTION

Intrduction

Le diabète est devenu un problème majeur de santé publique au XXIème siècle. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), définit « le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. L'hyperglycémie est un effet fréquent du diabète non contrôlé qui conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins » (OMS, 2020).

Selon l'OMS et la FID, 550 millions de personnes seront diabétiques en 2025 et 642 millions en 2040. Au niveau mondial, près de la moitié des diabétiques ne seraient pas diagnostiqués, principalement dans les pays en voie de développement (Diabetesatias , 2021).

Le diabète de type 1 se caractérise par une production insuffisante d'insuline, laquelle doit donc être administrée quotidiennement. On ne connaît ni la cause du diabète de type1 ni les moyens de le prévenir. Le diabète de type 2, le plus courant, résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et d'un manque d'activité physique. Les facteurs de risque de ce diabète sont la race, l'origine ethnique et l'âge (OMS, 2021).

L'une des approches thérapeutiques consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes qui hydrolysent les carbohydrates dans l'intestin, à savoir l'alpha-glucosidase et l'alpha-amylase (Wang et al 2016).

Le but de cette étude est de chercher de nouvelles molécules antidiabétiques. À cette fin, nous menons une étude pour évaluer certains inhibiteurs de l'alpha-amylase en laboratoire à l'aide de la technique de spectroscopie basée sur la spectroscopie UV-visible et la mesure du comportement électrochimique à l'aide de Potentiostat/Galvanostat. Les résultats obtenus expérimentalement ont été confirmés in-silico grâce à l'amarrage moléculaire.

L'utilisation du ferrocène dans la chimie médicinale est un domaine de recherche vigoureux, certains dérivés ferrocéniques sont très actifs dans les activités in vitro et in vivo (Sansook, 2017), donc cette étude a été réalisé sur 3 dérivés ferrocéniques suivants à savoir : N-ferrocenylmethyl-4-aminoacetophenone, N-ferrocenylmethyl-3-aminoacetophenone et N-ferrocenylmethyl-2-aminoaceto- phenone; dont le but de déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'activité de l' α -amylase (IC50) et l'énergie libre de l'interaction avec l' α -amylase.

Notre travail est divisé en deux parties. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui comporte quatre chapitres. Le premier chapitre concernant le diabète et le

INTRODUCTION

deuxième chapitre concerne métabolisme glucidique, le troisième chapitre Chimie de Ferrocène le quatrième chapitre techniques expérimentales. La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui contient la partie des matériels et méthodes utilisées durant ce travail et la partie des résultats et discussion qui contient la présentation des résultats et leur interprétation. Et enfin on termine par une conclusion générale.

PREMIÈRE PARTIE: CONTEXTE

BIBLIOGRAPHIQUE

*"Les nouvelles théories n'ont pas évolué à partir de l'ancien, mais le nouveau
contenait l'ancien"*

Gaston Bachelard

Chapitre I : Diabète

I.1. Définition :

Le diabète est un groupe de maladies métaboliques, d'étiologies diverses, caractérisé par une hyperglycémie chronique, accompagnée par une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique, résultant d'un défaut de sécrétion et/ou d'action de l'insuline **(DeFronzo et al., 2015)**. Cette hyperglycémie chronique est associée, à des degrés divers, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins **(ADA, 2008 ; Rodier, 2008)**.

Il correspond à une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L) ou une glycémie supérieure à 2 g/L (11,1 mmol/L) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à deux reprises (deux heures après le début d'un repas ou après ingestion de glucose orale de 75 g). Cette définition est fondée sur le seuil glycémique à risque de microangiopathie, en particulier à risque de rétinopathie **(Sachon et al., 2004 ; ADA, 2007)**.

I.2. Classification :

Une fois le diagnostic de diabète sucré est confirmé, le problème de sa classification va se poser. La nouvelle classification proposée repose sur l'étiologie de la maladie et non sur le degré d'hyperglycémie ou son traitement. Cette classification étiologique comporte de nombreux types de diabète, dont les plus fréquents sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2 **(Redouane, 2011)**. Cependant, il existe aussi des formes moins courantes de la maladie qui sont le diabète gestationnel et le diabète monogénique **(Henry, 2011)**.

I.2.1. Diabète Type 1 (DT1):

Le diabète de type 1 ou DID, représente environ 10% des cas de diabète mondiaux **(Peter-riesch et al., 2002)**. Il résulte d'une destruction auto-immune des cellules β du pancréas qui secrètent l'insuline **(Efrat, 2008)**. Les patients atteints de ce type de diabète produisent très peu ou presque pas d'insuline **(IDF 2013)**. Il apparaît le plus souvent chez l'enfant et le jeune adulte, c'est pourquoi il est aussi appelé « diabète juvéniles » Il peut se développer de manière asymptomatique durant une longue période **(Colas, 2010)**.

Les symptômes classiques les plus manifestes sont une sécrétion excessive d'urine (polyurie), une sensation de soif (polydipsie) ainsi qu'une perte de poids **(Grimaldi, 2001)**.

I.2.2. Diabète Type 2 (DT2) :

Ce diabète survient généralement chez les personnes de plus de 40 ans, mais touche également de plus en plus les enfants, les adolescents et les jeunes adultes en sur poids. C'est

pourquoi on l'appelait souvent « diabète d'adulte ». Il dit non insulino-dépendant (DNID) ou diabète de la maturité (**Chiasson, 2004**). Qui associe d'une combinaison entre une résistance à l'insuline et une déficience en insuline. Ce type de diabète représente 95% ou plus de l'ensemble des cas de diabète recensés de par le monde. Le diabète de type 2 touche plus spécifiquement les gens dans les années les plus productives du cycle de vie. Les personnes concernées se soignent au moyen de comprimés, même si des injections d'insuline peuvent parfois s'avérer nécessaires. Le diabète de type 2 est l'une des principales causes de maladies cardiaques et d'autres complications. Des interventions simples et efficaces par rapport aux coûts peuvent empêcher ou retarder l'apparition de ce type de diabète (**CHENG, 2008**).

I.2.3. Diabète Type gestationnel:

Le diabète gestationnel (DG) est défini par l'OMS comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable (**Beucher, 2010**). qui apparaît ou qu'on remarque pour la première fois pendant la grossesse. La prévalence du DG varie d'une population à l'autre et reflète l'incidence sous-jacente du diabète dans la population (**Dubé M, 2011**). Le diabète gestationnel concerne au moins une grossesse sur 25 dans le monde. Faute de diagnostic ou de traitement adéquat, ce diabète peut avoir diverses conséquences : macrosomie, anomalies fœtales, taux plus élevés de mortalité maternelle et infantile. Les femmes atteintes de DG et les enfants nés d'une grossesse marquée par le DG risquent davantage que les autres de développer le diabète de type 2 au cours de leur vie (**Mbanya, 2011**).

I.2.4. Diabète Type MODY:

Le diabète Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) est une forme de diabète monogénique se caractérisant par une apparition typique avant l'âge de 25 ans, l'absence d'auto-immunité contre les cellules β du pancréas, une fonction préservée des cellules β et un mode de transmission autosomique dominant. Ce type de diabète constitue 2 à 5 % de tous les cas de diabètes, mais reste souvent non diagnostiqué (**Caironi, 2021**).

Selon l'anomalie génétique en cause, les spécialistes distinguent actuellement 6 types de diabètes MODY, numérotés de 1 à 6. Les six types de diabètes MODY : (**Estelle, 2021**).

Tableau I.1 : Différents types de diabètes MODY (Estelle, 2021).

Diabète MODY	Chromosome concerné	Gène muté
1	20	Hepatocyte Nuclear Factor-4-alpha
2	7	Glucokinase
3	12	Hepatocyte Nuclear Factor-1-alpha
4	13	Insulin Promotor Factor-1
5	17	Hepatocyte Nuclear Factor-1-beta
6	2	Neurogenic Differentiation Factor 1

Les 3 les plus fréquents sont causés par des mutations des gènes codant pour la glucokinase, HNF1 α et HNF4 α , qui représentent environ 80 % des cas de MODY. La réalisation d'un test génétique peut ainsi permettre de poser le diagnostic de MODY et mettre en place un traitement approprié (Caironi, 2021).

I.3. Physiopathologie :

Quel que soit le type, le diabète est caractérisé par une augmentation prolongée de la quantité de glucose dans le sang, celle-ci peut avoir plusieurs origines. Le diabète est défini par:

- Une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L ou 7,00 mmol/L à deux reprises.
- Ou par une glycémie casuelle supérieure à 2,00 g/L ou 11,10 mmol/L associée à un syndrome polyuro-polydipsique.
- Ou encore par une glycémie supérieure à 2,00 g/L deux heures après l'ingestion de 75 g de glucose per os dans le cadre d'une hyperglycémie provoquée orale (HGPO), mais la pratique de cet examen n'est plus recommandée en pratique clinique.

I.3.1. Diabète Type 1(DT1):

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune d'origine multifactorielle, ou facteurs génétiques et environnementaux contrôlent son apparition et son développement (Lebailly, 2015).

Le diabète de type 1 est dû à une destruction auto-immune des cellules insulinosécrétrices dites cellules β . L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 % à 20 % de cellules B fonctionnelles (Cissé, 2012).

La prédisposition au diabète de type I ne semble pas liée à une altération génique mais plutôt à l'association de formes alléliques normales de divers gènes, notamment les gènes complexe majeur d'histocompatibilité. Mais les individus prédisposés génétiquement au diabète de type 1 ne progressent pas tous vers la maladie. Le processus d'auto-immunité ne surviendrait chez ces sujets qu'à la suite d'un facteur déclenchant : infections virales congénitales, facteurs nutritionnels (Januel, 2003).

I.3.2. Diabète Type 2(DT2):

Le diabète de type 2 (ou DNID) est caractérisé par une altération de l'insulinosécrétion, et aussi par l'association de deux pathologies également importantes : d'une part, la résistance à l'insuline et d'autre part, un déficit sécrétoire de la cellule β qui ne peut pas faire à l'augmentation des besoins en insuline. Ces deux troubles sont présents d'une façon plus ou moins marquée mais toujours associée chez l'ensemble des diabétiques de type 2, toutefois, les troubles de l'insulino-sécrétion semblent être les premiers à apparaître dans le temps (Daubresse, 2004 ; Halimi, 2005). La première phase de la maladie consiste en une mauvaise efficacité de l'insuline sur la pénétration intracellulaire du glucose.

Le glucose s'accumule alors dans le secteur extracellulaire, entraînant une augmentation d'insuline en réponse à l'hyperglycémie. L'hyperinsulinisme induit ne permet cependant pas d'abaisser le seuil glycémique et conduit à une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline. Les besoins chronique accrus en insuline finissent par épuiser la cellule bêta et conduisent à leur destruction progressive, entraînant finalement une insulino- sécrétion (Halimi, 2005).

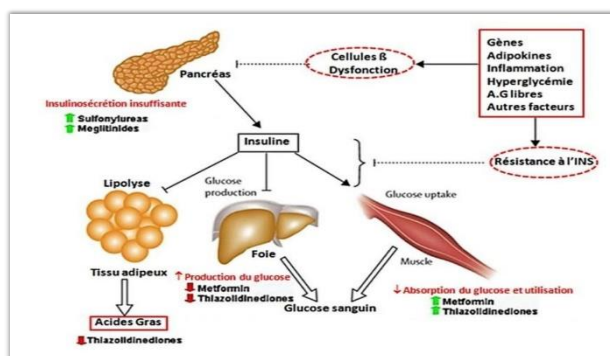


Figure I - 1 : Physiopathologie du diabète de type 2 (Matheus et al., 2013).

Le diabète de type 2 touche 4 principaux organes ; Le pancréas, le tissu adipeux, le foie et le muscle. Une dysfonction au niveau des cellules β engendre une sécrétion insuffisante de l'insuline (INS). Une altération au niveau du foie mène à une surproduction du glucose hépatique. Aux niveaux des tissus adipeux, on remarque une activation de la lipolyse menant à un taux anormal des acides gras (A.G). Une anomalie au niveau du muscle conduit à une diminution de l'absorption du glucose et de son utilisation. Tous ces facteurs mènent à une hyperglycémie.

I.3.3. Diabète Type gestationnel (DG) :

Ce type de diabète apparaît dans 1 grossesse sur 25, généralement entre la 24ème et la 28ème semaine d'aménorrhée. Il est associé à des complications :

- D'une part, pour la mère : hypertension artérielle, toxémie gravidique, pré-éclampsie, éclampsie.
- D'autre part, pour le fœtus : hypoglycémie, macrosomie fœtale (caractérisée par un poids de naissance supérieur à 4 kg), pouvant conduire à des complications lors de l'accouchement : détresse respiratoire, accouchement prématuré.
- De plus, cela prédispose la mère et l'enfant au développement d'un diabète de type 2 au cours de leur vie (**Buysschaert, 2012 ; Altman, 2012**).

I.3.4. Diabète Type MODY:

Le diabète MODY ou diabète monogénique du sujet jeune est une forme de diabète familial, à transmission autosomique dominante. On dénombre six sous-variantes génétiques du diabète MODY (de MODY 1 à MODY 6). En Europe, le type MODY 2 est le plus fréquent. Les types 1 et 3 sont les plus sévères en termes d'hyperglycémie. Dans leur expression clinique ces diabètes ressemblent au diabète de type 2 mais ils surviennent chez l'adulte jeune, avant 30 ans. Les diabètes MODY sont caractérisés par une déficience génétique primaire en insuline (**Buysschaert, 2012 ; Altman, 2012**).

I.4.Facteurs influençant :

I.4.1. Facteurs influençant le DT1 :

a. Facteurs environnementaux :

Il a été démontré que l'absence d'exposition à des organismes pathogènes au cours de la période d'enfance, limite la maturation du système immunitaire et augmente la susceptibilité à développer une maladie auto-immune (**Kukreja et Maclaren., 2002**).

b. Facteurs génétiques :

Plus de 20 régions différentes du génome humain représentent une certaine liaison avec le diabète de type 1 telles que la région codant pour le HLA sur le chromosome 6p21 et la région codant pour le gène de l'insuline sur le chromosome 11p 15 (gène appelé maintenant DSID2, ou en anglais IDDM2). Les types de HLA associés au diabète varient selon les populations étudiées (Arfa et al., 2008).

c. Facteurs immunologiques :

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune lente médiée par les lymphocytes T. Des études familiales ont prouvé que la destruction des cellules β par le système immunitaire (des autoanticorps dirigés contre le pancréas) se fait sur nombreuses années (Langlois., 2008).

L'hyperglycémie et les signes classiques du diabète n'apparaissent que quand 80% des cellules β ont été détruites (Dubois., 2010). Le DT1 peut être associé à d'autres affections auto-immunes dont des maladies thyroïdiennes, la maladie cœliaque, et certaines formes d'anémies (Carneir et Dumont., 2009).

d. L'infection virale :

Plusieurs virus (dont les virus coxsackie, de la rubéole, le cytomégalovirus, le virus EpsteinBarr et les rétrovirus) ont été associés au déclenchement du diabète de type 1. Les virus peuvent infecter les cellules bêta directement et les détruire ou susciter indirectement la destruction des cellules bêta en exposant les auto-Ag, en activant des lymphocytes auto réactifs, en simulant des séquences moléculaires d'auto-Ag qui stimulent une réponse immunitaire ou par d'autres mécanismes (Erika F. Brutsaert, 2020).

I.4.2. Facteurs influençant le DT2 :**a. Facteurs génétiques :**

L'évidence de l'implication des facteurs génétiques dans le déclenchement du diabète de type 2 a été démontrée par les études familiales : la concordance se situe entre 60 et 100% pour les jumeaux monozygotes. Elle est d'environ de 40% pour les individus apparentés au premier degré des sujets diabétiques de type 2 (Simonis-Bik et al., 2010).

b. Facteur de l'environnement :

L'obésité, en particulier l'obésité androïde, la sédentarité, le tabagisme et l'âge augmentent considérablement le risque de survenue du diabète de type 2 (Raverot, 2005).

c. Troubles de la sécrétion de l'insuline :

La sécrétion de l'insuline est assurée par les cellules β des îlots de Langerhans

pancréatiques. Dans les conditions physiologiques, la sécrétion de l'insuline est caractérisée par une cinétique dite biphasique (**Figure I - 2**).

Elle est stimulée par une augmentation aiguë et transitoire de la concentration extracellulaire du glucose. Le niveau maximum de la sécrétion est atteint au bout de quelques minutes (pic précoce). Lorsque la concentration élevée est prolongée, un deuxième pic apparaît (pic tardif). Cette phase dure tant que le stimulus reste appliqué (**Magnan et Ktorza, 2005**).

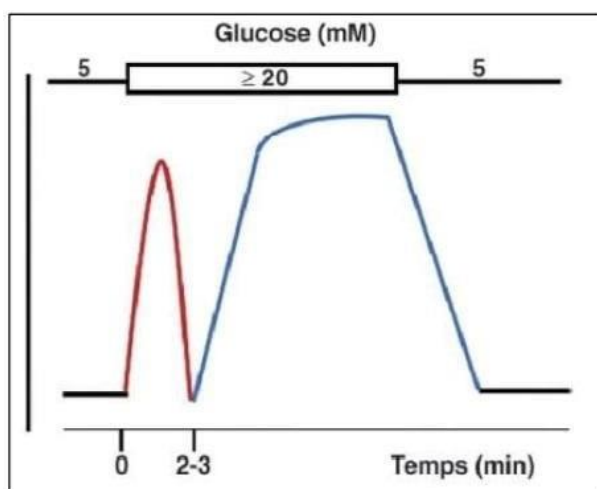


Figure I - 2 : Sécrétion biphasique de l'insuline en réponse à un stimulus constant en glucose (Magnan et Ktorza, 2005).

d. Troubles de la sensibilité à l'insuline :

La diminution des effets de l'insuline sur les tissus insulino-sensibles (tissus musculaires, tissus adipeux, foie) provoque une hyperproduction de glucose par le foie, expliquant l'hyperglycémie à jeun et une partie des hyperglycémies interprandiales (**Henri, 2011**). L'insulino-résistance est donc caractérisable au niveau des tissus périphériques, en particulier, du transport du glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux et de la production hépatique de glucose.

Cette insulino-résistance est aggravée par l'hyperglycémie et l'excès d'acides gras libres circulants ou de triglycérides stockés en excès dans le muscle. L'excès de la production hépatique de glucose est aussi majoré par les taux élevés d'acides gras circulants (**Halimi, 2006**).

I.5. Traitements du diabète:

Les traitements du diabète sont de deux types, les non médicamenteux (traitement hygiénodiététiques) et les médicamenteux (antidiabétiques oraux (ADO) et insulinothérapie). La recherche d'un équilibre glycémique optimal avec un taux de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) < 6,5 % repose sur les résultats de l'étude prospective britannique du diabète de type

2. Cette étude a montré que la réduction de l'hyperglycémie chronique, attestée par le dosage de l'HbA1c, permettait une diminution des complications, principalement microvasculaires et nerveuses, mais aussi cardiovasculaires (**Ukpds, 1998**).

I.5.1. Traitements non médicamenteux:

La réduction pondérale et la pratique régulière de l'activité physique (adaptée et contrôlée) ont un effet favorable sur le contrôle de la glycémie, ce dernier ayant un effet favorable sur l'insulinorésistance. Des mesures hygiéno-diététiques doivent être mises en œuvre dès que l'HbA1c est supérieure à 6. Une alimentation équilibrée est conseillée, avec une diminution des apports en graisses saturées, des sucres et de l'alcool. Une activité physique adaptée aux possibilités de chaque patient est recommandée chez le diabétique de type 2 (DT2) car elle contribue à une amélioration de la situation métabolique (insulinosensibilité, niveau glycémique, pression artérielle, profil lipidique etc...) et pourrait être utile pour le contrôle du poids (**ANAES, 2000**).

I.5.2. Traitements médicamenteux :

Les hypoglycémisants oraux sont nécessaires dès lors que la diététique et l'activité physique combinées ne suffisent pas, ce qui est habituel. L'objectif d'un traitement par les antidiabétiques est d'obtenir un taux d'HbA1c inférieur à 6,5% (**Christin-Maître, 2005**).

I.5.2.1. Antidiabétiques oraux (ADO) :

Ils ne sont utilisés qu'après échec ou insuffisance des mesures hygiéno-diététiques. La stratégie consiste en une monothérapie initiale adaptée au profil du patient qui, selon les résultats obtenus, sera progressivement majorée par une thérapie combinée (**Peter Riesch et al., 2002**).

Actuellement, on retrouve cinq classes d'agents antidiabétiques oraux que l'on divise en deux groupes : les hypoglycémisants et les antihyperglycémisants (**Levasseur et Patrick, 2003**).

A).Les hypoglycémiants (Augmenter la sécrétion d'insuline):

Les hypoglycémiants se divisent en deux classes : les sulfonylurées et les analogues des méglitinides. Ces médicaments agissent en stimulant la libération d'insuline préformée par le pancréas. La production endogène d'insuline n'est pas augmentée, mais sa sécrétion est accélérée. Ce mécanisme permet de renverser la sécrétion insuffisante d'insuline associée au diabète de type 2, mais ne permet probablement pas de diminuer la résistance à l'insuline (Levasseur, 2003).

- Les Sulfamides hypoglycémiants (SH ou Sulfonylurées): Qui stimulent la production d'insuline (Anca Nistone L., 2009).
- Les analogues des méglitinides (MGT) (répaglinide et natéglinide): Qui agissent comme les sulfonylurées (Slama G., 2010).

B).Les antihyperglycémiants (Augmenter la sensibilité à l'insuline):

Contrairement aux hypoglycémiants qui diminuent la glycémie, les antihyperglycémiants exercent leur action antidiabétique en empêchant la glycémie d'augmenter sans toutefois la faire chuter (Passa, 2002).

- Les biguanides (Metformine): Qui favorisent l'action de l'insuline en diminuant la production de glucose dans le foie (Philippe J., 2009).
- Thiazolidinedione (TZD) ou glitazones: Qui réduisent la résistance à l'insuline (Wens J., 2007).
- Les inhibiteurs des enzymes de l'absorption des glucides (Acarbose): L'alpha - glucosidase est une enzyme qui se trouve dans l'intestin grêle. Elle transforme les polysaccharides en monosaccharides. L'inhibition de cette enzyme ralentit la digestion des glucides et diminue leur absorption, aboutissant à une baisse des glycémies postprandiales et de l'HbA1c. Il existe peu d'effets secondaires et peu de contre-indications pour ces molécules (Fagherazzi-Pagel, 2002).

I.5.2.1.1. Mode d'action Acarbose:

Ce produit, récemment introduit en Amérique du nord, a peu d'effet sur la glycémie à jeun mais s'avère efficace pour réduire l'hyperglycémie postprandiale en Conformité avec son mécanisme d'action (Chiasson *et al.*, 2002).

L'acarbose est un oligosaccharide complexe qui agit comme un inhibiteur de plusieurs enzymes responsables de la dégradation des glucides complexes dans les intestins. Il inhibe à la fois l'alpha-amylase pancréatique et les alpha-glucosidases liées à la membrane - y compris

la glucoamylase intestinale, la sucrase, la maltase et l'isomaltase - qui sont responsables du métabolisme des amidons complexes et des oligo-, tri- et disaccharides en sucres simples absorbables. En inhibant l'activité de ces enzymes, l'acarbose limite l'absorption des glucides alimentaires et l'augmentation postprandiale subséquente des taux de glucose sanguin et d'insuline. L'acarbose est donc utilisé en conjonction avec le régime alimentaire, l'exercice et d'autres pharmacothérapies pour la gestion de la glycémie chez les patients atteints de diabète de type 2 (**DrugBank, 2022**).

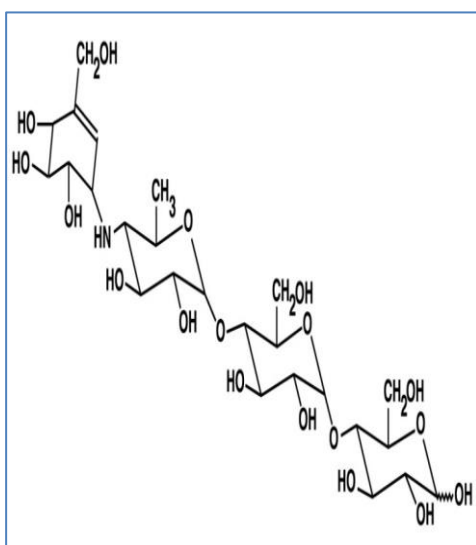


Figure I - 3 : Structure moléculaire (Higues, 2003).

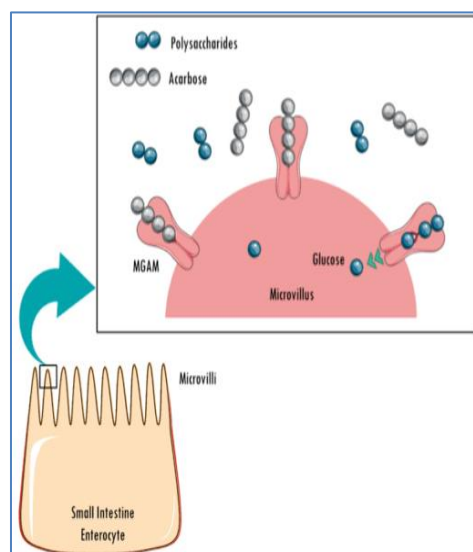


Figure I - 4 : L'inhibition de l'acarbose (compétitive de l'alpha glucosidase (MGAM) par l'acarbose (Bischoff, 1991).

I.5.2.2. Insulinothérapie :

En cas de diabète type 1. Le diabète type 2 peut être lui aussi traité à l'insuline, soit après échec du régime associé aux médicaments antidiabétiques oraux à dose maximale tolérée ; soit encore à l'occasion d'une grippe, d'une intervention chirurgicale ou d'autre stress et, dans ce cas, la mise à l'insuline est habituellement transitoire (**Simon D., 2005**).

Concernant les Types d'insulines il y a :

I.5.2.2.1. Les insulines rapides :

Elles débutent leur action environ quinze minutes après l'injection sous la peau et agissent pendant quatre à six heures. Ces insulines sont également appelées insulines ordinaires, Elles sont toutes limpides comme de l'eau. La libération est rapide mais de courte durée. Quant à leur durée d'action elle est « dose dépendantes », c'est-à-dire que la durée d'action, elle est mentie avec la quantité injectée (**Simon D., 2007**).

I.5.2.2.2. Les insulines retard :

Elles ont un début d'action plus tardif et un effet plus prolongé. Ces insulines ont toutes un aspect laiteux en raison de la présence des substances destinées à retarder la diffusion sous la peau. Lorsqu'on laisse ces flacons au repos pendant quelques heures, il est normal qu'il se produise un dépôt blanchâtre au fond du flacon. Ce dépôt correspond à des cristaux d'insulines ou aux substances à effet retard qui se trouvent dans le flacon. Avant de prélever l'insuline il faut toujours retourner plusieurs fois le flacon pour remettre en suspension « produit retard » qui s'est déposé au fond du flacon depuis la dernière injection (**Simon D., 2007**).

On dispose de deux sortes d'insulines à effet retard :

- Les insulines à durée intermédiaire :

Elles débutent leur action trente à quarante-cinq minutes après l'injection sous la peau, et agissent pendant dix à seize heures selon les insulines et selon les diabétiques (**Simon D., 2007**).

-Les insulines à durée prolongée :

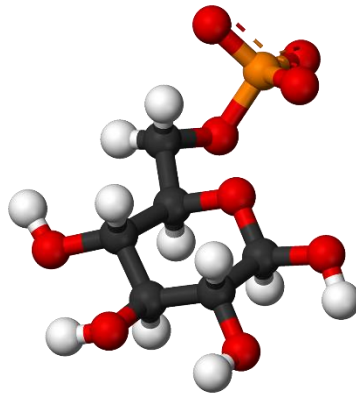
Elles débutent leur action une à deux heures après l'injection sous la peau, et agissent pendant vingt à trente-six heures selon les insulines et selon les diabétiques :

Ces insulines sont toutes de types zinc car la protamine ne permet pas d'obtenir une libération qui soit supérieure à une douzaine d'heures (**Simon D., 2007**).

Chapitre II:

Métabolisme

glucidique



II.1. Définition :

En 1850, Claude Bernard a créé le concept fondamental de la constance du milieu intérieur définie, quelques années plus tard, sous le nom d'Homéostasie. Ce terme se définit par la capacité, pour l'organisme, de maintenir ses paramètres physico-chimiques à des valeurs constantes malgré les contraintes qu'il subit.

Chez l'homme, la glycémie doit être régulée très finement de telle sorte qu'elle soit maintenue en alentour de 5,5 mmol.l⁻¹ (1 g.l⁻¹) afin de garantir un apport énergétique constant aux différents tissus. Trois organes vont principalement intervenir dans la régulation de l'homéostasie glucidique : le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. D'autres organes participent également à l'augmentation ou la diminution de la glycémie. C'est le cas, notamment du rein et de l'intestin qui sont capables de produire ce substrat énergétique. En période postprandiale (juste après un repas), l'augmentation du taux de glucose dans le sang entrainera l'activation de l'utilisation et du stockage de glucose sous forme de glycogène dans les muscles squelettiques et le foie, et sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. En revanche, en période de jeûne, la glycémie est maintenue stable par une augmentation de la production de glucose essentiellement au niveau du foie et, dans une moindre mesure, par le rein et l'intestin. Les flux entrants et sortants de glucose sont contrôlés par des régulations nerveuses et hormonales (Taveau, 2014).

II.2. Régulation glycémique :

L'homéostasie du glucose dépend de la balance entre les apports de glucose circulant provenant de l'alimentation et de la libération du glucose par le foie, et des besoins en glucose de l'organisme. Cette balance est régulée par un couple d'hormones secrétées par le pancréas endocrine : le glucagon, hormone hyperglycémiant capable d'augmenter la glycémie et de favoriser la lipolyse (destruction des acides gras), et l'insuline ayant un effet hypoglycémiant. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme, elle favorise l'incorporation du glucose dans les tissus cibles, sous forme de glycogène, afin d'éviter une hyperglycémie prolongée (Grise F., 2006).

L'insuline agit sur les cellules cibles en se fixant sur un récepteur spécifique à activité tyrosine-kinase. Ce récepteur est exprimé de façon ubiquitaire dans toutes les cellules de mammifères mais a des taux variables. L'insuline agit sur deux types de tissus cibles, les tissus périphériques qui comprend le foie, les adipocytes et le muscle squelettique, et sur le pancréas. La sous-unité β du récepteur porte l'activité tyrosine-kinase qui déclenche une voie de signalisation (cascade de phosphorylation) aboutissant à la phosphorylation de substrats

endogènes (Grise F., 2006).

II.3. Mécanismes de régulation glycémique postprandiale :

II.3.1. La captation de glucose :

Bien avant que le glucose puisse être utilisé ou stocké par les différents organes, ce dernier doit être assimilé en franchissant la membrane plasmique cellulaire. Toutefois, le glucose est une molécule hydrophile, polaire et de taille relativement importante l'empêchant de traverser librement la membrane plasmique des cellules. Son entrée dans la cellule sera alors facilitée par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques classés en deux catégories (Baly D.L. et Horuk R., 1988 ; Bell G.I. et al, 1990). Les co-transporteurs glucose/sodium (SGLT) et les transporteurs au glucose (GLUT).

✓ Les co-transporteurs glucose/sodium :

Les SGLT permettent le transport du glucose contre son gradient de concentration en couplant son entrée avec celle du sodium. Le taux de sodium entrant sera régulé par la présence d'une pompe ATPase Na^+ / K^+ située sur la membrane basolatérale. Il s'agit donc de transporteurs actifs secondaires fonctionnant comme des symports. Chez l'homme, il a été décrit la présence de 5 membres de la famille des SGLT permettant le transport du glucose et autres hexoses (Wright E.M. et al, 2011). Ces co-transporteurs sont notamment exprimés au niveau de la membrane apicale des cellules absorbantes de l'intestin (entérocytes) et au niveau des cellules épithéliales du tubule proximal du rein. Parmi ces membres, on retrouve le SGLT1 qui est présent dans les deux organes alors que le SGLT2 est présent uniquement dans le rein. Cependant, la réabsorption rénale de glucose se fait principalement par l'intermédiaire du SGLT2.

✓ Les transporteurs GLUTs:

Contrairement aux SGLT, les GLUT sont des transporteurs permettant le transport du glucose suivant son gradient de concentration par une diffusion facilitée ne nécessitant pas d'énergie. Cependant, certains d'entre eux peuvent transporter d'autres sucres tels que le galactose et le fructose. Bien qu'il ait été généralement considéré que ces transporteurs induisaient l'entrée du glucose dans la cellule, ils sont aussi capables de le faire sortir : une particularité favorable au foie pour la régulation de la glycémie. A ce jour, 14 membres de cette famille ont pu être identifiés (GLUT1 à GLUT14) et leur expression varie en fonction de l'espèce, du type tissulaire et cellulaire et ils disposent d'une sensibilité variable pour les stimuli (Uldry M. et Thorens B., 2004).

