



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

N série:.....

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Synthèse et étude *in silico* et évaluation de la toxicité
de quelques dérivés ferrocéniques**

Présentés Par :

FOUHMA Fatma Zohra & MEISSA Saida

04/06/2018

Devant le jury composé de :

- Présidente : M^{me} BOUKHARI Dalel M.A.A, Université d'El Oued.
- Examineur : M^r. ALLALI Ahmed M.A.A, Université d'El Oued.
- Promoteur : M^r LANEZ Touhami Professeur, Université d'El Oued
- Co-encadreur: M^{me} ADAIKA Aicha Doctorante, Université d'El Oued

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions « **Allah** », notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à plusieurs personnes auxquelles nous voudrions témoigner ici toute nos reconnaissance.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur le Professeur **LANEZ Touhami**, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son assistance et ses conseils pour assurer le succès de ce travail, pour ses efforts, sa disponibilité, son soutien et sa confiance.

Nous exprimons nos remerciements à notre co-encadreur **Mme ADAÏKA Aicha**, qui a toujours donné le maximum de ce qu'elle pouvait et elle a suivi nos travaux avec intérêt tout en nous prodiguant des conseils toujours justes et elle a su nous redonner courage et aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Aussi pour son soutien, son attention, sa qualité humaine.

Nous exprimons aussi nos remerciements à **Mme BOUKSARJ Dalel**, qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury et à **Mr. ALLALI Ahmed** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.

Nous tenons à remercier profondément tout qui nous a aidé pour faire ce travail, et surtout **Dr . Zegheb Nadjiba** et **Dr . Lanez Elhafnaoui**.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire de département de la science de la nature et de la vie, Université Hamma Lakhdar, El-oued. Et à tous les membres du laboratoire d'établissement hospitalier public Djilani Ben Omar D'El-oued, à tous l'équipe de laboratoire d'établissement public de santé de proximité d'El-oued le 19 mars à **Dhahab Ahmed Tedjani** de laboratoire de département de traitement chirurgical médical de centre de santé hospitalier d'El oued le 8 Mai. Nous remercions aussi au directeur du laboratoire de **CPB BEN**

BORDJ Yakoub et le directeur du laboratoire de cytologie et d'anatomie pathologique de clinique Echifa, de Tougourt pour son aide concernant la réalisation des coupes histologiques.

Enfin, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tout ce qui ont participé à la réalisation de ce mémoire. Surtout, *Boutera Sabrina, Nesba Safa, Senka Fatima, Lachraf Asma, Boualaga Yman, Barka Dalel, Benmoussa Radhia, Mdelel sara, Tedjani Aicha, Gouri L'hadjamara, Salhi Yman, Archi Chania, Dadda Reita, Fouhma Smail, Fouhma Mouhamed, Fouhma Belgacem, Meriga Said, Meissa Chams-Eddine et Maissa Younes.*

A Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail et dont les noms ne figurent malheureusement pas sur ces pages. Qu'ils trouvent ici le témoignage de nos estimations et de notre gratitude.

Dédicaces

Je dédie ce travail

♥ *À mon cher père Fouhma Smail*

Qui m'a appris le succès et la patience.... qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études,pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

♥ *À ma chère mère Bey Fatiha*

j'avoue vraiment que tu as été pour moi la lumière qui me guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite. J'espère que mon travail sera le témoignage de ma gratitude et mon respect le plus profond.

♥ *À mon seul et cher frère*

Younes

♥ *À mes sœurs*

Samira, Mouna, Ouafa, Hanine et Nourhane

♥ *À mes beaux frères*

Belgacem et Bachir

♥ *À Ma petite chérie*

Djoulene

♥ *À mes chers amis*

Safa, Samah, Samia, Saida, Fatima, Hadia, Karima, Intissar, Hana, Asma et Iman.

♥ *À mes collègues de travail*

Dalel, Zeita, Radhia, Kelthoum, Raounek, Sara

♥ *Et à toute ma famille et à tous ceux que j'aime.*

Fatma Zohra

Dédicaces

*C'est avec profond gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail
de fin d'étude à:*

♥ *À mes chers; respectueux parents :*

mon père 🧑 Moradj Meissa et ma mère 🧑 Abdellaoui Mebarka :

*Vraiment aucun dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon
amoure et mon affection, je vous offre ce modeste travail en témoignage de
tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me
combler, j'espère qu'un jour, je pourrai leurs
rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi. Puisse dieu tout puissant vous
garde et vous procure santé et bonheur.*

♥ *À deuxième maman « ma sœur »:*

Meissa Atkila. Merci d'être dans ma vie.

♥ *Mes chers frères :*

Djamel, Mouhammed, Idris et Hamza

♥ *Mes chers sœurs :*

*Nasira, Farida, Moufida, Zahia, Nour Elhouda, Djamilia et
Samia, pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent
l'expression de ma haute gratitude.*

♥ *Mes chers amis :*

*Safa, Samah, Samia, Soumia, Fatima, Fatma Zohra, Hadia,
Karima, Iman et Intisar.*

♥ *Et à toute ma famille et à tous ceux que j'aime.*

Saida

Résumé

La majorité des dérivés ferrocéniques ont présenté des activités biologiques (antioxydante et antimutagène) très élevée ce qui permet leurs candidature comme médicament potentiel ou, au moins, un complément alimentaire. Cependant, pour valider ces candidats il faut suivre leurs effets secondaires, leurs toxicités et leurs effets *in vivo*.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'évaluer l'effets et la toxicité de trois dérivés ferrocéniques (N-(ferrocenylmethyl)-2,3,4 -nitroaniline) chez les rates. Celle-ci a été réalisé sur 50 rates femelles de type Wistar Albinos divisées en dix lots: lot témoin(T), lot1 (D0.4FM2NA) , lot2 (D0.8FM2NA) , lot3 (D0.4FM3NA) , lot4 (D0.8FM3NA) , lot5 (D0.4FM4NA) , lot6 (D0.8FM4NA) , lot7 (D4FM4NA) , lot8 (D8FM3NA) et lot9 (D4FM2NA). Les rates ont été traitées pendant une semaines (7 jours) par l'injection intra-péritonéal de 1ml/jour pour les trois dérivés ferrocéniques à différentes concentrations.

L'analyse *in vivo*, montre une légère modifications des paramètres hémo-biochimiques chez les groupes traités par les doses élevées (D4 et D8) des dérivés ferrocéniques étudiées.

L'étude histologique des organes ne présente aucune altérations graves qui indiquent une toxicité, c'est juste des altérations simples qui peuvent être due a une inflammation.

L'étude *in silico* montre qu'il y a une interaction spontanée entre les trois dérivés ferrocéniques et l'ADN qui se lie par intercalation ou par liaisons hydrogènes traduit par les paramètres d'interaction K et ΔG , Les résultats *in silico* peuvent donner des paramètres inaccessibles via l'étude *in vivo*. En fin les résultats obtenus prouvent que ces trois dérivés n'ont pas une toxicité *in vivo* et peuvent être des candidats majeurs comme des produits de la chimiothérapie.

Mots clés : toxicité, ferrocène, rates *Wistar Albinos*, paramètres d'interaction K et ΔG , paramètres hémo-biochimiques, stress oxydatif.

ملخص:

تملك معظم المشتقات الفيروسية أنشطة بيولوجية عالية (مضادات الأكسدة ومضادات التخثر)، مما يسمح لها بالترشح واستعمالها كدواء أو على الأقل كمكمل غذائي. ومع ذلك، للتحقق من صحة هذه الاستعمالات للمشتقات الفيروسية من الضروري اتباع آثارهم الجانبية و السمية في الجسم الحي.

في هذا السياق ، الهدف من دراستنا هو تقييم الآثار السمية لثلاث مشتقات من الفيروسين (N) - (فيروسينيل-ميثيل)-2،3،4-نيتروأنيلين) في الجرذان. أجريت هذه الدراسة على 50 أنثى من جرذان *Wistar Albinos* البيضاء مقسمة إلى 10 مجموعات: المجموعة الشاهدة (T)، المجموعة الأولى (D0.4FM2NA)، المجموعة الثانية (D0.8FM2NA)، المجموعة الثالثة (D0.4FM3NA)، المجموعة الرابعة (D0.8FM3NA)، المجموعة الخامسة (D0.4FM4NA)، المجموعة السادسة (D0.8FM4NA)، المجموعة السابعة (D4FM4NA)، المجموعة الثامنة (D8FM3NA) أما المجموعة التاسعة (D4FM2NA). تمت معالجة الجرذان لمدة أسبوع (7 أيام) عن طريق الحقن داخل الصفاق (1 مل / يوم) لمشتقات الفيروسين الثلاثة بتركيزات مختلفة.

يظهر التحليل في الجسم الحي تغيرات طفيفة في المعايير الدموية والبيوكيميائية في المجموعات المعالجة بالجرعات العالية (D4 و D8) لمشتقات الفيروسين المدروسة. الدراسة النسيجية للأعضاء لا تظهر أي تغيرات خطيرة تشير إلى السمية ، إن ما تظهر مجرد تغير بسيط قد يكون بسبب بعض الالتهابات.

أظهرت النتائج حاسوبيا أن هناك تداخل تلقائي بين المشتقات (N) - (فيروسينيل-ميثيل)-2،3،4-نيتروأنيلين) وADN الذي يرتبط بواسطة إقحام أو عن طريق روابط هيدروجينية تترجم من قبل معايير التداخل K و ΔG . تعطي نتائج الدراسة حاسوبيا معايير لا يمكن التوصل إليها عن طريق الدراسة في الجسم الحي.

وفي الأخير، تثبت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه المشتقات الفيروسية الثلاث ليس لها سمية في الجسم الحي ويمكن أن يتشع رئيسي كمواد للعلاج الكيميائي.

كلمات مفتاحية : سمية، فيروسان، جرذان *Wistar Albinos*، معايير التداخل K و ΔG ، معايير دموية و بيوكيميائية، إجهاد تأكسدي.

LISTE DES ABREVIATIONS

Å : Ångström	DTNB :5-5'-dithiobis2-nitrobenzoïque
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	échant :échantillon
ALAT :Alanine aminotransférase	EDTA : Acide éthylène Diamine Tétraacétique
AMP : Acide monophosphate	EOR ou ROS : Espèces oxygénées réactives
ARN : Acide RiboNucléique	ESM : Ecartype moyenne
ASAT :aspartate aminotransférase	Fc : Ferrocene
ATP : Acide triphosphate	Fe : fer
BHT :Butylhydroxytoluène	Fe²⁺ : Fer ferreux
BSA :Sérum bovin albumine	Fe³⁺ : fer Ferrique
Ca : Calcium	FM2NA :N-ferrocenylméthyl-2- nitroaniline
CAT : Catalase	FM3NA : N-ferrocénylméthyl-3- nitroaniline
CDNB :1-Chloro-2,4-dinitrobenzène	FM4NA : N-ferrocénylméthyl-4- nitroaniline
cm : centimètre	FMNA : N- (ferrocenylmethyl)nitroaniline
CO2 : anhydride carbonique	FNS : formule de numération sanguine
Cp2Fe : bis(cyclopentadiényl)fer	g : gramme
CQ : chloroquine	GGT ou γ-GT : Gamma- glutmytransférase
D0.4 :Dose 0.4mg/Kg	GR : glutathion réductase
D0.8 : Dose 0.8mg/Kg	GSH :Glutathion réduite
D4 : Dose 4mg/Kg	GST : Glutathion S-transférase
D8 : Dose 8mg/Kg	H : Hydrogène
dl : décilitre	H2O : eau
DL50 :Dose létale 50	
DMF : N,N-dimethylformamide	
DMSO : Dimethyl sulfoxide	
DO : Densité Optique	
DPPH : 2,2diphenyl-1 picrylhydrazyl	

H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène

H₃PO₄ :Acide phosphorique

HCL :Chlorure d'hydrogène

K : constant de liaison

K₂HPO₄ :Hydrogénophosphate de potassium

Kcal :Kilocalorie

KH₂PO₄ :Phosphate de potassium monobasique

KJ : Kilojoule

l : Litre

LDH :Lactate Déshydrogénase

M : molaire

MDA : Malondialdéhyde

mg : Milligramme

min : minute

mM :millimole

mmol : millimole

Moy : moyenne

Nacl : Chlorure de sodium

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH :Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nm : Nanomètre

nM :nanomole

NS : Différence non significative

p. f. : point de fusion

PAL :phosphatase alcaline

PDB : protein Data Bank

Pdb : Protein Data Bank

Pdbqt : Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)

pH : potentiel Hydrogène

ppm : Parties par million

prot : protéine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RX : Rayon X

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SOD : Superoxydesdismutases

TBA :Acide thiobarbiturique

TCA :Acide trichloroacétique

Tris:Trishydroxyméthylaminométhane

trs : Tours

UI :unité international

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Vis : Visible

µl : microlitre

µM :micromole

µm: micromètre

ΔG : énergie libre de liaison

°C : Degrés Celsius

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	La structure de résonance	3
Figure 2	Structure correcte de ferrocène	4
Figure 3	Ferrocène sous forme poudre.	4
Figure 4	Substitutions électrophiles.	5
Figure 5	Structure cristalline de ferrocène	7
Figure 6	Oxydation monoélectronique réversible de la ferrocène	8
Figure 7	Synthèse de N-ferrocénylméthylnitroanilines2a: X = 2-NO2, 2b:X = 3-NO2, 2c:X= 4 NO2.	11
Figure 8	Relation entre la dose et l'effet	14
Figure 9	Relation entre la dose et la repense	14
Figure 10	Hydroxylation du ferrocène.	18
Figure 11	Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques	21
Figure12	le mécanisme réactionnel dans de détoxification enzymatique.	22
Figure 13	Structure de l'ADN d'un dodécamère	27
Figure 14	Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	35
Figure 15	Interaction de 2FMNA avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction 2FMNA-ADN,(B): Vue en surface de 2FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 2FMNA est attaché dans le petit sillon par liaison H.	41
Figure 16	Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal. mol ⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le 2FMNA et de l'ADN.	42
Figure 17	Interaction de 3FMNA avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction 3FMNA-ADN, (B) : Vue en surface de 3FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 3FMNA est attaché dans le petit sillon par liaison H.	44
Figure 18	Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal. mol ⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le 3FMNA et de l'ADN.	45
Figure 19	Interaction de 4FMNA avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction 4FMNA-ADN, (B) : Vue en surface de 4FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 4FMNA est attaché dans le petit sillon	47

	par liaison H.	
Figure 20	Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal. mol ⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le 4FMNA et de l'ADN.	48
Figure 21	Dose-réponse du FM2NA sur les poids relatif des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	49
Figure 22	Dose-réponse du FM3NA sur les poids relatif des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	50
Figure 23	Dose-réponse du FM4NA sur les poids relatif des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	51
Figure 24	Dose-réponse du FM2NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	52
Figure 25	Dose-réponse du FM3NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	53
Figure 26	Dose-réponse du FM4NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	54
Figure 27	Dose-réponse du FM2NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	56
Figure 28	Dose-réponse du FM3NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	58
Figure 29	Dose-réponse du FM4NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le témoin.	60
Figure 30	Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	62
Figure 31	Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	62
Figure 32	Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	63
Figure 33	Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	64
Figure 34	Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique ,rénal,	65

	cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin	
Figure 35	Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	66
Figure 36	Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	66
Figure 37	Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	67
Figure 38	Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	68
Figure 39	Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	69
Figure 40	Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.	69
Figure 41	Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin	70
Figure 42	Observation microscopique d'une coupe histologique des foies des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40	71
Figure 43	Observation microscopique d'une coupe histologique des reins des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40	72
Figure 44	Observation microscopique d'une coupe histologique des poumons des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40	73

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Les formes d'intoxication	16
Tableau 2	Principaux effets toxiques observés sur le foie	16
Tableau 3	Diverses catégories d'effets neurotoxiques	17
Tableau 4	Traitement des animaux.	29
Tableau 5	Mode opératoire de dosage de glycémie.	30
Tableau 6	Mode opératoire de dosage de l'activité enzymatique de GSTs.	37
Tableau 7	Différentes conformations de l'interaction 2FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.	40
Tableau 8	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 2FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.	42
Tableau 9	Différentes conformations de l'interaction 3FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.	43
Tableau 10	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 3FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.	45
Tableau 11	Différentes conformations de l'interaction 4FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.	46
Tableau 12	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 4FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.	48
Tableau 13	Comparaison entre l'énergies libres ΔG et constantes de liaison K des trois dérivés étudiées obtenus par les processus électrochimique, Spectroscopique et le processus de docking	49

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre1: Ferrocène et dérivés ferrocéniques étudiés	3
I.1.1. Historiques.....	3
I.1.2. Définition du ferrocène	4
I.1.3. Structure du ferrocène.....	5
I.1.4. Les réactions les plus importantes du ferrocène	5
I.1.4.1. Réaction de substitution.....	5
I.1.4.2. Acylation	6
I.1.5. Les propriétés du ferrocène	6
I.1.5.1. Propriétés physiques	6
I.1.5.2. Propriétés chimiques.....	6
I.1.5.3. Propriétés spectrales	6
I.1.5.4. Structure Cristalline	7
I.1.5.5. Propriétés Electrochimiques	7
I.1.6. La chimie médicinale du ferrocène	8
I.1.6.1. Anticancéreux.....	8
I.1.6.2. Activité antivirale.....	9
I.1.6.3. Antibactériennes.....	9
I.1.6.4. Activité antiallergique et anti-inflammatoire.....	9
I.1.6.5. Antipaludique.....	9
I.1.6.6. Anti-Toxoplasmose.....	10
I.1.6.7. Anti- Alzheimer	10
I.1.7. Quelques applications et utilisations du ferrocène et ses dérivés	10
I.1.8. Synthèse des dérivés ferrocéniques étudiées.....	11
I.1.8.1. Synthèse de dérivé N-(ferrocenylmethyl)-2-nitroaniline	12