II.3.2. Le devenir du glucose:

Une fois que le glucose est entré dans les cellules, celui-ci va être métabolisé de différentes façons en fonction des besoins de l'organisme. Les voies métaboliques de la glycolyse et des pentoses phosphates permettront la production d'énergie, de coenzymes réduites et autres intermédiaires alors que celles de la glycogénèse et de la lipogenèse de novo favoriseront le stockage du glucose sous forme de glycogène et la synthèse de tryglycérides, respectivement. Quel que soit la voie empruntée par le glucose, celui-ci doit être transformé en glucose 6- phosphate (Taveau, 2014).

✓ La voie de la glycolyse :

Cette voie métabolique correspond en l'oxydation du glucose pour former du pyruvate. Cette oxydation progressive conduira à la production d'énergie sous forme d'ATP et de divers substrats en vue du stockage du glucose par la glycogénèse et la production de triglycérides par la lipogenèse. Tous les tissus sont capables d'utiliser le glucose comme source d'énergie. Effectivement, une molécule de glucose oxydée donnera naissance à deux molécules de pyruvate, d'ATP et de coenzymes réduites sous forme de NADH, H⁺. Ainsi, la glycolyse permet la production directe d'énergie sous forme d'ATP et indirecte sous forme de NADH, H⁺ qui sera réoxydé en NAD⁺ par la chaîne respiratoire mitochondriale, en condition aérobie et par la fermentation lactique en condition anaérobie. L'ATP sera utilisée pour des réactions endergoniques et le pyruvate sera entièrement oxydé dans la matrice mitochondriale par le cycle de Krebs. Les points clés liés à cette voie sont le taux de glucose capté par la cellule via les GLUT, la phosphorylation du glucose sur son carbone 6 par l'hexokinase, la conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate par la phosphofructokinase et la formation de pyruvate par la PhosphoEnolPyruvate kinase. Ces trois enzymes ont une régulation allostérique et leur synthèse est sous l'influence de l'insuline aussi bien dans le foie que dans le muscle (Printz R.L et al, 1993 ; Wu C et al, 2004) , (Figure II- 1).

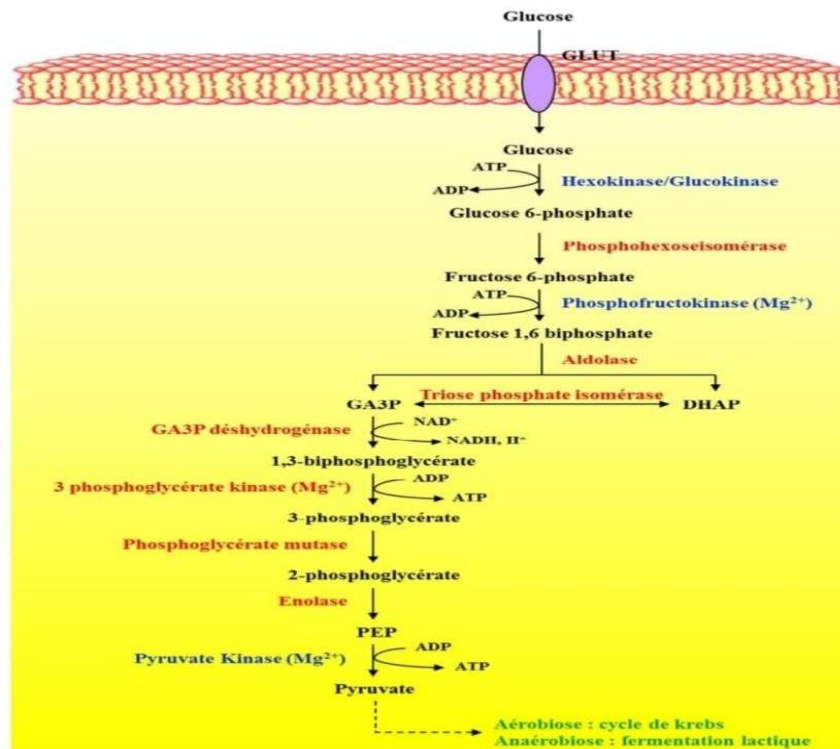


Figure II- 1 : La glycolyse (Taveau, 2014).

L'entrée du glucose par le transporteur GLUT conduit à son oxydation en glucose 6-phosphate et son intégration dans la voie de la glycolyse. Celle-ci formera au final du pyruvate qui rentrera dans le cycle de Krebs. GA3P : GlycérAldéhyde 3-Phosphate ; DHAP : DiHydroxyAcétone Phosphate ; PEP : PhosphoEnolPyruvate.

✓ La voie des pentoses phosphates :

Le pourcentage de glucose passant dans la voie des pentoses phosphates varie de 5 à 30% en fonction des tissus. Le flux maximal étant atteint dans les tissus capables de produire des acides gras et stéroïdes (foie, tissus adipeux ou encore la glande surrénale) et dans les hématies. Bien que son rôle soit de produire du Ribose 5-phosphate pour parfaire la synthèse

Des acides nucléiques, la voie des pentoses phosphates est également très utile pour générer le NADH, H⁺ (Bosca L. et al, 1985). La production de cette coenzyme réduite permet la synthèse des acides gras mais elle joue également un rôle antioxydant protégeant ainsi contre le stress oxydatif. Il est important de noter qu'au travers de cette voie, des substrats de la glycolyse sont produits, à savoir du fructose 6-phosphate et du GA3P. La voie des pentoses phosphates va permettre de dérouter l'oxydation du glucose, par la voie classique de la glycolyse, afin de produire des dérivés de la synthèse d'acides nucléiques et des coenzymes réduites.

✓ Stockage du glucose en glycogène:

La glycogénèse est le processus de synthèse du glycogène par l'assemblage de molécules de glucose. Cette forme de stockage se produit uniquement dans le foie et le muscle squelettique. La quantité de glycogène dépendant de la taille de l'organe, la glycogénèse est plus importante dans le foie que dans le muscle squelettique. Cependant, à l'échelle de l'organisme, la masse totale des muscles est nettement supérieure à celle du foie.

Ainsi, environ 65% du glycogène corporel est stocké dans les muscles. Dans cette voie métabolique et avant l'assemblage des molécules de glucose, le glucose sera transformé en glucose 6- phosphate par l'hexokinase/glucokinase. L'enzyme clé de cette voie métabolique est la glycogène synthase qui est activée par l'insuline (**Taveau, 2014**).

✓ Glucose et lipogenèse de novo :

La synthèse de lipides de novo est une voie métabolique qui conduit à la conversion d'un excès de carbohydrates en acides gras lesquels sont estérifiés avec le glycérol 3-phosphate pour former des triglycérides. Cette voie métabolique du glucose a lieu à la fois dans le tissu adipeux et le foie et lorsque les stocks en glycogène sont saturés (**Hellerstein M.K. et al, 1996**). Les différentes étapes conduisant à la formation de triglycérides sont illustrées ci-dessous (**Figure II- 2**).

L'activité de cette voie est fortement dépendante de l'état nutritionnel et il est maintenant bien établi que la transcription des enzymes lipogéniques nécessite de l'insuline et du glucose pour être pleinement réalisée (**Foufelle F. et Ferré P., 2002**). En effet, l'insuline régule non seulement le flux entrant de glucose par les GLUT (tissu adipeux) mais aussi l'activité des enzymes lipogéniques tels que la FAS (Fatty Acide Synthase) et l'Acétyl-CoA Carboxylase (tissu adipeux et foie) (**Clarke S. et Jump D., 1993 ; Girard J. et al, 1994**). Dans le foie, le pyruvate issu de la glycolyse peut être oxydé dans le cycle de Krebs mais aussi favoriser la lipogenèse (**Hers H.G. et Hue L., 1983**). Les gènes codant pour les enzymes de la lipolyse sont sous le contrôle de facteurs de transcription : SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein 1c) en réponse à l'insuline et ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) en réponse au glucose (**Foufelle F. et Ferré P., 2002 ; Dentin R. et al, 2005**). Les récepteurs X du foie (LXR : Liver X Receptor) sont également des facteurs de transcription activés par un ligand, appartenant à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux, et ils sont importants dans la régulation de la lipogenèse. LXR est un régulateur essentiel du contrôle transcriptionnel de SREBP-1c par l'insuline (**Chen G. et al,**

2004), des enzymes lipogéniques et de ChREBP (Decaux J.F. et al, 1989 ; Cha J.Y. et al, 2007).

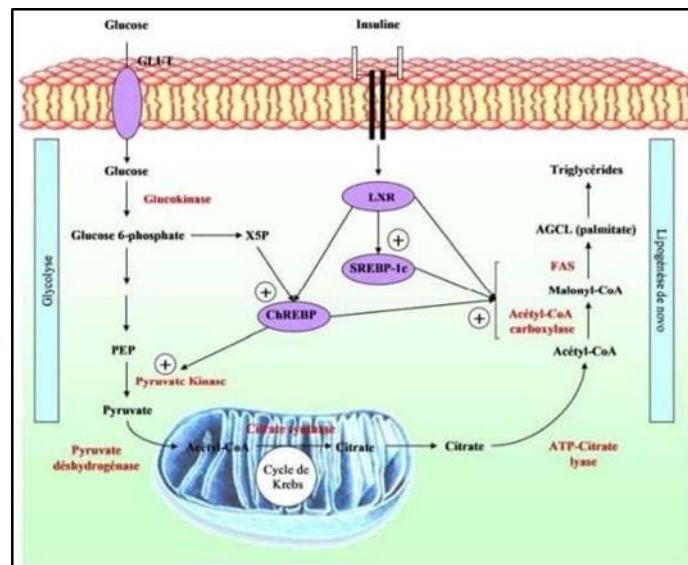


Figure II- 2 : Lipogenèse de novo et régulations transcriptionnelles (Taveau, 2014).

La conversion du glucose en acides gras, par l'intermédiaire de la lipogenèse, est sous le contrôle nutritionnel dont l'insuline et le glucose en sont des déterminants.

AGCL : Acides Gras à Chaine Longue ; ChREBP : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein ; LXR : Liver X Receptor ; PEP : PhosphoEnolPyruvate ; SREBP-1c: Sterol Response Element Binding Protein 1c.

II.4. La régulation hormonale de la glycémie :

❖ L'importance des hormones dans le contrôle du métabolisme glucidique :

L'insuline et le glucagon sont donc les hormones principales de la régulation du glucose sanguin. De plus, selon Lins et al en 1983, le ratio insuline / glucagon est crucial puisqu'une faible diminution de la concentration d'insuline rend le foie plus sensible aux effets du glucagon qui augmente la production de glucose se traduisant par une hyperglycémie, et ce, même avec une augmentation minimale de la glucagonémie (Annie Lé Gar., 2001).

• Rôle de l'insuline :

L'insuline est considérée comme la principale hormone pancréatique permettant de réguler finement la glycémie. Elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et stimule le stockage des lipides dans le tissu adipeux. L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante et elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (HACHIMI, 2021).

- **Le glucose, stimulus de l'insulino-sécrétion pancréatique :**

A la surface des cellules β pancréatiques est exprimé un transporteur au glucose non insulino-dépendant : GLUT2. Comme décrit précédemment, ce transporteur permet le transfert facilité du glucose depuis le compartiment sanguin vers l'intérieur de la cellule β . C'est la détection directe du glucose par le pancréas qui conduira à une augmentation de la sécrétion calcium dépendante de l'insuline. La première étape consiste en la métabolisation du glucose entrant afin d'augmenter le rapport ATP/ADP. Le taux élevé d'ATP intracellulaire entraînera la fermeture du canal K^+ sensible à l'ATP par fixation de l'ATP sur la protéine Kir 6.2 (**Cook D.L. et al, 1984**). La résultante est une dépolarisation membranaire de la cellule β suivie par l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (**Satin L.S. et Smolen P.D., 1994**). L'augmentation intracellulaire de calcium conduira à l'exocytose des vésicules contenant l'insuline par l'intermédiaire du complexe SNARE (**Henquin J-C., 2000**), (**Figure II- 3**).

- ✓ **Voies de signalisation de l'insuline :**

Une fois sécrétée dans la circulation systémique, les effets anaboliques de l'insuline résultent de sa liaison sur un récepteur spécifique situé, prioritairement, à la surface cellulaire de trois tissus cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux. Ce récepteur dispose d'une activité tyrosine kinase permettant son autophosphorylation suivie par la phosphorylation, sur des résidus tyrosines, de protéines substrats (IRS : Insulin Receptor Substrates) et de protéines adaptatrices de la famille SHC (src homologous and collagen protein) (**van Obberghen E. et al, 2001**). Les deux voies majeures de la signalisation sont celles de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) impliquée dans les effets métaboliques, et la voie des MAP kinases impliquée dans les processus de croissance, prolifération et de différenciation cellulaires. Le schéma 16 illustre la voie de signalisation passant par PI3K. La transmission du signal insulinémique dans la cellule met en jeu les IRS1 et IRS2 (**Yu, 2002**). Par l'intermédiaire de cette signalisation, l'insuline est capable d'induire la translocation du transporteur GLUT4 à la surface membranaire des cellules musculaires et adipocytaires (**Saltiel A.R. et Kahn C.R., 2001 ; Bryant N.J. et al, 2002**). Dans le foie, la voie insulinémique activera directement un ensemble de protéines et facteurs de transcriptions impliqués dans les voies métaboliques du glucose.

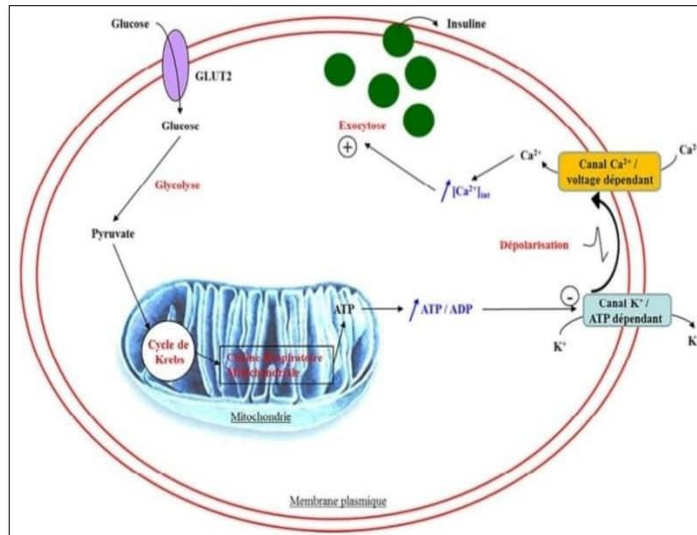


Figure II- 3: Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules β pancréatiques (Taveau, 2014).

Stimulation de la sécrétion d'insuline induite par l'entrée de glucose, l'inactivation des canaux K^+ sensibles à l'ATP et l'augmentation intracellulaire de calcium.

- **Rôle du glucagon :**

Le glucagon est sécrété par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas et il est un régulateur clé de l'homéostasie glucidique. L'administration exogène de glucagon conduit à une augmentation de la glycémie aussi bien chez l'homme que le rongeur (Young A.A. et al, 1993 ; Hvidberg A. et al, 1994).

- ✓ **Voies de signalisation de Glucagon :**

Le glucagon en se fixant sur son récepteur RCPG, associé à deux types de protéines G, stimule deux voies signalétiques :

Lié à la protéine G_s , le glucagon entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, induisant une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc et par conséquent, comme pour le récepteur V2 de la vasopressine, une stimulation de la PKA (Burcelin R. et al, 1996).

Lié à la protéine G_q , le glucagon favorise la voie de la PLC soit, comme pour les récepteurs de type V1 de la vasopressine, une augmentation du taux intracellulaire de calcium (Wakelam M.J. et al, 1986). Par cette voie de signalisation, le glucagon diminuerait l'activité de la pyruvate kinase (enzyme de la glycolyse).

D'un point de vue général, les effets du glucagon sont inverses à ceux de l'insuline. Le glucagon induit la phosphorylation de la phosphorylase kinase et de la glycogène synthase (activation de la glycogénolyse, inhibition de la glycogénèse), de la G6Pase et de la PEPCK

(activation de la néoglucogénèse) (Christ et al, 1988 ; Roach P.J., 1990 ; Bollen M. et al, 1998).

Le glucagon permet également de phosphoryler la phosphofructokinase II entraînant une réduction du taux de fructose 2,6-biphosphate et par conséquent lève l'inhibition exercée sur la F-1,6 BPase. In fine, il favorise la néoglucogénèse (Okar D.A. et Lange A.J., 1999). En même temps, le glucagon inhibe l'activité de la phosphofructokinase I et par conséquent inhibe la glycolyse. Il a également été démontré, au cours d'un long jeûne, que le glucagon favorisait la néoglucogénèse rénale et intestinale (Mutel et al, 2011), (Figure II- 4).

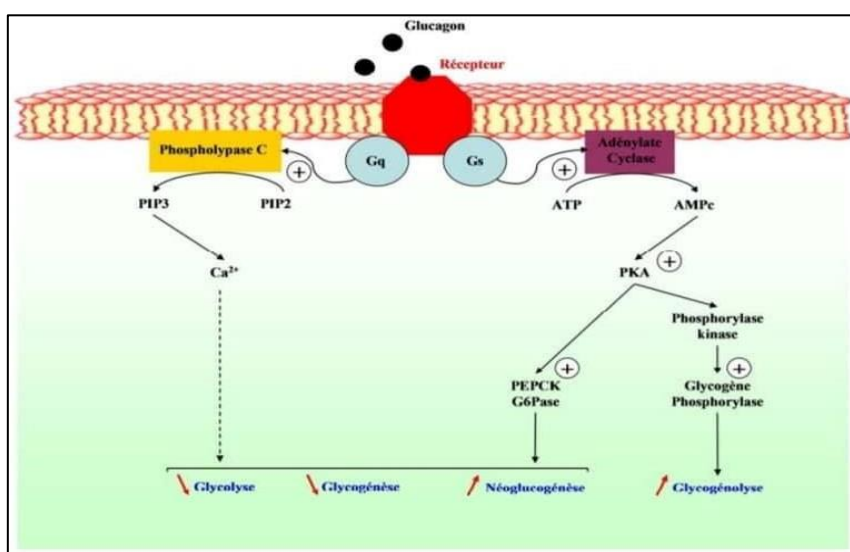


Figure II- 4 : Rôles physiologiques du glucagon (Taveau, 2014).

Suite à la stimulation de son récepteur, le glucagon favorise la production de glucose en faisant intervenir deux voies de signalisation : la voie PKA et la voie PLC.

II.5. La régulation enzymatique de la glycémie :

Les enzymes sont les outils clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines, en industries agroalimentaires (industries laitières, biscuiteries, charcuterie, pâtisserie...), en industries chimiques (détergents et textiles), en clinique (enzymes réactifs, enzymothérapies par des protéines recombinantes), dans la recherche (protéomique et en génomique) et autres. Parmi ces enzymes qui ont une grande importance dans différents domaines on trouve les α -amylases et les α -glucosidases (Gupta, 2003).

II.5.1. L'alpha amylase:

a. Définition :

L' α -amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe

des protéines globulaires (**Nouadri, 2011**). Elle est une enzyme ubiquitaire, synthétisée chez tous les êtres vivants (**Merabti, 2006**). C'est une endo-enzyme, de masse moléculaire comprise entre 40 et 70 kDa (**Panchal, 1990**), qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4) de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines (**Kelly et al., 1997**).

b. Nomenclature :

Le (**Tableau II.1**), récapitule les différentes nomenclatures d' α -amylase.

Tableau II.1: Différentes nomenclatures d' α -amylase (**Mercier, 1985**).

Nom systématique	α (1 - 4) D-glucane glucanohydrolase
Non codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase.
Synonymes	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

c. Types :

Plusieurs types d'amylase existent, alpha (3.2.1.1), bêta (3.2.1.2) et gamma (3.2.1.3) (**Yamamoto, 1995**). La bêta- amylase et la gamma-amylase (glucoamylase) sont généralement d'origine végétale ou microbienne quoique la glucoamylase ait été retrouvée chez certains mammifères ou espèces aquatiques (**Shetty, 2006**).

d. Lieu de synthèse :

Chez l'homme, l'amylase est largement présente dans les sécrétions salivaires (amylase S) et pancréatiques (amylase P). Les amylases humaines S et P sont codées par les gènes Amy 1 et Amy 2A, respectivement, qui sont situés sur le chromosome 1 (**Nishide et al., 1986 ; Horii et al., 1987 ; Tricoli et Shows, 1984**).

L'amylase humaine S est constituée principalement de deux familles ; Les amylases de la famille A sont des protéines glycosylées de 62 kDa, alors que les amylases de la famille B sont des protéines non glycosylées de 55 kDa (**Karn et Malacinski., 1978**).

e. Structure :

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 3 domaines globulaires (**Nouadri, 2011**). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes

(Figure II-5). La partie glucidique est formée essentiellement de maltose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (Chiba, 1988 ; Nouadri, 2011).

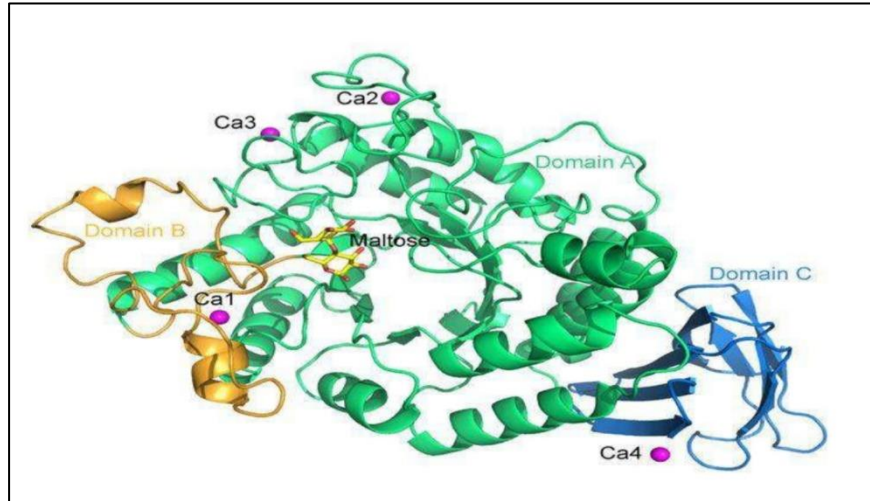


Figure II- 5 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase (Kraulis, 1991).

L' α -amylase fongique, comportant trois domaines globulaires (A, B, et C). Le domaine A (couleur verte), forme un tonneau (β / α) 8 feuillets et porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β .

Le domaine B (couleur jaune), forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de « couvercle ». Quant au domaine C (couleur bleue), il constitue un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles et l'ion de calcium (sphère violet) (Benaouida, 2008).

f. Caractéristiques physicochimiques d' α - amylase :

• Spécificité de substrat:

Le substrat naturel de l' α -amylase est l'amidon (Pandey *et al.*, 2000 ; Alais *et al.*, 2008). Dans la molécule d'amidon, les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques α (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques α (1-6) (Mercier, 1985). La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. Et *Penicilium* sp.) est contrôlée par l'amidon ;

Il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (Leveau et Bouix, 1993; Nouadri 2011).

• Poids moléculaire :

Le poids moléculaire des α - amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à

l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (**Schomburg et Salzmann, 1991**). Celui des α -amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (**Panchal, 1990**).

• **pH optimale :**

L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme (**McMahon et al., 1999**). Selon Kindle, (1983), l'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes, ont un optimum supérieur à la neutralité, alors que les fongiques, ont des pH optimum compris entre 4 et 6 (**Larpent et al., 1992**). Pour les levures, l'enzyme requiert selon les espèces des pH entre 4 et 6 (**Panchal, 1990** **Avwioroko, 2015**).

• **Température optimale:**

Selon l'origine et les espèces, les alpha amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C (**Schomburg et Salzmann, 1991**). En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputé pour sa grande thermostabilité, celle de *Bacillus amyloliquefaciens* est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l'optimum de l'alpha amylase fongique se situe entre 50°C et 70°C (**Sicard, 1982 ; Panchal, 1990**).

• **Effecteurs:**

Toutes les L'alpha amylases, exigent la liaison à au moins un ion calcium, pour le maintien de leur intégrité et leur stabilité structurale (**Vallee et al., 1959, Steer et Levitzki, 1973**). Cependant, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur (**Boel et al., 1990**).

g. Le rôle d'alpha-amylase:

L'hydrolyse de l'amylose abouti à la formation du maltose puis ce dernier sera hydrolysé à son tour.

L'hydrolyse de l'amylopectine se déroule en deux étapes ; La formation du glucose, maltose, et alpha dextrine, ces dernières possèdent au minimum 4 molécules de glucose et présentent des liaisons glycosidiques alpha (1-6) ensuite l'hydrolyse lente des dextrines. (**Fogarty et Kelly, 1994**). L'hydrolyse enzymatique de l'amidon permet non seulement d'avoir des composés purs mais aussi par un choix judicieux de l'enzyme ; une gamme de produits aux propriétés physicochimique bien caractérisées.

L'alpha amylase est une endoamylase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons glucosidiques alpha (1 – 4) de l'amylose et l'amylopectine, elle n'est pas capable de dégrader les liaisons alpha (1-6) et s'arrête jusqu' où elle rencontre une ramification. Les produits finaux de l'action des α -amylases sont des oligosaccharides qui constituent un mélange de maltose, et oligosaccharides ramifiée de 6-8 unités de glucose qui contiennent à la fois des liaisons α -(1,4) et α -(1-6) (**van der Maarel et al ; 2002**). L'action conduit à une diminution de la viscosité de la solution. Elles sont utilisées dans la phase initiale de l'hydrolyse ou liquéfaction.

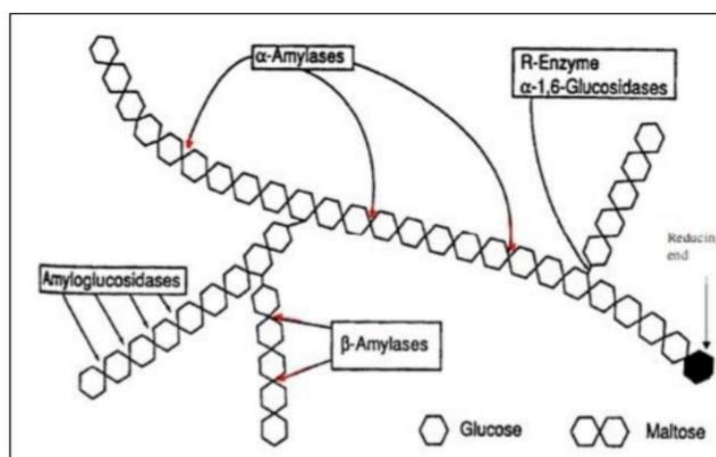


Figure II- 6 : La digestion enzymatique de l'amidon (Tormo et al., 2004).

h. Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (**Park et al., 1997**). Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (**Mazur et Nakatani, 1993 ; Nielson et al., 2001**).

Attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (**Park et al., 1997**). Ce mécanisme est une

caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (**Mazur et Nakatani, 1993 ; Nielson et al., 2001**).

- **Attaque aléatoire:** l' α -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments, qui seront séparément attaqués.
- **Attaque préférée:** l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- **Attaque répétitive ou multiple:** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (**Berry et Paterson, 1990 ; Scriban, 1999**).

Fogarty et Kelly (1980), signalent que les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium, vu la nécessité des ions calcium à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de ces enzymes.

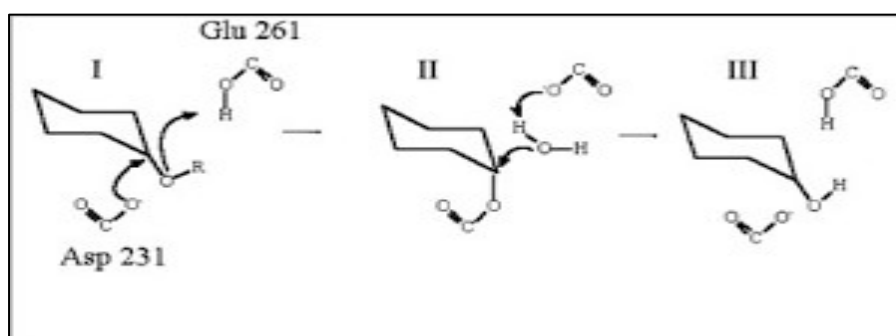


Figure II- 7: Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (**Nielsen et al., 2001**).

II.5.2. Alpha-glucosidase:

D'après la nomenclature IUPAC-IUBMB, les α -glucosidases (EC 3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase) sont définies comme des exo-glycosidases catalysant majoritairement l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glucosidiques d'un substrat (comme chez les malto-oligosaccharides ou le glycogène par exemple) pour libérer un α -D-glucose. Elles peuvent également catalyser des réactions de trans-glycosylation pour synthétiser des composés α -D-glucosylés (**Kato et al., 2002 ; Ferrer et al., 2005 ; Seo et al., 2011**). L'activité de trans-glycosylation des α -glucosidases est utilisée dans l'industrie pour produire des oligosaccharides et des sucres conjugués dans le but d'améliorer leurs propriétés chimiques et leurs fonctions physiologiques (**Kren & Martinkova, 2001 ; Murata & Usui, 2006**). Ces enzymes sont retrouvées dans six familles différentes de glycoside hydrolases répertoriées dans la base de données CAZy : GH4, 13, 31, 63, 97 et 122 (**Comfort et al.,**

2008), (Figure II- 8).

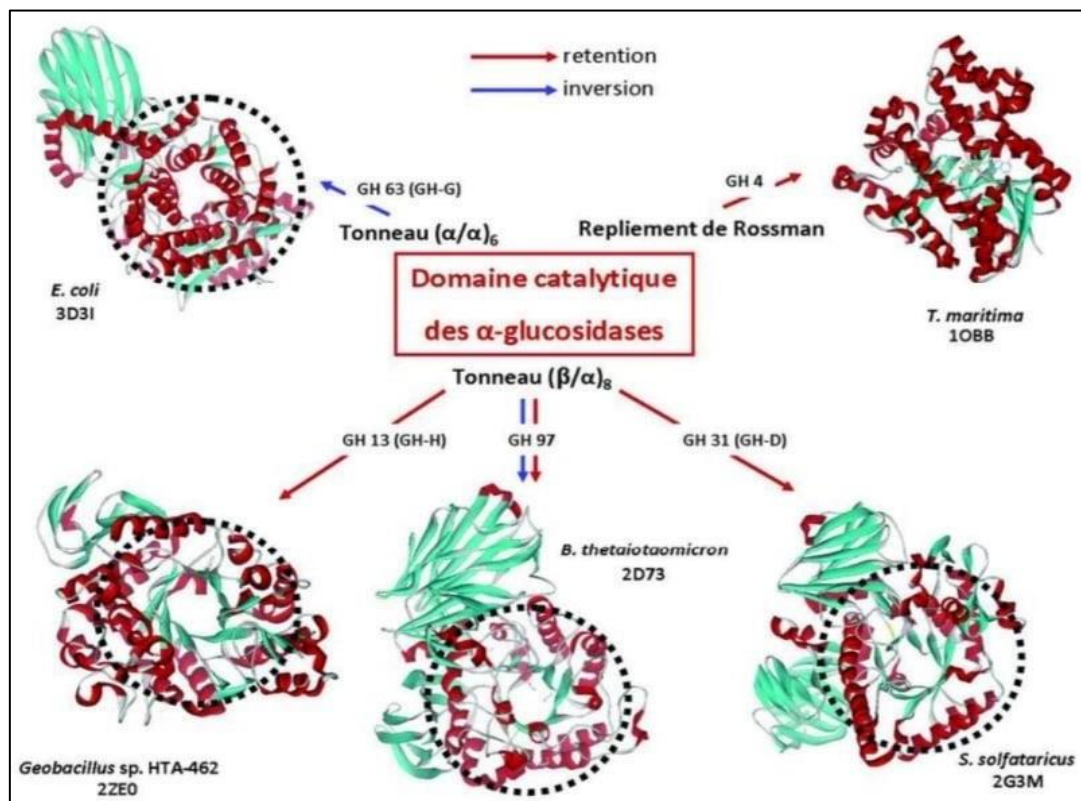


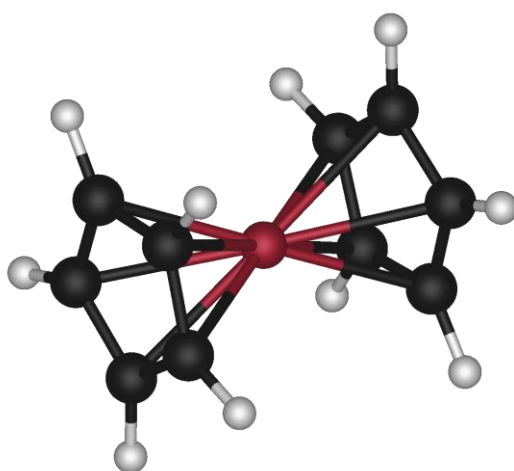
Figure II- 8: Représentations en ruban des repliements du domaine catalytique chez les différentes familles de GH où sont retrouvées les α -glucosidases (EC 3.2.1.20) (Dejob, 2013).