I.1.8.2.Synthèse de dérivé N-(ferrocénylméthyl) -3-nitroaniline	12
I.1.8.3.Synthèse de dérivé N- (ferrocénylméthyl) -4-nitroaniline	12
Chapitre 2: Étude pharmacotoxicologique des composés organiques	13
I.2.1. Introduction.....	13
I.2.2 Définition de la toxicité	13
I.2.3 Pharmacocinétique des produits à intérêt pharmaceutique.....	13
I.2.3.1. L'absorption.....	13
I.2.3.2. La distribution.....	13
I.2.3.3. La biotransformation.....	13
I.2.3.4. L'excrétion.....	14
I.2.4. Effet toxique.....	14
I.2.4.1. Notion d'effet toxique.....	14
I.2.4.2. Relations dose-effet et relation dose-réponse.....	14
I.2.5. Différents formes de toxicité.....	15
I.2.5.1. La toxicité aiguë.....	15
I.2.5.2. La toxicité subaiguë.....	15
I.2.5.3. La toxicité chronique	15
I.2.6. Description des manifestations toxiques par systèmes biologiques et quelques organes cibles.....	16
I.2.6.1. L'hépatotoxicité.....	16
I.2.6.2. La néphrotoxicité.....	16
I.2.6.3. La neurotoxicité.....	17
I.2.7. Pharmacocinétique et métabolisme des métalloènes.....	17
I.2.8. L'importance de dérivés ferrocéniques étudiées.....	18
I.2.8.1. L'activité Antioxydante.....	18
I.2.8.2. Activité antimutagène.....	20
I.2.9. Stress oxydant.....	20
I.2.9.1 Définition de stress oxydant	20
I.2.9.2. Systèmes de défenses antioxydants	21
A. Systèmes enzymatiques.....	21
B. Antioxydants non enzymatiques	23
PARTIE II :PARTIE PRATIQUE	
Chapitre 1: Matériels et méthodes	25
II. 1.1. Cadre de l'étude.....	25

II. 1.2. Matériels	25
II. 1.2. 1. Matériels animal	25
II. 1.2. 2. Produits chimiques	25
II. 1.2. 3. Matériels de laboratoires	26
II. 1.3. Méthodes	26
II. 1.3.1. Étude <i>in silico</i>	26
A. Préparation de l'ADN.....	26
B. Préparation des dérivés ferrocéniques (ligands).....	27
C. Amarrage (processus de docking).....	27
II. 1.3.2. Étude <i>in vivo</i>	28
A. Traitement des animaux	28
B. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes.....	29
C. Méthodes de l'analyse sanguine.....	29
D. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif.....	34
E. Préparation des échantillons pour l'étude histologique	38
F. Méthode d'analyse statistique.....	39
Chapitre 2: Résultats et discussions	40
II.2.1. Résultats et interprétation.....	40
II.2.1. 1. Étude <i>in silico</i>	40
A. Étude d'amarrage moléculaire du dérivé 2FMNA.....	40
B. Étude d'amarrage moléculaire du dérivé 3FMNA.....	43
C. Étude d'Amarrage moléculaire du dérivé 4FMNA.....	46
II.2.1.2. Étude <i>in vivo</i>	49
A. Poids relative des organes des rates	49
B. Évaluation des paramètres hématologiques.....	53
C. Évaluation des paramètres biochimiques sériques.....	57
D. Évaluation des paramètres de stress oxydatif.....	66
E. Étude histologique des organes	80
II.2.2. Discussion.....	83
Conclusion et perspective.....	89
Références bibliographiques.....	90
Annexes	

Introduction générale

Introduction générale

La chimie organométallique moderne a été fortement influencée par la découverte accidentelle du Ferrocène en 1951. En fait, le Ferrocène a été l'espèce organométallique la plus étudiée. La stabilité thermique, le caractère inerte en solutions d'acide et de base concentrées, ainsi que les propriétés redox de Ferrocène rendent ce métallocène un composé impliqué dans de nombreux domaines de recherche.

Jusqu'en 1979, les propriétés biologiques de métallocènes sont inexplorées. La découverte de dichlorure de titanocène comme le premier métallocène possédant une activité anti-tumorale a ouvert un nouveau domaine de recherche, la chimie bio organométallique, qui a été développé rapidement dans les dernières années (**Gao et al., 2009**).

Dans ces dernières années, la conception de nouvelles dérivés ferrocéniques avait un intérêt considérable et attire l'attention de nombreux groupes de chercheurs, en raison de leur utilité dans la synthèse organique, la chimie médicinale et dans des études électrochimiques. (**Khalef, 2014**).

En 1984, **Kopf-Maier et al** ont prouvé l'activité anticancéreuse de complexe de ferrocénium contre la tumeur. Les dérivés ferrocéniques sont des agents anti-tumoraux et antibiotiques. Ces agents interagissent avec l'acide nucléique en empêchant la réplication de l'ADN, en perturbant la division cellulaire et en inhibant la synthèse des protéines. Ils sont donc largement utilisés dans le traitement du cancer. De plus, l'importance des dérivés ferrocéniques s'étend de leur utilité comme médicaments potentiels à visée anticancéreuse ou antivirale à leurs fonctions biologiques. (**Baba Ahmed et al., 2010**).

Edwards et al ont publié que les dérivés ferrocéniques de pénicilline et Céphalosporine, des antibiotiques préparés par le remplacement du groupe phényle ou le groupe hétéroaromatique par un groupement ferrocène, ils ont trouvé qu'ils possèdent une activité antibiotique élevée (**Edwards et al., 1975; Edwards et al., 1976**).

Hammami (2017) a révélé que les dérivés ferrocéniques para, ortho et méta-nitro aniline ont une activité biologique très puissante et considère que ces produits peuvent être des candidats potentiellement importants comme des agents antimutagènes.

Des études antérieures ont révélé que les dérivés ferrocéniques étudiés ont des activités biologiques très puissantes ce qui permet leur candidature comme médicament potentiel ou, au moins, un complément alimentaire. Pour valider ces effets nous avons suivi leur interaction avec ADN *in silico* par l'amarrage moléculaire.

Cependant, lors de la découverte de toute substance à pouvoir thérapeutique, les tests de toxicité constituent une étape préliminaire aux expérimentations précliniques qui représentent un préalable indispensable à tout essai chez l'être humain (**Baba Ahmed *et al.*,2010**).

Ainsi, l'objectif de ce travail est de déterminer la toxicité de quelques dérivés ferrocéniques chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques. Les effets *in vivo* des dérivés ferrocéniques sont aussi déterminés en suivant l'évolution de quelques paramètres hémato-biochimiques.

Notre travail est divisé en deux parties. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres. Le premier chapitre concernant le ferrocène et les dérivés ferrocéniques étudiées et le deuxième chapitre concerne l'étude pharmacotoxicologique des composés organiques. 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.

Partie I : **Synthèse bibliographique**

CHAPITRE 1:
FERROCÉNE ET DÉRIVÉS FERROCÉNIQUES
ÉTUDIÉES

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Ferrocène et dérivés ferrocéniques étudiées

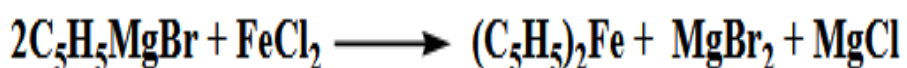
I.1.1. Historiques

Les composés organométalliques peuvent être définis comme des composés dans lesquels il existe au moins une liaison métal-carbone; plus généralement, la chimie organométallique concerne les transformations des composés organiques par des métaux (Bechki *et al.*, 2013).

La chimie des organométalliques est restée pour une grande période, un champ d'investigation limité, à cause de l'instabilité des composés contenant des liaisons métal carbone synthétisés par les premiers chimistes. Malgré cet obstacle d'instabilité des organométalliques, les recherches ont continué grâce à plusieurs savants comme Werner, Victor Grignard, Sabastier, qui ont préparé des composés organométalliques, mais la grande évolution de la chimie organométallique se produisit au troisième quart du XXème siècle à la suite de la découverte du ferrocène (Boukebous, 2009).

La chimie des métaux de transition était maîtrisée par les chimistes allemands avant la deuxième guerre mondiale. Cette discipline a été transférée aux anglais et aux américains après la deuxième guerre mondiale. En 1951, Kealy et Pauson ont publié pour la première fois dans un article célèbre au journal Nature, la synthèse de bis(cyclopentadiényl)fer ou ferrocène (Kealy & Pauson, 1951).

Kealy et Pauson (1951) ont essayé de préparer le dihydrofulvalène par oxydation d'un réactif de Grignard de cyclopentadiényle suivant l'équation suivante. Le composé obtenu à partir de cette réaction était un produit orange et thermiquement très stable (Henni, 2017).



La structure proposée par Pauson pour ce composé a une forme de résonance dans laquelle le fer est lié au cyclopentadiényle par une liaison sigma avec une formule ionique canonique comme le montre le schéma suivant :

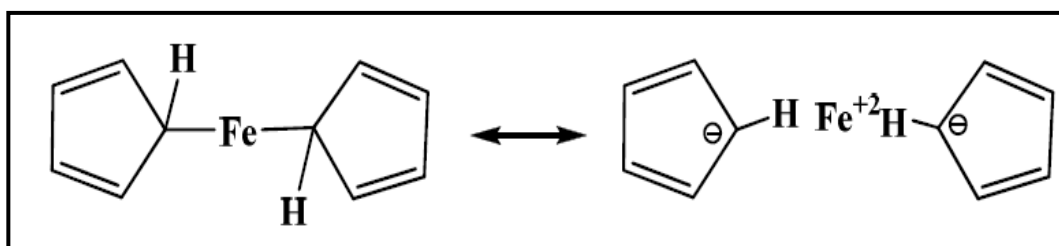


Figure 1: La structure de résonance proposée par (Kealy & Pauson, 1951).

Alors que la formule correcte de complexe π (fer lié aux cinq carbones de chaque cycle), ne fut établie que l'année suivante par Wilkinson et Woodward. Indépendamment, Ernst Otto Fischer à Munich arriva à la même conclusion. La structure du ferrocène fut ensuite confirmée par spectroscopie de RMN et cristallographie aux rayons X (Boukebbous, 2009).

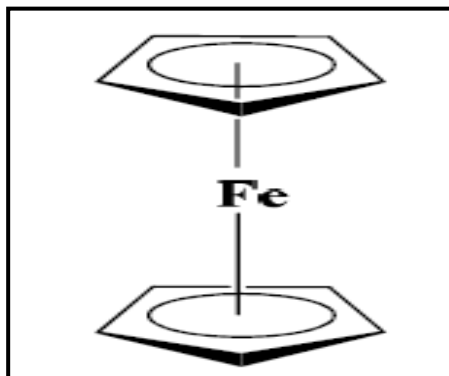


Figure 2 : Structure correcte de ferrocène (Woodward *et al.*, 1952).

Les recherches sur la synthèse, les structures et les propriétés des dérivés du ferrocène ont été continuellement actives au cours des dernières décennies. De nombreux dérivés du ferrocène ont été synthétisés et leurs propriétés et applications ont été étudiées à fond, ce qui a favorisé le développement de la théorie de la liaison chimique et de la chimie structurale (Yong-Hua, 2007).

I.1.2. Définition du ferrocène

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline orangée avec une odeur caractéristique (Cyril, 2010). stable à l'air qui sublime à 184°C sous 1 atm. 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 (Ron, 2001).



Figure 3 : Ferrocène sous forme poudre.

I.1.3. Structure du Ferrocène

La structure en sandwich de Cp_2Fe a été découverte en 1951 par **Wilkinson, Woodward et Fischer** indépendamment (**Wilkinson, 1975**). Ils ont proposé une structure à «double cône» avec l'ensemble des cinq atomes de carbone d'un ligand cyclopentadiényle interagissant avec le centre métallique. Ils sont constitués de deux anions cyclopentadiényles parallèles complexant un ion Fe^{2+} . Chaque ligand C_5H_5 étant un donneur de six électrons, ainsi que les six électrons de Fe(II) , on réalise alors une configuration de 18 électrons (**Görmen, 2010**).

Le ferrocène, avec 18 électrons de valence, est le membre le plus stable dans la série des métallocènes. Il sublime facilement et n'est pas attaqué par l'air ou l'eau, mais peut être oxydé de façon réversible (**Chavain, 2008**).

I.1.4. Les réactions les plus importantes du ferrocène

I.1.4.1. Réaction de substitution

L'atome de fer qui se lie avec les radicaux cyclopentadiényles, a une influence directe sur les propriétés chimiques de ferrocène et sur le mécanisme de la substitution. On suppose que les substitutions électrophiles se produisent selon un processus réactionnel général, au cours duquel le groupement électrophile réagit d'abord avec l'atome de fer pour donner un intermédiaire cationique π -diénique (**Terki, 2007**).

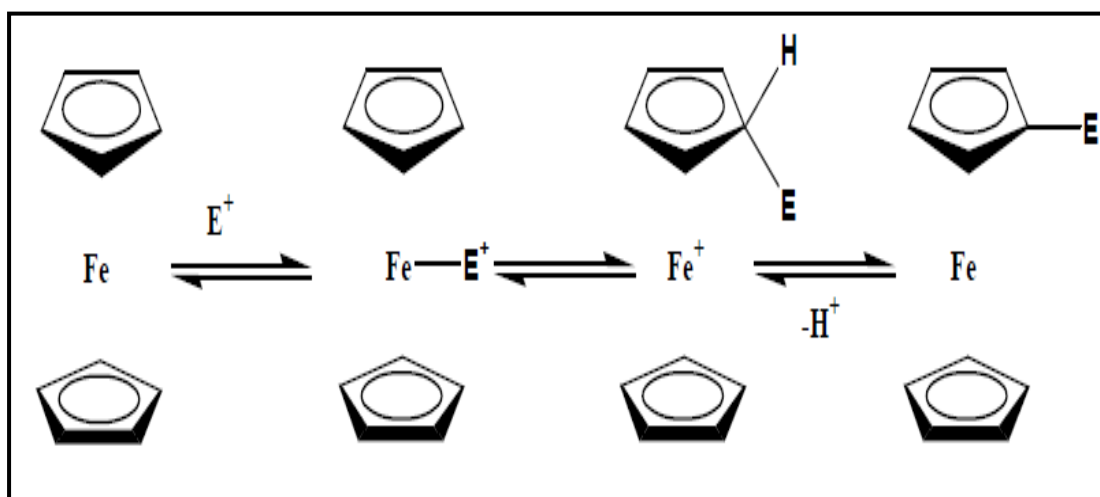


Figure 4 :Substitutions électrophiles.

Ce mécanisme explique pourquoi dans le cas des substitutions électrophiles les réactivités relatives des différents dérivés du ferrocène vont de pair avec la facilité d'oxydation de l'atome de fer.

I.1.4.2. Acylation

L'acylation du ferrocène, selon Fridel et Crafts peut être effectuée dans des conditions très douces avec, par exemple l'anhydride acétique contenant de l'acide phosphorique comme catalyseur conduit au mono-acétylferrocène. Avec le chlorure d'aluminium comme catalyseur on peut obtenir un bon rendement soit de mono soit du 1,1-diacétylferrocène selon les proportions de réactif employé (**Roxana et al., 2006**).

I.1.5. Les propriétés du ferrocène

I.1.5.1. Propriétés physiques

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 (**Didier, 2017**), 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 rouges foncées avec une fluorescence bleue (**Lanez, 2016**).

I.1.5.2. 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 chile 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 (**Zerari, 2013**).

I.1.5.3. Propriétés spectrale

A. Infrarouge

La spectroscopie infrarouge du ferrocène est relativement simple à cause de sa structure symétrique. Il présente une bande d'absorption à 3075 cm⁻¹ équivalente à l'élongation de la liaison C-H aromatique. Il existe uniquement quatre bandes apparentes : deux à 811 et 1002 cm⁻¹ sont équivalentes à la vibration de flexion de C-H, et une à 1108 cm⁻¹ équivalente à la vibration antisymétrique du cycle de pentadiényle. La bande d'absorption à 1411 cm⁻¹ est équivalente à la vibration d'éloignement antisymétrique de C-C du cyclopentadiényle non substitué (**Khalef, 2014**).

B. Résonance Magnétique Nucléaire RMN

☆ RMN ^1H

Le spectrale RMN ^1H de la molécule de ferrocène est très simple, il présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4,15 ppm.

☆ RMN ^{13}C

De même le spectrale RMN ^{13}C de la ferrocène présente un seul pic à 68 ppm correspond aux dix atomes de carbone de deux cycles de cyclopentadiényles (**Mahmoudi & Nems, 2009**).

I.1.5.4. 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 .

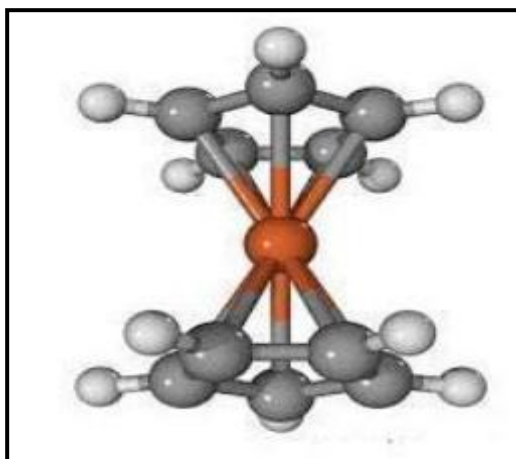


Figure 5 :Structure cristalline de ferrocène (**Kopp, 2010**).

La longueur moyenne de la liaison C-C dans les deux cycles pentadiényle du ferrocène est de 1.389Å, une valeur qui est très proche de celle du benzène (1.395Å). La longueur Fe-C est égale à 2.03Å. Les liaisons C-H ont une longueur moyenne de 1.389Å (**Khalef, 2014**).