Les flèches rouges et bleues indiquent selon quel mécanisme les différentes familles agissent.

Chapitre III :

Chimie de

Ferrocène



III.1. Histoire :

En Angleterre, plusieurs chimistes avaient remarqué, au tournant des années 50 et même avant, cette poudre orangée très stable qui se formait quand on faisait circuler le cyclopentadiène dans des tuyaux en fer ; certains en avaient même rempli des pots dans leurs laboratoires. Keally, Pauson et Miller publient le produit en 1951. Dans un article au journal nature, Pauson reporte la structure $[\text{Fe}(\sigma\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$. Ce faisant, il commet à peu près la même erreur que Hein avec le polyphénylchrome, 32 ans plus tôt. Mais, entre-temps, son compatriote Sidgwick a publié la règle des 18 électrons pour les complexes de transition dans son ouvrage «The Electronic Theory of Valency » (**Cornell University, Ithaca, 1927**). La structure du bis-cyclopentadiényle-fer de Pauson ne comporte que 10 électrons de valence sur le fer : elle ne fera pas long feu. A Harvard, Wilkinson et Woodward ne semble pas ignorer la règle de Sidgwick et ont tout de suite compris que cette formulation n'était pas la bonne. Quelques mois plus tard, ils publient, peu avant Fischer à Munich, la première structure sandwich : le di-cyclopentadiényle-fer est le ferrocène, un complexe à 18 électrons dans lequel les deux cycles sont parfaitement parallèles, π -liés au fer et possèdent des propriétés aromatiques (1952) (**Benabdesselam, 2017**).

III.2. Définition:

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il se présente sous forme d'un solide orange avec une odeur caractéristique, (**Figure III- 1**) (**Ghallab, 2014**).

Il fait partie de la famille des métallocènes, un type de composé organométallique composé de deux cycles pentadiényles entourant un centre métallique. Ils sont aussi appelés composés sandwich. La croissance rapide de chimie organométallique est souvent attribuée à l'excitation résultant de la découverte du ferrocène et de ses nombreux analogues. (**Khelef, 2014**).



Figure III-1: Ferrocène sous forme de poudre orange
(Zayya et al., 2013).

III.3. Structure électronique du ferrocène:

L'atome central de fer dans le ferrocène est normalement considéré comme étant dans l'état d'oxydation +2 (ceci peut être montré en utilisant la spectroscopie de Mossbauer). Chaque anneau de cyclopentadiényle est ensuite attribué une seule charge négative - cet électron supplémentaire occupe une π orbitale, ce qui porte le nombre d'électrons- π sur chaque anneau à six, et les rend ainsi aromatiques. Ces douze électrons (six de chaque anneau) sont ensuite partagés avec le métal par liaison covalente, ce qui, combiné avec les six d'électrons de Fe^{2+} , donne au complexe une configuration d'électrons à gaz inerte de 18 électrons. Cette configuration rend le ferrocène particulièrement stable (Monte, 2006).

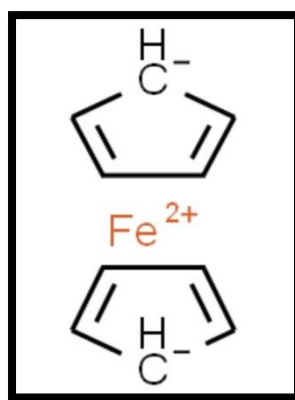


Figure III- 2 : Structure électronique du ferrocène (Chemspider, 2021).

III.4. Processus chimique de synthèse de ferrocène:

L'acidité du cyclopentadiène est suffisante pour réagir avec l'hydroxyde de sodium dans le DMSO et produire l'anion cyclopentadiényle. Le DMSO est un solvant dipolaire aprotique exaltant la basicité de l'ion OH^- en solvatant très efficacement le contre-ion Na^+ .

Une amine suffisamment basique comme le diéthylamine peut être utilisée pour former l'ion cyclopentadiényle à partir du cyclopentadiène (Khalef, 2012).

III.4.1. Réaction du cyclopentadiénylthallium avec le chlorure ferreux:

Le cyclopentadiénylthallium peut être utilisé également comme un produit de départ pour la préparation du ferrocène (Medellel, 2017).

III.4.2. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux:

Le réactif de Grignard du cyclopentadiène, intermédiaire facilement obtenu, a été utilisé par Kealy et Pauson pour leur préparation historique du ferrocène. Cette technique a été développée par Pauson en 1955.



Le succès de cette méthode est dû à la solubilité du chlorure ferrique dans les solvants organiques. Aucune réaction ne se produit si l'halogénure ferreux est insoluble dans le solvant, mais des rendements élevés de ferrocène sont obtenus si l'ion ferreux est "solubilisé" par chélation, comme dans le complexe d'acétylacétone-dipyridine. Dans la réaction de Grignard, un excès du réactif est nécessaire.

Plusieurs autres méthodes de synthèse du ferrocène ont été proposées. Il peut être préparé par réaction directe du cyclopentadiène avec le fer métallique, par la réaction du chlorure ferreux avec le cyclopentadiényle de sodium dans un solvant d'ammoniaque et la réaction du cyclopentadiène avec le complexe ferreux d'acétylacétone-dipyridine (**Bechki, 2012**).

III.5. Réactivité :

Les ferrocènes substitués peuvent être préparés directement ou indirectement. Dans la préparation indirecte, la molécule de ferrocène est utilisée comme un point de départ pour la synthèse des autres dérivés ferrocéniques, tandis que dans la synthèse directe, le ferrocène substitué est préparé par la réaction d'un composé dérivé de cyclopentadiène convenablement substitué avec le fer par des méthodes semblables à celles utilisées pour la préparation du ferrocène lui-même. Seulement, les bases fortes telles que le réactif de Grignard, les organothalliums, les réactifs de lithium ou de sodium, peuvent donner de bons rendements de dérivés ferrocéniques à partir de cyclopentadiènes substitués (**Khelef, 2014**).

III.5.1 Réaction de substitution:

Les propriétés semblables entre le ferrocène et le benzène ont contribué au développement de la chimie de cette nouvelle molécule, et ont facilité la réalisation d'une grande variété de réactions de substitution sur le ferrocène. Le mécanisme des réactions de substitution sur le cycle pentadiényle repose sur la formation directe d'un complexe sigma sans participation du métal. Deux mécanismes sont proposés (**Walker, 1983**).

Mécanisme (I) : il comporte un processus en deux étapes. La première est une étape rapide où l'électrophile E détruit la liaison métal-carbone dans une réaction de SE₂ avec la conservation de configuration, suivie d'une limitation de vitesse d'enlèvement du proton à partir de l'extérieur de la molécule, la deuxième étape est une réaction d'inversion SE₂.

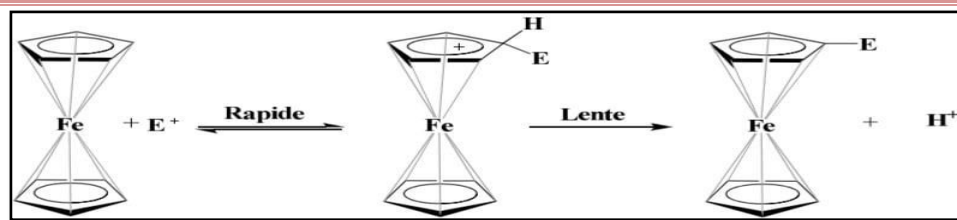


Figure III-3: Mécanisme (I) de réactions de substitution sur l'anneau pentadiénylique (formation d'un complexe sigma).

Mécanisme (II) : ce mécanisme comporte une limitation de vitesse de l'attaque par l'électrophile à partir de l'extérieur dans un déplacement SE2 avec une inversion de la configuration, suivie du départ rapide d'un proton de l'intérieur, avec la conservation de la configuration.

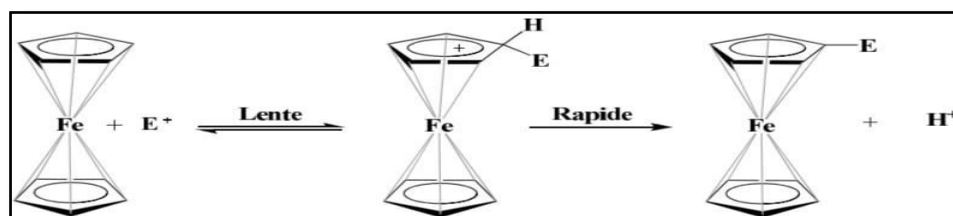


Figure III-4: Mécanisme (II) des réactions de substitution sur l'anneau pentadiénylique (formation d'un complexe sigma).

III.5.2. Réaction d'oxydation :

Le ferrocène est oxydé à l'ion ferrocénium par une large gamme d'agents d'oxydation. Au cours de cette oxydation, l'atome de fer qui peut être considéré formellement à l'état de Fe(II) dans le ferrocène, est oxydé à l'état de Fe(III). Ceci peut se produire même lorsque l'air est passé à travers une solution de ferrocène à faibles valeurs de pH. Cette oxydation oriente les tentatives de nitration ou d'halogénéation du ferrocène en employant l'acide nitrique ou le brome respectivement. Ainsi, la molécule du ferrocène porte une charge positive et résiste à toute attaque électrophile.

De nombreuses études sur l'oxydation contrôlée du ferrocène et ses dérivés ont été rapportées (**Farrugia, 1998 ; Trueblood, 1996**). Afin de diminuer la conversion du ferrocène et de ses dérivés en ion ferrocénium relativement instable et non réactif, la plupart des réactions doivent être réalisées sous une atmosphère inerte.

Le ferrocène peut exister sous d'autres formes d'oxydation. Ces différents états redox se caractérisent électrochimiquement par voltamétrie cyclique, chaque vague correspondant à un changement d'un degré d'oxydation. La forme de la vague montre que le transfert d'un électron est réversible sans variation structurale.

III.5.3. Réaction avec les électrophiles :

Le ferrocène se comporte comme la plupart des aromatiques, permettant la synthèse de dérivés substitués. Une expérience classique de démonstration est une réaction de FriedelCrafts avec l'anhydride acétique en présence d'acide phosphorique comme catalyseur. En présence de chlorure d'aluminium, Me_2NPCl_2 et le ferrocène réagissent pour donner la ferrocenyl dichlorophosphine alors que le traitement avec la phenyldichlorophosphine dans les mêmes conditions conduit à la P,P-diferrocenyl-P-phenyl phosphine. (Khelef, 2014).

La (**Figure III-5**) représente les Principales réactions du ferrocène avec les électrophiles.

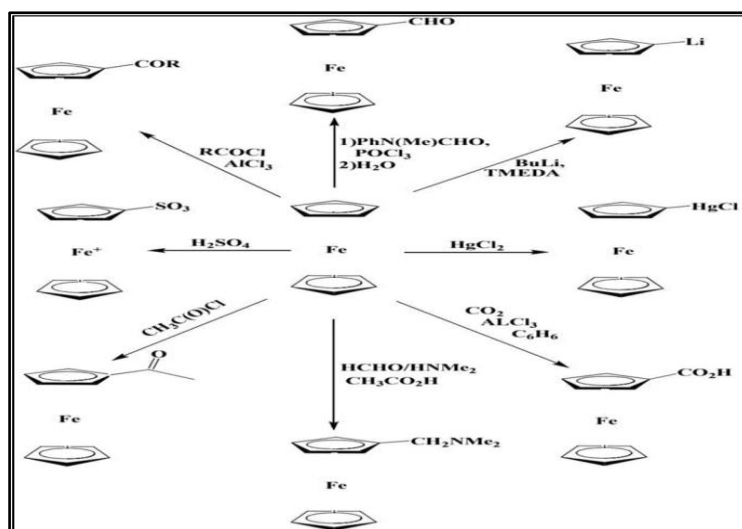


Figure III-5: Principales réactions électrophiles de ferrocène (Chemspider, 2021).

Les dérivés N,N-dialkylaminométhylferrocènes, tels que Le N, N diméthylaminométhyl ferrocène sont parmi les intermédiaires les plus utilisés pour la synthèse des ferrocènes substitués. L'iodure de ferrocénylméthyltriméthylamonium est employé comme un produit de départ pour la préparation d'un grand nombre de dérivés ferrocéniques monosubstitués.

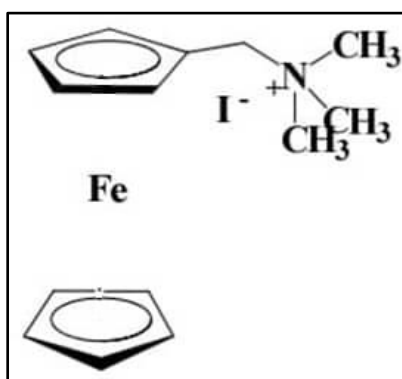


Figure III-6: Structure de ferrocénylméthyltriméthylamonium (Chemspider, 2021).

Le groupement triméthylamine dans le sel ferrocénylméthyltriméthylamonium (**Figure III-6**), peut être facilement substitué par les nucléophiles, tels que des anions d'alcoide et de cyanures, des réactifs de Grignard, des réactifs carbanioniques et des amines comme le montre le (**Figure III- 7**).

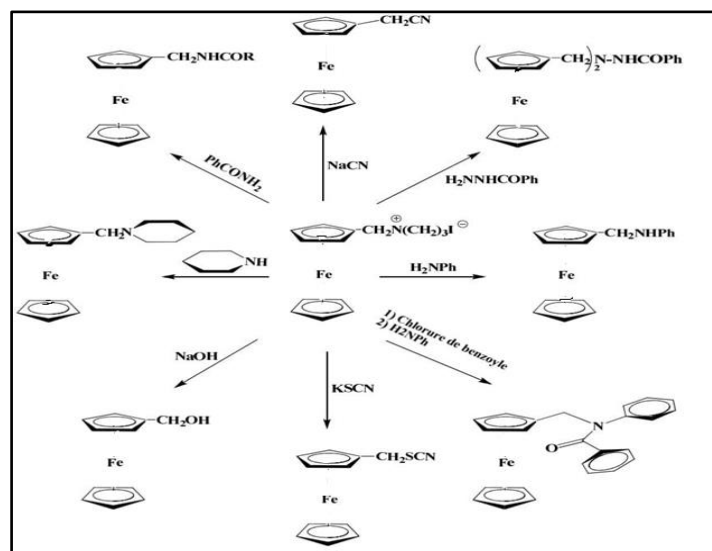


Figure III- 7 : Réactivités du sel ferrocénylméthyltriméthylamonium (**Khelef, 2014**).

III.6. Propriétés de ferrocène:

III.6.1. Propriétés électrochimiques:

Beaucoup d'études et des analyses par des méthodes électrochimiques ont été effectuées sur les propriétés oxydo-réductrices de ferrocène. D'une manière générale, le comportement cathodique habituel de ferrocène en milieux organiques tel que le dichlorométhane, l'acétonitrile et le DMF peut être décrit par une réduction réversible à un électron, conduisant à l'ion ferrocérium (**Khelef, 2014**).

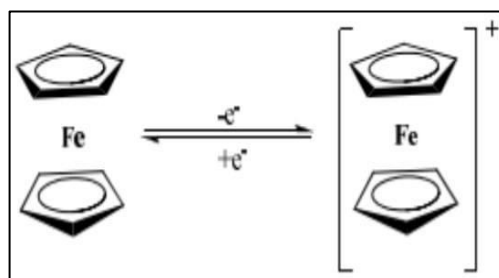


Figure III- 8 : Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène (**Neghmouche et al, 2010**).

La réversibilité de la réaction d'oxydoréduction a été démontrée par voltamétrie

cyclique, les paramètres électrochimiques tirés de voltammogramme de ferrocène montrent que le processus d'oxydoréduction se fait d'une façon rapide, réversible et monoélectronique (Khelef, 2014).

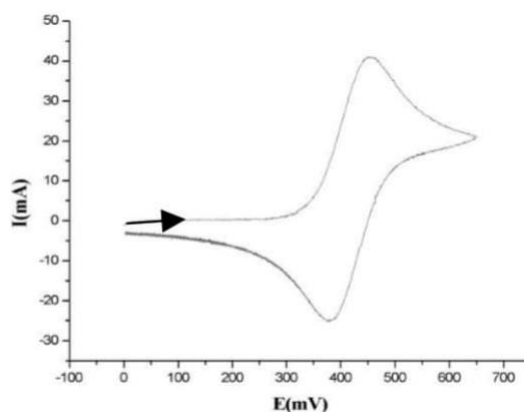


Figure III-9: Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10^{-3} M en présence de tétrabutylammonium perchlorate 10^{-1} M à $V = 100$ mV/s (Bechki, 2012).

Les valeurs des paramètres électrochimiques tirées de voltammogramme de la (Figure III-9), sont regroupées dans le (Tableau III.1). Ces valeurs renseignent sur les critères de rapidité et de réversibilité (Khelef, 2014).

Tableau III.1 : Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène

(Khelef, 2014).

E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	I_{pa} ($\mu A/cm^2$)	I_{pc} ($\mu A/cm^2$)	$E_{1/2}$ (mV)	ΔE_p (mV)
439	362	16.9	-16.69	380	77

III.6.2. Propriétés chimique :

Le ferrocène est insoluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques. Il est très stable thermiquement et peut être facilement fonctionnalisé de manière très variée. Dès lors, ces nouveaux dérivés organométalliques ont trouvé des applications pratiques en catalyse, science des matériaux et plus récemment en chimie domaine d'électrochimie, ses propriétés d'oxydo-réduction font du ferrocène un bon électron, caractère qui s'amplifie avec

l'alkylation du cycferrocèneperméthylé une espèce très sensible à l'oxydation (Boudebis, 2017).

III.6.3. Propriétés physique:

Le ferrocène est un solide cristallin orange, de masse molaire 186,04 g.mole⁻¹, stable à l'air son point d'ébullition 249°C et son point de fusion 173-174 °C. le ferrocène est soluble dans la plupart des solvants organiques, sa solubilité dans l'eau est d'environ 0,1 mg/ml à 21°C, 100 mg/ml dans le DMSO à 19.5°C. Il est stable à haute température, jusqu'à 400°C. A température ambiante, le ferrocène est le plus stable des métallocènes, d'une odeur de camphre. Les études ont montré qu'il est sensible à l'exposition prolongée à l'air et à la lumière. Le ferrocène forme avec l'acide nitrique dilué et l'acide sulfurique concentré des solutions rouge foncé avec une fluorescence bleue (Khelef, 2014).

III.6.4. Structure Cristalline:

La structure cristalline de ferrocène a été étudiée par Wilkinson et *al.* par diffraction des RX. C'est grâce à ces analyses que les longueurs des liaisons C-C C-Fe, et C-H ont été déterminés exactement (Khelef, 2014).

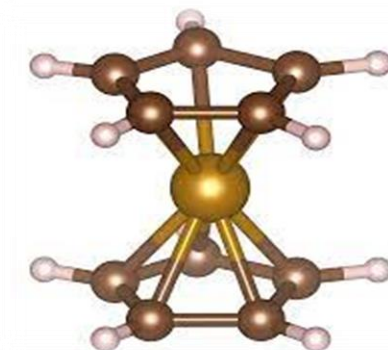


Figure III-10: Structure cristalline de ferrocène (Appel, 2015).

III.6.5. Chimie médicinale de ferrocène:

Le ferrocène a attiré une attention particulière car il offre des propriétés attrayantes telles que la neutralité, la lipophilie, de bonnes propriétés redox, une stabilité chimique et une faible toxicité. De nombreux composés ferrocéniques présentent une fascinante activité antibactérienne antifongique, DNACleaving, cytotoxiques et l'activité antitumorale. L'utilisation du ferrocène dans la chimie médicinale est un domaine de recherche vigoureux, certains dérivés du ferrocène sont très actifs dans les dosages *in vitro* et *in vivo* (Sansook, 2017).

III.6.5.1. Antibactériennes:

Depuis quelques décennies, la chimie du ferrocène a eu un impact énorme dans de nombreux applications tels que : les applications pharmaceutiques (fabrication des médicaments tels que : La Pénicilline, Céphalosporine, et Réfamycines), les applications thérapeutiques, la lutte contre certaines bactéries. Une des premières applications dans ce domaine, fut le développement de dérivés ferrocéniques d'antibiotiques (les ferrocényl pénicilline et ferrocényl-céphalosporine) par Edwards et ces collaborateurs pour lutter contre certaines bactéries. Ces travaux ont été suivis par de nombreuses tentatives d'introduction du ferrocène sur des antibiotiques, certains de ces composés ont montré une bonne activité et une sélectivité pour les bactéries gram positif (**Bioud et Lassoued, 2015**).

III.6.5.2. Activité antifongique:

Les résultats d'évaluation de l'activité antifongique du 3-nitrophénylferrocène contre deux espèces de levures pathogènes. D'après ces résultats, il a été révélé que le composé a des activités antifongiques prometteuses contre deux souches de levures (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*). Ces résultats suggèrent que le composé avait des activités sélectives contre les levures (**Benabdesselam, 2017**).

III.6.5.3. Activité antioxydants :

Les dérivés du ferrocène contenant des atomes d'azote sont connus pour avoir in vitro une capacité de piégeage des radicaux libres et une activité antioxydante. L'activité antioxydante des dérivés de ferrocène a d'abord été étudiée à la fin des années 1950, lorsque Acton et Silverstein ont rapporté la synthèse et l'évaluation antioxydante d'un certain nombre de ferrocénecarboxyamides N-substitués et de dérivés de ferrocénylamine. Zhang et Liu ont également étudié l'activité antioxydante des ferrocénylhydrazones et ont découvert qu'ils présentaient une activité antioxydante intéressante. Depuis lors, un grand nombre de composés ferrocéniques ont été synthétisés et évalués en termes d'activités antioxydantes (**Khelef et Lanez, 2015**).

III.6.5.4. Anti-cancéreux :

Au cours de la dernière décennie, une révolution dans le traitement du cancer a été réalisée par des chimistes organométalliques. De nombreux dérivés ferrocényliques donnent de bons résultats en tant qu'agents antitumoraux, et certains d'entre eux font actuellement l'objet d'essais cliniques (**Fouda, 2007**).

L'application des dérivés du ferrocène dans la thérapeutique du cancer, est un domaine de recherche actif, et de nombreux rapports ont démontré que certains composés ferrocényles

sont hautement cytotoxiques in vitro contre plusieurs lignées de cellules de cancer, notamment du sein, de la prostate, du poumon, du colon et des cellules cancéreuses de la leucémie. Cependant, seuls quelques-uns ont été testés in vivo (**Bioud et Lassoued, 2015**). Les ferrocifènes sont les premières molécules actives contre les certaines cellules cancéreuses hormono-dépendantes et hormono-indépendantes (**Sansook, 2017**). Plusieurs études ayant montrées que les dérivés ferrocénique peuvent se lier à l'ADN par modes d'interaction covalents et non covalent. l'activité anticancéreuse des dérivés du ferrocène dépend de l'état d'oxydation du fer dans le fragment ferrocène, certains résultats indiquant que le composé ferrocényle Fe (II) est plus actif que le fer (III) (**Chavain, 2008; Monserrat, 2012**).

III.6.5.5. Anti-Toxoplasmose :

L'atovaquone est une molécule utilisée dans le traitement de la toxoplasmose. En raison de problèmes d'intolérance, de concentrations et d'effets secondaires de l'atovaquone, des recherches sur de nouvelles molécules restent nécessaires.

Des tests biologiques à partir des homologues ferrocéniques de l'atovaquone ont été réalisés. Trois de ces dérivés ferrocéniques, possédant une chaîne alkyle de 6 à 8 carbones en R₂, se sont révélés actifs sur des souches Toxoplasmas. De plus, ces nouveaux composés sont particulièrement efficaces sur des souches résistantes à l'Atovaquone (**Barameea et al., 2006**).

III.6.5.6. L'activité antivirale:

L'activité des dérivés ferrocéniques antiviral basé sur l'étude de l'effet de ces composés sur virus VIH, responsable des symptômes du syndrome d'immunodéficience ; Il a été montré que les dérivés ferrocéniques entravent la multiplication du virus de SIDA en inhibant l'enzyme de transcriptase inverse, mais son effet inhibiteur sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte est plus important (**Hemmami, 2017**).

III.6.5.7. Anti- Alzheimer:

L'agrégation et la formation de fibrilles de peptides β -amyloïdes (A β) est un phénomène clé dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. De nombreux efforts ont été déployés sur le développement d'inhibiteurs efficaces pour empêcher la formation de fibrilles d'A β ou démonter les fibrilles A β préformées. Des inhibiteurs peptidiques ayant des séquences homologues aux segments hydrophobes de A β peuvent modifier la voie d'agrégation de A β , avec diminution de la toxicité cellulaire. Le Fc-KLVFF; une combinaison de ferrocenyl (Fc) avec pentapeptide KLVFF montre l'effet inhibiteur de haute sélectivité de la formation de

fibrilles de A β 1-42 (Wei et al., 2011).

III.6.5.8. Antipaludique:

La chloroquine CQ est l'une des plus anciennes molécules antipaludiques de synthèse dont la première utilisation date des années 40 (Dubar et al., 2008). Elle présente de nombreux avantages, notamment un faible coût et peu d'effets secondaires (toxicité uniquement en cas de surdosage). Elle était à l'origine efficace sur toutes les formes de paludisme mais, malheureusement, *P. falciparum* a développé une résistance à la CQ.

Pour pallier aux problèmes de résistance de *P. falciparum*, l'équipe de Pr. Brocard a synthétisé de nombreux analogues et dérivés ferrocéniques de molécules antipaludiques. Ces travaux de recherche ont conduit à la synthèse de la ferroquine qui résulte de l'introduction d'un groupement ferrocénique dans la structure de la chloroquine. C'est l'un des premiers antipaludiques organométalliques qui a été synthétisé (Beagley et al., 2003).

III.7. Dérivé ferrocénique étudié:

- **N-ferrocenylmethylaminoacetophenone :**

La synthèse du N-ferrocenylmethyl-2-aminoacétophénone (Fc2A), N-ferrocenylmethyl-3-aminoacétophénone (Fc3A) et N-ferrocenylmethyl-4-aminoacétophénone (Fc4A) a été obtenue à partir du sel quaternaire triméthylferrocéyliodure de méthylammonium bien connu et d'un excès de aminoacétophénone dans le rapport molaire 1/1,5 dans l'ébullition l'eau et la durée de la réaction a été de quatre heures. Le précipité jaune a été séparé par filtration, lavé avec de l'eau pour éliminer toute trace inchangée du sel d'ammonium quaternaire et finalement recristallisé dans 90% éthanol/eau pour produire 77% (E. LANEZ, 2016). Les structures chimiques des dérivés étudiés sont présentées dans la figure suivante :

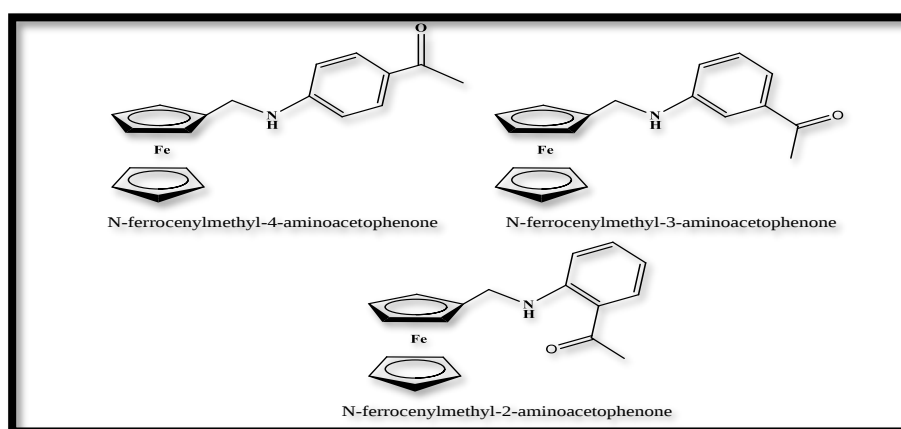
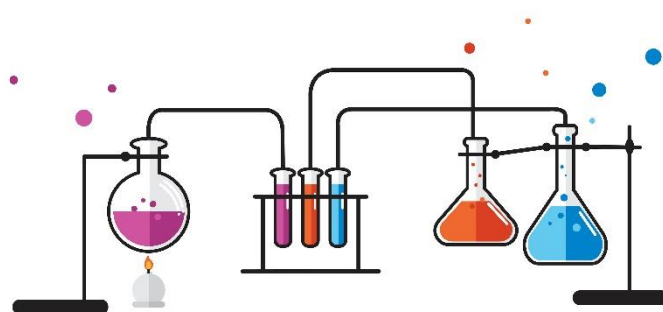


Figure III-11: Les structures chimiques des DFC- méthylacétylène. (E. LANEZ, 2016).

Chapitre IV :

Techniques

expérimentales



IV. Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées :

IV.1. Voltammétrie cyclique :

La voltampérométrie cyclique, plus communément appelée voltamétrie cyclique (CV), est une des méthodes électrochimiques les plus efficaces pour caractériser les réactions de transfert de charges. Elle consiste à imposer une rampe linéaire en potentiel avec une vitesse de balayage positive ou négative, et à enregistrer l'intensité du courant.

Le montage généralement utilisé est un montage à trois électrodes. Le balayage des potentiel s'effectue de façon cyclique à vitesse constante, après avoir balayé vers les potentiels anodiques et réaliser une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel pour effectuer une exploitation vers les potentiels cathodiques (**Bernard et al, 2018**).

Si le balayage est suffisamment rapide le produit aussi formé à l'aller et encore présent au balayage retour et peut se réduire on enregistre donc sur le voltammogramme les courbes de polarisations anodique et cathodique (dites voltammogrammes cycliques).

Le tracé du potentiel en fonction du courant est dit voltammogramme cyclique. Lors d'un cycle unique de potentiel, la réponse i - E attendue d'un couple redox réversible est illustrée par la (**Figure IV- 1**).

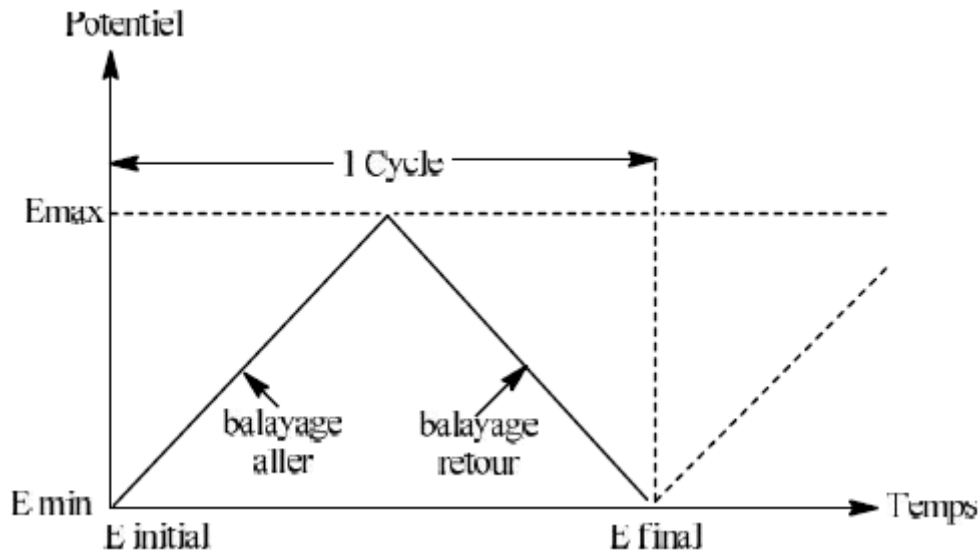


Figure IV- 1 : Variation du potentiel en fonction du temps pour un cycle CV (Bernard et al, 2018**).**

Le courant enregistré est représenté graphiquement en fonction du potentiel, ce qui a pour résultat, pour un processus réversible, l'apparition d'un pic d'oxydation et un pic de réduction de l'analyte dans le balayage aller et dans le balayage retour respectivement.

Le tracé du courant en fonction du potentiel fait apparaître un pic maximum de courant

i_{pa} (courant de pic anodique) à E_{pa} (potentiel de pic anodique) dans le scan anodique et un pic minimal de courant i_{pc} (courant de pic cathodique) à E_{pc} (potentiel de pic cathodique) lors du balayage cathodique (**Figure IV- 2**).

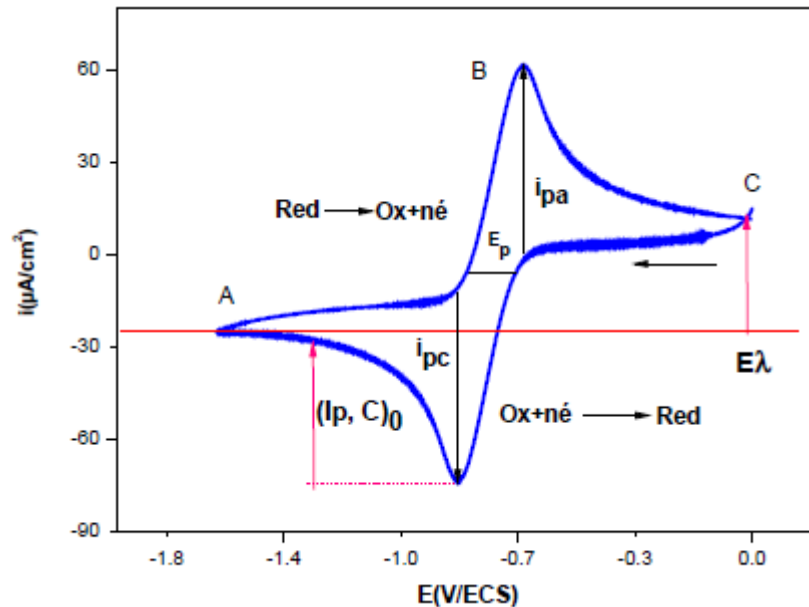


Figure IV- 2 : Voltammogramme cyclique pour un système réversible (**Bernard et al, 2018**).

Le voltammogramme cyclique peut fournir des informations importantes concernant la réversibilité du système. Dans un système entièrement réversible, les hauteurs des pics du courant obtenus dans le balayage aller et retour sont les mêmes, et sont séparées par 59 mV pour un processus monoélectronique. Ces caractéristiques devraient être indépendantes de la vitesse de balayage si le transfert d'électrons est un transfert rapide (**Bernard et al, 2018**).

La forme de la courbe cathodique est toujours la même, indépendamment de $E\lambda$ mais la valeur de $E\lambda$ modifie la position de la courbe cathodique par rapport à l'axe de courant. Pour cette raison i_{pc} doit être mesurée à partir d'une ligne de base qui est une continuation de la courbe anodique, comme le montre la Figure précédente.

$E\lambda$ est le potentiel d'inversion, il doit être $E\lambda > E_{pa}$ (d'au moins $\frac{35}{n} mV$ après E_{pa})

Parfois, et c'est l'un des inconvénients des voltammogrammes cycliques, il n'est pas possible de mesurer la ligne de base avec précision suffisante afin de mesurer i_{pc} .

Cependant, il est une bonne approximation d'appliquer l'expression suivante en termes de courant de pic mesuré à partir de l'axe de courant (i_{pc})₀ et le courant à l'inversion de potentiel (I_{λ})₀ (voir Figure précédente).

$$\left| \frac{I_{pc}}{I_{pa}} \right| = \frac{(I_{pc})_0}{I_{pa}} + \frac{0.485(I_{\lambda})_0}{I_{pa}} + 0.086$$

La contribution du courant capacitif au courant total tel qu'il vu précédemment doit également être pris en considération. Écrivant $I_f = I_{pa}$ nous obtenons l'équation suivante :

$$\left| \frac{I_c}{I_{pa}} \right| = \frac{C_d v^{\frac{1}{2}} 10^{-5}}{2.69 n^{\frac{3}{2}} D_{red}^{\frac{1}{2}} [Red]_{sol}}$$

Replaçant par des valeurs typiques $C_d = 20 \mu F.cm^{-2}$, $D_{Red} = 10^{-5} cm^2.S^{-1}$, $[Red]_{sol} = 10^{-4} M$ et $n = 1$

$$\left| \frac{I_c}{I_{pa}} \right| = 0.24 v^{\frac{1}{2}}$$

Le rapport est égale à 0.1 pour une vitesse de balayage égale à $0.18 V.s^{-1}$, si $[Red]_{sol}$ est d'ordre de grandeur plus élevé $10^{-3} M$ par exemple, le rapport est 0.01, Cela montre l'avantage d'utiliser des concentrations aussi élevées que possible, les concentrations millimolaires représentant la limite supérieure (**Bernard et al, 2018**).

IV.1.1. Cas d'un système réversible (rapide) :

Dans le cas où le système étudié $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ est rapide ou Nernstien, tel que l'on puisse admettre la vérification de la relation de Nernst a la surface de l'électrode, en tenant compte de la variation linéaire de potentiel, on peut exprimer la variation de concentration de l'espèce Ox a la surface de l'électrode en fonction du temps et la résolution des équations de FICK dans ces conditions conduit à l'expression du courant sous la forme :

$$i = n.F.S.C(\pi D)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{nF}{RT} v \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \chi(\delta, t)$$

Où $\chi(\delta, t)$ est une variable sans dimension, fonction de E , calculée numériquement pour certaines valeurs de $(E - E_{1/2})$ et $\delta = \frac{nF}{RT} v$ le traitement mathématique a été abordé successivement par Randles-Sevcik puis par Nicholson et Shain.

La fonction $\chi(\delta, t)$ présente un maximum égal à 0.25 correspondant au courant de pic i_p , pour une réaction réversible est donné par la relation de RANDLES-SEVCIK suivante :

$$i_p = 0.4463nF \left(\frac{nF}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} S \cdot C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

Cette équation peut se mettre à 25 °C sous la forme suivante (**Brett, 1993**):

$$i_p = 0.269 \cdot 10^5 \times A \times n^{\frac{3}{2}} \times D^{\frac{1}{2}} \times C \times v^{\frac{1}{2}}$$

Tel que :

A, surface de l'électrode en cm².

n, nombre total des électrons transférés.

D, coefficient de diffusion en cm².s⁻¹.

C, concentration de l'espèce réagissant au sein de l'électrolyte en mol/cm³.

v, vitesse de balayage en mV/s.

La réaction précédente peut être utilisée pour des analyses quantitatives étant donné la proportionnalité de i_p avec la concentration. Le principal avantage réside dans la rapidité de la méthode ; une seule détermination de concentration peut être effectuée en quelques secondes. Le domaine de concentration utilisable est de 10⁻² à 10⁻⁵ M. pour un système réversible, le potentiel de pic E_{pc} peut être calculé par la relation :

$$E_p = E_{\frac{1}{2}} + 2.2 \frac{nF}{RT}$$

À 25 °C l'équation précédente peut se mettre sous la forme suivante :

$$E_p - E_{\frac{p}{2}} = \frac{56.6}{n} \text{ mV}$$

$E_{\frac{1}{2}}$: Potentiel de demi-vague.

Une fois effectuée le balayage de potentiel précédent, on inverse le sens de balayage du potentiel. Dans cette situation, l'espèce adjacente à la surface de l'électrode produite durant le balayage aller subit au cours du balayage retour la transformation inverse.

L'allure des voltampérogrammes cycliques selon le système rapide est représenté par les suivantes ci-dessous. Nous pouvons résumer toutes les informations caractéristiques des voltampérogrammes de balayage cyclique pour des réactions réversibles (**Bernard et al, 2018**):

- ✓ I_p dépend de $v^{\frac{1}{2}}$
- ✓ E_p indépendant de v

$$✓ \quad E_p - E_{\frac{p}{2}} = \frac{56.6}{n} \text{ mV}$$

$$✓ \quad E_{pc} - E_{pa} = \frac{59}{n}$$

$$✓ \quad \frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1$$

IV.2. Spectroscopie électronique :

La spectroscopie électronique, plus communément appelée la spectroscopie d'absorption dans ultraviolet et le visible (UV-Vis), est une des méthodes spectroscopiques les plus efficaces pour caractériser les interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée (**Mulliken, 1969**).

La spectroscopie électronique présente beaucoup d'avantages, est non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en analyse quantitative (après construction d'une droite d'étalonnage et report d'une mesure expérimentale) ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. On peut citer par exemple le dosage des ions nitrates dans les eaux de piscine (après adjonction d'un additif formant un complexe colore) ou la détermination de la pureté de l'ADN et de certaines protéines après leur extraction. D'autres applications sont connues pour le contrôle qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires (**Boeyens, 1967**).

IV.2.1. Règles de sélection :

Une molécule absorbera une radiation de fréquence ν s'il existe des transitions nécessitant une énergie ΔE donnée par la relation suivante :

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Avec h constant de Planck, ν la fréquence, λ longueur d'onde et $\bar{\nu}$ nombre d'onde.

Une transition électronique est analysée comme un changement de population entre une orbitale moléculaire fondamentale occupée et une orbitale moléculaire excitée vacante.

Lorsqu'elle a lieu, la matière absorbe un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises (**Mulliken, 1952**).

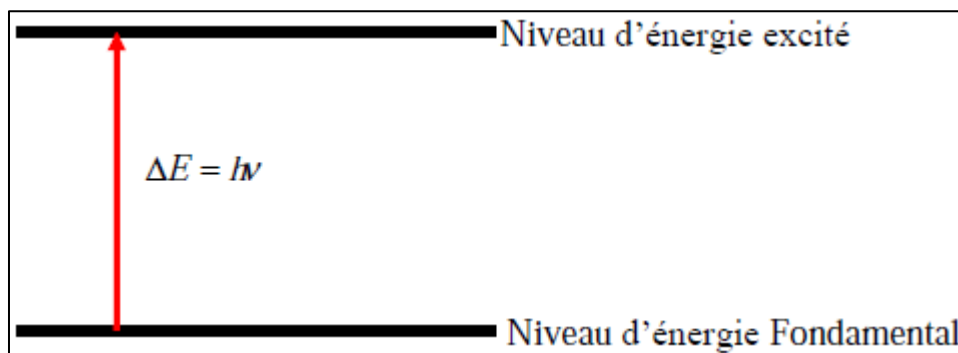


Figure IV- 3 : Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible (**Bernard et al, 2018**).

Les règles de sélection déterminent si une transition est permise (active) ou interdite (inactive). Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. De plus, une transition permise a lieu si les orbitales impliquées au cours de ce processus sont telles que $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta S = 0$. En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron (**Boeyens, 1967**).

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon (via l'ordre de grandeur de $\lambda_{\max}$ et $\varepsilon_{\max}$) et de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral.

IV.2.2. Principe de la spectroscopie UV – Visible :

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules (**Rao, 1967**).

IV.2.3. Etude spectrophotométrique en UV-Visible :

Dans une étude spectrophotométrique UV-Visible, il est d'usage de tracer le graphe de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ . Par exemple, le spectre de dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile est représenté ci-dessous (25°C, acétonitrile) :

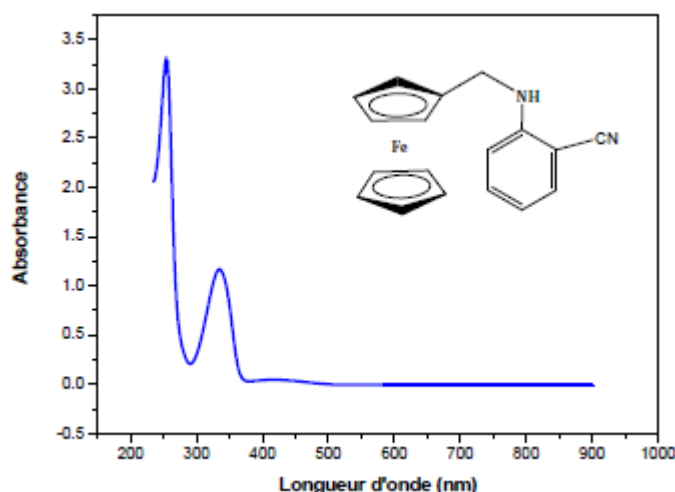


Figure IV- 4: Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile dans l'acétonitrile (Bernard et al, 2018).

On remarque que le spectre de la (Figure IV-5) , est constitué de bandes larges, et non de pics. De nombreuses transitions énergétiquement proches sont donc réalisées. Or si les transitions électroniques sont bien responsables de ces absorptions, les sous-structures vibrationnelles et rotationnelles, au sein d'un même niveau électronique, peuvent conduire à des transitions énergétiquement du même ordre de grandeur, partant et aboutissant aux mêmes niveaux électroniques mais mettant en jeu des niveaux vibrationnels et rotationnels différents. Différents rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes légèrement différentes conduisent alors à différentes transitions énergétiquement très proches et ainsi à des bandes d'absorption.

L'analyse d'un tel spectre mène à la détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption $\lambda_{\max}$. Dans l'exemple précédent, celle-ci est de 334 nm. Cependant, la donnée d'une telle longueur d'onde ne renseigne pas sur l'intensité de l'absorbance. Une donnée intensive et quantitative est nécessaire. Celle-ci est fournie par la loi de Beer-Lambert : pour une solution contenant une unique solution absorbante (Mulliken, 1952) : $A = \varepsilon l C$

Avec l la largeur de la cuve contenant l'échantillon (donc la longueur du chemin optique), C la concentration molaire de l'échantillon et ε le coefficient d'extinction molaire (exprimé usuellement en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ si l est exprimée en cm). Cette loi est valable pour les solutions transparentes, peu concentrées et dans ces conditions elle est également additive. Ainsi, la relation de linéarité est valide tant que l'absorbance garde des valeurs faibles.

La relation de Beer-Lambert donne donc accès au coefficient d'extinction molaire ε qui caractérise l'absorption de l'édifice dans les conditions de l'expérience. Ainsi, il dépend de la

température, de l'édifice et du solvant dans lequel est enregistré le spectre. En se plaçant à la longueur d'onde du maximum d'absorption, les coefficients $\varepsilon_{\max}$ peut être calculé. La donnée de ces deux grandeurs ($\lambda_{\max}$, $\varepsilon_{\max}$) est caractéristique de l'absorption d'un édifice dans des conditions expérimentales données, mais ne dépend pas de l'appareil utilisé (**Boeyens, 1967**).

IV.2.4. Analyse de l'absorption:

L'absorption provient d'une transition énergétique entre deux niveaux électroniques dont la nature joue fortement sur les deux grandeurs ($\lambda_{\max}$ et $\varepsilon_{\max}$). Dans le cas de molécules organiques les niveaux électroniques concernés par des transitions dans l'UV-Visible correspondent grossièrement aux orbitales de valence de l'édifice et leur énergie est dépendante de leur nature (σ, π) et de leur caractère (liante, antiliante, non liante). Schématiquement, l'ordre relatif des niveaux électroniques est le suivant :

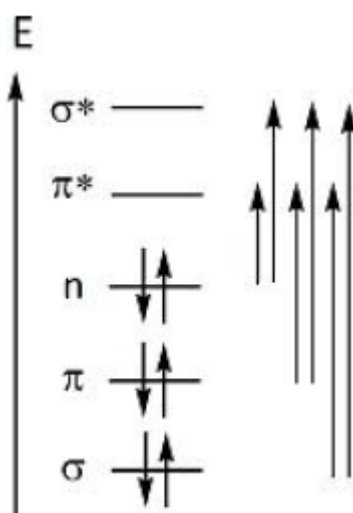


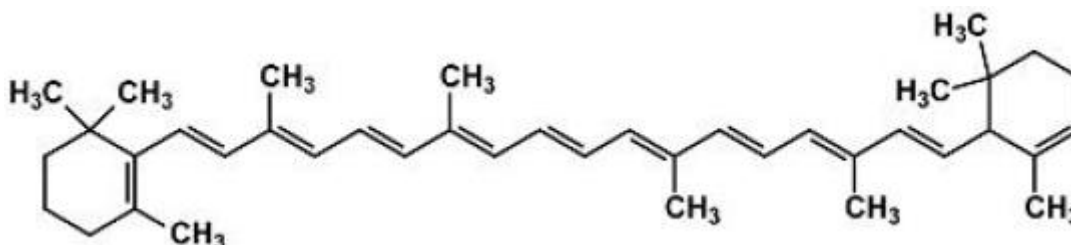
Figure IV- 5 : Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques.

De nombreuses transitions sont donc possibles mais seules celles de plus faibles énergies conduisent à une absorption dans l'UV-Visible. La nature σ ou π des niveaux implique reflètent la nature du groupe fonctionnel présent dans l'édifice. Certaines fonctions organiques provoqueront donc une absorption, ce sont des chromophores. L'enregistrement d'un spectre UV-Visible peut donc, à l'instar de la spectroscopie Infrarouge, conduire à l'identification des fonctions présentes dans une molécule organique. Les ordres de grandeurs de nombreux chromophores caractéristiques sont tabulés :

Tableau IV.1 : Ordres de grandeurs de quelques chromophores.

Chromophore	Transition	$\lambda_{\max}$	$\log(\varepsilon_{\max})$
Alcène	$\pi - \pi^*$	175	3.0
Alcool	$n - \sigma^*$	180	2.5
Aldéhyde – Cétone	$\pi - \pi^*$ $n - \pi^*$	180 ; 280	3.0 ; 1.5
Acide carboxylique	$n - \pi^*$	205	1.5
Nitro	$n - \pi^*$	271	< 1.0

La présence de liaisons multiples et de doublets non liants permet en général une bonne absorption dans l'UV-Visible. De plus, la conjugaison du système π conduit à un resserrement des niveaux π et π^* et par conséquent une augmentation du $\lambda_{\max}$. Il s'agit de l'effet bathochrome. Si les alcènes absorbent de façon caractéristique dans l'UV, les polyènes voient leur $\lambda_{\max}$ augmenter avec le nombre de liaisons π conjuguées pour finir par atteindre le domaine du visible pour les grandes molécules conjuguées. Ainsi, le β -carotène, contenant 11 liaisons C=C conjuguées, à son maximum d'absorption vers 450nm.

**Figure IV- 6:** Structure de β -carotène.

Une solution de β -carotène absorbant dans le bleu, elle ne laisse passer que les radiations peu absorbées et apparaît alors de sa couleur complémentaire, l'orange.

Dans le cas des complexes des métaux de transitions, les transitions électroniques sont réalisées entre orbitales d, dont la dégénérescence a été levée par les ligands. Il s'agit alors de transitions d-d, en général peu intenses et qui conduisent souvent à des absorptions dans le visible.

IV.3. Amarrage moléculaire :

IV.3.1. Introduction :

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des

réactions biologiques (**Mezhoud, 2020**). Elle permet la régulation de certains processus, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques (**Amina, 2017**). Etudier les détails de ces interactions, à l'échelle moléculaire grâce au Docking moléculaire, s'avère donc d'un très grand intérêt (**Bouchagra, 2018**).

Initié au début années 1980 (**Morris, 2008**), le Docking moléculaire ou amarrage moléculaire *in silico*, vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées. Il consiste à trouver les modes de liaison les plus favorables d'un ligand à la cible d'intérêt, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales *in vitro*. Le Docking a émergé au cours des trois dernières décennies, poussé par les besoins de la biologie moléculaire structurale et la découverte de médicaments structuraux. Il a été grandement facilité par la croissance spectaculaire et la disponibilité des outils informatiques, et la facilité d'accès aux bases de données biomoléculaires (**Morris, 2008**).

IV.3.2. Types du Docking moléculaire :

Il existe trois types de docking moléculaire : le premier est le Docking rigide qui est basé sur le modèle « clé-serrure ». Proposé en 1894 par Emile Fischer, ce docking considère la protéine et le ligand comme corps rigides. Cette procédure est la plus simple et la plus rapide à réaliser, car la taille de l'espace de recherche est beaucoup plus petite, mais si la conformation du ligand n'est pas correcte, la probabilité de trouver un ajustement complémentaire sera plus faible. Elle demeure toutefois encore souvent employée pour l'amarrage protéine-protéine.

Le deuxième type est le docking semi-flexible qui est souvent utilisé pour l'amarrage protéine-ligand. Le ligand étant considéré comme flexible et la protéine gardée rigide. Cependant, certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité, subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand. Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats du docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier.

En revanche, la troisième classe qui est le docking flexible traite la flexibilité des deux molécules, mais la flexibilité permise reste limitée (**Lebbad, 2016 ; El Hadji Said, 2016; Bouchagra, 2018**).

IV.3.3. Principes du docking moléculaire :

Le docking peut être réalisé en deux étapes complémentaires : la première consiste à

placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. La deuxième étape est celle du classement (scoring). Elle consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine, et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposé (El Hadji Said, 2016).

Idéalement, les algorithmes de docking devraient être capables de reproduire le mode de liaison expérimental et la fonction de scoring devrait également le classer le plus haut parmi toutes les conformations générées (Bouchagra, 2018).

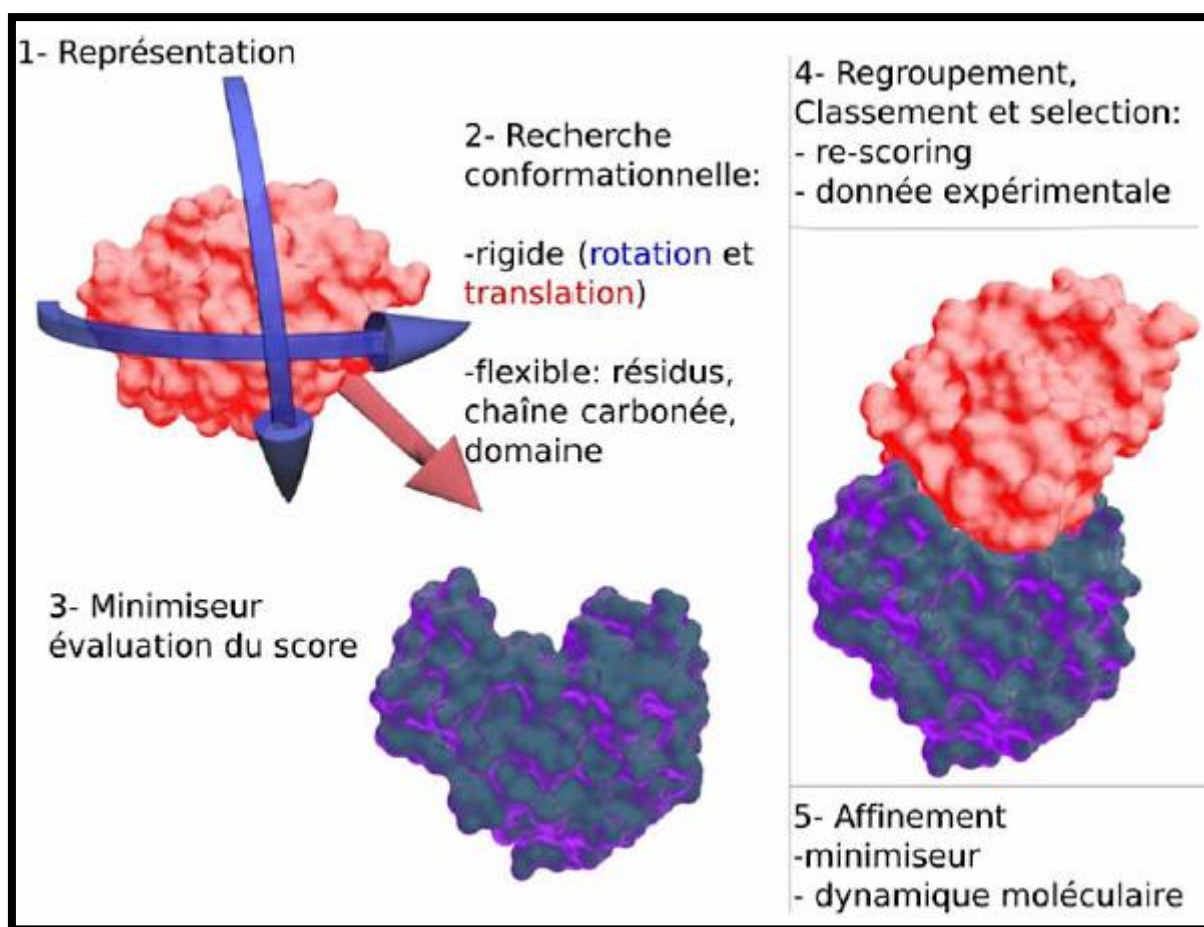


Figure IV- 7: Schéma du protocole général de docking (Férey, 2009).

Les fonctions de notation (scoring) prédisent des facteurs tels que : la force de van der Waals, l'énergie de liaison, les effets de solvation, les effets d'entropie, le nombre de liaisons hydrogènes formées entre la protéine cible et le ligand, et d'autres types d'interactions intermoléculaires (interactions hydrophobes et électrostatiques) (George Priya Doss, 2014, LEBBAD, 2016).

Le score est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant (Arrault, 2007) :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{Protéine}}$$

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative ($\Delta G_{\text{complexation}} < 0$) (LEBBAD, 2016).

Les fonctions de scoring peuvent être divisées en quatre classes principales : la première détient les fonctions basées sur le champ de force (force field-based) qui décident l'énergie de liaison en calculant la somme des interactions non-covalentes telles que les interactions électrostatiques et les interactions de van der Waals.

La deuxième classe englobe les fonctions de scoring empiriques où les éléments tels que la liaison hydrogène, l'interaction ionique, l'effet hydrophobe et l'entropie de liaison sont pris individuellement et multipliés séparément par un coefficient pour donner un score individuel. Tous les scores sont ensuite résumés pour obtenir un score final.

La troisième classe quant à elle regroupe les fonctions basées sur les connaissances (knowledge-based). Ces fonctions utilisent une analyse statistique des interactions ligand-protéine. Elles sont basées sur la théorie selon laquelle s'il existe une interaction élevée entre une protéine particulière et un ligand, la probabilité de les combiner est très élevée.

La dernière classe est la plus récente, elle regroupe les fonctions de notation basées sur le consensus. Ces fonctions combinent les scores de tous les programmes de scoring et donnent un score final afin de minimiser les erreurs et trouver le ligand parfait pour une macromolécule cible donnée (Dar, 2017 ; Arrault, 2007).

IV.3.4. Applications du docking moléculaire :

Le docking moléculaire peut démontrer la faisabilité de toute réaction biochimique telle qu'elle est effectuée avant la partie expérimentale. Dans certains domaines, le docking a révolutionné les résultats. En particulier, quand il s'agit des études structure-activité où il peut prédire l'activation ou l'inhibition de la protéine cible.

En combinaison avec le scoring et grâce au criblage virtuel des différentes bases de données, le docking permet l'identification des molécules potentielles (hits) qui peuvent cibler la molécule d'intérêt, afin de découvrir des candidats médicaments. Il permet aussi l'optimisation des molécules identifiées pour développer des médicaments plus puissants, sélectifs et efficaces (Dar, 2017; Morris, 2008). Il est aussi appliqué pour fournir des hypothèses des différentes interactions afin de faciliter les prédictions des études de

mutagenèse, et aider la cristallographie aux rayons X dans l'adaptation des substrats et des inhibiteurs à la densité électronique. Le docking peut également être utilisé dans les études des mécanismes chimiques et la conception de la bibliothèque combinatoire (Morris, 2008).

IV.3.5. Les étapes du docking moléculaire :

Les étapes clés communes à tous les protocoles de docking, commencent d'abord par le choix des structures 3D de la macromolécule cible et le ligand. Puis, chaque structure doit être préparée conformément aux exigences de la méthode utilisée. Après le docking, les résultats doivent être analysés (Morris, 2008).

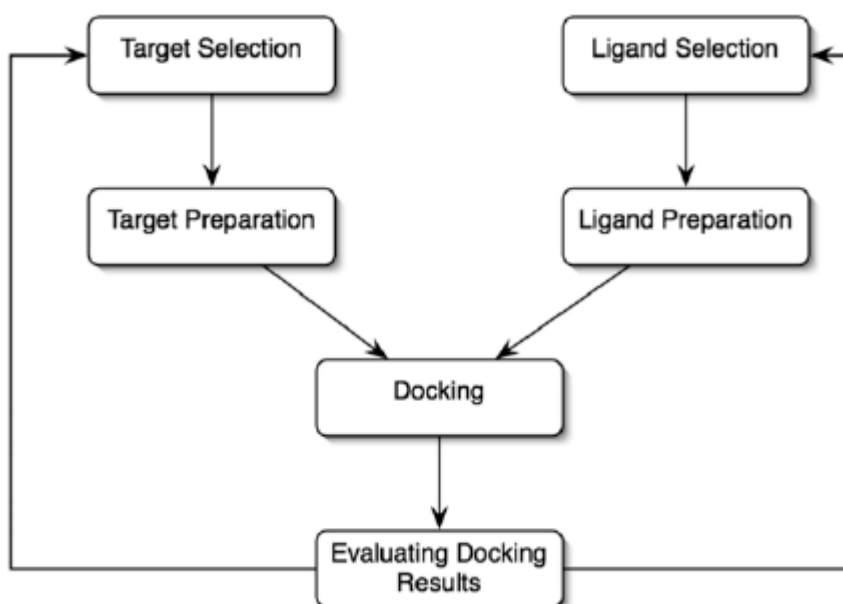


Figure IV- 8 : Les étapes clés du docking moléculaire (Morris, 2008).

IV.3.6. Les outils du docking moléculaire :

Comme chaque protocole expérimental, l'application pratique du docking moléculaire nécessite la disponibilité de plusieurs paramètres qui sont :

a) Protéine :

L'application pratique du docking moléculaire nécessite avant tout la disponibilité de la structure tridimensionnelle (3D) de la cible d'intérêt (Enzyme dans notre cas) (Dar, 2017), qui peut être facilement acquise depuis les bases de données protéiques notamment la PDB « Protein Data Bank ».

La PDB est une collection mondiale de données sur la structure 3D de macromolécules biologiques : protéines essentiellement et acides nucléiques. Ces structures sont principalement déterminées par cristallographie aux rayons X, microscopie électronique ou

par la résonance magnétique nucléaire (RMN). En plus des structures 3D, on y retrouve également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée (**Mohamed, 2019**).

Ces données expérimentales appartiennent au domaine public et peuvent être consulté gratuitement depuis les sites internet de la banque (**Cavarelli, 2020**). Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée (**El Hadji Said, 2016**).

b) Ligand :

L'acquisition des structures du (ou des) ligand(s) est une étape importante et indispensable dans le processus du docking moléculaire. Ces structures peuvent être obtenues à partir de diverses bases de données (ZINC, PubChem...etc), ou construits grâce aux programmes de modélisation moléculaire (Chemsketch, Titan, Gaussian...etc) où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Ces structures sont gouvernées par les lois de la chimie quantique (**Jade, 2016; El Hadji Said, 2016**).

❖ Modélisation moléculaire :

Afin de réaliser l'amarrage moléculaire, les structures des ligands doivent être optimisées par modélisation moléculaire, dans ce qui suit une aperçue théorique sur la modélisation moléculaire.

La modélisation moléculaire est une application des méthodes théoriques et des méthodes de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire elles peuvent être extrêmement complexes et demander des centaines d'heures de temps d'ordinateur, même sur un super-ordinateur. En plus, ces méthodes utilisent souvent des moyens infographiques très sophistiqués qui facilitent grandement la transformation de quantités impressionnantes de nombres en quelques représentations graphiques facilement interprétables.

Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Si ceux de mécanique classique, économiques en termes de temps de calcul, permettent de traiter des systèmes moléculaires de grande taille, les méthodes quantiques

(semi-empiriques ou théorie de la fonctionnelle de la densité) sont, quant à elles, capables de calculer les propriétés électroniques des systèmes. C'est pour cette raison que ces approches ont été employées dans le cadre de cette étude.

➤ *La mécanique moléculaire (MM) :*

La mécanique moléculaire est apparue en 1930 (**Andrews, 1930**), mais s'est développée à partir des années 1960, avec les progrès d'accessibilité et de performance des ordinateurs. Elle permet de déterminer l'énergie d'une molécule en fonction de ses coordonnées atomiques et de chercher des minima de l'énergie correspondant à des conformères stables (**Hetényi, 2003; Keseru, 1999**). Les techniques de modélisation basées sur la mécanique quantique souffrent d'un inconvénient majeur : elles sont très coûteuses en termes de temps de calcul et ne sont dès lors applicables qu'à des systèmes moléculaires de taille restreinte. Au final, le temps nécessaire au traitement d'un système par les méthodes *ab initio* est environ proportionnel à la quatrième puissance du nombre d'électrons qu'il contient. L'utilisation de ces techniques peut s'avérer problématique pour l'étude d'objets macromoléculaires tel qu'une enzyme en interaction avec un inhibiteur ou encore pour la caractérisation de complexes métallo-organiques de grande taille, comme ceux qui font l'objet de cette recherche.

Par contre, la mécanique moléculaire (**Bremner, 1998**), considère l'énergie d'un système uniquement en fonction de ses positions atomiques. Cette approximation repose elle aussi sur les travaux de Born et Oppenheimer. En effet, l'approximation de Born Oppenheimer, en découplant les mouvements des noyaux et des électrons d'une molécule, postule que ces derniers peuvent s'adapter de manière quasi instantanée à la position des noyaux. Le fait d'ignorer les mouvements des électrons épargne ainsi un temps de calcul considérable.

En particulier, la mécanique moléculaire permet l'étude d'une gamme étendue de propriétés en décrivant l'énergie d'un système par la somme d'une série de contributions rendant compte des interactions intra et intermoléculaire. Pour chacune des contributions, des pénalités énergétiques sont appliquées lorsqu'une variable (par exemple une longueur de liaison ou un angle de valence) s'écarte de sa valeur de référence. L'ensemble de ces termes et des paramètres destinés à décrire chaque type d'atome rencontré constitue un champ de forces qui comporte généralement cinq contributions principales (**Née Lebbad, 2011**).

$$E_{\text{stériq}} = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{van der waals}} + E_{\text{électro}}$$

Chacun de ces termes possédant une position d'équilibre préférentielle (longueur de

liaison, angle de liaison...). La recherche de l'énergie minimale par optimisation de la géométrie joue un rôle primordial. L'énergie de la molécule est exprimée sous la forme d'une somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence. A cet égard, la mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type "tiges et boules", mais elle est beaucoup plus quantitative.