I.1.5.5. Propriétés Electrochimiques

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 au ion ferrocérium (**Neghmouche & Lanez, 2013**).

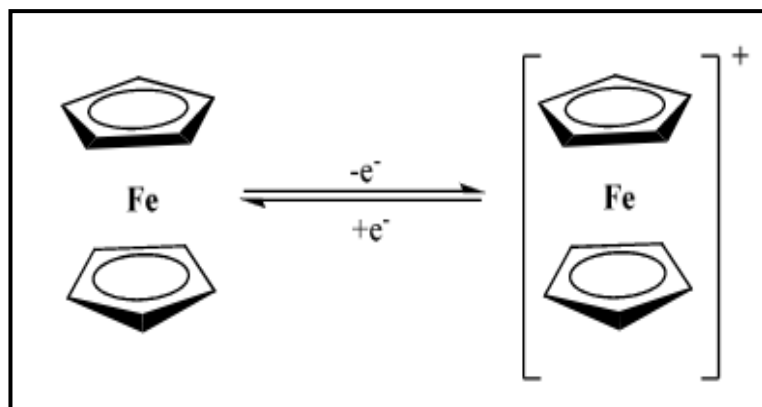


Figure 6 : Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène (Neghmouche *et al.*, 2010).

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 mono électronique (Neghmouche *et al.*, 2009).

I.1.6. La chimie médicinale du ferrocène

La découverte du ferrocène et l'élucidation de sa structure chimique remarquable est considéré comme le début de la chimie organométallique moderne. Depuis lors, ce métallocène a été utilisé pour de nombreuses applications, parmi ceux-ci, la chimie médicinale (Cázares-Marinero, 2013).

I.1.6.1. Anticancéreux

L'intérêt du ferrocène pour la chimie médicinale débute vers l'année 1984, quand certains sels du ferrocénium ont révélé des effets antitumoraux. A partir de cette observation, il a été proposé que les composés ferrocéniques puissent être oxydés à l'intérieur de la cellule et qu'une telle oxydation puisse être à l'origine de ces effets cytotoxiques (Köpf *et al.*, 1984).

Par ailleurs, il a été proposé que l'activité des dérivés de l'ion ferricénium ne puisse pas être liée à l'intercalation directe à l'ADN. En revanche, il a été observé que ces espèces étaient capables d'engendrer des radicaux HO• dans les cellules cancéreuses et d'endommager rapidement leur ADN. Des études ultérieures ont confirmé la capacité des sels de ferrocénium de produire des espèces oxygénées réactives (EOR) comme conséquence de leur dégradation dans l'eau en présence d'oxygène. De cette manière, la toxicité de ce type d'espèces conduit à l'endommagement oxydatif de l'ADN par la production de ROS simultanée à leur dégradation (Tabbi, 2002).

I.1.6.2. Activité antivirale

L'activité des dérivés ferrocéniques antiviral basé sur l'étude de l'effet des 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**).

I.1.6.3. Antibactériennes

Quelques antibiotiques connus ont été modifiés par l'insertion d'un groupement ferrocényle dans leurs structures, il s'agit des dérivés ferrocéniques de pénicilline et céphalosporine créés en 1970.

Un carborane dérivé du ferrocène substitué a été synthétisé et utilisé comme agent thérapeutique prometteur antibactérien contre des infections bactériennes multirésistantes. Les résultats montrent l'effet antibactérien significatif contre deux agents pathogènes cliniques (Gram positif *Staphylococcus aureus* et Gram négatif *Pseudomonas eruginosa*), à la fois *in vitro* et *in vivo*, sans/ ou peu de toxicité pour les cellules normales et des tissus (**Monserat, 2011**).

I.1.6.4. Activité antiallergique et anti-inflammatoire

Cette action est due à l'effet de dérivés ferrocéniques étudiées pour produire l'histamine qui provoque des allergies; Ce dernier soumet à décourager des certaines enzymes libérateurs d'histamine à partir des cellules mastocyte et les cellules basales (phosphodiesterase AMP et dépendent ATPases Ca^{+2}), Par exemple, cette dernière libère de l'énergie (ATP) pour faciliter l'absorption du calcium par la membrane cellulaire, ce qui permet la libération d'histamine stockée dans des vésicules cellulaires.(**Hemmami, 2017**).

I.1.6.5. 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**).

I.1.6.6. 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**).

I.1.6.7. 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**).

I.1.7. Quelques applications et utilisations du ferrocène et ses dérivés

Le ferrocène s'est avéré être l'un des composés les plus utiles et les plus intrigants dans les composés organométalliques et a apporté un grand changement à la communauté chimique. Et voici quelques utilisations du ferrocène et ses dérivés :

- Le ferrocène est utilisé, comme matière à ajouter au carburant, des puissants réacteurs puisque elle permet aux propriétés d'oxydation, d'augmenter l'énergie de la réaction, thermique ce qui donne aux réacteurs une énergie supplémentaire de propulsion équivalent à 40% ,Comme, il peut être (le ferrocène) associé dans différents types de combustion, étant donné qu'il joue un rôle important dans la réduction de la fumée, le contrôle de la pollution et l'allongement de la durée de vie des réacteurs de propulsion (**Hanzab & Houas, 2013**).
- Il peut être utilisé comme un facteur de protection dans le polyéthylène (**Bechki, 2012**).
- Quelques dérivés du ferrocène peuvent être utilisés dans la protection des fines couches des pôles photoélectrochimiques (**khalef, 2014**).
- L'ajout du ferrocène fixe la polymérisation de la matière cellulosique et lui donne une certaine rigidité, contre la chaleur et l'air .
- Certains dérivés du ferrocène sont utilisés comme insecticides (**Bouameur, 2001**).

- Le ferrocène est utilisé dans l'amélioration de la stabilité thermique, du plastique et du caoutchouc.
- Le ferrocène et ses dérivés trouvent de nombreuses applications dans l'agriculture, à la fois comme produits agrochimiques et comme catalyseurs, pour la synthèse sélective de produits agrochimiques. De plus, ils peuvent être utilisés comme surfactants dans l'assainissement des sols et comme chimiosensors sélectifs colorimétriques et électrochimiques pour des analytes d'intérêt dans l'agriculture (**Barbara, 2015**).
- Des dérivés de ferrocène et des polymères contenant du ferrocène comme électrodes électroactives ont été utilisés dans diverses applications, par exemple, des capteurs, des dispositifs de mémoire, des cellules photochimiques et des matériaux de stockage de charge (**Al Khalyfeh, 2016**).
- Ferrocene (fc) et ses dérivés attiré un grand intérêt pour la dernière décennie en raison de leurs applications potentielles dans capteur électrochimique technologie, bioactivités, la science des matériaux, non linéaire dispositifs optiques, et la détection de métaux alcalino-terreux et lanthanide métaux (**Tian et al., 2013**).
- l'application biologique et pharmaceutique: fabrication des médicaments telle que ; La pénicilline, céphalosporine, réfamycines. Ainsi la ferrocène fluconazole et triadiménol, ferrocène aspirine, ferroquine, ferrocifène. (**Navneet et al., 2012**).
- Applications en catalyse.

I.1.8. Synthèse des dérives ferrocéniques étudiées

La nitroaniline correspondante a été ajoutée par petites portions à une solution bien agitée d'iodure de (ferrocénylméthyl) triméthylammonium dans de l'eau. Le mélange résultant a ensuite été chauffé à 110-115 ° C pendant 6 heures. Le précipité résultant a été séparé par filtration, lavé avec de l'eau pour éliminer toute trace de sel d'ammonium quaternaire inchangé et finalement recristallisé pour produire le composé cible. (**Boubekri et al., 2015**).

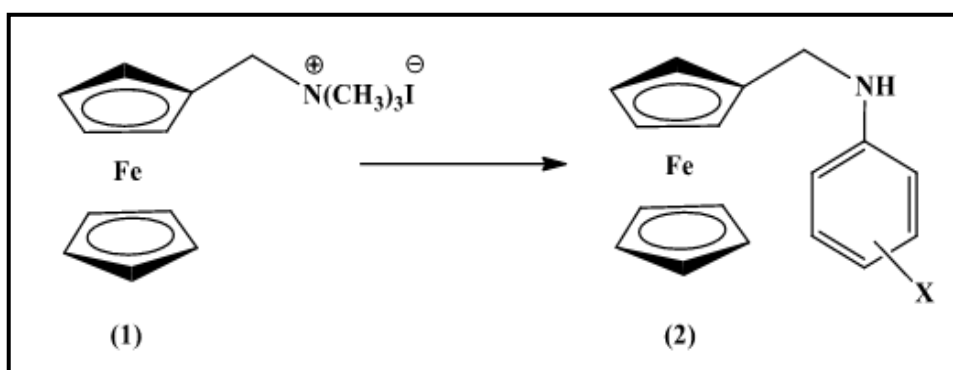


Figure 7 : Synthèse de N-ferrocénylméthylnitroanilines 2a: X = 2-NO₂, 2b: X = 3-NO₂, 2c: X = 4 NO₂.

I.1.8.1.Synthèse de dérivé N-(ferrocénylméthyl)-2-nitroaniline (2a)

On a obtenu comme décrit ci-dessus de la N- (ferrocénylméthyl) -2-nitroaniline à partir d'iodure de (ferrocénylméthyl) triméthylammonium et de 2-nitroaniline. Le produit a été recristallisé dans de l'éthanol à 95% pour fournir le composé (2a) sous forme d'aiguilles de couleur rouge cinabre, p. f. 110-112 °C (**Rahim et al., 2012**).

I.1.8.2.Synthèse de dérivé N-(ferrocénylméthyl) -3-nitroaniline (2b)

N- (ferrocénylméthyl)-3-nitroaniline a été obtenu à partir d'iodure de (ferrocénylméthyl) triméthylammonium et de 3-nitroaniline. Le produit a été recristallisé dans de l'éthanol à 95% donner des cristaux rouges d'alizarine, p.f. 118 °C (**Boubekri et al., 2015**).

I.1.8.3.Synthèse de dérivé N- (ferrocénylméthyl) -4-nitroaniline (2c)

La N- (ferrocénylméthyl) -4-nitroaniline a été obtenue à partir d'iodure de (ferrocénylméthyl) triméthylammonium et de 4-nitroaniline. Le produit a été recristallisé dans de l'éthanol à 95% pour donner le composé (2c) sous la forme de cristaux de citrouille-orange, p.f.115°C. (**Boubekri et al.,2015**).

CHAPITRE 2
ÉTUDE PHARMACOTOXICOLOGIQUE
DES COMPOSÉS ORGANIQUES

Chapitre 2: Etude pharmacotoxicologique des composés organiques

I.2.1. Introduction

Les composés organiques sont souvent classés comme biodégradables, persistants ou récalcitrants. Le terme biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme. Ce processus peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance persistante ou modifier la toxicité du composé (**Marie, 2003**).

La toxicologie est l'étude des substances chimique et plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents chimiques (**Bensalah, 2014**). Elle fait appel à une multitude de connaissances scientifiques et s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine: l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique ... etc (**Gilles, 2004**).

I.2.2 Définition de la toxicité

La toxicité c'est un caractère des substances chimiques qui, au contact ou après pénétration dans un organisme, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique (**Viau &Tardif, 2003**). Cette toxicité dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition, des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques (**Tron et al., 2002**).

I.2.3 Pharmacocinétique des produit à intérêt pharmaceutique

I.2.3.1. L'absorption

On appelle absorption le processus de pénétration d'un produit dans l'organisme. Il s'agit d'une étape importante, car, tant qu'il n'a pas pénétré dans la circulation sanguine, un produit ne peut causer d'action toxique systémique. L'absorption peut se dérouler sur 3 sites principaux : le tube digestif, essentiellement au niveau de l'estomac et de l'intestin ; les poumons au niveau des alvéoles pulmonaires ; et la peau au niveau de l'épiderme et du derme (**Tron et al., 2002**).

I.2.3.2. La distribution

Lors de leur transport sanguin, les produits peuvent être liées aux hématies, aux composants plasmatiques, ou se trouve à l'état libre non liées dans le sang (**Holmberg et al., 2000**).

I.2.3.3. La biotransformation

La biotransformation désigne l'ensemble des réactions qui rendent la structure chimique d'une molécule (qui est plutôt liposoluble au départ) plus polaire (ionisable) donc plus solubles dans l'eau et ainsi plus facilement excrétables dans l'urine. Le foie est le

principal organe impliqué dans la biotransformation des produits toxiques (Viau & Tardif, 2003).

I.2.3.4. L'excrétion

Ce processus consiste à rejeter le produit inchangé ou ses métabolites à l'extérieur de l'organisme. L'excrétion peut se faire par voie rénale (l'urine), gastro-intestinale (les selles), pulmonaire (l'air expiré), cutanée (la sueur) ou lactée (le lait) (Gilles, 2004).

I.2.4. Effet toxique

I.2.4.1. Notion d'effet toxique

L'effet toxique est la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse. Ainsi l'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion (Gilles, 2004).

I.2.4.2. Relations dose-effet et relation dose-réponse

La relation « dose-effet » est la relation entre la dose et l'effet à l'échelle de l'individu (Figure 8). L'augmentation de la dose peut accroître l'intensité ou la sévérité d'un effet. Une courbe dose-effet peut être tracée pour l'ensemble de l'organisme, la cellule ou la molécule cible. Certains effets toxiques, comme la mort ou le développement d'un cancer, n'ont pas un caractère progressif: ils représentent des effets «tout ou rien» (Holmberg *et al.*, 2000).

La relation «dose-réponse» désigne la relation entre la dose et le pourcentage d'individus présentant un effet spécifique (Figure 9). Lorsque la dose augmente, un plus grand nombre d'individus sont affectés dans la population exposée (Holmberg *et al.*, 2000).

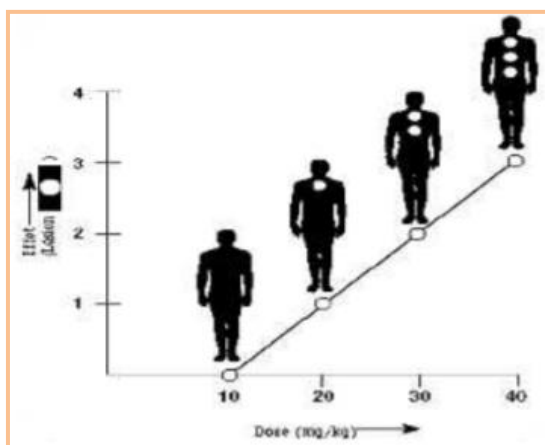


Figure 8: Relation entre la dose et l'effet (Gilles, 2004).

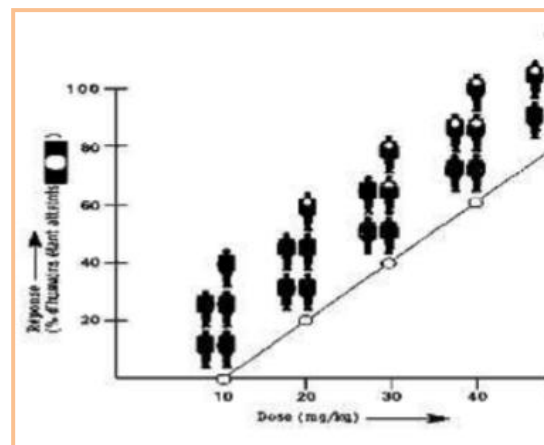


Figure 9: Relation entre la dose et la réponse (Gilles, 2004).

I.2.5. Différents formes de toxicité

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités (Alain, 2002). L'homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique (**Bismuth et al., 1987**).

I.2.5.1. La toxicité aiguë

la toxicité aiguë se manifeste rapidement, voire immédiatement, juste après l'exposition de l'organisme (**Boulouiz, 2016**) une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament. La toxicité aiguë d'une substance chimique est estimée par une série de tests réalisés sur des animaux de laboratoire (**Benzidane, 2012**).

Le terme toxicité aiguë est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL50. La DL50 est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée (**Oliver, 1986**).

I.2.5.2. La toxicité subaiguë

Elle consiste à étudier les conséquences néfastes de l'administration répétée du produit étudié (**Laroche, 2001**). La substance à tester reste administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés (**Ocde, 2008**).

I.2.5.3. La toxicité chronique

Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez les animaux, à la suite d'une exposition répétée et prolongée au-delà de 90 jours. Dans ce cas, le produit est administré quotidiennement, une à deux fois par jour pendant 18 à 24 mois. Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour la toxicité subaiguë, sauf que la période est plus longue (**Laroche, 2001**).

Il est habituel de mettre fin au bout de deux ans aux expériences à long terme sur les animaux, car on considère ordinairement que cette durée couvre la plus grande partie de leur vie (**Schubik & Sicé, 1956**).

Tableau 1 : Les formes d'intoxication (Gilles, 2004).

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition
Aigue	Unique	< 24 heures
Subaigüe	Répétée	≤1 mois
Sub-chronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	>3 mois

I.2.6. Description des manifestations toxiques par systèmes biologiques et quelques organes cibles

I.2.6.1. L'hépatotoxicité

C'est une atteinte du foie. Le foie est un organe vital, tout comme le cœur et les poumons. Il remplit de multiples fonctions et son rôle est très important dans le maintien de l'équilibre général. C'est une cible pour de nombreux toxiques à cause de son important débit sanguin et de sa situation par rapport à la circulation sanguine (Gilles, 2004). Les atteintes du foie sont complexes et diverses. Le tableau ci-après résume les principaux effets toxiques observés.

Tableau 2 : Principaux effets toxiques observés sur le foie (Lu, 1992).