L'idée directrice de cette méthode est d'établir, par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique, le "champ de force", qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, il n'existe pas encore de modèle unique permettant de simuler tous les aspects du comportement moléculaire, mais un ensemble de modèles (**Parr, 1989**). Alors pour atteindre un minimum local sur la surface de potentiel dans un temps minimum, il faut représenter toutes les variations possibles de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'obtention de la plus basse énergie : c'est-à-dire le minimum global ou absolu. Presque toutes les méthodes de minimisation ont un point en commun ; on commence à un endroit donné de l'hypersurface énergie-coordonnées et on accède au minimum local le plus proche.

➤ *La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) :*

Dans le formalisme de la théorie de la fonctionnelle de la densité on exprime l'énergie en fonction de la densité électronique. Les premiers à avoir exprimé l'énergie en fonction de la densité furent L.H. Thomas (1927), E. Fermi (1927, 1928) et P.A. Dirac (1930) sur le modèle du gaz d'électrons non interagissant. Le but des méthodes DFT est de déterminer des fonctionnelles qui permettent de donner une relation entre la densité électronique et l'énergie (**Hohenberg, 1964**). La DFT a véritablement débuté avec les théorèmes fondamentaux de Hohenberg et Kohn en 1964 (**Mezhoud , 2020**), qui établissent une relation fonctionnelle entre l'énergie de l'état fondamental et sa densité électronique. Les deux théorèmes montrent l'existence d'une fonctionnelle de la densité qui permet de calculer l'énergie de l'état fondamental d'un système.

➤ *Les méthodes semi-empiriques :*

Elles sont utilisées pour modéliser les systèmes moléculaires de grande dimension. Elles sont basées sur deux approximations, la première consiste à ne considérer que la couche de valence (les électrons de valence qui interviennent dans les liaisons chimiques et définissent

donc les propriétés du système). La seconde annule les intégrales de répulsion électroniques multicentres. Utilisant des paramètres ajustés aux résultats expérimentaux, elles peuvent conduire parfois à d'importantes erreurs dans l'évaluation des énergies totales.

c) Les programmes du docking :

Les logiciels de docking moléculaire sont des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine (**Amina, 2017**). A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (Commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont : Surflex, GOLD, FlexX, DOCK et AutoDock. Ils permettent un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques tel que : l'Algorithme génétique (GA), l'algorithme de Monte Carlo (MC) et l'Algorithme de construction incrémentale (IC)...etc, (**Dias, 2008 ; Forli, 2016**).

Tableau IV.02 : les principaux programmes de docking moléculaire, le nom de leur éditeur et le site Internet.

Programmes de docking moléculaire	Nom de l'Editeur	Site Internet
<i>AutoDock</i>	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
<i>Dock</i>	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
<i>FlexX</i>	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
<i>Fred</i>	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
<i>Glide</i>	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
<i>Gold</i>	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
<i>ICM</i>	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
<i>LigandFit</i>	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
<i>Surflex</i>	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Dans ce travail, nous avons utilisé le programme AutoDock qui est une suite de logiciels libres et gratuits utilisés pour le docking moléculaire (**Forli, 2016**). Dans ce logiciel l'amarrage se base sur la simulation de trajectoire, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les

mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation. L'énergie d'interaction est calculée par une fonction énergétique. Les mouvements du cycle à venir sont guidés par les variations d'énergie induites par les mouvements des cycles précédents. L'algorithme s'arrête lorsqu'il a trouvé la position idéale du ligand dans le récepteur. Ces techniques prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes.

IV.4. Prédiction du paramètre bio-informatique :

IV.4.1. Serveurs utilisés :

➤ SwissADME :

Les modèles informatiques constituent des alternatives valables aux expériences. Ici, nous présentons le nouvel outil web SwissADME qui donne un accès gratuit à un pool de modèles prédictifs rapides mais robustes pour les propriétés physico-chimiques, la pharmacocinétique, la ressemblance avec les médicaments et la convivialité de la chimie médicinale. Une saisie et une interprétation simples et efficaces sont assurées grâce à une interface conviviale via le site Web <http://www.swissadme.ch>. Spécialistes, mais aussi un non-expert en chiminformatique ou en chimie computationnelle peut prédire rapidement des paramètres clés pour une collection de molécules pour soutenir leurs efforts de découverte de médicaments (Daina et al., 2017).

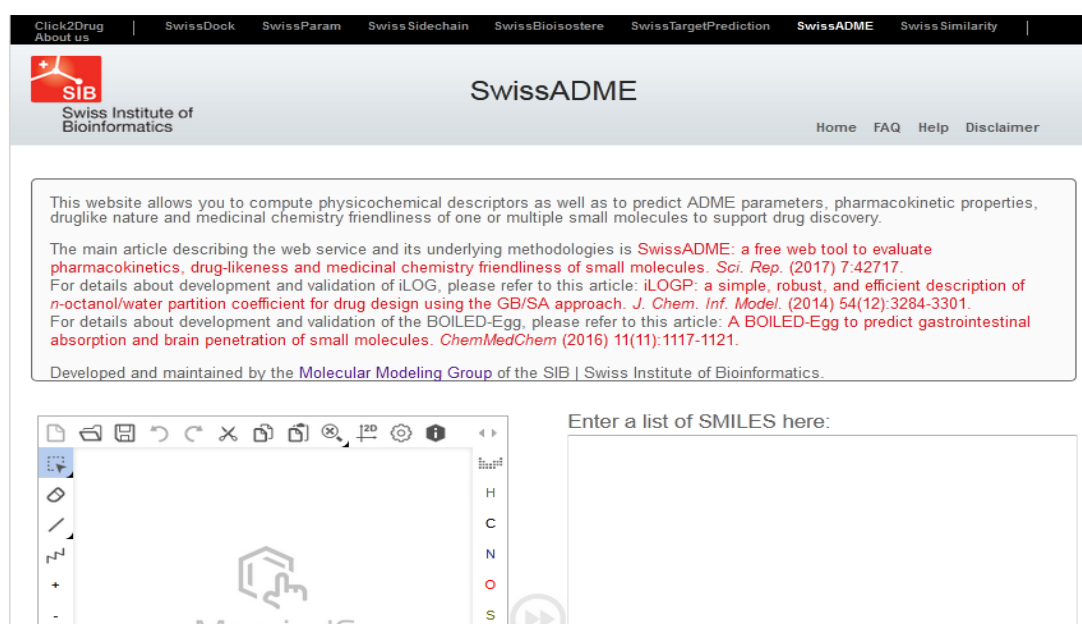


Figure IV- 9: Page d'accueil du serveur SwissADME.

➤ **admetSAR :**

Le serveur de relations structure-activité ADMET, intitulé admetSAR, est une connaissance et un outil complets pour prédire les propriétés ADMET des médicaments candidats et des produits chimiques environnementaux. Dans notre serveur, plus de 200 000 points de données annotés ADMET pour environ 96 000 composés uniques ont été sélectionnés manuellement à partir de grandes littératures. Le serveur admetSAR fournit une interface conviviale pour rechercher facilement des profils chimiques, par CASRN, par nom commun et par recherche de similarité.

La nouvelle version d'admetSAR (version 2.0) se concentre principalement sur la prédiction in silico des propriétés chimiques d'ADMET. Plus de 40 modèles prédictifs ont été mis en œuvre dans admetSAR pour de nouvelles propriétés chimiques ADMET dans le filtrage silico (Cheng et al., 2012).

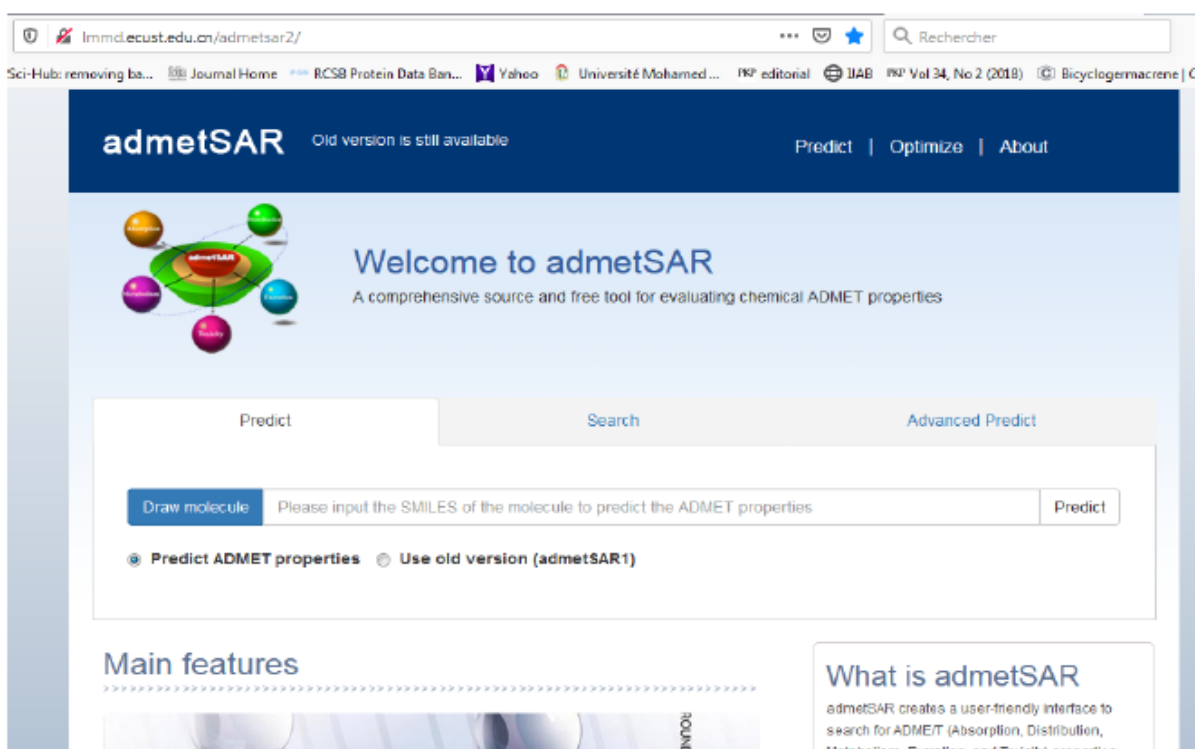


Figure IV- 10 : Page d'accueil du serveur admetSAR.

➤ **Protox :**

ProTox-II fournit un serveur Web gratuit pour la prévision de la toxicité in silico pour les toxicologues, les organismes de réglementation, les chimistes computationnels et médicaux, et tous les utilisateurs sans connexion à http://tox.charite.de/prottox_II. Le serveur Web prend structure chimique deux-dimensionnelle en tant qu'intrant et indique le profil de

toxicité possible du produit chimique pour 33 modèles avec des scores de confiance, et un tableau radar de toxicité globale avec trois composés les plus semblables ayant une toxicité aiguë connue (P. Banerjee et al., 2018).

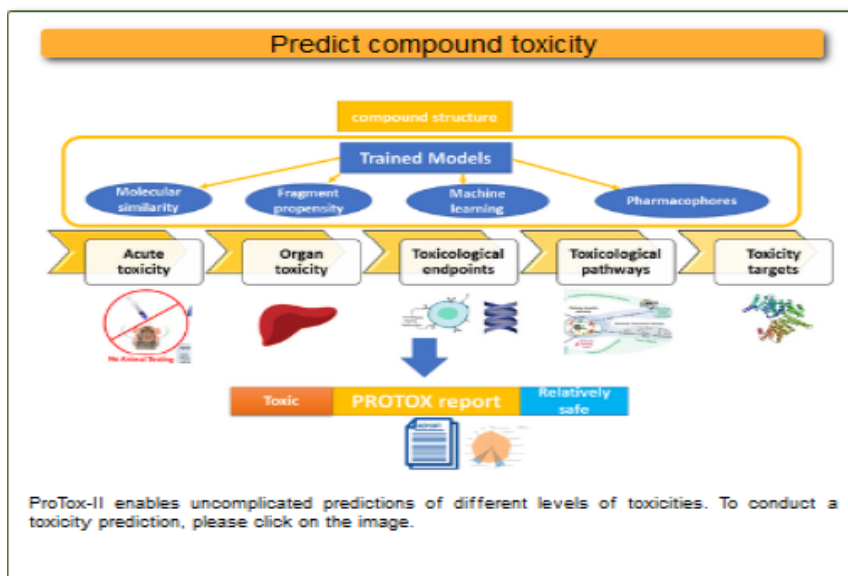


Figure IV- 11: Page d'accueil du serveur Protox.

IV.4.2. Prédiction des propriétés ADMET :

Outre une affinité qui lui confère une activité biologique, un candidat médicament doit être facile à administrer et doit atteindre sa cible en concentration suffisante pour être efficace. C'est pourquoi la prédiction des propriétés ADMET joue un rôle crucial dans le processus de la conception des médicaments (Hazan, 2008).

ADME est une abréviation pour « Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion », elle décrit la disposition d'un composé pharmaceutique au sein d'un organisme (Walters, 2002). Alors que le « T » représente la toxicité potentielle de ce composé.

Dans ce travail, nous avons calculé et simulé les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés issus de la substitution en utilisant le serveur SwissADME, alors que la toxicité potentielle a été prédite en utilisant le serveur Protox-II.

➤ Propriétés physico-chimiques :

Règle de Lipinski : (règle des 5) :

Christopher A. Lipinski a défini un ensemble de critères permettant de déterminer si un composé chimique possède des propriétés physico-chimiques qui en feraient de lui un médicament oralement actif chez l'homme. Il observe que les molécules ayant le plus de chances d'être absorbées par voie orale doivent satisfaire au moins trois des caractéristiques

suivantes (Cheng, 2002) :

1. Le poids moléculaire doit être inférieur à 500 Dalton.
2. Le coefficient de partage octanol-eau (LogP) doit être inférieur à 5.
3. Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène doit être inférieur ou égal à 10.
4. Le nombre de donneurs de liaison hydrogène doit être inférieur ou égal à 5.
5. Le nombre de liaisons flexibles doit être inférieur à 15.

Règle de Veber :

Avec un objectif similaire, Veber et al. étendent la règle de Lipinski en ajoutant deux contraintes sur la surface polaire (TPSA) qui doit être inférieure à 140 Å², et le nombre de liaisons de rotation qui doit être inférieur ou égal à 10 (Savjani, 2012).

Solubilité dans l'eau :

La solubilité, le phénomène de dissolution du soluté dans un solvant pour donner un système homogène, est l'un des paramètres les plus importants pour atteindre la concentration souhaitée d'un médicament dans la circulation systémique pour avoir la réponse pharmacologique anticipée (Daina, 2017). La possession d'une molécule soluble facilite grandement de nombreuses activités de développement de médicaments, surtout pour les projets de découverte ciblant l'administration orale (pharmacomedicale.org. , 2020).

➤ **Propriétés pharmacocinétiques :**

Absorption gastro-intestinal (GI) :

La voie d'administration orale impose au médicament un passage à travers de la barrière digestive. Ce passage peut se faire par simple diffusion passive ou fait intervenir des phénomènes plus complexes avec la mise en jeu d'un système de transporteurs favorisant ou au contraire limitant l'absorption (Bodor, 1999).

BBB perméabilité :

La capacité de nos meilleurs inhibiteurs à traverser la barrière hémato-encéphalique a été simulé à l'aide du serveur SwissADME. Ce critère est important tant pour les médicaments psychotropes, qui doivent exercer leur action dans le système nerveux central, que pour les médicaments destinés aux organes périphériques, et qui ne doivent surtout pas y pénétrer. (Bodor, 1999).

Inhibition des cytochromes P450 :

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes hépatiques intervenant dans le métabolisme des substrats endogènes ou exogènes, notamment médicamenteux. Les principaux CYP impliqués dans le métabolisme des médicaments sont : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4. Toutefois, en fonction de leur degré d'affinité pour ces enzymes, certains médicaments peuvent inhiber le métabolisme. C'est pourquoi Il vaut mieux choisir ceux qui ne sont pas inhibiteurs des cytochromes P450 (**ansm.sante.fr, 2020**).

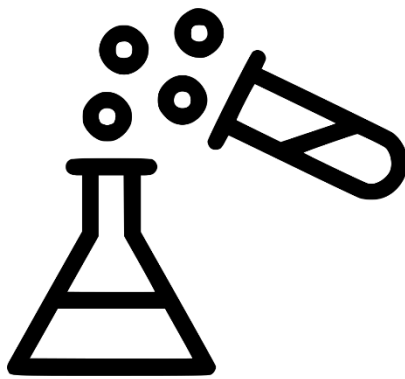
DEUXIÈME PARTIE :

EXPÉRIMENTALES

"La vérité est ce qui est prouvé avant l'examen d'expérience "

Einstein

Matériels et Méthodes



I.1. Produits chimiques et réactifs :

I.1.1. Alpha Amylase :

Une solution d'alpha amylase (commercialisé sous le nom de Megamylase avec une activité spécifique de 3000 (U. CEIP/cp) avec une concentration de 4mg/ml a été préparée dans une solution tampon phosphate saline pH = 6.5.

I.1.2. Substrat :

Le substrat utilisé est l'amidon soluble. La solution d'amidon est préparée dans la solution tampon phosphate saline (0.02 M, pH = 6.5) à une concentration de 1% afin de réaliser les tests sur l'alpha amylase.

I.1.3. Réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :

Dans un erlenmeyer, 1 g de DNSA est dispersé dans 40 ml d'eau distillée. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. En parallèle, nous avons préparé une solution de NaOH (2N) dans 20 ml d'eau distillée dans laquelle nous avons dissous 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sous agitation. Une fois les deux solutions sont mélangées, le réactif devient limpide avec une couleur orange. Le volume final est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C (Kez Amel.,2018).

I.1.4. Acarbose :

L'acarbose « commercialisé sous le nom de Acorbay 50mg » est un pseudo-tétra-saccharide d'origine microbienne. Il est utilisé dans cette expérience comme contrôle positif « molécule de référence » à une concentration 20mM, afin de comparer son activité vis-à-vis de l'alpha amylase par rapport à celle des dérivés étudiés.

I.1.5. Tampon phosphate (0.02 M, pH = 6.5) :

On prépare la solution tampon à partir :

- Solution « A » dibasique (KH_2PO_4 ; $M = 119.98 \text{ g / mol}$)
- Solution « B » monobasique (K_2HPO_4 ; $M = 141.96 \text{ g / mol}$)
- KCL pour avoir une concentration de 0.02 M et un pH = 6.5.

I.1.6. Dérivés ferrocéniques étudiés :

La synthèse des trois dérivés ferrocéniques étudiés dans ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de « VTRS » en deux étapes, la première étape est la préparation du sel quaternaire iodure ferrocénylméthyltriméthyl-ammonium (2) par la réaction entre le réactif de Mannich et le ferrocène (1) dans un mélange d'acide acétique glacial et l'acide phosphorique

selon la méthode de d'Osgerby et Pauson (**J. M. Osgerby et al 1958**), comme le montre le (Figure V- 1):

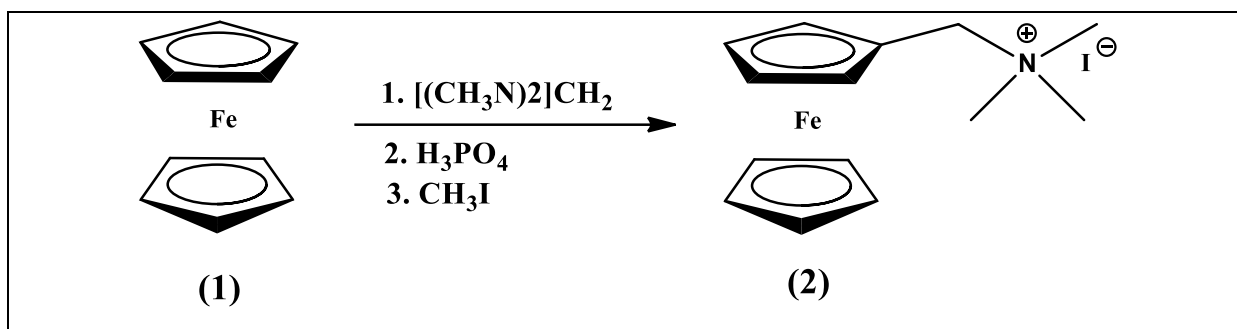


Figure V- 1: Aminométhylation de ferrocène.

Ensuite les trois dérivés : N-ferrocenylmethyl-2-aminoacetophenone (3), N-ferrocenylmethyl-3-aminoacetophenone (4) et N-ferrocenylmethyl-4-aminoacetophenone (5) sont préparé en traitant le sel quaternaire (2) avec un excès de l'aminoacetophenone dans l'eau distillée bouillant (**E. Lanez, 2016**), comme le montre le schéma suivant :

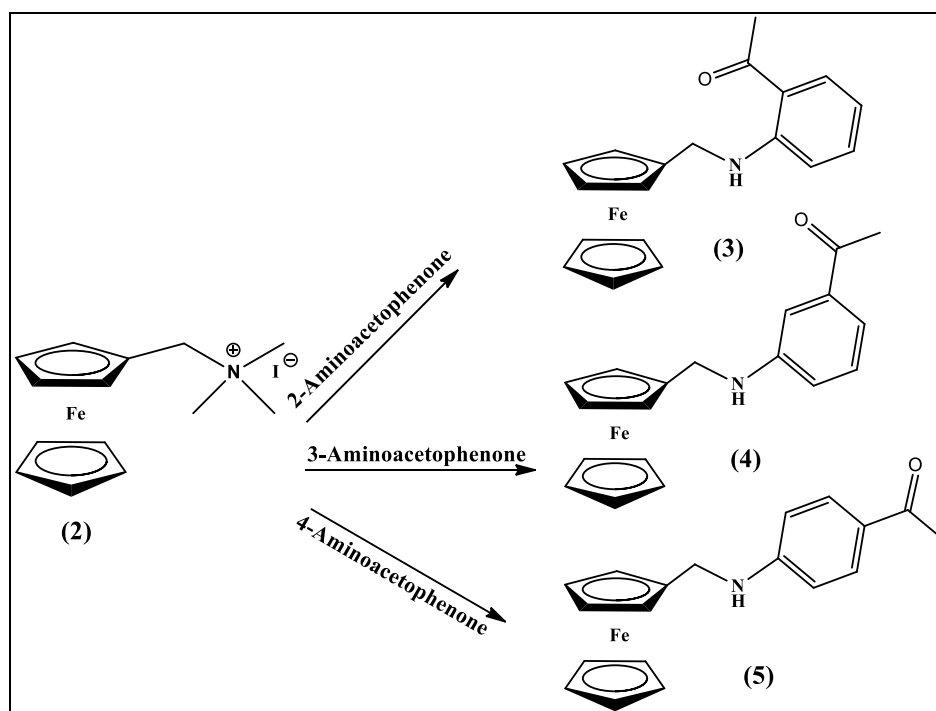


Figure V- 2: Synthèse de la N-ferrocenylmethyl-aminoacetophenone.

I.2. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-diabétique :

I.2.1. Mode opératoire :

Ce test a été réalisé en utilisant une procédure modifiée de McCue et Shetty (**P. P. McCue et al., 2004**). Trois solutions de tampon phosphate saline 0.02 M (pH = 6.5) contiennent des différentes concentrations des dérivés ferrocéniques étudiés (0.3 mg/ml à 10

mg/ml), ensuite 250 μ L d'une solution d' α -amylase (4 mg/ml) était ajoutée. Cette solution a été pré incubée à 25 °C pendant 10 min, après 250 μ L de solution d'amidon à 1% dissoute dans 0.02 M du tampon de phosphate saline (pH = 7) a été ajouté à intervalles réguliers et puis incubé à 25 °C pendant 30 min. La réaction a été terminée par l'ajout de 500 μ L du réactif acide dinitrosalicylique (DNSA).

Les tubes ont ensuite été incubés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes et refroidis à température ambiante. Le mélange réactionnel a été dilué avec 5 ml d'eau distillée.

La solution de l'acarbose a été utilisée comme contrôle positif pour tous les tests de cette étude et préparé de la même manière citée pour les dérivés ferrocéniques.

Chaque mesure a été répétée 3 fois pour qu'on peut présenter les résultats par la moyenne des résultats $\pm$ l'écart type .

I.2.2. Mesure voltammétriques :

❖ *Appareillage :*

L'appareil utilisé pour réaliser les mesures voltammétriques est un Potentiostat/Galvanostat Model PGZ301 (Radiometer Analytical SAS) relié à une cellule électrochimique à trois électrodes:

- Une électrode en carbone vitreux. Diamètre 5.2 mm².
- Une électrode de référence Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturée.
- Une électrode auxiliaire en platine. Diamètre 3 mm.

Le tout est piloté par un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel VoltaMaster4, version 7.08.

❖ *Procédure :*

La réaction entre les dérivés ferrocéniques étudiés et l' α -amylase se fait dans la cellule électrochimique. Le milieu réactionnel est une solution tampon saline constitué d'un mélange de phosphate mono- et bi-potassique (KH₂PO₄+K₂HPO₄) et KCl à un pH égal à 6.5.

Avant chaque mesure on effectue un polissage de l'électrode de travail en utilisant le papier abrasif p4000. Après polissage, on lave l'électrode avec de l'eau distillé et on la sèche à l'air. La surface de l'électrode présente ainsi l'aspect d'un miroir. Ensuite on équipe la cellule électrochimique avec l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire, et aussi l'électrode de travail. On remplit la cellule avec 10 ml de la solution à tester, en suite on fait un barbotage d'azote pendant 10 à 15 minutes pour chasser l'oxygène de la cellule.

On impose un potentiel variable à une vitesse de balayage fixe et à une température (25 $\pm$ 2°C), les voltammogrammes obtenus sont exploités pour accéder aux paramètres d'interaction

entre le dérivé ferrocénique étudié et l' α -amylase.

I.2.3. Mesure spectroscopique :

❖ Appareillage :

Les mesures UV-Vis ont été effectuées en utilisant un spectromètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et une cellule de quartz ayant une capacité volumétrique de 3 ml. L'acquisition des données a été accompli avec un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel UV probe version 2.34 (Shimadzu). Les données sont traitées en utilisant le logiciel OriginLab 2.0.

❖ Procédure :

La densité optique des échantillants préparés a été déterminée à une longueur d'onde de 540nm. Le pourcentage d'inhibition de la α -amylase était calculé par la relation suivante (**P. McCue et al., 2004**) :

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

Avec :

A = La valeur de la densité optique en absence de l'inhibiteur.

B = La valeur de la densité optique en présence de l'inhibiteur.

I.3. Evaluation *in silico* de l'activité anti-diabétique :

I.3.1. Méthodes d'évaluation des propriétés ADMET :

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADMET) des médicaments candidats ou des dérivés ferrocéniques a pour but d'évaluer l'activité antidiabétique, pour cela nous avons d'abord déterminé les paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des dérivés ferrocéniques étudiés par l'outil SwissADME disponible à (<http://www.swissadme.ch>), pour ce fait les structures Canoniques SMILES de chacune de ces molécules a été copiée à partir du logiciel open Babel et introduite dans le serveur de prédiction (**Tableau V.1**).

Tableau V.1 : Les formes SMILES et les identifiants des molécules testées.

Composés	Structure SMILES
Fc4A	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNc1ccc(cc1)C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
Fc3A	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNC1=C[C](C=C[CH]1)C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
Fc2A	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNC1=C[CH]C=C[C]1C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
Acarbose	<chem>C1(=C[C@@H]([C@H]([C@@H]([C@H]1O)O)O)N[C@H]1[C@@H]([C@H]([C@@H](O[C@H]2[C@@H]([C@@H]([C@H](O[C@H]3[C@@H]([C@H]([C@H](O)[C@@H]3CO)O)O)O[C@@H]2CO)O)O)O[C@@H]1C)O)O)CO</chem>

La toxicité de ces dérivés a été ensuite étudiée à l'aide d'un serveur en ligne (ProTox-II16) qui donne les valeurs de la toxicité, de la cytotoxicité, de la mutagénicité, de la cancérogénicité et de l'immunotoxicité prévues. La Prédiction des propriétés de la toxicité des dérivés étudiés a été faite par le serveur en ligne admetSAR : (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>). Et Protox2 : (<https://bioinformatics.charite.de/protoxII>).

I.3.2. Amarrage moléculaire :

❖ Outils utilisés :

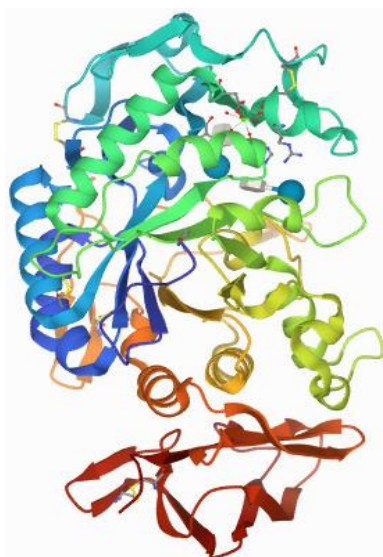
Afin de pouvoir réaliser l'amarrage moléculaire avec le logiciel AutoDock 4.2, l'ensemble d'outils suivant est nécessaire :

- AutoGrid.
- AutoDockTools.
- Python 2.7.
- Les structures optimisées des ligands.
- Le fichier d' α -amylase téléchargeable depuis le site de base de données de protéine (www.pdb.com).

La structure chimique de Fc2A, Fc3A et Fc4A a été optimisée par le logiciel Gaussian 09 (**M, Frisch et al 2009**), en utilisant le niveau de théorie B3LYP (**A, Becke et al 1993**), avec une base 6-311⁺⁺G(d,p). Les géométries des complexes ont été entièrement optimisées en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité, sans imposer de contraintes de symétrie.

Les expériences d'amarrage moléculaire des ligands FcA et l'acarbose ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle d' α -amylase pancréatique (PDB ID : 1OSE) avec une longueur de séquence égale à 496 acide aminé (**Figure V-1**), extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) (**Berman et al., 2000**).

Tableau V.2 : Informations sur les récepteurs cibles choisies pour les études d'amarrage.

	Alpha-amylase pancréatique	
	PDB ID	1OSE
	Résolution (Å)	2.30
	Valeur R libre	0.222
	Valeur R	0.176
	Mutation (s)	No
	Chaînes	A
	Organisme (s)	Sus scrofa

❖ Procédure :

La procédure d'amarrage est constituée de deux étapes principales suivantes :

- Génération de carte d'interactions de la structure d' α -amylase (récepteur) en utilisant l'outil AutoGrid.
- Amarrage du ligand au récepteur avec AutoDock.

Nous utiliserons l'interface graphique AutoDockTools (ADT) afin d'effectuer l'amarrage et visualiser les résultats. Les étapes sont décrites ci-dessous :

- Préparation des fichiers de coordination en utilisant AutoDockTools.
- Calcul d'affinités des atomes avec AutoGrid.
- Amarrage de ligands avec AutoDock.
- Analyse des résultats avec AutoDockTools.

La (**Figure V- 2**), présente les étapes à suivre pour la procédure d'amarrage.

Toutes les études d'amarrage ont été réalisées sur un micro-ordinateur Pentium 3.30 GHz et RAM 4.00 Go de mémoire avec système d'exploitation Windows 7.

Pour les calculs d'amarrage, le programme AutoDock 4.2 basé sur l'algorithme génétique lamarckien (LGA) a été utilisé. Des simulations d'amarrage ont été effectuées en utilisant les paramètres par défaut tandis que le nombre d'exécutions a été fixé à 15 avec 150 individus et 2500 000 évaluations énergétiques.

La recherche a été effectuée dans une grille de 41 et 51 points par dimension avec des points séparés par 1.000 Å. Les centres et les tailles de la grille ont été définis pour chaque

ligand comme indiqué dans le (Tableau V. 2), et une taille d'étape de 0.375 centrée sur le site actif e protéine. La meilleure conformation a été sélectionnée avec l'énergie d'amarrage la plus faible.

A la fin des exécutions d'amarrage, diverses énergies de liaison des ligands ont été obtenues avec leurs conformations respectives ; la meilleure pose amarrée énergétiquement favorable a été utilisée dans l'analyse d'amarrage à l'aide du serveur Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (S, Salentin et al 2015).