Lésions hépatiques	Caractéristiques
Stéatose	Elle correspond à l'envahissement du tissu par des graisses. Les toxiques agissent en bloquant l'élimination des triglycérides hépatiques dans le sang
Nécrose	Elle suppose la destruction des hépatocytes et correspond généralement aux lésions aiguës.
Cholestase	Diminution ou arrêt de l'écoulement de la bile par modification de l'excrétion biliaire.
Cirrhose	Présence d'infiltrations de collagène dans la masse hépatique.
Hépatite	Manifestations cliniques de l'inflammation du foie.

I.2.6.2. La néphrotoxicité

C'est un effet toxique sur le rein. Le rein est l'organe d'élimination responsable de la sécrétion de l'urine. Il joue un rôle dans la régulation de l'équilibre des liquides du corps et contribue à débarrasser le sang de ses impuretés, et notamment de certains toxiques (Gilles, 2004). Les atteintes rénales concernent principalement le glomérule en diminuant la filtration, mais également les tubules proximaux qui concentrent les toxiques du fait de leur forte activité d'absorption et de sécrétion (Lu, 1992).

I.2.6.3. La neurotoxicité

C'est un effet toxique sur le système nerveux, Le système nerveux est un ensemble de cellules spécialisées ou non dont l'unité fondamentale est le neurone. Les neurones assurent le transfert de l'information (influx nerveux) d'une partie du corps à une autre afin d'assurer le fonctionnement interne de l'organisme et ses relations avec le milieu extérieur (**Gilles, 2004**). Les principaux effets toxiques sur le system nerveux sont résumés dans le tableau ci-après ;

Tableau 3 : Diverses catégories d'effets neurotoxiques (Gilles, 2004**).**

Effets toxiques	Caractéristiques
la dépression du système nerveux central	qui se manifestent à la suite d'une exposition à des solvants tels que le toluène et le xylène.
La neuropathie périphérique	affection du système nerveux périphérique qui peut être produite par des solvants tels que le n-hexane.
le tétanos	qui consiste en des contractures musculaires et qui est causé par une toxine biologique produite par le Clostridium tetani.
la paralysie musculaire	causée par une toxine biologique produite par le Clostridium botulinum.

I.2.7. Pharmacocinétique et métabolisme des métallocènes

Le ferrocène est rapidement identifié comme étant le métallocène de choix. En effet, c'est une petite molécule rigide et lipophile ($\log P = 3.28$) qui peut faciliter la pénétration des membranes cellulaires. Cette propriété confère à la molécule une bonne biodisponibilité. Le ferrocène est stable en solution aqueuse et en conditions aérobiques. De plus, son comportement électrochimique le rend attrayant pour des applications biologiques et particulièrement pour la conception de médicaments.

L'absorption des dérivés ferrocéniques est liée à la nature de la chaîne latérale. Plus la molécule est lipophile, meilleure est l'absorption. (**Chavain, 2008**).

L'hydroxylation enzymatique des aromatiques est un processus vital de métabolisme des exogènes. (**Jerina & Daly, 1974**). Comme pour tout autre aromatique, le métabolisme du ferrocène passe par son hydroxylation qui semble être un processus cytochrome P-450 dépendant (**figure 10**), nécessitant de l'oxygène moléculaire et du NADPH comme cofacteur. Le produit hydroxylé peut ensuite se lier à une molécule d'acide glucuronique provenant du système uridinediphosphate/glucuronate ou à un sulfate « actif » provenant du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate. L'ester ainsi formé est un composé polaire soluble dans l'eau et facilement excrété par la bile ou l'urine (**Chem, 2011**).

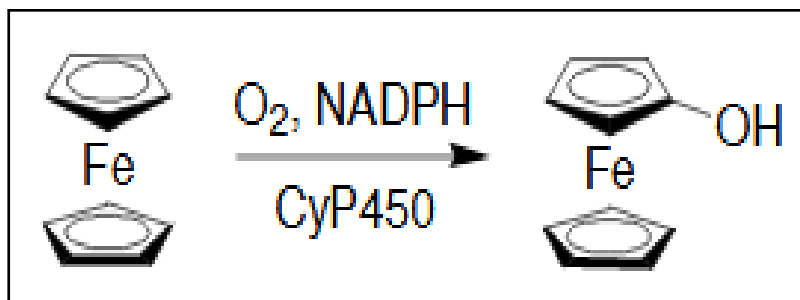


Figure 10 : Hydroxylation du ferrocène.

Des études sur le métabolisme du ferrocène, utilisant un marquage au Fe, suggèrent une excrétion urinaire du fer sous une forme non ferrocénique.

En effet, *in vivo*, la décomposition spontanée de l'hydroxyferrocène qui échappe à la conjugaison avec le sulfate ou l'acide glucuronique libère du fer qui est utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine (25% du fer absorbé sous forme de ferrocène se retrouvent dans l'hémoglobine) (**Ben alaya, 2008**).

Les métallocènes montrent des affinités spécifiques aux différents organes suivant les substituants qu'ils portent. Les métallocènes avec des substituants polaires seront localisés au niveau du foie et des reins alors que les métallocènes avec des groupes hydrophobes ou acétyles auront quant à eux comme cible les glandes surrénales, responsables de la détoxification des hormones stéroïdiques (**Nielsen & Heinrich, 1993**).

I.2.8. L'importance des dérivés ferrocéniques étudiés

Dans les dernières années, on s'intéresse aux dérivés ferrocéniques. Alors que de nombreuses expériences (*in vitro*) dans le domaine médical et biologique ont confirmé le rôle préventif contre l'apparition du cancer et l'activité antioxydante de ces composés, qui sont des premiers mécanismes étudiés. Les dérivés ferrocéniques agissent pour capturer les radicaux libres qui conduisent à des déformations de l'acide désoxyribonucléique (ADN), et donc des mutations au niveau des gènes tumoraux ou qui entrave l'apparition des tumeurs qui sont un signe de l'émergence de la maladie (**Siden et al., 1997; Gérard et al., 2004**).

Les dérivés ferrocéniques étudiés ont montré des activités similaires, c'est pour cette raison que nous voulons avoir des informations sur leur toxicité si elle existe, parmi leurs activités on cite:

I.2.8.1. L'activité Antioxydante

Le test DPPH est l'un des tests les plus importants qui est utilisé pour évaluer la capacité des composés synthétiques à capturer les radicaux libres par la méthode colorée, en utilisant le radical libre stable (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), c'est le radical aromatique qui contient dans sa structure moléculaire plusieurs structures résonantes. (**Jannie et al., 2008**).

Le radical de DPPH est relativement stable, interagissant avec les molécules anti-radicaux, se transformant en (DPPH_H) avec une diminution de l'absorption, en augmentant la concentration à la longueur d'onde 517nm (**Zerargui, 2015**).

Ce test évalue pour calculer le pourcentage d'inhibition radicalaire et la comparaison de l'efficacité des composés étudiés avec des composés standards.

La possibilité de calculer des certains paramètres thermodynamiques: Tels que l'énergie libre ΔG résultant de la liaison de DPPH avec les dérivés ferrocéniques étudiées (4FMNA, 3FMNA, 2FMNA) confirme l'interaction des dérivés ferrocéniques avec le radical DPPH (interaction électrostatique) (**Hemmami, 2017**).

Hemmami (2017) ont montré la capacité des dérivés Ferrocéniques dans la capture des radicaux libres où l'effet de capture d'un radical de DPPH a été estimé plus de 50%. L'effet de ces dérivés reste important à des faibles concentrations.

En comparant l'activité antioxydante de N-(ferrocenylmethyl)-2,3,4 –nitroaniline avec ces composés commerciaux Standard (acide ascorbique -vitamine c- et alpha-tocophérol) qui sont connus comme les plus antioxydants; L'effet du dérivé étudiée dans la situation para (4FMNA) a été observé environ la moitié de cet effet dans la vitamine C; Par contre l'effet du dérivé dans la situation ortho et méta (3FMNA ,2FMNA) était environ la moitié de cet effet dans l'α-tocophérol.

Selon ces études antérieures, l'évaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques étudiées montre que les différentes dérivés possèdent une activité inhibitrice élevée du radicaux libres, où l'activité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration.

Le radical d'oxygène active est aussi l'un des tests les plus importants qui utilisés pour évaluer la capacité des composés ferrocéniques à capturer les radicaux libres. Ce radical a une grande réactivité, car il peut facilement pénétrer les membranes cellulaires au niveau des sites spécifiques. il peut réagit avec la plupart des biomolécules, en particulier les acides aminés, les lipides et les nucléotides.

Ce test est basé sur l'inhibition des radicaux libres par les dérivés étudiés (4FMNA ,3FMNA ,2FMNA). Le radical ($O_2^{\cdot -}$) est relativement stable, interagissant avec les molécules anti-radicaux, se transformant en (O_2) avec une diminution de l'intensité du courant en augmentant la concentration dans le potentiel de la paire ($O_2^{\cdot -}/O_2$) (**Benabdesselam, 2017**).

La détermination de certains paramètres thermodynamiques, y compris l'énergie de liaison libre, le rapport K_{Ox}/K_{Red} et la constante de liaison, confirme l'interaction électrostatique entre le radical libre ($O_2^{\cdot -}$) et les dérivés ferrocéniques étudiées.

D'après **Hemmami (2017)**, l'étude électrochimique par voltamètre cyclique des dérivés ferrocéniques (4FMNA, 3FMNA, 2FMNA) et le radical (O^{2-}) indique que le phénomène de diffusion est responsable du processus d'interaction. Selon l'équation de **Randles-Sevcik**, la valeur du coefficient de diffusion à l'état libre était plus grande que dans le cas associé aux dérivés ferrocéniques, où cette diminution due au changement du poids moléculaire (**Bouchema, 2008**). Ainsi la structure spatiale du complexe résultant est l'un des facteurs qui aident à l'inhibition de radical libre (O^{2-}).

I.2.8.2. Activité anti-mutagène:

L'étude électrochimique par la voltamétrie cyclique de l'interaction des dérivés ferrocéniques (4FMNA, 3FMNA, 2FMNA) avec l'ADN à pH différents indique que le phénomène de diffusion est responsable du processus d'interaction. Selon l'équation de **Randles-Sevcik**, la valeur du coefficient de diffusion à l'état libre était plus grande que dans le cas associé aux dérivés ferrocéniques où cette diminution due au changement du poids moléculaire (**Bouchema, 2008**).

Cette technique dépend de variation de la valeur de potentiel et du courant en présence d'ADN, ce changement permet de déterminer les coefficients de la liaison, tandis que les paramètres thermodynamiques (constante de liaison, énergie libre, rapport K_{ox} / K_{red} , la taille du site de liaison S) peuvent être utilisées pour déterminer le type d'interaction entre les composés étudiés et l'ADN, c'est confirmé l'interaction électrostatique des dérivés ferrocéniques étudiées avec l'ADN (**Corinne, 2008**).

Hemmami (2017) a montré que l'interaction entre les dérivés ferrocéniques étudiées avec l'ADN peut provoquer une déformation ou un dysfonctionnement au niveau de l'ADN, ce qui empêche le processus de clonage du matériel génétique (l'inhibition des codants pathogènes d'ADN), ce qui conduit à la mort de la cellule en éliminant définitivement la cellule pathogène. Ces composés peuvent être utilisés comme des résistants en chimiothérapie.

I.2.9. Stress oxydant

I.2.9.1 Définition de stress oxydant

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre entre la génération des oxydants et l'activité des défenses anti-oxydantes, qui pourrait mener aux dommages oxydants. de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, (**Sergent et al., 2000**). Ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes (**Durackova et al., 2008**) et leur constituants cellulaires: les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces

activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Sergent *et al.*, 2000).

I.2.9.2. Systèmes de défenses antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002; Powers & Lennon, 1999).

A. Systèmes enzymatique

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Chavan & Melinkeri, 2013).

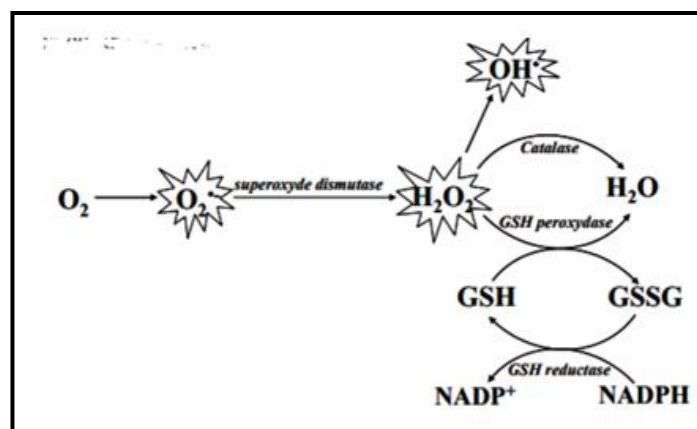
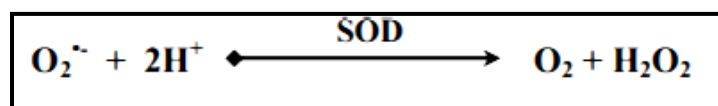


Figure 11 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.

A.1. Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SOD)(EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes ubiquitaires qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxydes d'hydrogènes et oxygènes moléculaires (Comhair & Erzurum, 2002) selon la réaction suivante :

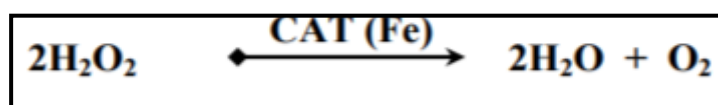


Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Chez les mammifères, on distingue dans cette famille trois isoenzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002). Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au centre de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer la

SOD à cuivre et zinc présent dans le cytoplasme (Cu, Zn-SOD ou SOD1), la SOD à manganèse (Mn-SOD ou SOD2) présent dans les mitochondries, et une SOD extracellulaire c'est une SOD à cuivre-zinc (Ec-SOD ou SOD3) (**Crapo, 1997**).

A.2. Catalase

La catalase (**EC1.11.1.6**) est une protéine hémique, formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT (**Delattre et al., 2005**). Elle présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Sorg, 2004**). pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (**Bonnefont et al., 2003**).



A.3. Glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

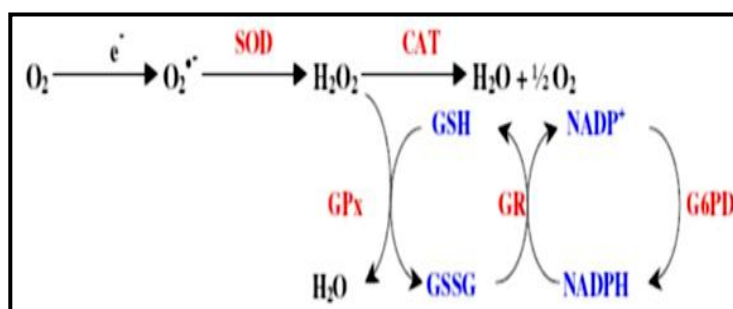
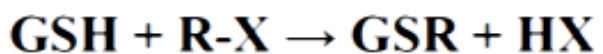


Figure 12 : Le mécanisme réactionnel dans de détoxification enzymatique.

A.4. Glutathionne-S-transférase

Glutathion S-transférase (GST) (**EC2.5.1.18**) est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (**Renuka et al., 2003**). La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhihua et al., 2004**).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:

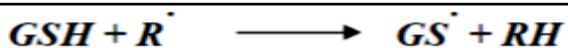


B. Antioxydants non enzymatiques :

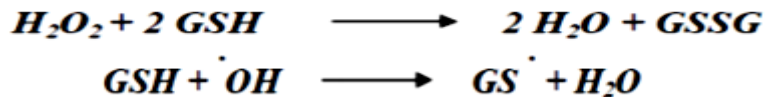
Les systèmes de défense secondaires agissent comme des systèmes de réparation car ils peuvent réduire les dommages que les radicaux libres font subir aux protéines, aux lipides et à l'ADN.

B.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol.L⁻¹ (Halliwell, 2006). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles:



Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R[•] (Gardès-Albert *et al.*, 2003):



B.2. Protéines plasmatiques

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe²⁺/Fe³⁺ ou Cu²⁺/Cu⁺ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martinez-Cayuela, 1995).

B.3. Acide urique

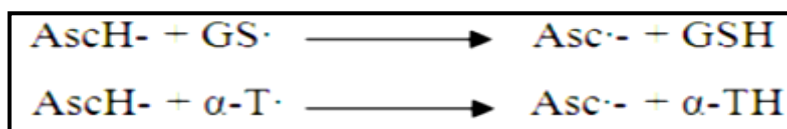
Produit terminal majeur du métabolisme des purines, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH[•], ROO[•], NOO[•]...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (Haleng *et al.*, 2007).

B.4. Bilirubine

La bilirubine représente un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine. La bilirubine est un puissant agent réducteur et un antioxydant physiologique potentiel. Au niveau des fluides extracellulaires, elle est principalement liée à l'albumine, ce qui rend ce pigment hydrophobe, hydrosoluble. La molécule libre et celle liée à l'albumine ont la capacité de réduire la vitamine E et d'inhiber la peroxydation lipidique dans le plasma et les lipoprotéines (**Rabovsky et al., 2006**).

B.5. Acide ascorbique

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO• ou O₂ (**Vertuani et al., 2004**). De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l' α -tocophérol (α -TH) à partir de leurs formes radicalaires (**Gardes et al., 2003**).



Partie II : **Partie pratique**

CHAPITRE 1:

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PARTIE II : PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

II. 1.1. Cadre de l'étude:

Les paramètres d'étude ont été réalisés dans cinq institutions:

-Les paramètres de stress oxydatif ont été effectuées au niveau du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar-El-Oued.

- Les analyses sanguines ont été effectuées au niveau du laboratoire d'établissement hospitalier spécialisé Ben Omor Djilani, du laboratoire d'établissement public de santé de proximité d'El oued-19 Mars et laboratoire de département de traitement chirurgical médical de centre de santé hospitalier d'El oued-8 Mai.

- L'étude histologique ont été effectuées au niveau du laboratoire de cytologie et d'anatomie pathologique de clinique Echifa, de Touggourt.

II. 1.2. Matériels :

II. 1.2. 1. Matériel animal :

Notre étude *in vivo* a été réalisé sur cinquante (50) rates femelles de type *Wistar Albinos*, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés presque de 3 à 4 mois et pesant entre 160 et 255g au début de l'expérimentation. Les animaux sont élevés à l'animalerie au niveau de la faculté de sciences de la nature et de la vie, à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'El-oued.

Les rates sont logées dans des cages en plastique avec accès libre de nourriture et d'eau potable à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie pendant 30 jours.

II. 1.2. 2. Produits chimiques :

- | | |
|---|--|
| ☞ N-ferrocenylméthyl-2-nitroaniline. | ☞ Acide phosphorique (H ₃ PO ₄). |
| ☞ N-ferrocénylméthyl-3-nitroaniline. | ☞ Sérum bovin albumine (BSA). |
| ☞ N-ferrocénylméthyl-4-nitroaniline. | ☞ Acide thiobarbiturique (TBA). |
| ☞ Chloroforme. | ☞ Acide trichloroacétique (TCA). |
| ☞ Formol 36 %. | ☞ Butylhydroxytoluène (BHT). |
| ☞ Chlorure de sodium (NaCl). | ☞ Acide salicylique. |
| ☞ Trishydroxyméthylaminométhane (Tris). | ☞ 5-5'-dithiobis2-nitrobenzoïque (DTNB). |
| ☞ Chlorure d'hydrogène (HCL). | ☞ Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄). |
| ☞ Méthanol. | ☞ Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂). |
| ☞ Bleu de Coomassie. | |

- ☞ Hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄).
- ☞ Glutathion réduite (GSH).

- ☞ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB)

II. 1.2. 3. Matériels de laboratoires :

- ☞ Centrifugeuse horizontale de type SIGMA.
- ☞ Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV-VIS -1240.
- ☞ Bain-marie de type MEMMERT.
- ☞ Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0.1mg).
- ☞ Balance électrique de type KERN EMB 2200-O.
- ☞ Micropipettes ajustables avec des embouts stériles.
- ☞ Bain de glace.
- ☞ portoir pour tubes spéciaux de centrifugation.
- ☞ Vortex.
- ☞ Agitateur thermo-programmable.
- ☞ pH mètre 210 MeterLAB.
- ☞ Microscope optique avec appareil photo (camera).
- ☞ Hown.
- ☞ Verreries (bucher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).
- ☞ Agitateurs magnétiques à plaque chauffante.

II. 1.3. Méthodes :

II. 1.3.1. Étude *in silico*

➤ Amarrage moléculaire

L'amarrage moléculaire plus connue sous l'appellation de ``docking`` moléculaire permet de connaître la façon dont un ligand (petite molécule) interagisse avec un récepteur (macromolécule) et de calculer l'énergie de liaison entre eux. Il permet aussi de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec un récepteur cible. (Lanez, T. & Lanez, H., 2016).

A. Préparation de l'ADN

PDB (*protein Data Bank*) est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN (Teniou, 2012). Dans notre étude nous avons utilisé l'ADN disponible dans la PDB (code:1BNA), la molécule d'ADN a été téléchargé au format pdb.

La longueur de cette structure est de 12 nucléotides avec un poids théorique égal à 3.66 KDa et un séquençage dont l'ordre,

Chain A: DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3');

Chain B: DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3');

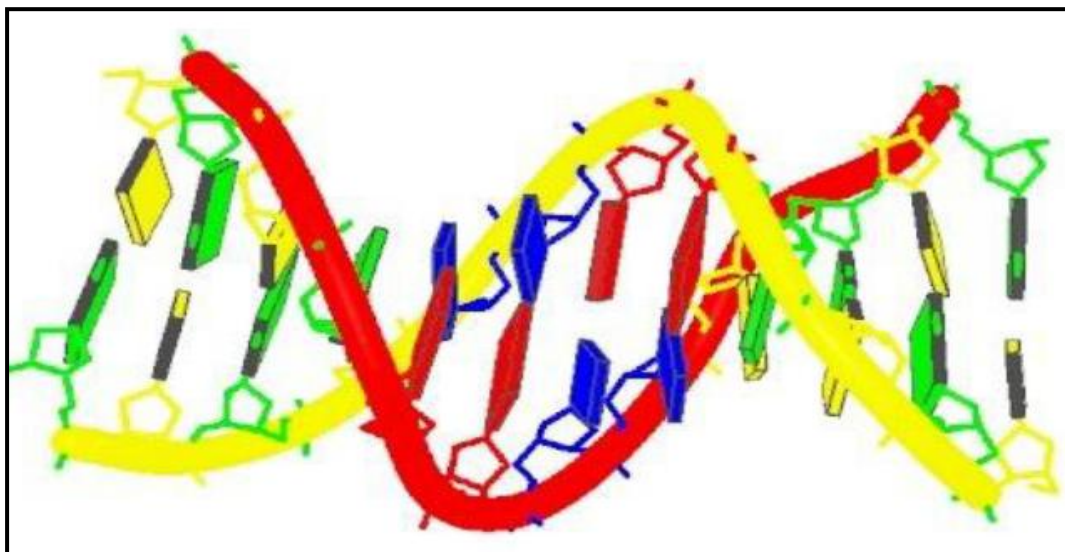


Figure 13: Structure de l'ADN d'un dodécamère (Drew et al., 1981).

B. Préparation de ligands

Les structures des trois dérivés ferrocéniques retenues pour l'amarrage ont été optimisées avec le logiciel Gaussian 09, elles sont enregistrées sous format pdb. Le logiciel Autodock exige le format pdbqt, les ligands sont donc convertis en format pdbqt par le logiciel OpenBabel 2.3.0.

C. Amarrage

L'amarrage a été réalisé en utilisant le logiciel AutoDock 4.2.6, six étapes sont nécessaires:

1. Préparation de l'accepteur.
2. Chargement de récepteur et du ligand.
3. Configuration des paramètres de l'AutoGrid.
4. Exécution de l'AutoGrid.
5. Exécution de l'AutoDock.
6. Analyse de résultats.

C.1. Préparation de l'accepteur

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ File-Read Molecule-select1BNA.pdb.
- ☞ Edit-Delete-Delete Water.
- ☞ Edit-Hydrogens-Add Hydrogens.
- ☞ Edit-Hydrogens-Merge Non-Polar.
- ☞ Edit-Charges-Compute Gasteiger Charge.

C.2. Chargement de récepteur et du ligand

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ Ligand-Input-Open-ligand.pdbqt
- ☞ Ligand-Torsion Tree-Detect Root

C.3. Configuration des paramètres de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ Grid-Macromolécule-Chose
- ☞ Grid-Select Map Types-Choose Ligand-select Ligand
- ☞ Grid-Select Map Types-Set Up Covalent Map-set Energy Barrier Height to 1000 and set Half-width (angstrom) to 5.00
- ☞ Grid-Grid Box-Set number of points in x, y and z-dimension to 100 and set Spacing;(angstrom) to 0.200

C.4. Exécution de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ Run-AutoGrid

C.5. Exécution de l'AutoDock

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ Doking-Macromolecule-Rigid Filname-select 1BNA.pdbqt
- ☞ Docking-ligand-Choose and select ligand
- ☞ Docking-Search Parametres-Genetec-Algorithm-set Number of GA Runs to 25
- ☞ Docking-output-Lamarckian GA (4.2) and save output as dock.dpf
- ☞ Run-Autodock

C.6. Analyse de résultats

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ☞ Analyze-Confirmation-Play, Ranked by energy and analyze interactions.

II. 1.3.2. Étude *in vivo*

A. Traitement des animaux

Après 30 jours d'adaptation, les rates ont été divisées en dix lots chacun contient cinq rates, les rates ont été traitées comme suit:

Lot T: rates saines (groupe témoin)

Tableau 4 : Traitement des rates .

Période de traitement	Les dérivés injectés	FM2NA	FM3NA	FM4NA
	Dose (mg/kg)			
Pendant une semaines (7 jours)	D _{0,4}	Lot 1	Lot 3	Lot 5
	D _{0,8}	Lot 2	Lot 4	Lot 6
	D ₄	Lot 9		Lot 7
	D ₈		Lot 8	

Les dérivés ferrocéniques ont été solubilisé dans une huile végétale (l'huile de tournesol), 1ml/jour est injecté par voie intra-péritonéal aux rates des lots 1 à 9.

B. Sacrifice et prélèvement de sang et les organes

Les rates sont anesthésiés par chloroforme (94%) après 16 h de jeûne et sont sacrifiés. Le prélèvement sanguin s'effectue au moment de sacrifice dans des tubes EDTA pour les analyses hématologiques, des tubes secs pour les analyses biochimiques. Le sang des tubes secs est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le sérum est récupéré et conservés à (-20C°). Après la dissection, le foie, les reins, les cœurs et les poumons sont attentivement prélevés, rincés avec du NaCl 0,9% puis pesés. Une partie des organes est utilisé pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé dans des flacons de formol (15%) pour faire des coupes histologiques. Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, glutathion réduit, glutathion-s-transférase, MDA et catalase).

C. Méthodes de l'analyse sanguine

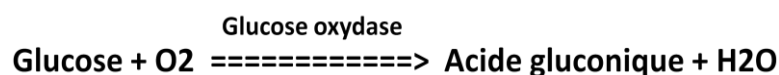
C.1. Dosage des paramètres hématologiques

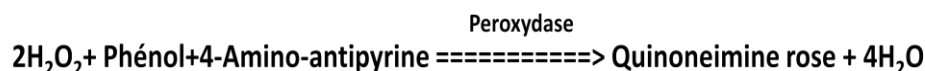
Le dosage des paramètres hématologique se fait par un analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800. On a basé sur la mesure des paramètres suivants: Globules blancs, globules rouges, hémoglobine, hématocrite et plaquettes.

C.2. Dosage des paramètres biochimiques

C.2.1. Dosage de la glycémie

La glycémie est la détermination enzymatique du glucose se fait selon les réactions suivantes :



**Mode opératoire :**

- ☞ Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.
- ☞ Doser selon le tableau ci dessous.
- ☞ En suite lire les DO après une incubation de 10 min à 37°C ou 30 min à 20-25 °C la coloration est stable 30 minutes.

Tableau 5: Mode opératoire de dosage de glycémie

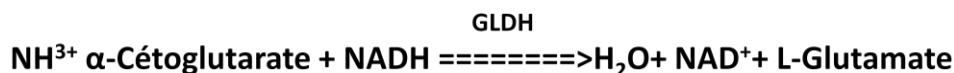
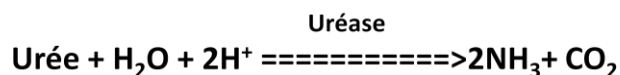
	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml

C.2.2. Dosage de fer sérique

Le dosage de fer sérique se fait selon une méthode colorimétrique. A pH 4,8 le fer Ferrique (Fe^{+++}) est libéré instantanément de la transferrine. L'acide ascorbique le réduit en fer ferreux (Fe^{++}). La ferrozine forme avec le fer ferreux, un complexe coloré soluble, mesurable de 560 à 580 nm. La présence de thiourée permet d'éliminer l'interférence des ions cuivreux (**Williams *et al.*, 1977**).

C.2.3. Dosage d'urée

L'uréase catalyse l'hémolyse de l'urée, présentée dans l'échantillon, en ammoniac (NH_3) et en anhydride carbonique (CO_2). L'ammoniac formé est incorporé à l' α -cétooglutarate par l'action du glutamate déshydrogénase (GLDH) avec oxydation parallèle de la NADH à la NAD.



La diminution de la concentration de NAD^+ dans la méthode est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon testé. L'absorption est mesurée à 340 nm (**Mac et Rackeyll., 1927**).

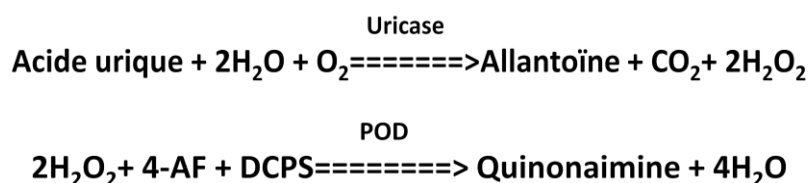
C.2.4. Dosage de la créatinine

Le dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium. Créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps choisi pour les

mesures évite les interférences provenant d'autres constituants du sérum. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984).

C.2.5. Dosage de l'acide urique

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2-4 Diclorophénolsulphonate (DCPS) forme un composé rosacé :

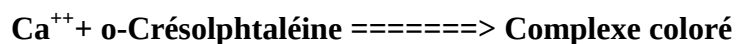


L'intensité de quinonaimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présentée dans l'échantillon testé, l'absorption est mesurée à 520 nm (Barham & Trinder, 1972).

C.2.6. Dosage de la calcémie

Principe

La mesure du calcium est fondée sur la formation d'un complexe coloré entre le calcium de l'échantillon et l'o-crésolphtaléine, en milieu alcalin : OH^+



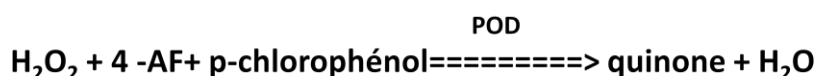
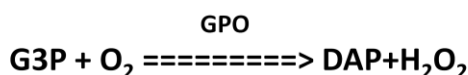
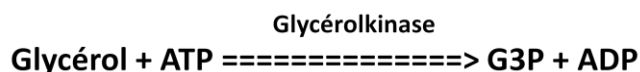
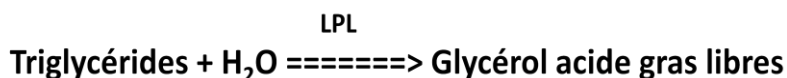
L'intensité de la couleur formée est directement proportionnelle à la concentration de calcium présentée dans l'échantillon testé, l'absorption est mesurée à 570 nm (Farell, 1984).

C.2.7. Méthode de dosage des triglycérides

Principe

Dans notre étude, Les triglycérides sont été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de triglycérides. Les triglycérides incubés avec la lipoprotéine lipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres le glycérol est phosphorylé par du glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphates (G3P) et de l'adénosines -5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé dihydroxyacétone phosphate(DAP) et en peroxydée d'hydrogène (H_2O_2) par GPO.

Au final, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec du 4-aminophénazone (4-AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge.

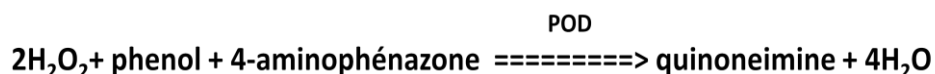
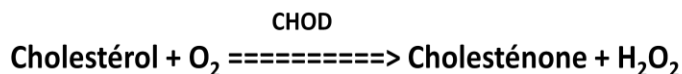


Le taux des triglycérides est déterminé à une longueur d'ondes de 505 nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présentes dans l'échantillon testé.

C.2.8. Méthode de dosage du cholestérol total

Principe

Dans notre étude, Cholestérol total ont été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de cholestérol total. La réaction consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-oxydase. L'indicateur est une quinoneimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en quinoneimine colorée est mesurée à 505 nm, elle est proportionnelle à la concentration en cholestérol total.



C.2.9. Méthode de dosage des paramètres de bilan hépatique

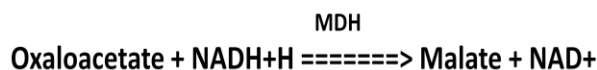
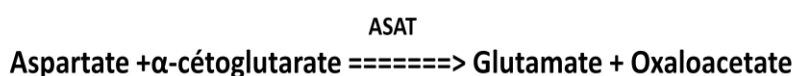
C.2.9.1. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) a été déterminé selon la méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de l'Aspartate aminotransférase (ASAT) (**Murray, 1984b**).

L'aspartate aminotransférase (ASAT) est une transaminase, également connue sous le nom de glutamate-oxalo-acétate-transaminase (GOT). Elle catalyse le transfert du groupe aminé du l' aspartate vers l' α -cétooglutarate pour donner du L-glutamate et l'oxaloacetate.

L'oxaloacetate est réduit au Malate par Malate déshydrogénase (MDH).

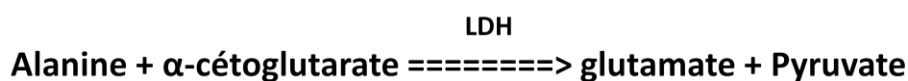
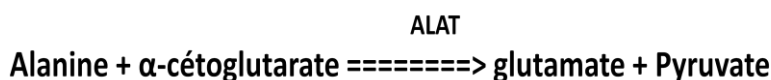


Le taux de diminution de NADH, mesurée photo-métriquement. Elle est proportionnelle avec la concentration de ASAT catalysée dans l'échantillon. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=340$ nm.