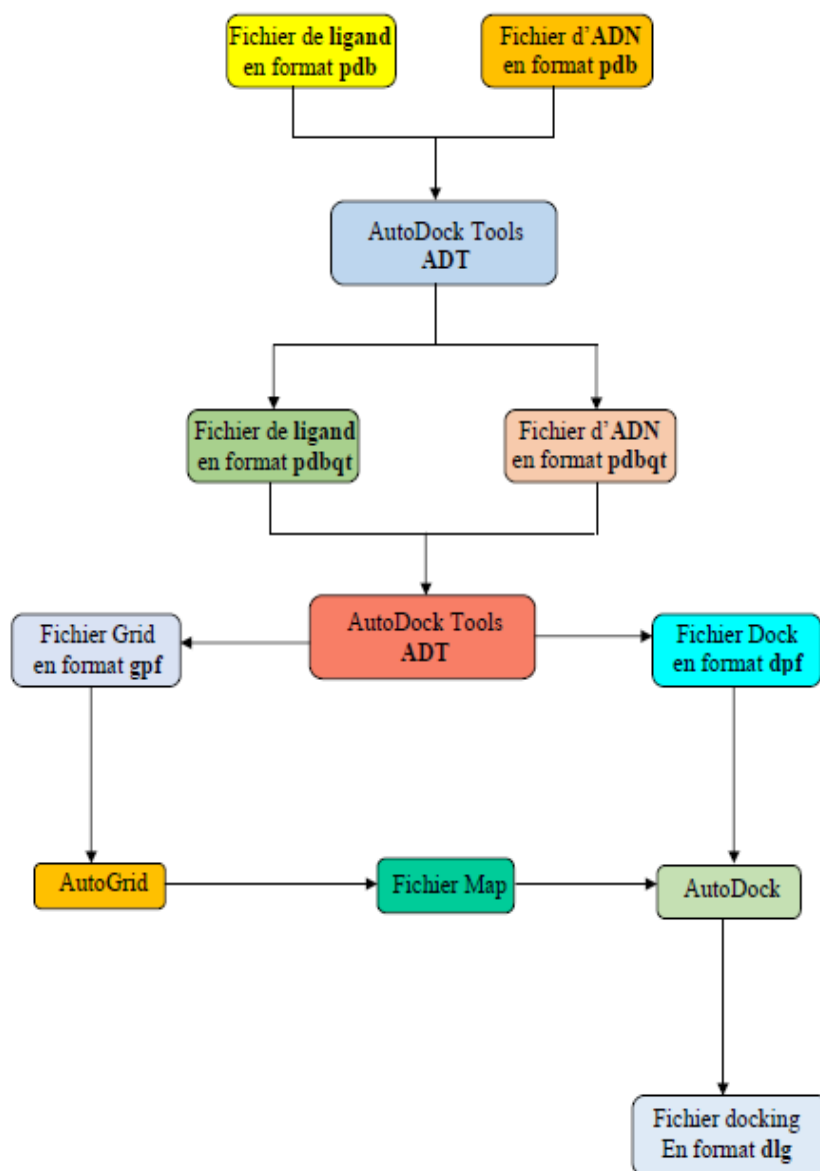


Figure V- 3: Différentes étapes d'amarrage.

Tableau V.3: Paramètres d'amarrage sélectionnés pour l' α -amylase.

Centre de la grille			Taille de la grille (Å)		
X	Y	Z			
30.562	37.946	18.681	40	50	50

Résultats et Discussion



II.1. Résultats et interprétation

II.1.1. Prédiction des propriétés ADMET :

Il est estimé que près de 90% des candidats-médicaments échouent en raison d'une efficacité inacceptable ou en raison de leur toxicité. Il est donc devenu évident que les études ADMET jouent un rôle crucial dans le succès d'un candidat-médicament. C'est pourquoi, nous avons jugé utile de prédire les propriétés ADMET des trois dérivés étudiés.

Les résultats obtenus ont été comparé à ceux d'une molécule de référence en l'occurrence l'acarbose, un médicament inhibiteur de l'enzyme alpha-amylase et utilisé pour le traitement du diabète de type 1.

II.1.1.1. Propriétés physico-chimiques :

Nous avons prédit les paramètres physicochimiques des inhibiteurs de l' α -amylase étudiés en utilisant le serveur online SwissADME, les valeurs des propriétés observées sont montrées dans le tableau qui suivent.

Tableau VI.1: Propriétés physicochimiques des composés étudiés et du l'acarbose.

Propriétés	Acarbose	Fc4A	Fc3A	Fc2A
Formule	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	C ₁₉ H ₁₉ FeNO	C ₁₉ H ₁₉ FeNO	C ₁₉ H ₁₉ FeNO
Poids moléculaire (g/mol)	645.6	333.21	333.21	333.21
Nom.atomes lourds	44	22	22	22
Fraction Csp3	0.92	0.32	0.42	0.42
Nom.Liaison Flexibles	9	4	4	4
Nom.Accepteurs de liaison H	19	1	1	1
Nom. Donneurs de liaison H	14	1	1	1
Log P	-6.12	2.82	2.43	2.54
Log S	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Réfractivité molaire	136.69	86.25	86.06	86.06
TPSA (Å ²)	321.17	29.10	29.10	29.10

Les dix composés ont des poids moléculaires ≤ 500 g/mol. D'autre part, nous n'observons que les valeurs de lipophilie (LogP) de tous nos composés inférieurs à 5, ils ont donc montré de très bons résultats et peuvent être facilement absorbés par le corps. Cependant tous les composés ont un nombre de donneurs de liaisons hydrogène ≤ 5 , un nombre

d'accepteurs de liaisons hydrogène : ≤ 10 . Nous pouvons donc dire que la règle des cinq Lipinski a été vérifiée.

Ainsi, les résultats de ce tableau montrent que les trois molécules étudiées s'inscrivent parfaitement dans la marge de ces critères.

II.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques :

Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastrointestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages. Nous avons prédit les paramètres pharmacocinétiques afin d'affirmer notre sélection et d'aller vers le composé ayant le plus de chance d'être un candidat médicament. Les résultats de l'évaluation des propriétés pharmacocinétiques des dérivés ferrocéniques étudiés à l'aide du serveur SwissADME sont présentés dans le **(Tableau VI.2)**.

Tableau VI.2: Propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés et du l'acarbose.

Propriétés	Acarbose	Fc4A	Fc3A	Fc2A
GI Absorption	Faible	Élevée	Élevée	Élevée
BBB perméabilité	No	Yes	Yes	Yes
CYP1A2 inhibition	Négative	Négative	Négative	Négative
CYP2C19 inhibition	Négative	Négative	Négative	Positive
CYP2C9 inhibition	Négative	Négative	Négative	Positive
CYP2D6 inhibition	Négative	Négative	Négative	Négative
CYP3A4 inhibition	Négative	Positive	Négative	Négative

L'analyse des molécules par le paramètre de barrière hémato-encéphalique (BBB) qui protège le système nerveux central, montre que toutes les composées ont été prédits comme perméables à la membrane hémato-encéphalique, ce qui présente un bon résultat pour les médicaments destinés à agir au niveau du système nerveux central.

Les résultats montrent également et contrairement au médicament de référence que le composé Fc4A possède un effet inhibiteur du CYP2C19. De même, Fc2A a un effet inhibiteur sur les deux Cytochrome CYP2C19 et CYP2C9. Cependant, nous n'avons remarqué aucune inhibition ou modification sur les différents isoformes de Cytochrome P450 pour le Fc3A.

L'inhibition de ces enzymes est une source importante d'interactions médicamenteuses indésirables étant donné que les changements dans l'activité enzymatique CYP peuvent

affecter le métabolisme des médicaments.

II.1.1.3. Prédiction de la toxicité:

Les résultats de la prédiction de la toxicité des dérivés ferrocéniques et de l'acarbose établie à partir du serveur online Pro-Tox-II sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VI.3: Prédiction de la toxicité des composés étudiés et de l'acarbose.

Toxicités	Acarbose	Fc4A	Fc3A	Fc2A
Hépatotoxicité	Active	Inactif	Inactif	Inactif
Cancérogénicité	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
Immunotoxicité	Active	Inactif	Inactif	Inactif
Mutagénicité	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
Cytotoxicité	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif

II.1.2. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par voltamétrie cyclique :

L'étude du comportement cathodique de la dissociation de l'amidon par l' α -amylase (**Figure VI-1**), en absence et en présence des concentrations croissantes des dérivés ferrocéniques N-ferrocénylméthyl-4-acétylaniline, N-ferrocénylméthyl-3-acétylaniline et N-ferrocénylméthyl-2-acétylaniline a été utilisé pour déterminer l'activité antidiabétique et l'énergie libre de liaison de l' α -amylase avec les dérivés ferrocéniques étudiés. Cette étude du comportement électrochimique a été réalisée par la technique de la voltamétrie cyclique dans une solution tampon phosphate 0.1 M à pH = 7, la fenêtre du potentiel était de 1.6 à -0.2 Volt dans la direction de balayage négatif avec une vitesse de balayage égale à 0.1 V/s. Les voltammogrammes cycliques étaient initialement début à 1.6 V et inversé à -0.2 V.

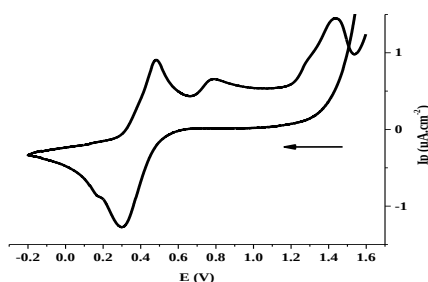


Figure VI- 1 Voltammogramme cyclique de l'amidon 2% en présence de l' α -amylase enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 10^{-1} M (KH_2PO_4 / K_2HPO_4) à pH = 7, avec une vitesse de balayage de potentiel égale à 0.1 V/s.

Les voltammogrammes cycliques à pH = 7 en absence des dérivés ferrocéniques sont

caractérisé, dans le domaine de potentiel étudié, par un couple redox stable. Le pic du potentiel cathodique a été apparu à 0.302 V, dans le balayage retour le pic de potentiel anodique a été observé à 0.485 V.

En présence des différentes concentrations du dérivés ferrocénique (**Figure VI-2**), la densité de courant des pics cathodique subite a une diminution successive (**Tableau VI.4**). En outre le système redox de l'amidon gardé sa réversibilité.

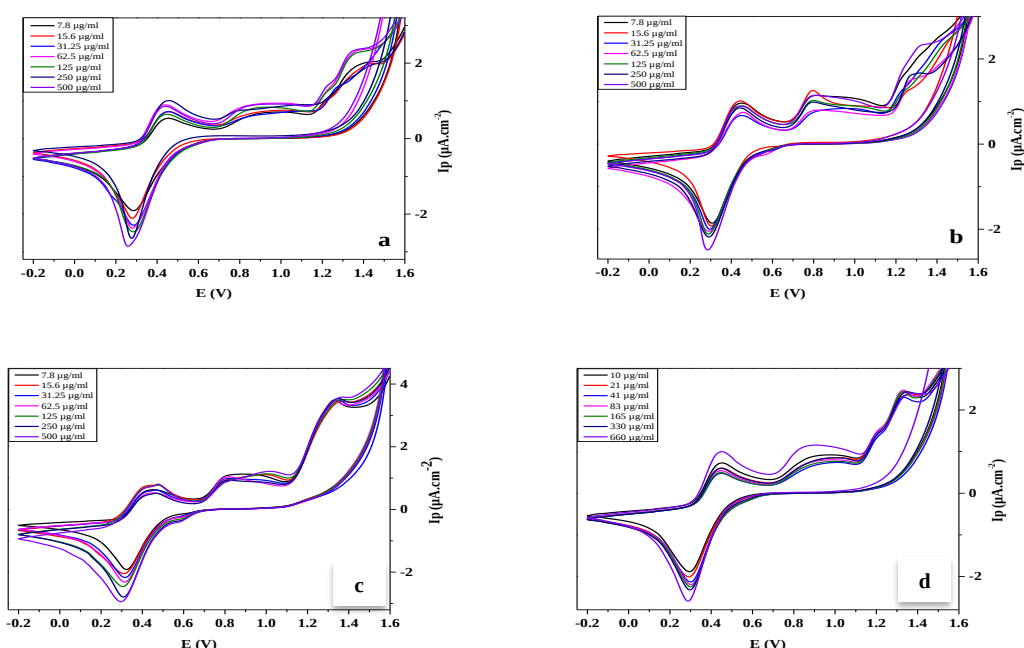


Figure VI- 2: Voltammogramme cyclique d'une solution d' α -amylase en présence de différentes concentrations de : Fc2A(a), Fc3A(b), Fc4A(c) et Acarbose(d) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 10^{-1} M (KH_2PO_4 / K_2HPO_4) à pH = 7, avec une vitesse de balayage de potentiel égale à 0.1 V/s.

Les voltammogrammes cycliques de la (**Figure VI-2**), révèlent que quel que soit la portion de l'inhibiteurs ajouté, il y a toujours une diminution de la densité du courant des pics cathodiques. La diminution de la densité du courant cathodiques est plus remarquable pour les dérivés Fc4A, Fc2A et l'acarbose que celle du Fc3A.

Les paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la (**Figure VI-2**), sont regroupés dans le (**Tableau VI.4**) suivant.

En comparant les valeurs des densités de courant cathodiques I_{pc} , on remarque que lorsque la concentration du composés étudiées augmenté I_{pc} augmenté aussi en valeurs absolu. Cette augmentation des densités de courant peut être attribuée à l'augmentation du coefficient

de diffusion de l'amidon comme l'indique l'équation suivante (E. LANEZ, 2016) :

$$ip_a = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} ACD^{\frac{1}{2}} V^{\frac{1}{2}}$$

Tableau VI.4: Paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la Figure VI-2.

Composés	[Concentration] ($\mu\text{g/ml}$)	E_{pc} (V)	$ I_{pc} $ ($\mu\text{A/cm}^2$)
Fc4A	7.8	0.318	1.936
	15.6	0.308	2.05
	31.25	0.308	2.182
	62.5	0.308	2.313
	125	0.302	2.477
	250	0.302	2.805
	500	0.297	2.985
Fc3A	7.8	0.308	1.872
	15.6	0.302	1.951
	31.25	0.297	2.03
	62.5	0.292	2.09
	125	0.292	2.151
	250	0.292	2.32
	500	0.286	2.509
Fc2A	7.8	0.284	1.928
	15.6	0.279	2.131
	31.25	0.284	2.289
	62.5	0.278	2.379
	125	0.284	2.469
	250	0.284	2.649
	500	0.257	2.853
Acarbose	7.8	0.291	1.884
	15.6	0.291	2.02
	31.25	0.296	2.11
	62.5	0.296	2.223
	125	0.296	2.268
	250	0.296	2.336
	500	0.285	2.606

II.1.2.1. Détermination de l'efficacité inhibitrice de l'activité de l' α -amylase (IC₅₀) :

Le pourcentage d'inhibition a été calculé d'après la diminution en valeurs des densités de courant représenté dans le Tableau 3.4 en utilisons la formule suivante : (S. Youmbai, 2021).

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

Avec : A = La valeur de la densité de courant en absence de l'inhibiteur.

B = La valeur de la densité de courant en présence de l'inhibiteur.

Le tracé du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'inhibiteur est présenté dans la (Figure VI - 3).

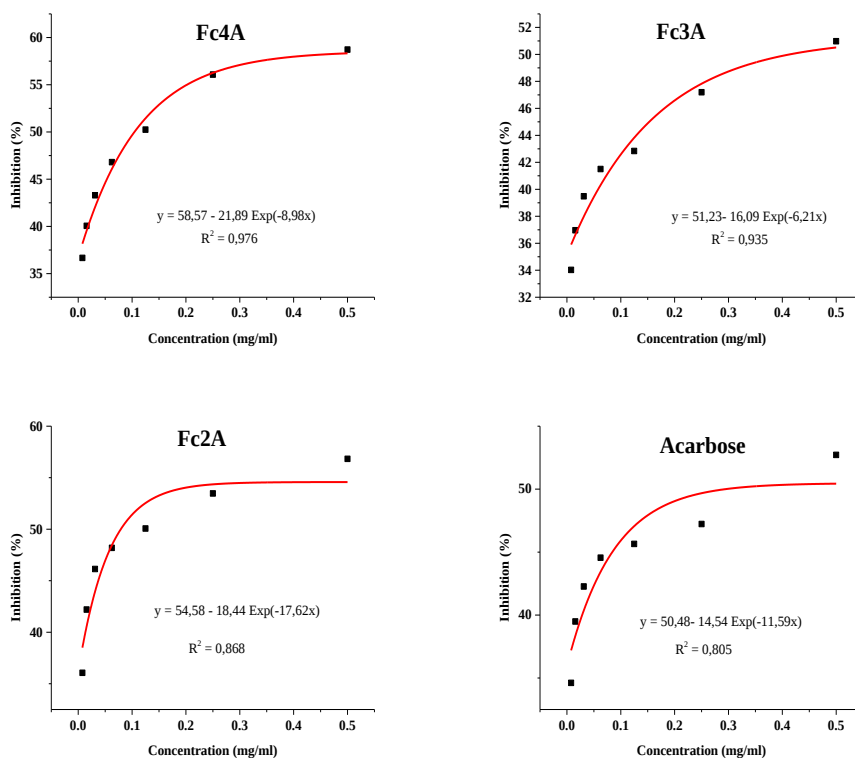


Figure VI- 3: Courbes exponentiels des pourcentages d'inhibition obtenu à partir des données électrochimiques en fonction des concentrations des composés étudiées.

D'après la (Figure VI-3), nous pouvons constater une fonction exponentielle entre le pourcentage d'inhibition de l'enzyme et la concentration utilisé des dérivés ferrocénique étudiées. Cette inhibition dépasse les 50% pour 0.5 mg/ml. Les valeurs obtenues de la concentration inhibitrice 50 de l'interaction des composés étudiées avec de l' α amylase

sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI.5 : valeurs de la IC_{50} des composés étudiés et de l'acarbose obtenu à partir de la voltammétrie cyclique.

Composés	IC_{50} (mg/ml)
Fc4A	0.104 ± 0.001
Fc3A	0.416 ± 0.02
Fc2A	0.113 ± 0.003
Acarbose	0.343 ± 0.076

Les IC_{50} ont été réalisées par répétition 3 fois ($n = 3$) et les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type.

Le dérivé qui présente l'inhibition la plus forte est le Fc4A une valeur de IC_{50} de 0.104 ± 0.001 mg/ml, suivi par Fc2A qui exerce une inhibition avec une IC_{50} de 0.113 ± 0.003 mg/ml et à la fin le Fc3A avec une IC_{50} de 0.416 ± 0.02 mg/ml.

Par rapport à la IC_{50} de l'acarbose qui est de 0.343 ± 0.076 mg/ml, les deux dérivés Fc4A et Fc2A présentent un effet inhibiteur plu forte sur l'activité de l' α -amylase.

II.1.2.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de l'interaction avec l' α -amylase :

La décroissance de la courante de pic cathodique par l'addition des diverses concentrations des dérivés ferrocéniques a été utilisé pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation suivante (E. LANEZ, 2016) :

$$\log \frac{1}{[Fc]} = \log K + \log \frac{i_{p0}}{i_p - i_{p0}}$$

$[Fc]$: est la concentration du dérivés ferrocéniques ou de l'acarbose.

K : est la constante de liaison.

i_{p0} et i_p : sont les densités de courante cathodique en absence et en présence du ferrocène.

Le tracé de $\log \frac{1}{[Fc]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$ donne une ligne droite (Figure VI.4) avec une interception en « y » égale au logarithme de la constante de liaison K_b .

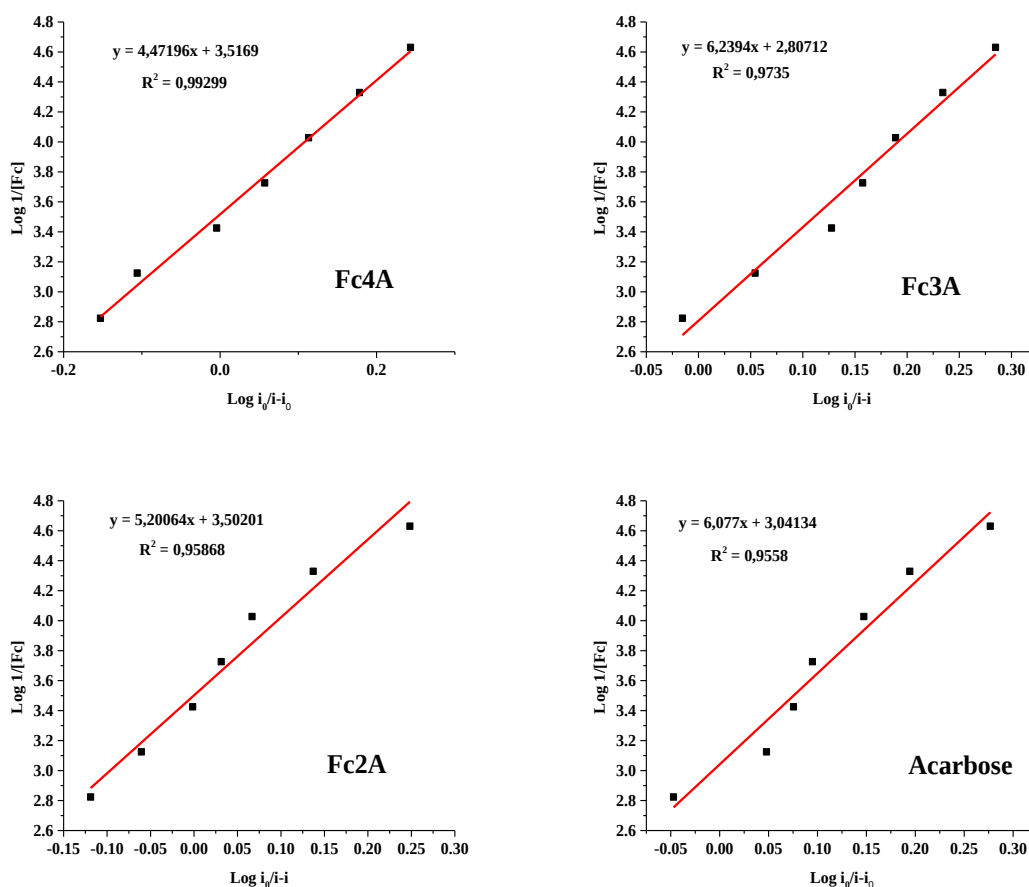


Figure VI- 4: Tracés de $\log 1/[Fc]$ en fonction de $\log i_p/i_{p0} - i_p$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec l' α -amylase.

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

Où R : La constante des gaz parfait, T : La température en Kelvin.

Les valeurs obtenues des constantes de liaisons et des énergies libres de liaison des adduits étudiés sont regroupées dans le (Tableau VI.6).

Tableau VI.6: Valeurs des K et ΔG des composés étudiés obtenues par des données de la voltammétrie cyclique.

Composés	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
Fc4A	1.94×10^3	16.69 ± 1.246
Fc3A	1.12×10^2	11.41 ± 0.27
Fc2A	5.14×10^2	15.49 ± 0.021
Acarbose	2.23×10^2	13.53 ± 0.154

Les résultats obtenus à partir de la voltammétrie cyclique tabulés dans le (**Tableau VI.4**), révèlent que les constantes de liaison à $pH = 7$ pour les trois dérivés et l'acarbose varient dans l'ordre : $K_{Fc4A} > K_{Fc2A} > Acarbose > K_{Fc3A}$. La plus grande affinité du dérivé Fc4A justifie sa candidature comme un médicament anti-diabète efficace.

II.1.3. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par spectroscopie électronique :

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec l' α -amylase l'absorbance et la longueur d'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition de l' α -amylase la variation d'absorbance peut être utilisé pour la détermination de la concentration inhibitrice 50 et des paramètres de liaison.

Dans ce qui suit les résultats de mesure des paramètres de liaison et de IC_{50} des dérivés ferrocénique étudiés obtenu par la voltammétrie cyclique on était déterminé par la spectroscopie électronique.

Ces deux paramètres ont été déterminés par l'étude de la variation de l'absorbance de l' α -amylase en absence et en présence des concentrations croissante des dérivés ferrocénique. Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisé par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans une solution tampon de phosphate 0.1 M mesurer à 580 nm. Le (**Tableau VI.5**), ci-dessous présent la variation de l'absorbance de la réaction de dissociation de l'amidon par l' α -amylase en fonction de la concentration des dérivés ferrocénique ajouté. Les valeurs de l'absorbance représenté dans le (**Tableau VI.7**), révèlent que quel que soit la portion de ferrocène ajouter il y a toujours une diminution de l'absorbance moléculaire. La diminution d'absorbance est plus remarquable pour les dérivés Fc4A et Fc2A que celle du dérivé Fc3A.

Tableau VI.7: Valeurs de l'absorbance des dérivés ferrocéniques étudiés et de l'acarbose obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis.

[Concentration] (mg/ml)				Absorbance			
Fc4A	Fc3A	Fc2A	Acarbose	Fc4A	Fc3A	Fc2A	Acarbose
0			0	0.113	0.142	0.111	0.135
0.004			0.025	0.173	0.163	0.153	0.234
0.008			0.05	0.187	0.166	0.167	0.279
0.017			0.1	0.197	0.169	0.177	0.291
0.031			0.2	0.205	0.176	0.185	0.306
0.063			0.4	0.22	0.191	0.2	0.317
0.125			0.8	0.234	0.25	0.215	0.335
0.25			1.6	0.235	0.269	0.219	0.709
0.5			3.2	0.241	0.279	0.227	0.786
1			6.5	0.246	0.292	0.234	1.997
2			12.9	0.294	0.307	0.285	-

En se basent sur l'augmentation d'absorbance de l'amidon suit à l'addition des différentes concentrations du dérivé ferrocénique et de l'acarbose (**Tableau VI.5**), et afin de valider l'ensemble de résultats obtenues par la voltammétrie cyclique, les paramètre de liaison et l'IC₅₀ de l'interaction entre ces dérivés et l' α -amylase a été calculé à partir des données spectroscopiques.

II.1.3.1. Détermination de l'efficacité inhibitrice de l'activité de l' α -amylase (IC₅₀) :

D'après les résultats de l'absorbance il est possible de calculer le pourcentage d'inhibition par la formule :

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

Avec :

A = La valeur de la densité de courant en absence de l'inhibiteur.

B = La valeur de la densité de courant en présence de l'inhibiteur.

Le tracé du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'inhibiteur est présenté dans la Figure ci-dessous.

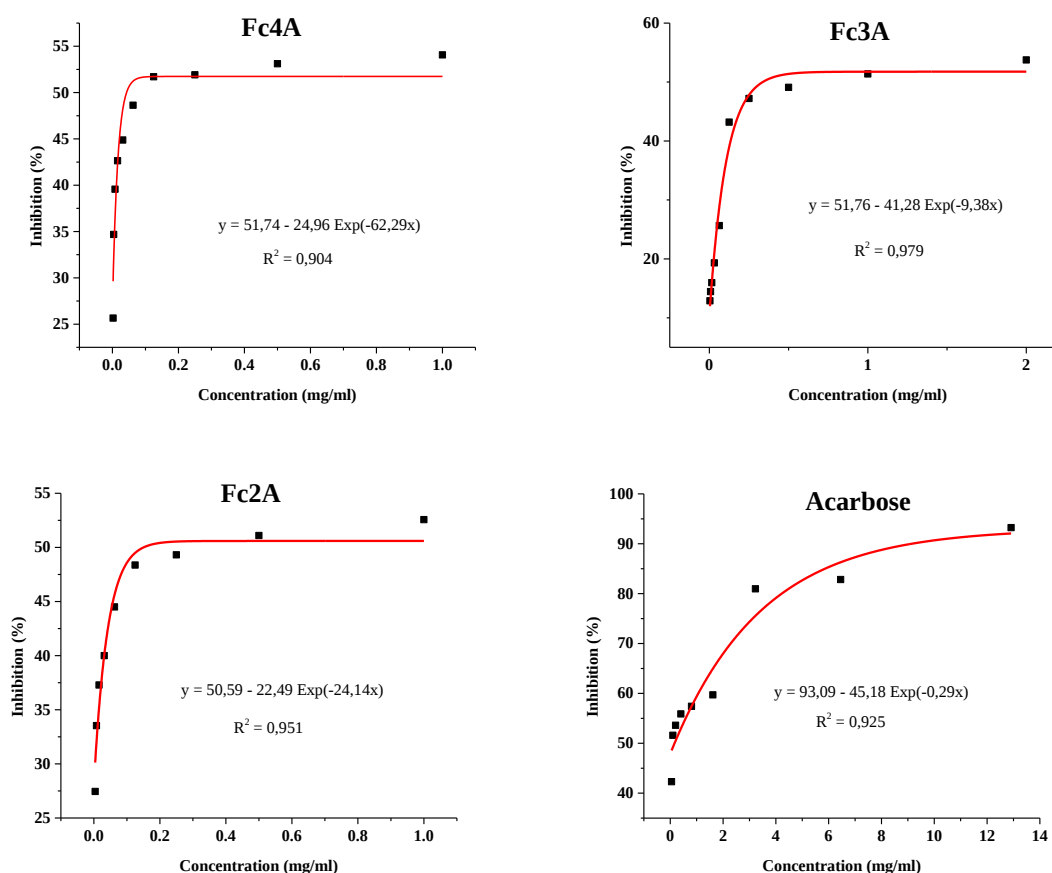


Figure VI- 5 : Courbes exponentiels des pourcentages d'inhibition obtenu à partir des données spectroscopiques en fonction des concentrations des composés  tudi es.

D'après la (**Figure VI-5**), nous pouvons constater une fonction exponentielle entre le pourcentage d'inhibition de l'enzyme et la concentration utilis e des dérivés ferrocénique  tudi es. Cette inhibition dépasse les 50% pour 1 mg/ml pour tous les dérivés ferrocénique et le 90% pour 12mg/ml pour l'acarbose. Les valeurs obtenues de la concentration inhibitrice 50 de l'interaction des composés  tudi es avec de l'alpha amylase sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI.8 : valeurs de la IC_{50} des composés étudiés et de l'acarbose obtenu à partir d'UV-Visible.

Composés	IC_{50} (mg/ml)
Fc4A	0.044 ± 0.0098
Fc3A	0.287 ± 0.0618
Fc2A	0.135 ± 0.0286
Acarbose	0.191 ± 0.0278

Les IC₅₀ ont été réalisées par répétition 3 fois (n = 3) et les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type.

II.1.3.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de l'interaction avec l' α -amylase :

L'énergie libre de liaison ΔG de l' α amylase avec les dérivés ferrocénique et l'acarbose a été déterminé par l'étude du comportement spectroscopique en absence et en présence d'une concentration croissante des ferrocène.

D'après les résultats de l'absorbance il est possible de calculer l'énergie libre de liaison ΔG par la formule :

$$\frac{A}{A_0 - A} = \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} \frac{1}{K[Fc]}$$

Avec :

A_0 : est l'absorbance du composé libre.

A : est l'absorbance de l'adduit.

ε_0 et ε : sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire.

La constante de liaison a été évaluée à partir du tracé de $\frac{A}{A_0 - A}$ en fonction de $\frac{1}{[Fc]}$ (**Figure VI- 6**). Le rapport pente/intersection peut nous permettre de calculer la constante de liaison.

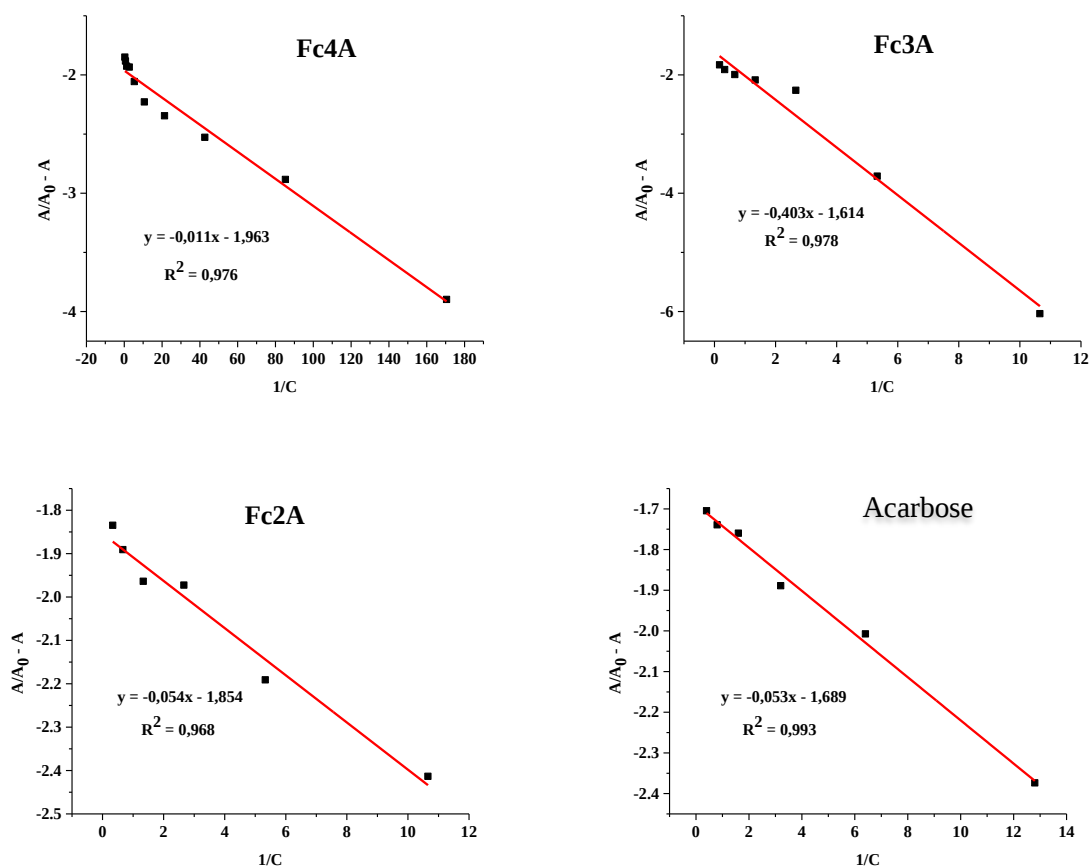


Figure VI- 6 : Tracés de $1/[Fc]$ en fonction de $A/A_0 - A$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec l' α -amylase.