C.2.9.2. Méthode de dosage de l'activité de l'Alanine aminotransférase (ALAT)

Principe

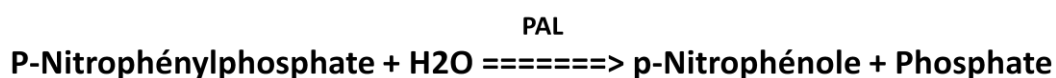
L'alanine aminotransférase (ALAT) a été déterminé suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de L'alanine aminotransférase (ALAT) (**Murray, 1984c**). L'alanine aminotransférase (ALAT) est une transaminase connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase (GPT). L'ALAT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l' α -cétooglutarate pour donner du L-glutamate et pyruvate. Pyruvate est réduit au lactate par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH. La mesure du taux de diminution de NADH, est photo-métriquement proportionnelle à l'activité catalytique de ASAT dans l'échantillon. La lecture se fait par :



C.2.9.3. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

Principe

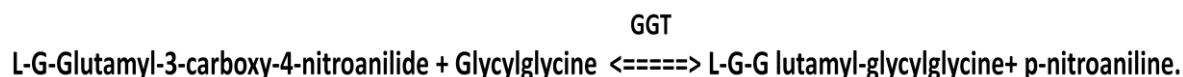
L'activité de la phosphatase alcaline a été déterminée suivant une méthode cinétique p-nitrophénylphosphate DGKC. La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (pNPP) à pH 10,4 libérant du p-nitrophénole et du phosphate en fonction de la réaction suivante:



La vitesse de formation du p-Nitrophénole, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé.

C.2.9.5. Méthode de dosage de Gamma- glutmytransférase (γ -GT ou GGT)

Le dosage sanguin des gamma-GT permet d'évaluer l'activité hépatique. Il est parfois nécessaire de contrôler le dosage sanguin à quelques semaines d'intervalle. La méthode dosage basée sur les travaux de **Szasz, Roslaki et Tarlow (1969)**. Le schéma réactionnel est le suivant :



La vitesse de formation du p-nitroaniline, directement proportionnelle à l'activité GGT dans le spécimen, est mesurée à 405 nm.

D. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif

D.1. Préparation de l'homogénats des organes

Un gramme de tissu (foie, cœur, reins et poumon) de chaque rates des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (3000 trous/min, 15min), puis le surnageant obtenu est conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

D.2. Dosage des protéines tissulaire

Principe

Il est nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des protéines contenues dans les tissus. Le dosage des protéines se fait par la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines et en particulier sur les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu.

L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

Préparation de la solution de travail

Mélange 25 ml de méthanol (95%) et 50mg du bleu de Comassie, puis mettre la mélange sur l'agitateur pendant 2 heures et ajouté 50ml de H₃PO₄ et complète le volume jusqu'à 500ml avec d'eau distillé.

Mode opératoire

- ☞ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ☞ Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- ☞ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ☞ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.
- ☞ La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions.

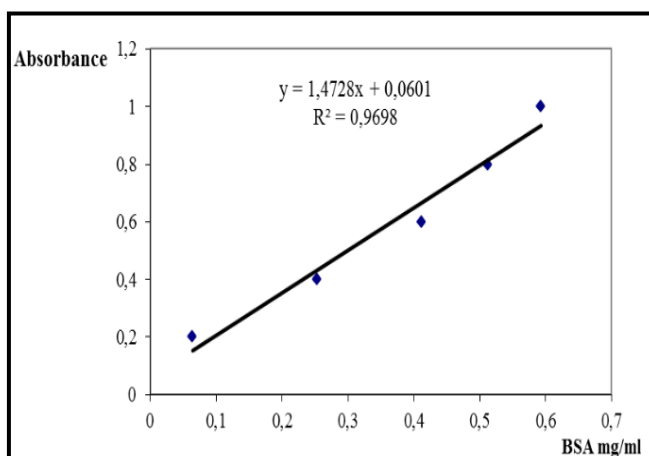


Figure 14: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

D.3. Méthode de dosage des malondialdéhyde (MDA) tissulaires

Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).

Réactif

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% P/V ; Chlorure d'hydrogène (HCl) 1 N. 375 mg de TBA, 20g de TCA, 0,01g de BHT, 25 ml de HCl 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution

complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 ml et le volume complété à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Mode opératoire

Pipeter dans les tubes à essai à vis en verre, 300µl d'échantillon, 1200µl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100°C pendant 15 minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Expression des résultats

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon} / 1.53 \times 10^5) / \text{mg de prot}$$

D.4. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaires

Principe

Le glutathion a été déterminé suivant une méthode colorimétrique de **(Weckbercker & Cory, 1988)** par un spectrophotomètre, la mesure de la densité optique résulte de la formation de l'acide 2-nitro-5 mercapturique à partir de la réduction de l'acide dithio-bis2-nitrobenzoïque ce qu'on appelle réactif de d'Ellman avec les groupements SH existent dans le GSH.

Mode opératoire

- ☞ Prendre 0.8 ml de la solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) solution 2.
- ☞ Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minutes dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 trs/min pendant 5 min.
- ☞ Prélever 0.5ml de surnagent.
- ☞ Ajouter 1ml de solution tampon tris avec NaCl solution 1 avec 0.025ml de DTNB (0.01mol) méthanol solution 3.
- ☞ Laisser le mélange 5min à température de chambre puis lire l'absorbance avec spectrophotomètre d'absorption molaire à 412 nm contre le blanc (eau distillé).

Calcule:

$$(\text{GSH})(\text{nM/mgdeprot}) = \frac{\text{Do} \times 1 \times 1.525}{13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mgdeprot}} \times d$$

13133: constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

DO: la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525ml: volume total de mélange.

0.5ml: volume de surnagent.

1: volume de mélange de protéine.

0.8ml: volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

(GSH): concentration de glutathion.

d:facteur de dilution.

D.5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GSTs)

Principe

L'activité de la GSTs a été mesurée par spectrophotométrie en se basant sur la cinétique de formation d'un complexe entre un substrat des GST: le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB), et le glutathion (GSH). Le complexe formé peut être visualisé par une augmentation de la densité optique à une longueur d'onde de 340 nm .

Mode opératoire

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **(Habig et al., 1974)**; celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

Tableau 6: Mode opératoire de dosage de l'activité enzymatique de GSTs.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1M) ph 6.5	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH (0.1M)	100	100
Homogénat	-	20

Expression des résultats

L'activité de la GSTs exprimée en nano-moles de CDNB par minute par milligramme de protéines (nmol CDNB/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$(GSTs)(nM/min/mgdeprot) = \frac{DO \text{ échant/min} - DO_{blanc/min}}{9.6 \times mgdeprot}$$

GSTs: glutathion S-transférase.

Do échant/min: Densité optique de l'échantillon /min.

Do blanc /min: Densité optique du blanc /min.

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM-1. Cm-1

D.6. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du catalase

Principe:

Un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml de H_2O_2 fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (**Clairborne, 1985**).

Calcule:

L'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon la formule :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) / \text{g de protéine}$$

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

E. Préparation des échantillons pour l'étude histologique

Pour l'étude histologique, le foie, les reins et les poumons de tous les lots sont prélevés. Ils doivent être rapidement prélevés pour éviter son autolyse qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau distillée ensuite avec du NaCl 0,9%, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 30%.

La technique utilisée comporte les étapes suivantes :

E.1. Fixation

La fixation des échantillons (fragment de l'organe) dans le formol, puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

E.2. Déshydratation

Déshydratation des échantillons à l'aide d'un appareil automatique qui permet le passage automatiques et progressif des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 95% et 100%).

E.3. Inclusion et réalisation

Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» refermant un réservoir de paraffine

maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 μm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélative chauffée.

E.4. Coloration

Pour la coloration, la technique utilisée est celle à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique).

La coloration suit les étapes suivantes :

Déparaffinage et hydratation des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée. Puis sont mises dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux). Les lames sont plongées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); ensuite dans un bain d'eau du robinet avec vérification de la différenciation au microscope. Mises dans un bain d'eau ammoniacale, puis dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

E.5. Observation au microscope

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

F. Méthode d'analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de cinq répétitions pour chaque groupe ($\pm$ l'écart type), et pour mieux visualiser les résultats on utilise la représentation graphique, les histogrammes, en utilisant EXCEL 2007. Aussi, On utilise test T de student à un facteur, avec $\alpha < 0.05$ pour les analyses significatives des résultats, et pour les comparaisons des moyennes en utilisant logiciel MINITAB13. Si $P < \alpha$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité

CHAPITRE 2:

Résultats et discussion

II.2.1. Résultats et interprétation

II.2.1. 1. Étude *in silico*

L'amarrage moléculaire par le logiciel AUTODOCK de l'interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN permet d'obtenir les paramètres de cette interaction à savoir : l'énergie libre de liaison ΔG et la constante de liaison K.

A. Étude d'amarrage moléculaire du dérivé 2FMNA

Tableau 7 : Différentes conformations de l'interaction 2FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ. mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
1	-24,4112	19,103 × 10 ³
2	-23,617	13,861 × 10 ³
3	-23,199	11,708 × 10 ³
4	-22,7392	9,724 × 10 ³
5	-21,945	7,056 × 10 ³
6	-21,7778	6,595 × 10 ³
7	-20,4402	3,843 × 10 ³
8	-20,3984	3,778 × 10 ³
9	-20,3984	3,778 × 10 ³
10	-19,9804	3,191 × 10 ³
11	-19,3952	2,520 × 10 ³
12	-18,5592	1,798 × 10 ³
13	-18,4756	1,738 × 10 ³
14	-18,1412	1,518 × 10 ³
15	-17,765	1,304 × 10 ³
16	-17,0544	0,979 × 10 ³
17	-16,7618	0,870 × 10 ³
18	-15,9676	0,631 × 10 ³
19	-15,5914	0,542 × 10 ³
20	-15,3406	0,490 7 × 10 ³
21	-15,2988	0,481 × 10 ³
22	-14,8808	0,407 × 10 ³
23	-13,9612	0,280 × 10 ³
24	-13,9194	0,276 × 10 ³
25	-13,7104	0,253 × 10 ³

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 4 avec une valeur de ΔG : -22,7392, et dans laquelle 2 liaisons hydrogènes sont formées entre le 2FMNA et l'ADN.

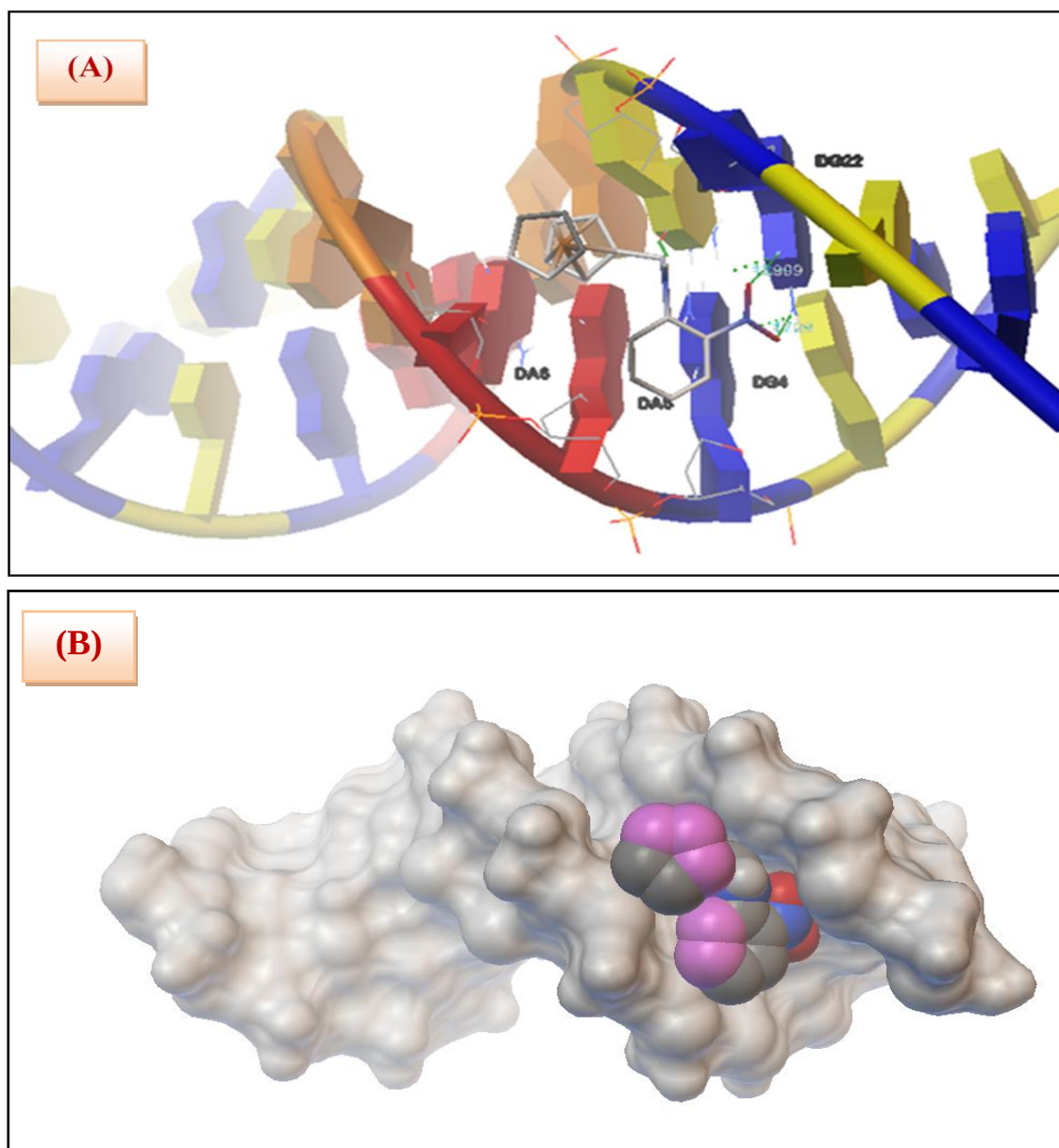


Figure 15: Interaction de 2FMNA avec l'ADN.

(A) : Amarrage moléculaire de l'interaction **2FMNA** -ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine(DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, **(B)**: Vue en surface de 2FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 2FMNA est attaché dans le petit sillon par liaison H.

Le 2FMNA se lie avec l'ADN en formant 2 liaisons hydrogènes (figure.15, tableau.8), la première entre l'hydrogène n° 22 de désoxyguanine (DG) n°22 de la chaîne B d'ADN et l'oxygène de 2FMNA, la deuxième entre l'hydrogène n° 3 de désoxyguanine (DG) n°22 de la chaîne B de l'ADN et l'oxygène de 2FMNA.

Tableau 8 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 2FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.

Type de Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ. mol ⁻¹)
ADN : chaîne B : DG22: H22 <=> Ligand : O	1,729	-7,03
ADN : chaîne B : DG22 : H3 <=> Ligand : O	1,839	-3,909

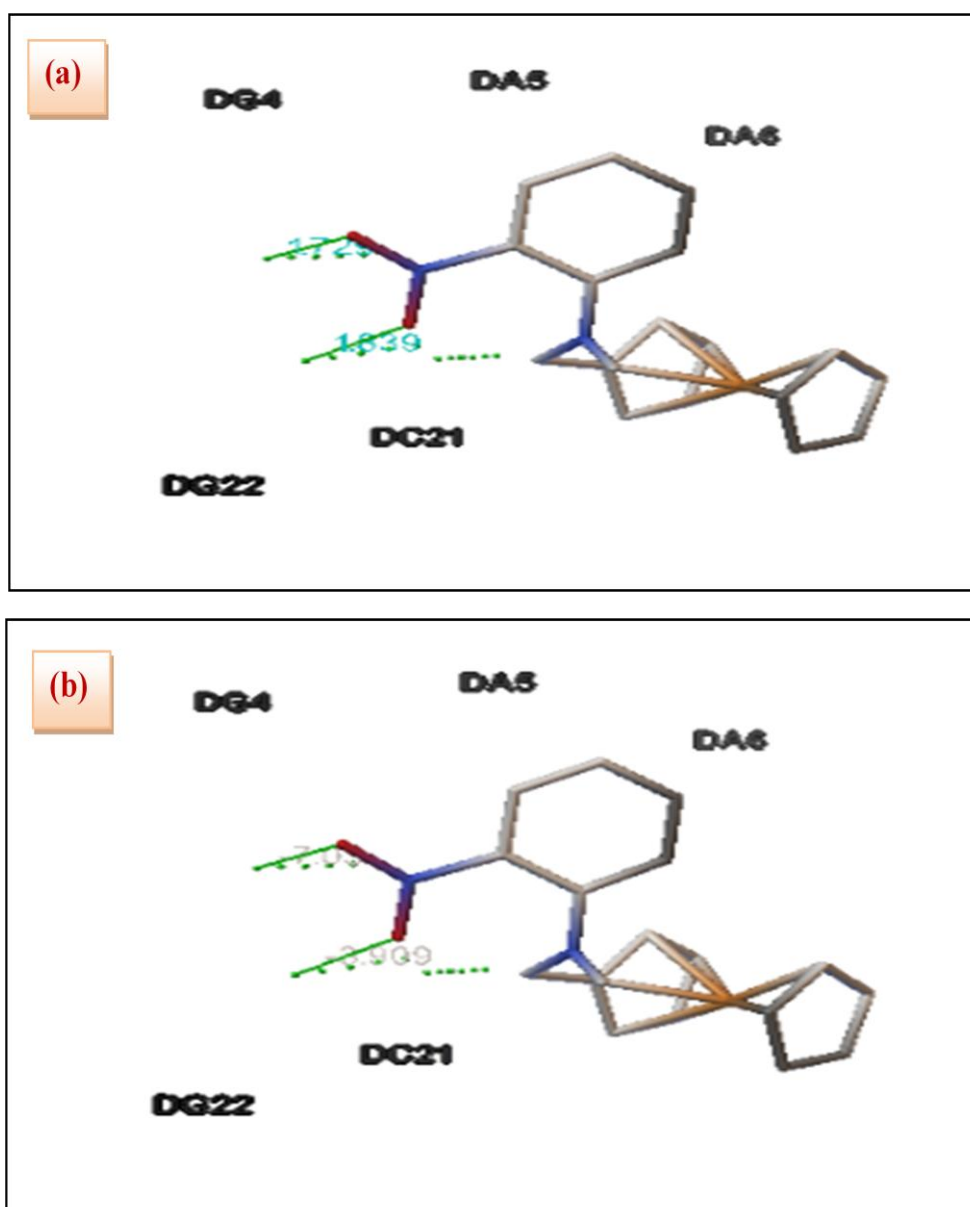


Figure 16 : Distances exprimées en Å **(a)** et énergies exprimer par Kcal. mol⁻¹ **(b)** des liaisons hydrogènes formées entre le 2FMNA et de l'ADN.