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction des dérivés ferrocénique et l'acarbose avec de l'alpha amylase sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau VI.9 : Valeurs des K et ΔG des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques.

Composés	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
Fc4A	5.56×10^4	27.05 ± 0.271
Fc3A	2.61×10^3	19.49 ± 0.814
Fc2A	7.13×10^4	27.01 ± 0.611
Acarbose	1.53×10^4	23.89 ± 0.376

II.1.4. Étude de l'inhibition de l' α -amylase par amarrage moléculaire :

L'étude de l'amarrage moléculaire des complexes synthétisés FcA ont été ancrés dans la protéine de l'alpha amylase pancréatique humain afin de prédire le mode de liaison possible des complexes avec la protéine et de mieux visualiser les interactions. Les études de simulation moléculaire prédisent également le site de liaison sélectionné ainsi que la meilleure configuration des ligands étudiés à l'intérieur de protéine.

II.1.4.1. Optimisation structurale :

Les structures de conformation 3D entièrement optimisées de Fc2A, Fc3A et Fc4A sont présentées à la (Figure VI-7).

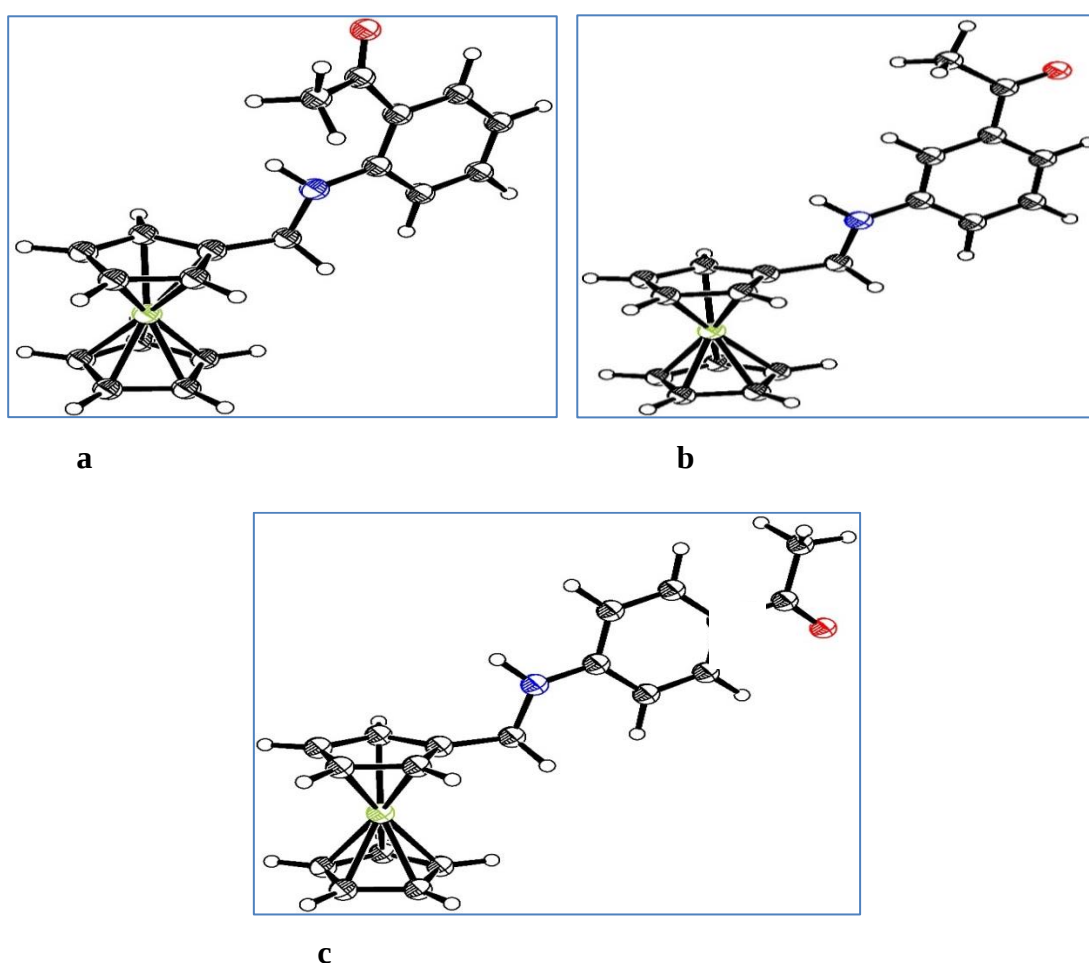


Figure VI- 7: Représentation ORTEP de Fc2A (a), Fc3A (b) et Fc4A (c).

Les ellipsoïdes de déplacement sont dessinés au niveau de probabilité de 30 % et les atomes H sont représentés sous forme de petites sphères de rayons arbitraires. Les codes de couleur sont : le carbone gris, l'hydrogène blanc, l'azote bleu, l'oxygène rouge et le fer vert.

La structure tridimensionnelle de l'acarbose (Numéro d'accès DrugBank : DB00284) provienne du Bank du médicament (<https://go.drugbank.com/>) est présenté dans la (Figure VI-8) (Clissold SP et al, 1988).

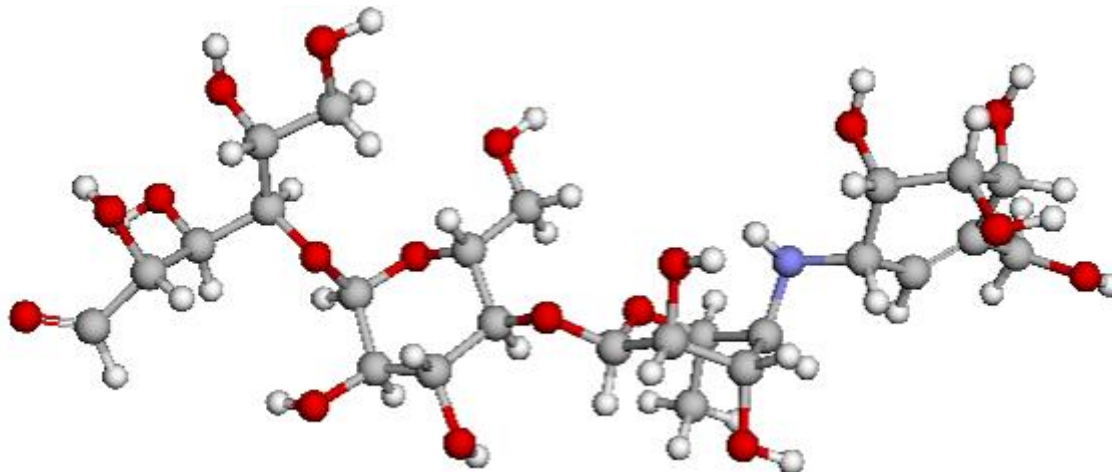


Figure VI- 8: Structure tridimensionnelle de l'acarbose téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès DrugBank : DB00284.

Les études d'amarrage moléculaire des ligands Fc2A, Fc3A et Fc4A ainsi que l'acarbose ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle (Figure VI-9), d' α -amylase pancréatique (PDB ID : 1OSE) avec une longueur de séquence égal à 496 acide aminé, extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) (Gilles, C et al., 1996).

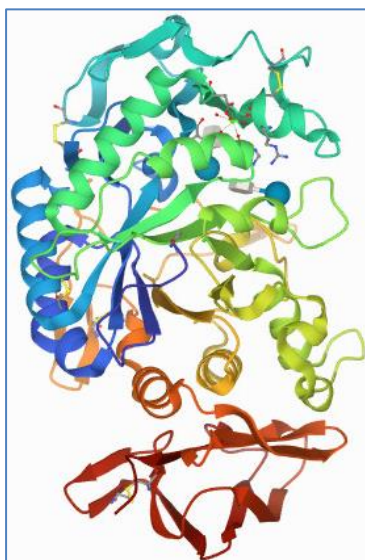


Figure VI- 9 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase pancréatique (PDB ID : 1OSE) téléchargé depuis Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

II.1.4.2. Simulations d'amarrage :

L'amarrage moléculaire a été réalisé afin de prédire le mode de liaison possible des

dérivés de ferrocène préparés à l' α -amylase et de visualiser davantage les interactions.

Avant d'effectuer les calculs d'amarrage, toutes les molécules d'eau cristallographiques ont été retirées de la structure cristalline de l' α -amylase, des atomes d'hydrogène ont été ajoutés et des charges partielles ont été attribuées au fichier de structure d' α -amylase.

Les énergies libres de liaison, les constantes de liaisons et les valeurs de l'IC50 résultante des adduits ancrés α -amylase-FcA et α -amylase-acarbose est résumée dans le (Tableau VI.10).

Tableau VI.10 : Constantes de liaisons, les énergies libres de liaisons et les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour les complexes étudiés par approche d'amarrage moléculaire.

Adduits	K (M^{-1})	$-\Delta G$ ($KJ.mol^{-1}$)	IC50 (mg/ml)
Fc4A- α -amylase	7.99×10^3	22.28	0.048
Fc3A- α -amylase	7.43×10^2	16.39	0.085
Fc2A- α -amylase	5.51×10^3	21.36	0.055
Acarbose- α -amylase	1.03×10^3	17.21	0.063

La vue de l'interaction présentée dans la (Figure VI-10), indique le positionnement des complexes étudiés dans le site actif de la protéine.

De plus, les résultats d'amarrage de FcA et l'acarbose avec l' α -amylase ont clairement montré la formation des liaisons électrostatique (Figure VI-11), entre les acides aminés de la protéine et les ligands étudiés.

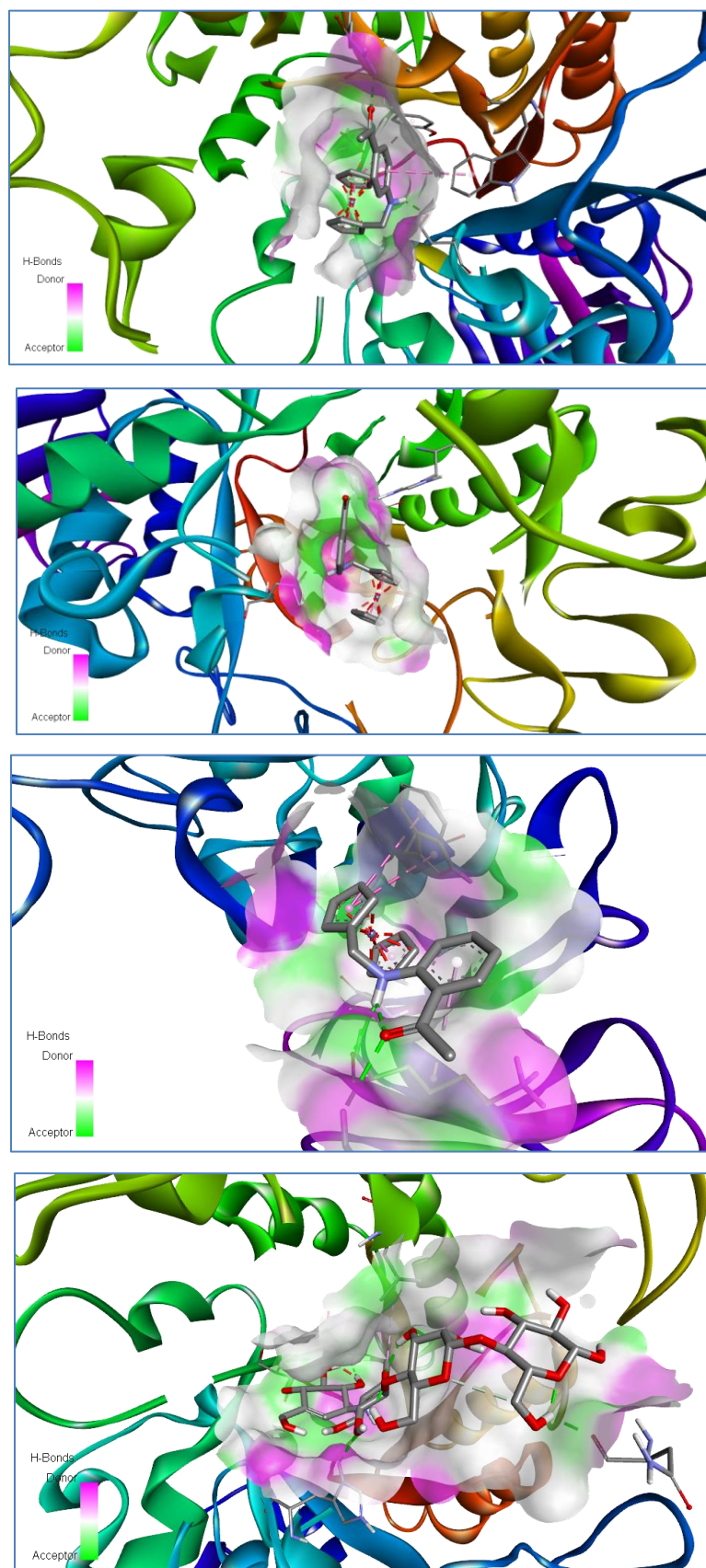


Figure VI- 10 : Poses d'amarrage de Fc4A (a), Fc3A (b), Fc2A (c) et l'acarbose avec l' α -amylase (PDB ID : 1OSE) illustrant l'interaction de tous les ligands.

Le ligand Fc4A forme deux liaisons hydrogène, un est entre l'atome d'oxygène de la fonction acétyle et de la Glutamine (GLN63), l'autre liaison hydrogène est entre (ASP300) et l'atome d'azote (NH₂) de Fc4A (**Figure VI-11a**).

Fc3A forme également deux liaisons hydrogène, la première entre l'atome d'oxygène de Fc3A et l'acide Histidine numéro 201 (HIS201) (chaîne A), l'autre liaison hydrogène est entre l'atome d'azote de Fc3A et le numéro 300 acide aspartique (ASP 300) de la même chaîne A de l' α -amylase (**Figure VI-11b**).

Fc2A aussi forme deux liaisons hydrogène, l'une est entre l'atome d'oxygène de Fc2A et l'acides aminé (GLY 459) dans la chaîne A, l'autre liaison hydrogène est entre l'atome d'hydrogène de NH₂ dans Fc2A et la Lysine numéro 457 acide (LYS 457) (**Figure VI.11c**).

Dans le cas de l'acarbose il y a 8 liaisons hydrogènes formé le tous sont illustrés dans la (**Figure VI-11d**).

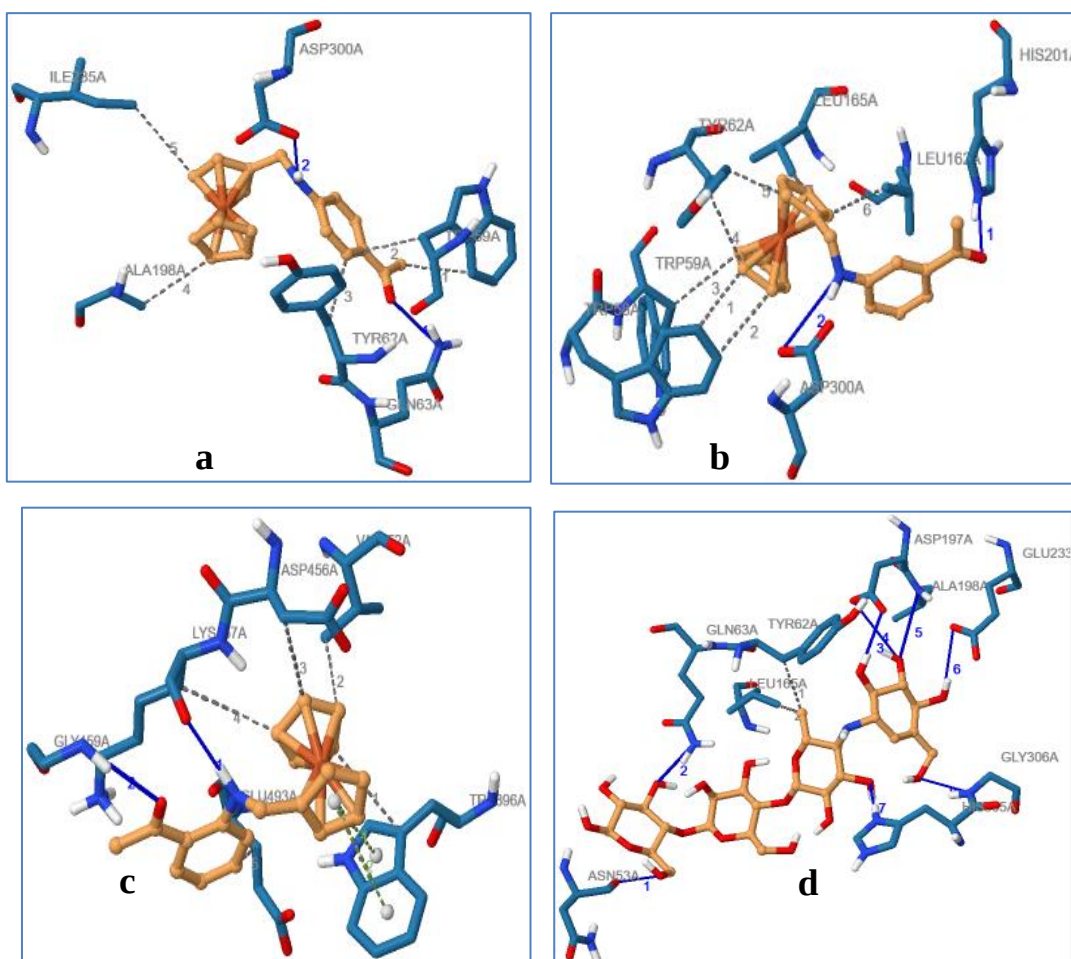


Figure VI- 11 : Liaisons électrostatiques entre les ligands étudiés et les acides aminés de l' α -amylase (PDB ID : 1OSE). (Les lignes en gris montrent les liaisons hydrophobiques, les lignes bleu indiquent les liaisons hydrogènes).

La distance entre des liaisons hydrogène sont résumées dans le (Tableau VI.11).

Tableau VI.11: Longueur des liaisons hydrogène formées entre les ligands étudiés et les acides aminés de l' α -amylase.

Fc4A

Résidu	AA	Distance H-A	Distance D-A
63A	GLN	2.13	3.02
300A	ASP	2.15	2.99

Fc3A

Résidu	AA	Distance H-A	Distance D-A
201A	HIS	2.12	3.09
300A	ASP	3.04	3.99

Fc2A

Résidu	AA	Distance H-A	Distance D-A
457A	LYS	2.10	3.10
459A	GLY	2.73	3.56

Acarbose

Résidu	AA	Distance H-A	Distance D-A
53A	ASN	1.95	2.42
63A	GLN	2.61	3.47
197A	ASP	2.47	3.44
197A	ASP	3.09	3.88
198A	ALA	3.62	4.06
233A	GLU	2.82	3.70
305A	HIS	1.84	2.86
306A	GLY	2.37	3.29

Les valeurs des énergies libres de liaison et des constantes de liaison ainsi les IC50 obtenues expérimentalement par CV et UV-Vis sont comparées à celles obtenues par amarrages moléculaire, (Tableau VI.12).

Tableau VI.12 : Comparaison des constants (M^{-1}), énergies libres de liaison ($KJ.mol^{-1}$) et les concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) obtenues expérimentalement avec celles obtenues par amarrages moléculaires.

Composés	CV	UV-Vis			Amarrages				
	<i>K</i>	$-\Delta G$	<i>IC50</i>	<i>K</i>	$-\Delta G$	<i>IC50</i>	<i>K</i>	$-\Delta G$	<i>IC50</i>
Fc4A	1.94×10^3	16.69	0.104	5.56×10^4	27.05	0.044	7.99×10^3	22.28	0.048
Fc3A	1.12×10^2	11.41	0.416	2.61×10^3	19.49	0.287	7.43×10^2	16.39	0.085
Fc2A	5.14×10^2	15.49	0.113	7.13×10^4	27.01	0.135	5.51×10^3	21.36	0.055
Acarbose	2.23×10^2	13.53	0.343	1.53×10^4	23.89	0.191	1.03×10^3	17.21	0.063

II.2. Discussion générale

L'étude *in silico*, par les serveurs SwissADME, admetSAR et Protox des paramètres physicochimiques, pharmacocinétiques et toxicologiques des dérivés de Ferrocényl-méthylacétylaniline, indiquent que les 3 composés ferrocéniques répondent à la règle de Lipinski et celle de Veber ; Les paramètres : poids moléculaire, nombre de H-bond donneurs et accepteurs d'hydrogène, le Log P et le nombre de liaisons flexibles sont respectés pour tous les composés. En plus nous avons noté que tous les composés sont solubles dans les milieux aqueux.

Concernant la règle de Veber, la surface polaire topologique de ces composés est moins de 140 Å², ainsi que, un nombre inférieur ou égale à 10 de liaisons flexibles.

Les résultats de la prédiction des propriétés pharmacocinétiques montrent que tous les dérivés ferrocéniques présentent une forte absorption par la membrane intestinale ce qui rend possible leur accès au sang, alors que le médicament de référence est caractérisé par une faible absorption intestinale.

Les résultats de la prédiction de toxicité révélé que nos composés ne peuvent pas induire des effets néfastes pour l'organisme pour les 5 types de toxicités présentés qui sont mieux même par rapport au médicament témoins.

Dans l'ensemble ; les prévisions d'ADMET ont confirmé les propriétés pharmacocinétiques et de ressemblance aux médicaments des trois candidats principaux sélectionnés.

Les résultats *in vitro*, par la méthode de la voltammétrie cyclique révéler que les trois dérivés étudiés montrent une inhibition vis-à-vis l'activité de l' α -amylase. Les résultats sont exprimés dans un premier temps en pourcentage d'inhibition et ensuite par les IC₅₀ (la concentration d'échantillon nécessaire pour diminuer l'activité enzymatique à 50%). Le pourcentage d'inhibition varie d'un composé à un autre en fonction de la concentration utilisée, il augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les valeurs de l'énergie libre de liaison varient dans le même ordre que celle de la constante de liaison, leur insigne indique la spontanéité de la réaction d'interaction de l' α -amylase avec les dérivés ferrocénique étudiés.

D'après la méthode spectroscopique, La plus stable conformation est celle de Fc4A avec une valeur de ΔG plus négative : -27.05 KJ/mol, ce qui traduit la bonne interaction entre le Fc4A et l' α amylase. Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG obtenu

par spectroscopie électronique il est remarquable que toutes les valeurs ayant le même ordre que les valeurs obtenues par voltammétrie cyclique, le chose qui confirme le bonne accorde entre les deux techniques in-vitro.

Notre travail est complété par l'étude de plusieurs conformations d'un ligand in- silico via l'amarrage moléculaire. L'amplitude des énergies libres de liaison calculées indique une affinité de liaison élevée entre l'alpha amylase et les ligands étudiés. Les constantes de liaison ont été conclues à partir des valeurs d'énergie de liaison à l'aide de l'équation décrite précédemment. Les valeurs d'énergie libre de liaison obtenues ainsi l'IC50 sont très proches de celles obtenues par voltamétrie cyclique et spectroscopie électronique. Ainsi, nous pouvons voir qu'il y avait un complément mutuel entre les études expérimentales et la technique d'amarrage moléculaire, ce qui peut valider nos tests expérimentaux et fournit une preuve supplémentaire de l'interaction d'inhibition.

L'analyse des données a montré que tous les composés sélectionnés ont formé des liaisons électrostatiques soit de type hydrogène ou bien hydrophobique avec l'enzyme cible, il est remarquable que tous les dérivés interagissent avec les acides aminés de site actif.

D'après les résultats obtenus on peut classer les IC 50 des dérivés ferrocénique étudiés et de l'acarbose comme suit : Fc4A > Fc2A > Acarbose > Fc3A ; ce qui montre que le Fc4A est le dérivé qui a une IC50 plus efficace.

Conclusion

Conclusion

Les études effectuées dans ce travail s'appuient sur l'utilisation d'outils biologiques et bio-informatiques pour vérifier l'activité antidiabétique des dérivés ferrocéniques étudiés.

Vu le rôle crucial de l' α -amylase dans la régulation enzymatique de l'homéostasie glucidique, nous suggérons dans la première étape de ce travail, de réaliser une étude *in silico* à l'aide de SwissADME qui vise à évaluer les divers propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de ressemblance aux médicaments des dérivés ferrocéniques étudiés.

Par la suite, nous avons travaillé *in vitro* on utilise deux méthodes expérimentales à savoir la voltamétrie cyclique et la spectroscopie électronique, afin de déterminer l'interaction entre les composés étudiés et l' α -amylase et d'évaluer leur activité inhibitrice. En fin, nous avons confirmé leur efficacité biologique obtenue *in vitro* à l'aide de l'AutoDock Tools.

Les résultats obtenus après l'étude bio-informatique indiquent que les composés étudiés ont des bonnes caractéristiques donnent l'espoir pour les considérer comme des bons candidats médicamenteux.

Les travaux effectués *in vitro* confirment les perspectives bio informatiques en montrant que les composés étudiés ont une action sur l' α -amylase, en effet ils sont capables de se lier à l'enzyme cible et l'inhiber grâce à ses bonne affinité traduite par les valeurs de l'IC 50 et ΔG .

Il a été montré aussi, d'après la visualisation obtenue par le logiciel AutoDock Tools, que les composés étudiés se fixent à l' α -amylase avec lequel ils forment des liaisons électrostatiques.

En effet tous les composés étudiés interagissent avec les AA de site actif. Ce type de liaison engendre des complexes du type enzyme-inhibiteur.

On conclut que nos dérivés ayant un potentiel d'inhibition de l' α -amylase et nous espérons que l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances biologiquement actives visés à traiter les sujets diabétiques.

Références

Références :



- **Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008).** Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.
- **Alessi, D. R., & Downes, C. P. (1998).** The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(1-2), 151-164.
- **Allain p, (2008).** Les médicaments, 3ème édition. N°123.
- **Altman, J. J., Ducloux, R., & Lévy-Dutel, L. (2012).** Le grand livre du diabète. Editions Eyrolles.
- **Amina, C., & Khaoula, N. (2017).** Etude in silico de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la chitinase fongique.
- **Andrews, D. H. (1930).** The relation between the Raman spectra and the structure of organic molecules. *Physical Review*, 36(3), 544.
- **Anne, F. C..** Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France. *Institut Veille Sanitaire*, 42-43.
- **Annie Lé garé. (2001).** Changement des propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon induit par l'entraînement en endurance. Thèse de doctorat. Université du Québec à Trois-Rivières. P:3
- **Anonyme, 2017. -** Les diabètes. Available from <https://www.bio-top.net/Schemas/Glucagon1.gif>. Consulté le 18-05-2017.
- **Ansm.sante.fr . (ansm.sante.fr ,2020).** Interactions médicamenteuses et cytochromes – agence nationale de sécurité du médicament (ansm) et de produits de santé. [Enligne]. [https://ansm.sante.fr/Dossiers/Interactions-medicamenteuses/Interactions-medicamenteuses-et-cytochromes/\(offset\)/1](https://ansm.sante.fr/Dossiers/Interactions-medicamenteuses/Interactions-medicamenteuses-et-cytochromes/(offset)/1). Consulté le : [25/05/2020].
- **Appel, M. A. (2015).** Ring Rotation in Ferrocene and Ferrocene-containing Polymers.
- **Arfa L., Abid A., Kéfi R., Nouira S., (2008).** Base génétique du diabète. XI ème congrès de la Société Tunisienne de médecine interne .www.stmi.org.tn. Janvier 2011.

- **Arrault, A. (2007).** *Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- **Auberval N., 2010.** - Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. In *Physiologie et biologie des organismes-populations- interactions*. Université de Strasbourg, France. p. 257.
- **Avwioroko, O. J., Tonukari, N. J., & Asagba, S. O. (2015).** Biochemical characterization of crude α -amylase of *Aspergillus* spp. associated with the spoilage of cassava (*Manihot esculenta*) tubers and processed products in Nigeria. *Adv. Biochem*, 3(1), 15-23.



- **Balarac ,N ;sauvanet J.P(1999).**diagnostique et classification du diabète sucré ,les nouveaux critères- diabètes et métabolismes vol 25 N 1 P :72-83.
- **Baly, D. L., & Horuk, R. (1988).** The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochimica et biophysica acta*, 947(3), 571–590. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90008-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90008-1)
- **Baramееa, A. Coppinc, A. Mortuairec, M. Pelinskia, L. Tomavoc, S. & Brocarda, J. (2006).** Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 1294-1302.
- **Beagley, P. Blackie, M.A. L. Chibale, K. Clarkson, C. Meijboom, R. Moss, J.R. Smith P. J. & Su, H. (2003).**Synthesis and antiplasmodial activity in vitro of new ferrocene chloroquine analogues. *the royal society of chemistry*, 3046-3051.
- **Bechki, M. K. (2012).** Etude de comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanolet nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Kasdi Marbah Ouargla.
- **Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., ... & Seino, S. (1990).** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care*, 13(3), 198-208.

- **Benabdesselam, S. (2017).** Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par l'arylation de ferrocène. *Doctorat ès sciences, Université Kasdi Merbah, Ouargla, p61.*
- **Benaouida K., 2008.** - Etude de l' α -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. In *Biotechnologie microbienne. Université Mentouri, Constantine, République Algerienne Démocratique et Populaire. p. 67.*
- **Benhaddou Andaloussi, A. (2010).** Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa*: sites d'action cellulaires et moléculaires. Thèse présenté à la faculté de l'étude supérieure et poste doctorale en vue d'obtention du grand phd en pharmacie p214.
- **Bernard, A. S., Clède, S., Emond, M., Monin-Soyer, H., & Quérard, J. (2018).** *Techniques expérimentales en chimie-Classes prépas et concours: Travaux pratiques.* Dunod.
- **Berry D. et Paterson A., 1990.** Enzymes in food industry. In: Sucking C.J. (ed.), *Enzyme chemistry impact and application.* Edition champman and hall London, 2nd edition, pp. 306 - 351.
- **Biggs, W. H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., & Arden, K. C. (1999).** Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7421- 7426.
- **Bioud, M et Lassoued, N. (2015).** Schéma D'élaboration d'une Molécule à Visée Thérapeutique et Application Biologique .Mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine. P10
- **Bodor, N., & Buchwald, P. (Bodor, 1999).** Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 36(2-3), 229–254. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00090-8](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00090-8)
- **Boel E ., Brady L ., Brzozwski A ., Derewenda Z ., Dodson G ., Jensen V., Petersen S., Swift H., Thim L .et Woldike., H. (1990).** Calcium binding in α -amylases: an Xray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*; 29,p :6244–6249.

- **Boeyens. J.C.A. (1967)** .J . Phy. Chem. Hhaca., 71, 2969.
- **BOITARD C, 1, avril 2014.** In : INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale). Dossier d'information : diabète de type Disponible sur : <https://www.inserm.fr/dossier/diabete-type-1/>(Page consultée le 22/11/2021).
- **Bollen, M., Keppens, S., & Stalmans, W. (1998).** Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochemical Journal*, 336(1), 19-31.
- **Bosca, L., Challiss, R. A. J., & Newsholme, E. A. (1985).** The effect of fructose 2, 6-bisphosphate on muscle fructose-1, 6-bisphosphatase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 828(2), 151-154.
- **Bouchagra S. (2018).** Modélisation des interactions protéine-petites molécules : Etude de la relation structure-fonction dans le cas des lipases. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Bioorganique : Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie. 145 p.
- **Boudebia, O., & Boutera, S. (2017).** Evaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane.
- **Bremner, I. (1998).** Manifestations of copper excess. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5), 1069S-1073S.
- **Brett, C. M., Brett, O., & Electrochemistry, A. M. (1993).** Principles, methods and applications.
- **Brown H., Sanger F. & Kitai R., 1955.** - The structure of pig and sheep insulins. *Biochemical*.
- **Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002).** Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(4), 267-277.
- **Burcelin, R., Katz, E. B., & Charron, M. J. (1996).** Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes & metabolism*, 22(6), 373-396.
- **BUYSSCHAERT M, 2012.** Diabétologie clinique, 4ème édition, Éditions De Boeck, Bruxelles, Belgique .