B. Étude d'amarrage moléculaire du dérivé 3FMNA

Tableau 9 : Différentes conformations de l'interaction 3FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ. mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
1	-24,871	$23,0009 \times 10^3$
2	-23,2826	$12,110 \times 10^3$
3	-22,6138	$9,244 \times 10^3$
4	-22,3212	$8,214 \times 10^3$
5	-22,0704	$7,423 \times 10^3$
6	-21,4852	$5,860 \times 10^3$
7	-21,3598	$5,571 \times 10^3$
8	-21,3598	$5,571 \times 10^3$
9	-21,1926	$5,207 \times 10^3$
10	-21,109	$5,034 \times 10^3$
11	-21,109	$5,034 \times 10^3$
12	-20,6492	$4,181 \times 10^3$
13	-20,482	$3,908 \times 10^3$
14	-20,3984	$3,778 \times 10^3$
15	-20,3566	$3,715 \times 10^3$
16	-19,8968	$3,086 \times 10^3$
17	-19,646	$2,788 \times 10^3$
18	-19,3534	$2,477 \times 10^3$
19	-19,2698	$2,395 \times 10^3$
20	-19,1444	$2,277 \times 10^3$
21	-17,765	$1,304 \times 10^3$
22	-17,5142	$1,179 \times 10^3$
23	-17,3052	$1,083 \times 10^3$
24	-16,8036	$8,849 \times 10^3$
25	-12,122	$1,336 \times 10^3$

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative -24,871 , et dans laquelle 1 liaison hydrogène est formée entre le 3FMNA et l'ADN.

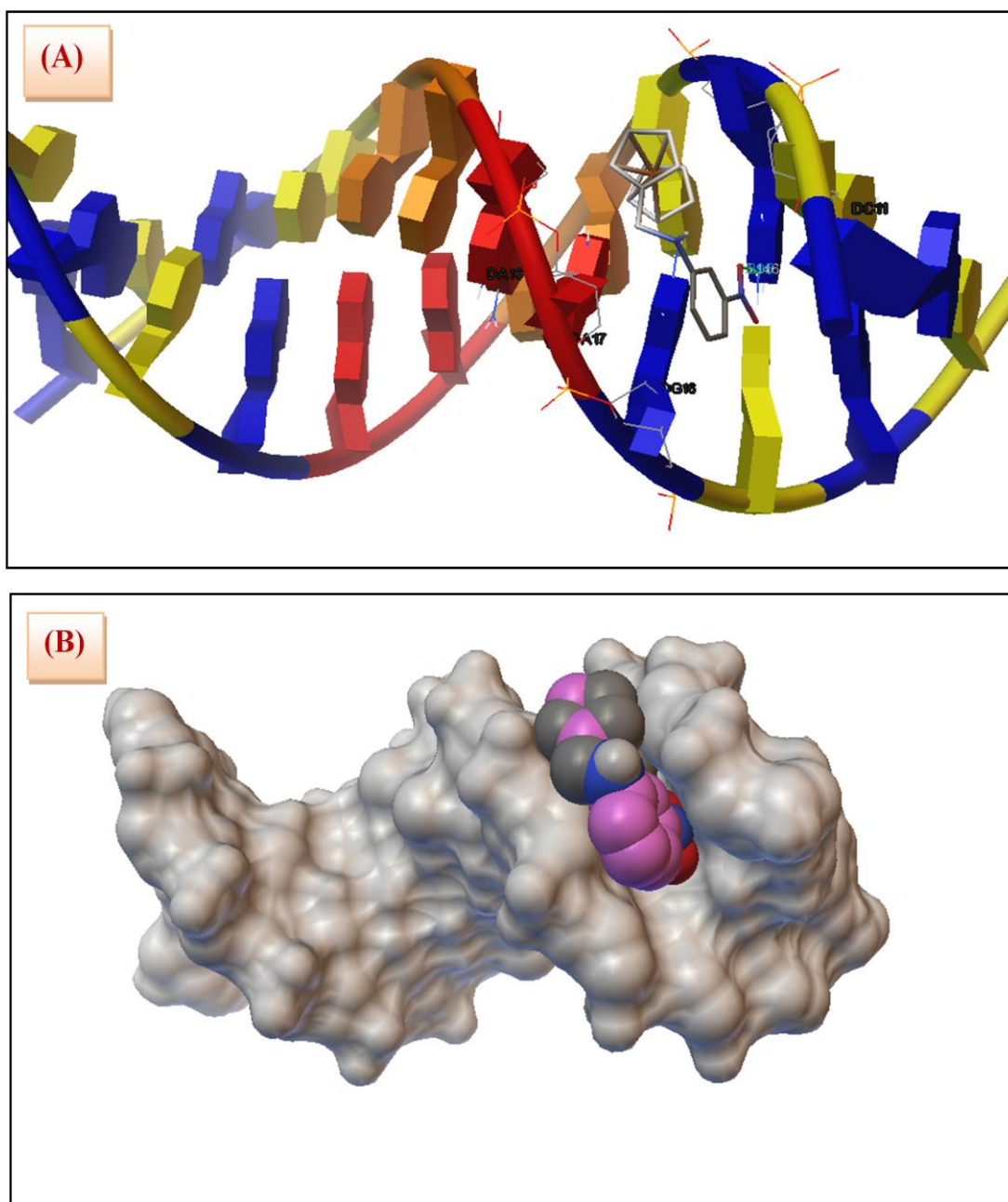


Figure 17 : Interaction de 3FMNA avec l'ADN.

(A) : Amarrage moléculaire de l'interaction 3FMNA-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé,
(B) : Vue en surface de 3FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 3FMNA est attaché dans le petit sillon par liaison H.

Le 3FMNA se lie avec l'ADN en formant 1 liaison hydrogène (fig.17, tab.10) entre l'hydrogène n°21 de déoxyguanine (DG) n°10 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de 3FMNA.

Tableau 10 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 3FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.

Type de Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ. mol ⁻¹)
ADN : chaîne A : DG10: H21 <=> Ligand : O	1,695	-5,146

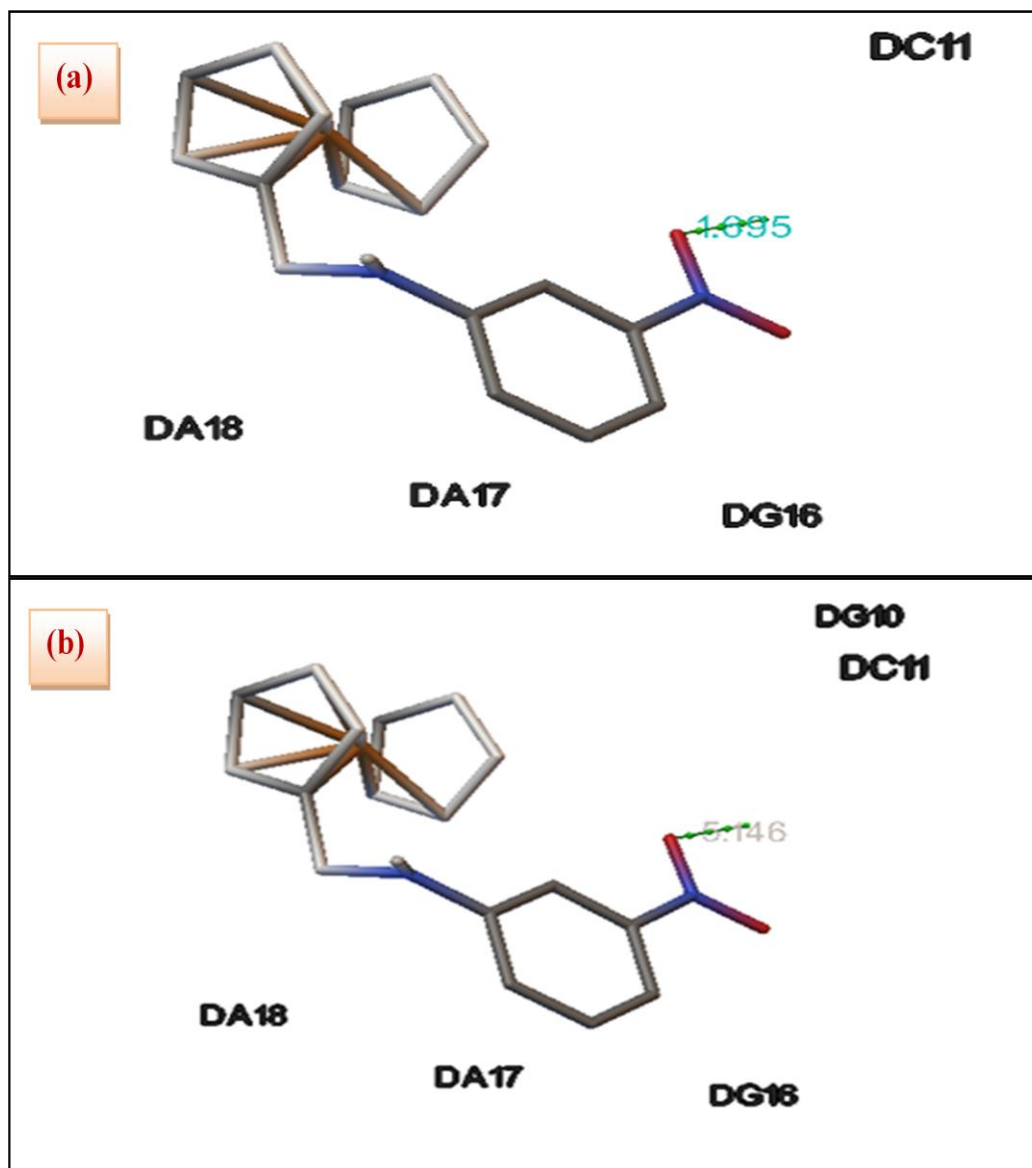


Figure 18 : Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal. mol⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le 3FMNA et de l'ADN.

C. Étude d'Amarrage moléculaire du dérivé 4FMNA

Tableau 11 : Différentes conformations de l'interaction 4FMNA-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ. mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
1	-23,4916	13,177×10 ³
2	-23,2826	12,110 ×10 ³
3	-23,1572	11,512 ×10 ³
4	-23,1154	11,320 ×10 ³
5	-22,4466	8,641 ×10 ³
6	-22,363	8,354 ×10 ³
7	-22,3212	8,214 ×10 ³
8	-22,1958	7,808 ×10 ³
9	-22,1958	7,808 ×10 ³
10	-22,0704	7,423 ×10 ³
11	-21,9032	6,938 ×10 ³
12	-21,8614	6,822 ×10 ³
13	-21,8614	6,822 ×10 ³
14	-21,6942	6,376 ×10 ³
15	-21,1508	5,120 ×10 ³
16	-20,6492	4,181 ×10 ³
17	-20,6492	4,181 ×10 ³
18	-20,6492	4,181 ×10 ³
19	-20,5656	4,042 ×10 ³
20	-20,482	3,908 ×10 ³
21	-20,273	3,592 ×10 ³
22	-19,3952	2,520 ×10 ³
23	-19,1444	2,277 ×10 ³
24	-18,6428	1,859 ×10 ³
25	-18,5592	1,798 ×10 ³

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative: -23,4916, et dans laquelle 3 liaisons hydrogènes sont formées entre le 4FMNA et l'ADN.

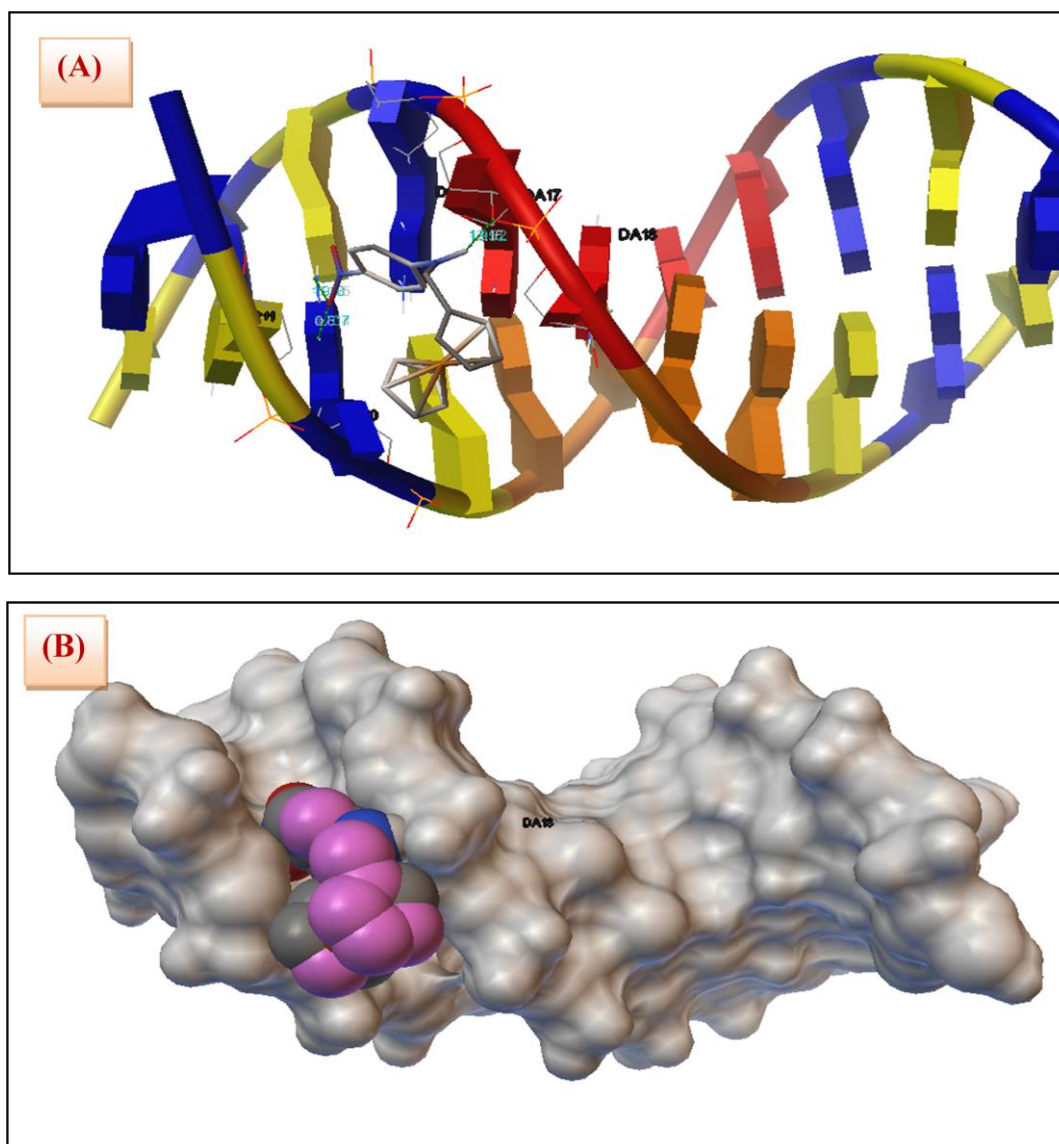


Figure 19 : Interaction de 4FMNA avec l'ADN.

(A) : Amarrage moléculaire de l'interaction 4FMNA-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé,
(B) : Vue en surface de 4FMNA amarré avec de l'ADN, Il montre que le 4FMNA est attaché dans le petit sillon par liaison H.

Le 4FMNA se lie avec l'ADN en formant 3 liaisons hydrogènes (fig.19, tab.12), la première entre l'oxygène n°3 de deoxyadénine (DA) n°17 de la chaîne B d'ADN et l'hydrogène de 4FMNA, la deuxième entre l'hydrogène n°21 de déoxyguanine (DG) n°10 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de 4FMNA, la troisième entre l'hydrogène n°3 de déoxyguanine (DG) n°10 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de 4FMNA.

Tableau 12 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de 4FMNA et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.