- **Cabrera O., Berman D., Kenyon N., Ricordi C., Berggren P. & Caicedo A., 2006.**
- The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7): 2334-2339.
- **Caironi, V., Schwitzgebel, V. M., Jornayvaz, F. R., & Gariani, K. (2021).** Diabète de type MODY : une entité souvent méconnue [MODY type diabetes: an often-misunderstood entity]. *Revue médicale suisse*, 17(741), 1062–1066.
- **Carbonell, R., Desroches, J., & Detournay, E. (1999).** A comparison between a semi- analytical and a numerical solution of a two-dimensional hydraulic fracture. *International journal of solids and structures*, 36(31-32), 4869-4888.
- **Carneir M., Dumont C., (2009).** Maladie de Biermer chez une adolescente diabétique. *Archive de Pédiatrie*. Vol.16 (4): 357-59.
- **Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., & Devaskar, S. U. (2009).** Will the original glucose transporter isoform please stand up!. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(4), E836-E848.
- **Cavarelli, J. Biocristallographie (2020).** : De la détermination des phases à la structure cristallographique. Technique de l'ingénieur. [En ligne] <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharmath15/chimie-pharmaceutique-42609210/biocristallographie-p1111/base-de-donnees-pdb-p1111v2niv10008.html>. Consulté le : [12/05/2020].
- **Cha, J. Y., & Repa, J. J. (2007).** The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: the carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 743-751.
- **Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M., & Kandror, K. V. (2010).** Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes*, 59(4), 775-781.
- **Chavain, N. (2008).** Conception, synthèse, analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de ferroquine. Thèse de doctorat. Université de Lille I. P11-12.

- **Cheeseman, C. (2008).** GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E238-E241.
- **Chemspider (2021).** Ferrocene | C₁₀H₁₀Fe | ChemSpider . Retrieved 4 May 2022, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7329.html>.
- **ChemSpider . (2022).** Ferrocene | C₁₀H₁₀Fe | Retrieved 13 March 2022, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7329.html>.
- **Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2004).** Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11245-11250.
- **Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Tang Y. 2012.** admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*.2012, 52, 3099–3105.
- **CHENG, A. Y. (2008).** Les lignes directrices de pratique clinique 2008 de l'Association canadienne du diabète: le point sur les maladies cardiovasculaires.
- **Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., ... & Tang, Y. (2002).** A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties, *ACS Publication Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 3099–3105.
- **Chiasson, J. L., & Hôtel-Dieu, C. P. (2004).** Connaître son diabète--pour mieux vivre. Éditions Rogers media.
- **Chiasson, j. l; Josse, R. j; Gomis, R ; Hanefeld, M ; Manasik, A et Leakso, M(2002) .** Acarbose for prenention of type2 diabetes ellitus, stoppriddmtrail Reserch group.
- **Chiba S., 1988.** - Amyloglycosidase. In *Handbook of Amylases and related enzymes*. The Amylase Research Society of Japan, Pergamum Press, Oxford, U.K. pp. 104-116.
- **Chirgwin J.M., 1990.** - Molecular biology for nonmolecular biologists. *Diabetes Care*, 13(3): 188-197.
- **CHRIST, B., NATH, A., BASTIAN, H., & JUNGERMANN, K. (1988).** Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat

- hepatocytes by glucagon and insulin. *European journal of biochemistry*, 178(2), 373-379.
- **Christin-Maître, S. 2005.** Les nouveaux traitements du diabète: quand les utiliser?.
 - **Cissé, B. I. (2012).** Influence des apports alimentaires chez les enfants diabétiques de type 1 de 6 mois à 18 ans venus en consultation au centre de lutte contre le diabète.
 - **Clarke, S. D., & Jump, D. B. (1993).** Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Progress in lipid research*, 32(2), 139-149.
 - **Clissold, S. P., Heel, R. C. Tioconazole.** A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial mycoses. *Drugs* 1986, 31 : 29–51.
 - **Colas, R. (2010).** *Syndrome métabolique et diabète chez l'Homme. Composition lipidique et oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) plasmatiques en relation avec l'activation des plaquettes sanguines* (Doctoral dissertation, INSA de Lyon).p 31-32.
 - **Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. (2010).** Recommandations pour la pratique clinique: le diabète gestationnel. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 39(8 Suppl 2), S1- 342.
 - **Comfort D.A., Chou C.J., Conners S.B., VanFossen A.L. & Kelly R.M., 2008.** - Functional genomics-based identification and characterization of open reading frames
 - **Cook, D. L., Ikeuchi, M., & Fujimoto, W. Y. (1984).** Lowering of p H i inhibits Ca²⁺- activated K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311(5983), 269-271.



- **Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017).** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- **Dar, A. M., & Mir, S. (2017).** Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges. *J Anal Bioanal Tech*, 8(2), 1-3.
- **Daubresse, J-C, (2004).** Le traitement du diabète de type 2 in revue médicale Bruxel.25, 22- 8.C.H.U.de Charleroi, servie de diabétologie. *Endocrinologie* N°107.

- **Decaux, J. F., Antoine, B., & Kahn, A. (1989).** Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11584-11590.
- **Dejob M., 2013.** - Études structurales et fonctionnelles d'alpha-glucosidases bactériennes. In Biochimie [qbio.BM]. Université Claude Bernard Lyon I, France. p. 266.
- **Dentin, R., Girard, J., & Postic, C. (2005).** Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1), 81-86.
- **Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J., & Montminy, M. (2008).** Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*, 319(5868), 1402-1405.
- **Diabetesatias , (2021).**Extrait de la 9ème édition de l'Atlas du diabète de la FID. Chiffres clés. [Internet]. Disponible sur: <https://diabetesatias.org/tr/key-figures/>.
- **Dias, R., Timmers, L. F. S. M., & Caceres, R. A. De Azevedo Jr., WF (Dias, 2008).** *Curr. Drug Targets*, 9(12), 1040-1047.
- **Doblado, M., & Moley, K. H. (2009).** Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(4), E831-E835.
- **DrouinP ;Blickle ,G ;F,charbonnel,B ,Eshweege ,E;Guillausseau,P ,G ;polain.P .F ;Dnoise ;balarac ,N ;sauvanet J.P(1999).**diagnostic et classification du diabète sucré ,les neveux critères- diabète et métabolismes vol 25 N 1 P :72-83.
- **DrugBank Online. (2022).** Acarbose: Uses, Interactions, Mechanism of Action | Retrieved 4 May 2022, from <https://go.drugbank.com/drugs/DB00284> .
- **Dubar, F. Khalife, J. Brocard, J. Dive, D. & Biot , C. (2008).** Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug Thoughts on the Mechanism of Action, *Molecules*, 13:2900-2907.
- **Dubois LD., (2010).** Progrès physiopathologiques dans le diabète de type1. Revue du praticien. Vol.60. P : 165-69.
- **Ducobu, J, (2003).** Oral ant diabetic drugs in 2003. Rev Med Brux, 24, pp.361-368.

- **Durham, S. K., Suwanichkul, A., Scheimann, A. O., Yee, D., Jackson, J. G., Barr, F. G., & Powell, D. R. (1999).** FKHR binds the insulin response element in the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter. *Endocrinology*, 140(7), 3140-3146.



- **Efrat, S. (2008).** Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus. *Advanced drug delivery reviews*, 60(2), 114-123.
- **El Hadji Said, K. (2016).** *Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire* (Doctoral dissertation, thèse de master d'université de tlemcen faculté des sciences département de chimie. tlemcen. algérie).
- **El-Maghrabi, M. R., Noto, F., Wu, N., & Manes, N. (2001).** 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: suiting structure to need, in a family of tissue-specific enzymes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 4(5), 411-418.
- **Encoding alphasglucoside-processing enzymes in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus.** *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4): 1281-1283. doi: 10.1128/AEM.01920-07.
- **Erika F. Brutsaert. (2020).** Traitement médicamenteux du diabète sucré. Le manuel MSD. Disponible à (<https://www.msdmanuals.com/fr/>).
- **Erika F. Brutsaert.(2020).** Diabète sucré. New York Medical College. Le manuel MSD. Disponible à: (<https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-endocriniens-et-metaboliques/diabete-sucree-et-troubles-du-metabolisme-glucidique/diabete-sucree>).
- **Estelle B. (2021).** Diabètes MODY. Consulter le 21 November 2021, sur <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/metabolisme/diabetes-mody/>



- **Férey, N., Bouyer, G., Martin, C., Drif, A., Bourdot, P., Ammi, M., ... & Autin, L. (2009).** Docking de protéines en réalité virtuelle. Une approche hybride et

- multimodale. *Revue des Sciences et Technologies de l'Information-Série TSI: Technique et Science Informatiques*, 28(8), 983-1015.
- **Ferrer M., Golyshina O.V., Plou F.J., Timmis K.N. & Golyshin P.N., 2005.** - A novel alphasglucosidase from the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* strain Y with high transglycosylation activity and an unusual catalytic nucleophile. *Biochemical Journal*, 391(Pt 2): 269-276. doi: 10.1042/BJ20050346.
 - **Fogarty W. M. et Kelly, C. T., 1994.** *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science, London, New York. (43):71-132. wikidoc (2022). Ferrocene - wikidoc. Retrieved 4 May 2022, from <https://www.wikidoc.org/index.php/Ferrocene>.
 - **Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (Forli, 2016).** Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, 11(5), 905-919.
 - **Fouda, M. F. R., Abd-ElZaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007) .** On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*, 21: 613–625.
 - **Foufelle, F., & Ferré, P. (2002).** New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochemical Journal*, 366(2), 377-391.
 - **Fröjdö, S., Vidal, H., & Pirola, L. (2009).** Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(2), 83-92.
- 
- **George Priya Doss, C., Chakraborty, C., Narayan, V., & Thirumal Kumar, D. (2014).** Computational approaches and resources in single amino acid substitutions analysis toward clinical research. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 94, 365–423. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00010-X>
 - **Ghallab, R. (2014).** Synthèse et étude structurale par diffraction des rayons X de nouveaux ligands ferroceniques et leur complexation avec le palladium.

- **Gilles, C., Polette, M., Piette, J. et al. (1996).** High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cell. *Int J cancer* 65 : 209-213.
- **Girard, J. (2007).** Fondements, physiologiques du diabète du type II, in. *La revue de praticiens*. 49, 22-9. *Chhnutr. Diet.* 36, hors série 1.
- **Girard, J., Perdereau, D., Foufelle, F., Prip-Buus, C., & Ferré, P. (1994).** Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *The FASEB Journal*, 8(1), 36- 42.
- **Gray, N. E., Lam, L. N., Yang, K., Zhou, A. Y., Koliwad, S., & Wang, J. C. (2012).** Angiopoietin-like 4 (Angptl4) protein is a physiological mediator of intracellular lipolysis in murine adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8444-8456.
- **Grimaldi, A.(2001).**Guide pratique du diabète. Paris: Masson. 312 p.
- **GRISE, F. (2006).** Recherche des senseurs calciques de la sécrétion d'insuline dans les cellules-pancréatiques: Étude des synaptotagmines (Doctoral dissertation, Université Bordeaux 1).
- **Guedes, I. A. (2014).** Magalhães CS, Dardenne LE. *Biophys Rev*, 6(1), 75.
- **Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective: A review. *Process biochemistry*.38(1): 599- 616.



- **HACHIMI, Mohamed. (2021).** Étude de la corrélation entre la glycémie à jeun et l'hémoglobine glyquée chez une population de diabétiques de type 2 Thèse N°049/21.
- **Halimi S. (2006).**Metformin: 50 years old, fit as a fiddle, and indispensable for its pivotal role in type 2 diabetes management. *Diabetes Metabolism*. 32:555–6
- **Halimi, S. (2005).** Les glitazones- The glitazones- revue de médecine interne, N°26. P: 54-57.
- **Haslett, H; Chilevers E et Nicolas, A. (2002).** Médecine interne principe et pratique. Ed.Malonie, Vol : 18. P : 473- 500.

- **Hattich, N. (2017).** *Diabète de type 2 et glycémie: quelle répartition idéale des repas en termes d'apport énergétique?: travail de Bachelor* (Doctoral dissertation, Haute école de santé Genève).
- **Hazan, C. (2008).** *Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase bêta par criblage virtuel et RMN* (Doctoral dissertation, Toulouse 3).
- **Hellerstein, M. K., Schwarz, J. M., & Neese, R. A. (1996).** Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annual review of nutrition*, 16(1), 523-557.
- **Hemmami, H.(2017).** Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl)nitroaniline. Thèse de doctorat en chimie, Université Echahid Hamma Lakhdar, ELOUED, p13.
- **Henquin, J. C., Anello, M., & Sato, Y. (2000).** ATP-dependent potassium channels and insulin secretion: essential but not sufficient role. *Journées annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu*, 13-24.
- **Henri M. (2011).** Obésité et insulino-résistance :Etude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [125I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose. Thèse doctorat. Université de Grenoble.
- **Henry, C. (2011).** Le rôle de ST18 dans la cellule pancréatique bêta.
- **Hers, H. G., & Hue, L. (1983).** Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 617-653.
- **Herz, M., Arora, V., Sun, B., Ferguson, S. C., Bolli, G. B., & Frier, B. M. (2002).** Basal-bolus insulin therapy in Type 1 diabetes: comparative study of pre-meal administration of a fixed mixture of insulin lispro (50%) and neutral protamine lispro (50%) with human soluble insulin. *Diabetic medicine*, 19(11), 917-923.
- **Hetényi, C., Maran, U., & Karelson, M. (2003).** A comprehensive docking study on the selectivity of binding of aromatic compounds to proteins. *Journal of chemical information and computer sciences*, 43(5), 1576-1583.
- **Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964).** Inhomogeneous electron gas. *Physical review*, 136(3B), B864.

- **Horii, A., Emi, M., Tomita, N., Nishide, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1987).** Primary structure of human pancreatic α -amylase gene : its comparison with human salivary α -amylase gene. *Gene*, 60, 57-64.
- **Hugues Beauregard. 2003.** Le suivi du diabète de type 2 in le clinicien. Hugues Beauregard. 2003. Le suivi du diabète de type 2 in le clinicien.
- **Hvidberg, A., Djurup, R., & Hilsted, J. (1994).** Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *European journal of clinical pharmacology*, 46(1), 15-17.

J

- **IDF, 2013.** IDF Diabetes Atlas sixth edition, T.N. Leonor Guariguata, Jessica Beagley, Ute Linnenkamp, Olivier Jacqmain, Editor 2013.

L

- **Jacqueminet S. & Grimaldi A., 2005.** - Guide pratique du diabète, In 2 : Quand et comment diagnostiquer un diabète. Edited by Elsevier Masson, France. p. 271.
- **Jade, Dhananjay & Gupta, Dinesh. (2016).** Introduction to methods for molecular docking and HT virtual screening. 10.13140/RG.2.2.12322.84167.
- **Januel, C. (2003).** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète: étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4 (Doctoral dissertation, Lyon, INSA). *Journal*, 60(4): 556-565.

K

- **K. N.Trueblood, H. B. Burgi, H. Burzlaff, J. D. D'unité, C. M. Gramaccioli, H. H. Schulz, U. Shmueli and S. C. Abrahams, Acta Crystallogr., Sect. A, 52, (1996), 770-781.**
- **Karn, R.C., Malacinski, G.M. (1978).** The comparative biochemistry, physiology, and genetics of animal alpha-amylases. *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, 7, 1-103

- **Kato N., Suyama S., Shirokane M., Kato M., Kobayashi T. & Tsukagoshi N., 2002.** - Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1250-1256.
- **Kelly C.T., Bolton D. & Fogarty W.M., 1997.** - Bi-phasic production of a-amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnology*, 19(7): 675-677.
- **Keseru, G. M., & Menyhárd, D. K. (1999).** Role of proximal His93 in nitric oxide binding to metmyoglobin. Application of continuum solvation in Monte Carlo protein simulations. *Biochemistry*, 38(20), 6614-6622.
- **Khalef, A. (2012).** Etude du comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanol et nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Mohamed Khider – Biskra. P8- 10.
- **Khelef, A et Lanez, T. (2015).** In vitro assays of the antioxidant activities of ferrocene derivatives bearing amine, amide or hydrazine groups. *Der Pharma Chemica*, 7(6):318- 323
- **Khelef, A. (2014).** *Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N- phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N'-phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- **Kimball C. & Murlin J., 1923.** - Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 58(1): 337-346.
- **Koliwad, S. K., Kuo, T., Shipp, L. E., Gray, N. E., Backhed, F., So, A. Y. L., ... & Wang, J.(2009).** Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4, fasting-induced adipose factor) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25593-25601.
- **Kraulis P.J., 1991.** - MOLSCRIPT : A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24(5): 946-950. doi: 10.1107/s0021889891004399.
- **Kren V. & Martinkova L., 2001.** - Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1303-1328.

- **Kukreja A., Maclaren NK., (2002).** NKT Cells and Type-1 diabetes and the "HygieneHypothesis" to explain the rising incidence rates diabetes. *Technology & Therapeutics.*, 4(3): 323-33.



- **L. J. Farrugia, WinGx-Ver 1.61,** An intergrated system of Programs of the Solution, Refinement and analysis of single crystal X-Ray Diffraction Data, University of Glasgow (1998).
- **Lambillotte, C., Gilon, P., & Henquin, J. C. (1997).** Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 414-423.
- **LANEZ, E. (2016).** Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de master. Université Mohamed Khider – Biskra.
- **Langlois A., (2008).** Optimisation de la revascularisation des ilots pancréatiques au cours de latransplantation, approche génétique ou pharmacologique . Thèse de doctorat . Université Louis Pasteur. Strasbourg. France.
- **Laouar, I. (2015).** Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.
- **Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2010).** mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3281-3282.
- **Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., & Beylot, M. (2004).** Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism*, 30(4), 294-309.
- **Larpent G .M et Sanglier J. J. (1992).** Biotechnologies. Principes et méthodes. P : 574- 581.
- **Laurent, D., Petersen, K. F., Russell, R. R., Cline, G. W., & Shulman, G. I. (1998).** Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis and insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 274(1), E130- E138.

- **Lebailly, B. (2015).** *Implication du gène Arntl2 lié au rythme circadien dans le diabète de type 1* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- **LEBBAD, F. (2016).** *Etude par modélisation moléculaire des mécanismes de complexation* (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid).
- **Lefebvre P.J., 1995.** - Glucagon and its family revisited. *Diabetes Care*, 18(5): 715-730.
- **Levasseur Patric. 2003.** Les antidiabétique oraux dans le traitement du diabète de type 2 inpharmas- tu lu ? Volume 6 Numéro 1.
- **Leveau J.Y. et Bouix M.(1993).** Les moisissures. In : Florent J. Ed. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc .Lavoisier Apria, pp.110-170.
- **Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010).** Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(8), 3441-3446.
- **LIN, B., MORRIS, D. W., & CHOU, J. Y. (1998).** Hepatocyte nuclear factor 1 α is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA and cell biology*, 17(11), 967-974.



- **Magnan C, Ktorza A. (2005).** Production and secretion of insulin by the pancreatic β -cell. *EMC Endocrinologie*. 2: 241-264.
- **MAKHLOUF S ; CHAHBOUB S., 2015.** - Evaluation des facteurs de risque chez les diabétiques au niveau de Ain defla. Mémoire de fin d'études : Régulations Endocriniennes et Physiopathologies. P09-10-20-21-46.
- **Mangambu, M. D. D., Mushagalusa, K. F., & Kadima, N. J. (2014).** Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75, 6211-6220.

- **Matheus, A. S. D. M., Tannus, L. R. M., Cobas, R. A., Palma, C. C. S., Negrato, C. A., & Gomes, M. D. B. (Matheus et al 2013).** Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *International journal of hypertension*, 2013.
- **Mazur A. K. et Nakatani H., 1993.** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Arch. Bioch. Biophysics*. Vol., 306 (1), pp. 29-38.
- **Mcmahon E .M., Kelly C.T. et FogartyW.M. (1999).** High maltose producing amylolytic system of a *Streptomyces* species. *Biotechnology Letters*. 21, p: 23-26.
- **Medellel, S., & Tedjani, A. (2017).** Synthèse et étude in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline.
- **Merabti R., 2006.** - Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Université Mentouri, Constantine. p. 85.
- **Mercier C., 1985.** Les enzymes amylolytiques. In : Mouranche A. Coste C. hydrolases et dépolymérase. Ed Gauthier-Villars., pp.110-140.
- **Mezhoud K. Doking (2020).** Principes et Méthode. – Ubuntu wiki [Enlinge] <https://wiki.ubuntu.com/kmezhoud/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=docking.pdf>. Consulté le [10/05/2020].
- **Mohamed, G., & Hichem, H. (2019).** Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites.
- **Monserat, J. P. (2012).** Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocénique des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). P.
- **Moore M., Cherrington A. & Wasserman D., 2003.** - Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17(3): 343–364.
- **Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008).** Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp. 365-382). Humana Press.
- **Motta P.M., Macchiarelli G., Nottola S.A. & Correr S., 1997.** - Histology of the exocrine pancreas. *Microscopy Research and Technique*, 37(5-6): 384-398. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970601)37:5/6<384::AID-JEMT3>3.0.CO;2-E.

- **Müller D., 2016.** - Conséquences traductionnelles de la perte de 4E-BP1 dans l'adénocarcinome pancréatique. In ED BSB : Cancérologie. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), Toulouse, France. p. 222.
- **Mulliken, R. S., Mulliken, R. S., & Person, W. B. (1969).** *Molecular complexes: a lecture and reprint volume.* Wiley-Interscience.
- **Mulliken, R.S. . (1952).** J. Phys. Chem. , 56 (801), 53.
- **Murata T. & Usui T., 2006.** - Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 70(5): 1049-1059. doi: 10.1271/bbb.70.1049.
- **Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigó-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A.,... & Rajas, F. (2011).** Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes*, 60(12), 3121-3131.



- **National Diabetes Data Group. 1979.** Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, .
- **Née Lebbad, F. B. (2011).** Contribution à l'étude de la stabilité des complexes de «métaux-pyrazoles» par modélisation moléculaire.
- **Neghmouche, NS., Khelef, A. et Lanez, T. (2010).** Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 01(76-82)
- **Negrato, C. A., & Gomes, M. B. (2013).** Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5(1), 1-8.
- **Nielsen J.E ., Borchert T. V and Vriend .G. (2001).** The determinants of -amylase pH- activity profiles . *Protein Engineering*, Oxford University Press. 14 (7), p:505-512.
- **Nishide, T., Nakamura, Y., Emi, M., Yamamoto, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K.(1986).** Primary structure of human salivary alpha-amylase gene. *Gene*, 41, 299-304.

- **Nistor, L. A. (2010).** Inhibition de l'absorption intestinale du glucose par les produits naturels issus de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James.
- **Nouadri T.(2011).** L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification,Caractérisation et immobilisation. Thèse de Doctorat d'Etat ; Option Biochimie Biotechnologies. Université Mentouri-Constantine, 125p.



- **Oghenetega Jonathan Avwioroko, Nyerhovwo John Tonukari, Samuel Ogheneovo Asagba. (2015).** Biochemical Characterization of Crude α -Amylase of *Aspergillus* spp. Associated with the Spoilage of Cassava (*Manihot esculenta*) Tubers and Processed Products in Nigeria 3(1): 15-23..
- **Okar D.A. and Lange A.J.** Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors*. 1999, 10(1): 1-14.
- **OMS Aide mémoire N°138, révisé en Avril 2002.**
- **OMS. (2014).** *Global status report on noncommunicable diseases 2014* (No. WHO/NMH/NVI/15.1). World Health Organization.
- **OMS. (2021).** Le pacte mondial contre le diabète : ce que vous devez savoir. Consulter sur <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/diabetes/global-diabetes-compact-brochure-french.pdf>.
- **OMS. juin 2020.**Diabète principaux repères,. Disponible sur : <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- **Orci L. & Unger R.H., 1975.** - Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet*, 2(7947): 1243-1244. doi: 10.1016/s0140-6736(75)92078-4.



- **Palladino A.A., Bennett M.J. & Stanley C.A., 2009.** - Hyperinsulinisme de l'enfant et de l'adolescent : quand la détermination de la concentration en insuline n'est pas toujours suffisante (version française). *Annales de Biologie Clinique*, 67(3): 245-254.
- **Panchal C.J., 1990.** - Yeasts strain selection. In Marcel Dekker, USA. p. 189.

- **Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 135-152.
- **Papin J. & Lang J., 2009.** - Bases moléculaires des défauts sécrétoires des cellules β pancréatiques lors de la glucotoxicité. In Sciences de la vie et de la santé. Bordeaux 1 Bordeaux, France. p. 192.
- **Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y., 1997.** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.*, 272 (11), pp.6876-6881.
- **Parr, R. G. (1989).** W. Yang Density functional theory of atoms and molecules. Oxford University Press, 1, 1989.
- **Passa, P. (2002).** Diabetes trends in Europe. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18(S3), S3-S8.
- **Peckett, A. J., Wright, D. C., & Riddell, M. C. (2011).** The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, 60(11), 1500-1510.
- **Peter-Riesch, B., Philippe, J., Stalder, H., 2002.** Découverte d'un diabète sucré. *PrimaryCare* 2:284–290.
- **pharmacomedicale.org. (2020).** Pharmacocinétique : ABSORPTION – Pharmacomédicale.org. [Enligne]. <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament/74-absorption>. Consulté le: [25/05/2020].
- **Pocock G. & Richards D.C., 2004.** - Fonction exocrine du pancréas. In Physiologie humaine : les fondements de la médecine. Masson, Paris, France. pp. 422-426.
- **Portha, B. (2003).** Anomalies programmées de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2: le paradigme du rat GK. *M/S : médecine sciences*, 19(8-9), 847–853.
- **Portha, B. (2005).** Programmed disorders of β -cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 21(6), 495-504.
- **Preitner, F., Bonny, O., Laverrière, A., Rotman, S., Firsov, D., Da Costa, A., ... & Thorens, B. (2009).** Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic

inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15501-15506.

- **Printz, R. L., Magnuson, M. A., & Granner, D. K. (1993).** Mammalian glucokinase. *Annual review of nutrition*, 13(1), 463-496.
- **Priyanka Banerjee, Andreas O Eckert, Anna K Schrey and Robert Preissner.** ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2; 46 (Web Server issue): W257–W263. (Doi: 10.1093/nar/gky318).



- **Radermacher, P., & Trager, K. (2003).** Catecholamines in the treatment of septic shock: effects beyond perfusion.
- **Rao, C. N. R. (1967).** Ultra-Violet and Visible Spectroscopy Butterworths.
- **Raverot G. (2005).** Diabète sucré de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte: Edition La Collection Hippocrate. 11-233.
- **Rena G., Guo S., Cichy S.C., Unterman T.G. and Cohen P.** Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem.* 1999, 274(24): 17179-83.
- **René, N. (2002).** Guide sur le diabète et l'hypertension artérielle.
- **Reumort V- P et Buysschaert, M. 2002.** Nouvelle approches dans le traitement du diabète de type 2 in espace cremec. 121 : 31-37 MED louvain.
- **Roach, P. J. (1990).** Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. *The FASEB journal*, 4(12), 2961-2968.
- **Rosenfeld L., 2002.** - Insulin: discovery and controversy. *Clinical Chemistry*, 48(12): 2270- 2288.
- **Rouillé Y., Martin S. & Steiner D., 1995.** - Differential processing of proglucagon by the subtilisin- like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 26488-26496.



- **Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001).** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806.
- **Sansook, S. (2017).** Biological Evaluation of Ferrocene Derivatives. Doctorat thesis. University of Sussex. P06-09.
- **Satin, L. S., Tavalin, S. J., & Smolen, P. D. (1994).** Inactivation of HIT cell Ca²⁺ current by a simulated burst of Ca²⁺ action potentials. *Biophysical journal*, 66(1), 141-148.
- **Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012).** Drug solubility: importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- **Scheen, A. J. (2015).** Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2: perspectives historique et médico-économique. *Médecine des maladies Métaboliques*, 9(2), 186-197.
- **Schmidt, S., Joost, H. G., & Schurmann, A. (2009).** GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(4), E614-E618.
- **Schomburg D and Salzmänn M. (1991).** Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
- **Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, pp.149-159.
- **Seo S.H., Choi K.H., Hwang S., Kim J., Park C.S., Rho J.R. & Cha J., 2011.** - Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum* alpha-glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72: 305-312.
- **Shetty, K. (2006).** *Food biotechnology*. CRC/Taylor & Francis,.
- **Sicard P. (1982).** Applications industrielles des enzymes ; In : Les enzymes, production et utilisation industrielles .Durand G., Monson P. Editions Gauthier .Villars, Paris.p.110-180.

- **Simonis-Bik AM, Eekhoff EM, Moor MH, Kramer M, Boosmsma D, Heine RJ. (2010).** Gene variants in the novel type 2 diabetes loci CDC123/CAMK1D, THADA, ADAMTS9, BCL11A, and MTNR1B affect different aspects of pancreatic beta-cell function. *Diabetes*. 2010; 59: 293- 301.
- **Sinclair E.M. & Drucker D.J., 2005.** - Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology (Bethesda)*, 20: 357-365. doi: 10.1152/physiol.00030.2005.
- **Stafford, J. M., Wilkinson, J. C., Beechem, J. M., & Granner, D. K. (2001).** Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39885-39891.
- **Steer M and Levitzki A. (1973).** The metal specificity of mammalian α -amylases as revealed by enzyme activity and structural probes. *FEBS Lett* 31, p:89-92.



- **Tang, E. D., Nuñez, G., Barr, F. G., & Guan, K. L. (1999).** Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16741-16746.
- **Taveau, C. (2014).** Rôle de la vasopressine dans les troubles du métabolisme glucidique : possible impact dans le développement du diabète (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- **Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., de Tejada, A. R., & Campillo, J. E. (2004).** Hypoglycaemic and anorexigenic activities of $\alpha\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British journal of nutrition*, 92(05), 785-790.
- **Träger, K., Radermacher, P., DeBacker, D., Vogt, J., Jakob, S., & Ensinger, H. (2001).** Metabolic effects of vasoactive agents. *Current opinion in Anesthesiology*, 14(2), 157-163.
- **Tricoli, J.V., Shows, T.B. (1984).** Regional assignment of human amylase to p22-p21 of chromosome 1. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 10, 205-210.

U

- **UKPDS, 1998.** - Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 325: 837-853.
- **Uldry, M., & Thorens, B. (2004).** The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv*, 447(5), 480-489.

V

- **Vallee B . L ., Stein E . A ., Summer W.N et Fisher E .H. (1959).** Metal content of amylases of various origins. *J Biol Chem*. 234, p:2901-2929.
- **Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L.(2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol*; 94, pp.137-55.
- **Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S.,... & Giudicelli, J. (2001).** Surfing the insulin signaling web. *European journal of clinical investigation*, 31(11), 966-977.
- **Virally, M., Blicklé, J. F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D., & Guillausseau, P. J. (2007).** Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & metabolism*, 33(4), 231-244.
- **Voet D. & Voet J., 2005.** - Biochimie. In Edition De Boeck. p. 1600.

W

- **Wack S. & Aprahamian M., 2005.** - Etude de modalités multi thérapeutiques et diagnostiques appliquées au cancer du pancréas : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Strasbourg 1, Strasbourg, France. p. 197.
- **Wakelam, M. J., Murphy, G. J., Hruby, V. J., & Houslay, M. D. (1986).** Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature*, 323(6083), 68-71.
- **Walker, N., & Stuart, D. (1983).** *Acta Crystullogr. Sect. A*, 39, 158.

- **Walters, W. P., & Murcko, M. A. (2002).** Prediction of ‘drug-likeness’. *Advanced drug delivery reviews*, 54(3), 255-271.
- **Wei, C-W., Peng, Y., Zhang, L., Huang, Q., Cheng, M., Liu, Y-N. & Li, J.(2011).**Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as aninhibitor of Alzheimer’s A β -fibril formation in vitro, *inorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 5818–5821.
- **Weinstein, S. P., Wilson, C. M., Pritsker, A., & Cushman, S. W. (1998).** Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism*, 47(1), 3-6.
- **Whalley N., Pritchard L., Smith D. & White A., 2011.** - Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic α -cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on β -cells? *Journal of Endocrinology*, 211(1): 99-106.
- **Wieczorek G., Pospischil A. & Perentes E., 1998.** - A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates).
- **Wilson. (2006).** **Diabète sucré. Fiche (606).** Autre information médicales. P : 4.
- **Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J. M., & Stoffel, M. (2004).** Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*, 432(7020), 1027-1032.
- **Wright, E. M., Loo, D. D., & Hirayama, B. A. (2011).** Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological reviews*, 91(2), 733-794.
- **WU J., SHI S., WANG H., WANG S., 2016.** Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate Polymers*, Vol.144: 474-494.
- **Wu, C., Okar, D. A., Stoeckman, A. K., Peng, L. J., Herrera, A. H., Herrera, J. E., ... & Lange, J. (2004).** A potential role for fructose-2, 6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology*, 145(2), 650-658.

Y

- **Yamamoto, T. (1995).** Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. United State of America, CRC Press: 206.
- **YOUMBAI, S et SAHRAOUI, A. (2021).** Etude de l'activité antidiabétique et amarrage moléculaire de quelques dérivés ferrocénylméthyl-bases nucléiques comme nouveaux inhibiteurs d'alpha-amylase.
- **Young, A. A., Cooper, G. J., Carlo, P. A. M. E. L. A., Rink, T. J., & Wang, M. W. (1993).** Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 264(6), E943-E950.
- **Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., ... & Shulman, G. I. (2002).** Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS- 1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50230-50236.

Z

- **Zayya, I. A.; Jonathan Singh, J. and Spencer, J. L. (2013).** Synthesis and Reactions of Ferrocene. Chemical and Physical Sciences.