Type de Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ. mol ⁻¹)
ADN : chaîne B : DA17 : O3 <=> Ligand : H	1,952	-2,16
ADN : chaîne A : DG10: H21 <=> Ligand : O	1,918	-1,155
ADN : chaîne A : DG10: H3 <=> Ligand : O	1,707	0,614

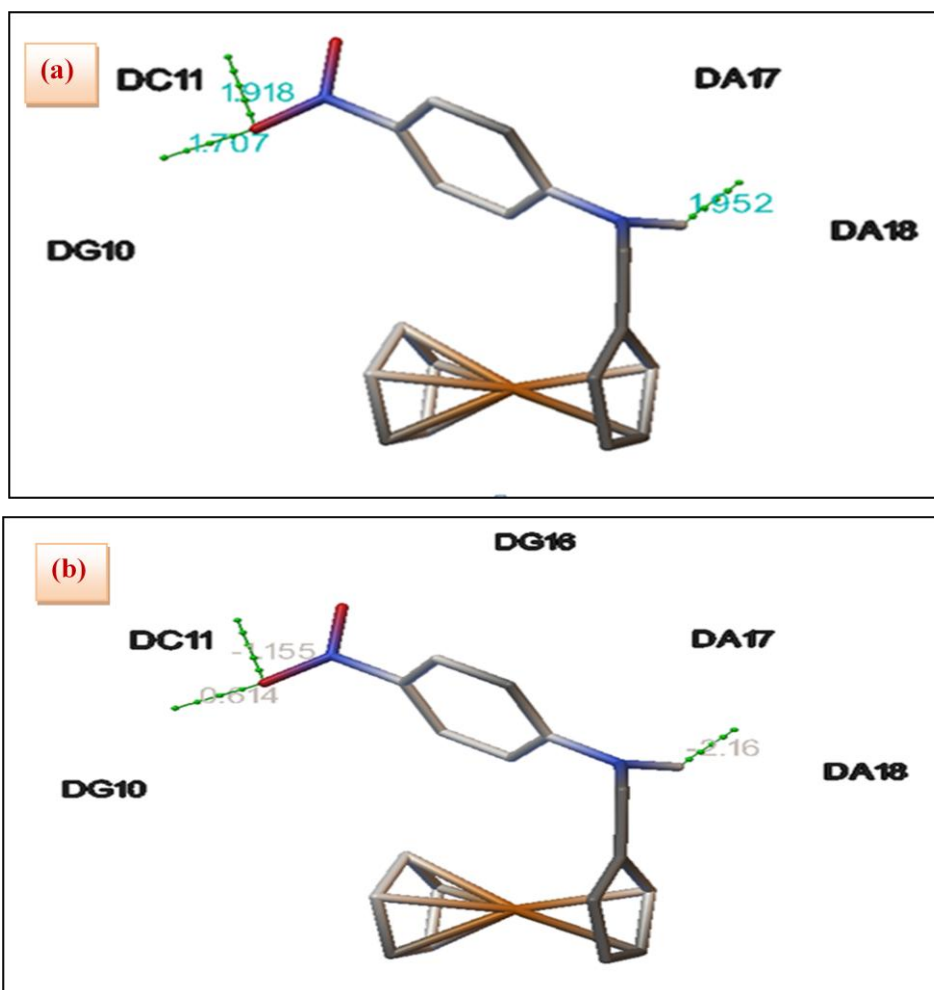


Figure 20 : Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal. mol⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le 4FMNA et de l'ADN.

Tableau 13 : Comparaison entre l'énergies libres ΔG et constantes de liaison K des trois dérivés étudiées obtenus par les processus électrochimique, Spectroscopique (Hammami, 2017) et le processus de docking.

Adduit	Mesures	ΔG (KJ. mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
2FMNA-ADN	Docking	-22,7392	$0,9724 \times 10^4$
	Électrochimique	-22.671	0.939×10^4
	Spectroscopique	-23.4	1.24×10^4
3FMNA-ADN	Docking	-24,871	$2,300 \times 10^4$
	Électrochimique	-24.386	1.862×10^4
	Spectroscopique	-23.6	1.36×10^4
4FMNA-ADN	Docking	-23,4916	$1,3177 \times 10^4$
	Électrochimique	-23.41	1.26×10^4
	Spectroscopique	-23.0	1.06×10^4

II.2.1.2. Étude *in vivo*

A. Poids relative des organes des rates

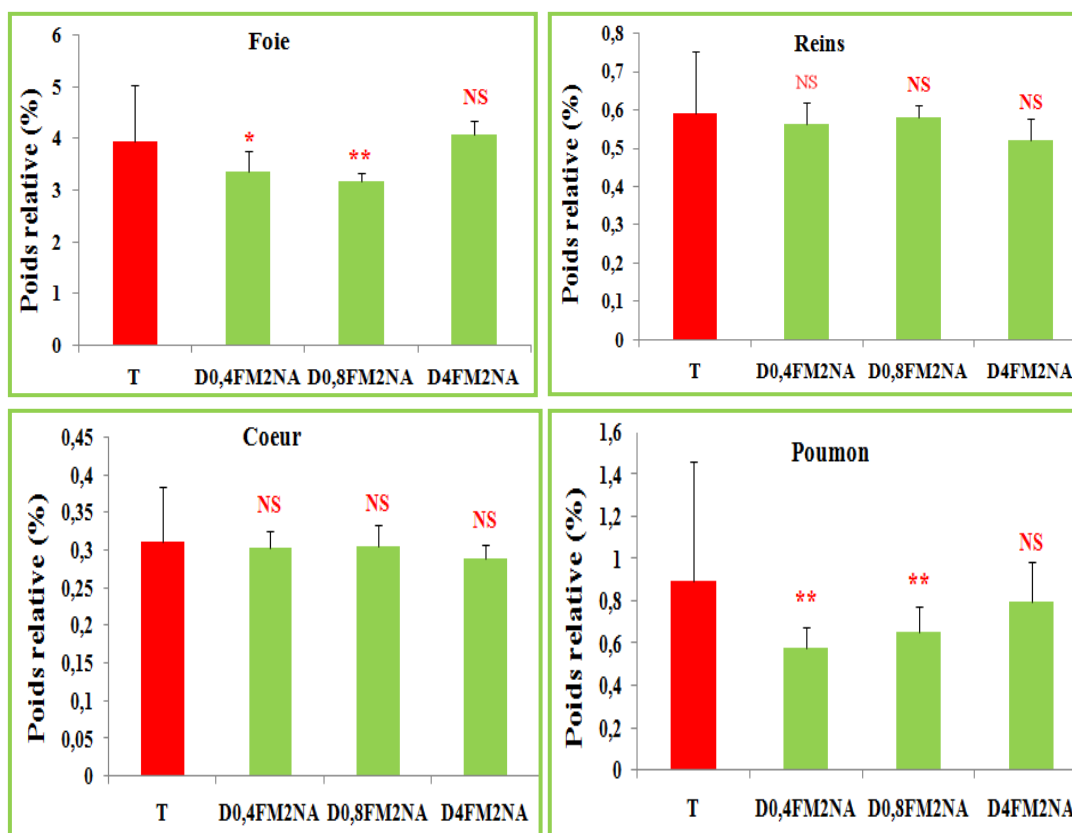


Figure 21: Dose-réponse du FM2NA sur les poids relatifs des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentées dans la figure (21) ne montrent aucune différence significative de poids relatif des organes dans les reins et le cœur pour différents groupes traités et aussi dans le foie et le poumon chez le groupe traité par D4FM2NA. Mais dans le poumon les résultats montrent que le poids relatif diminue d'une façon hautement significative ($p < 0,01$) chez les groupes traités de D0,4FM2NA et de D0,8FM2NA par rapport au groupe témoin.

Aussi, les résultats présentent une diminution significative ($p < 0,05$) et hautement significative ($p < 0,01$) de poids relatif de foie respectivement chez le groupe traité par D0,4FM2NA et le groupe traité par D0,8FM2NA par rapport au groupe témoin.

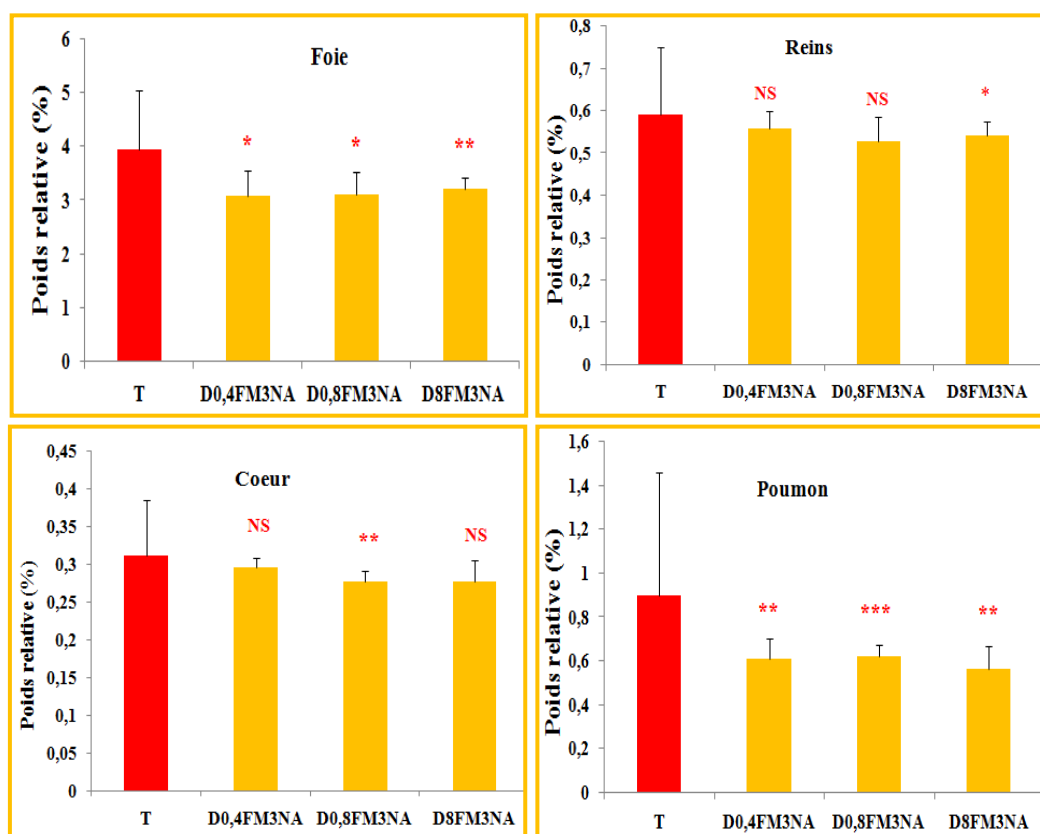


Figure 22: Dose-réponse du FM3NA sur le poids relatif des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (22) montrent une diminution significative ($p < 0,05$) de poids relatif de foie dans les groupes traités de D0,4FM3NA et de D0,8FM3NA et une diminution hautement significative ($p < 0,01$) dans le groupe traité de D8FM3NA. Par contre dans les reins ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) chez les groupes traités de D0,4FM3NA et de D0,8FM3NA mais montrent une diminution significative ($p < 0,05$) chez le groupe traité de D8FM3NA par rapport au groupe témoin.

D'autre part, nos résultats indiquent une diminution hautement significative ($p < 0,01$) de poids relatif de cœur chez le groupe traité de D0,8FM3NA et chez les groupes D0,4FM3NA

et D8FM3NA pour le poumon par rapport au groupe témoin. Aussi nos résultats ne présentent aucune différence significative de poids relatif dans les groupes D0,4FM3NA et D8FM3NA pour le cœur mais une diminution très hautement significative ($p<0,001$) dans le groupe D0,8FM3NA pour le poumon par rapport au groupe témoin .

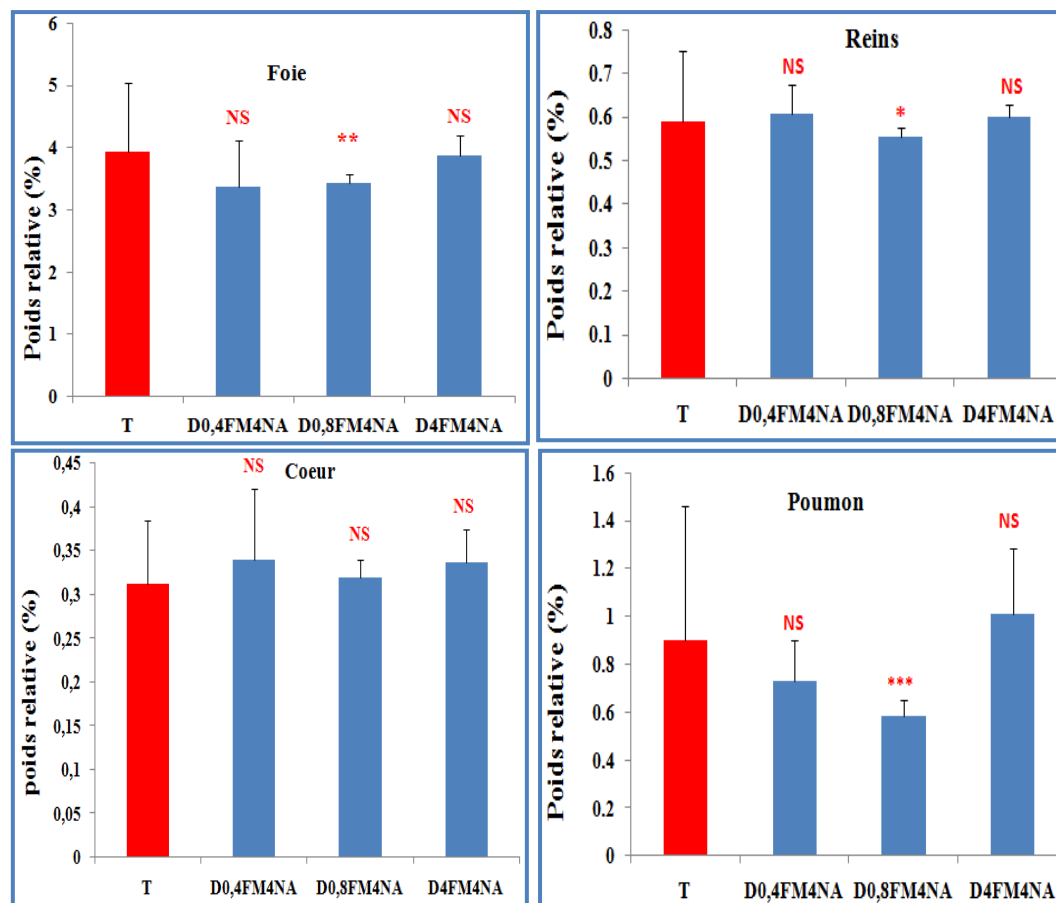


Figure 23: Dose-réponse du FM4NA sur les poids relatifs des organes des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (23) ne montrent aucune différence significative de poids relatif des différents organes dans les groupes traités de D0,4FM4NA et D4FM4NA par rapport au groupe témoin. Aussi, les résultats dans le groupe traité de D0,8FM4NA indiquent une diminution significative ($p<0,05$), hautement significative ($p<0,01$) et très hautement significative ($p<0,001$) respectivement de poids relatif de reins, de foie et de poumon, mais aucune différence significative de poids relatif de cœur par rapport au groupe témoin.

B. Évaluation des paramètres hématologiques

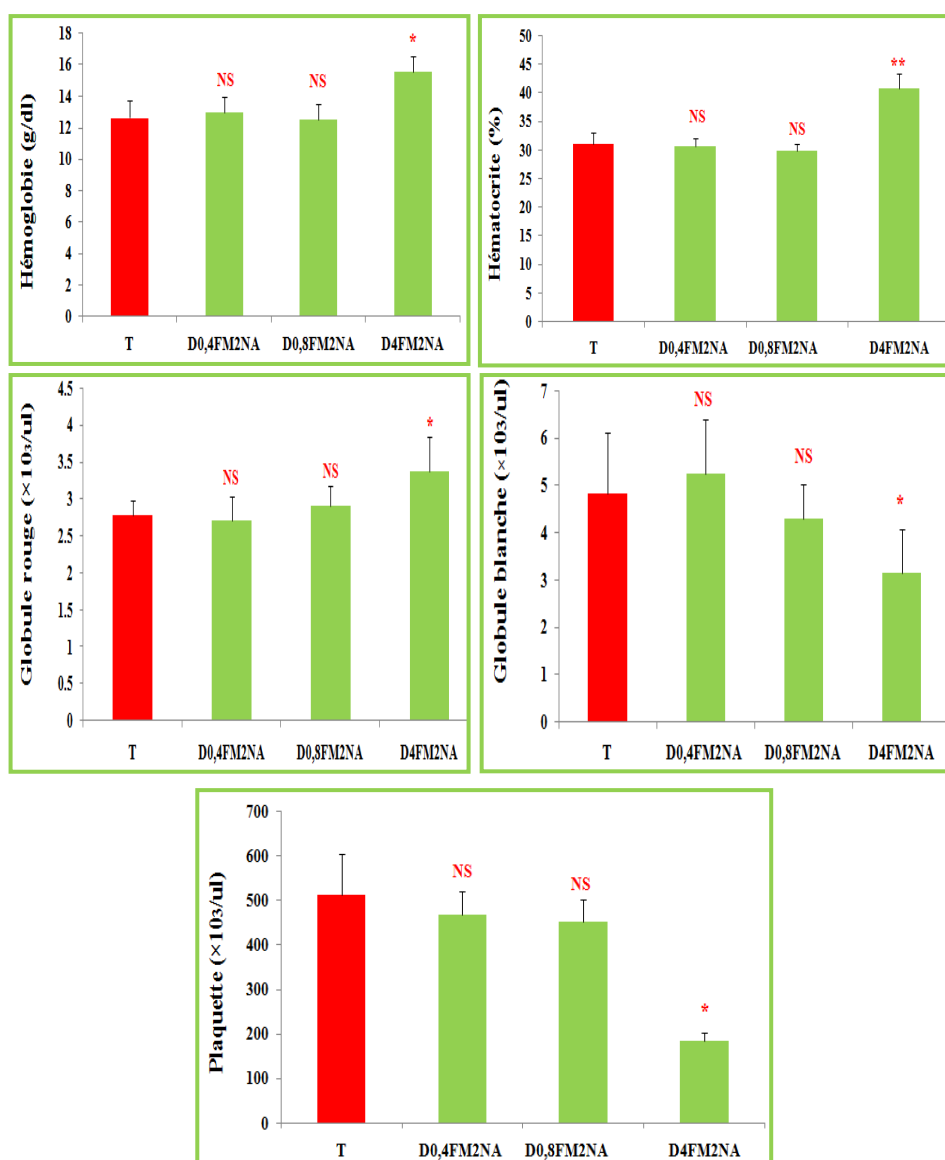


Figure 24: Dose-réponse du FM2NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (24) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) pour tous les paramètres hématologiques chez les groupes D0,4FM2NA et D0,8FM2NA. Mais chez le groupe D4FM2NA, les résultats présentent une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration d'hémoglobine et de nombre de globules rouges et hautement significative ($p < 0,01$) de pourcentage d'hématocrite. En revanche, le nombre de plaquettes et de monocytes diminue d'une façon significative ($p < 0,05$) chez le groupe D4FM2NA par rapport au groupe témoin.

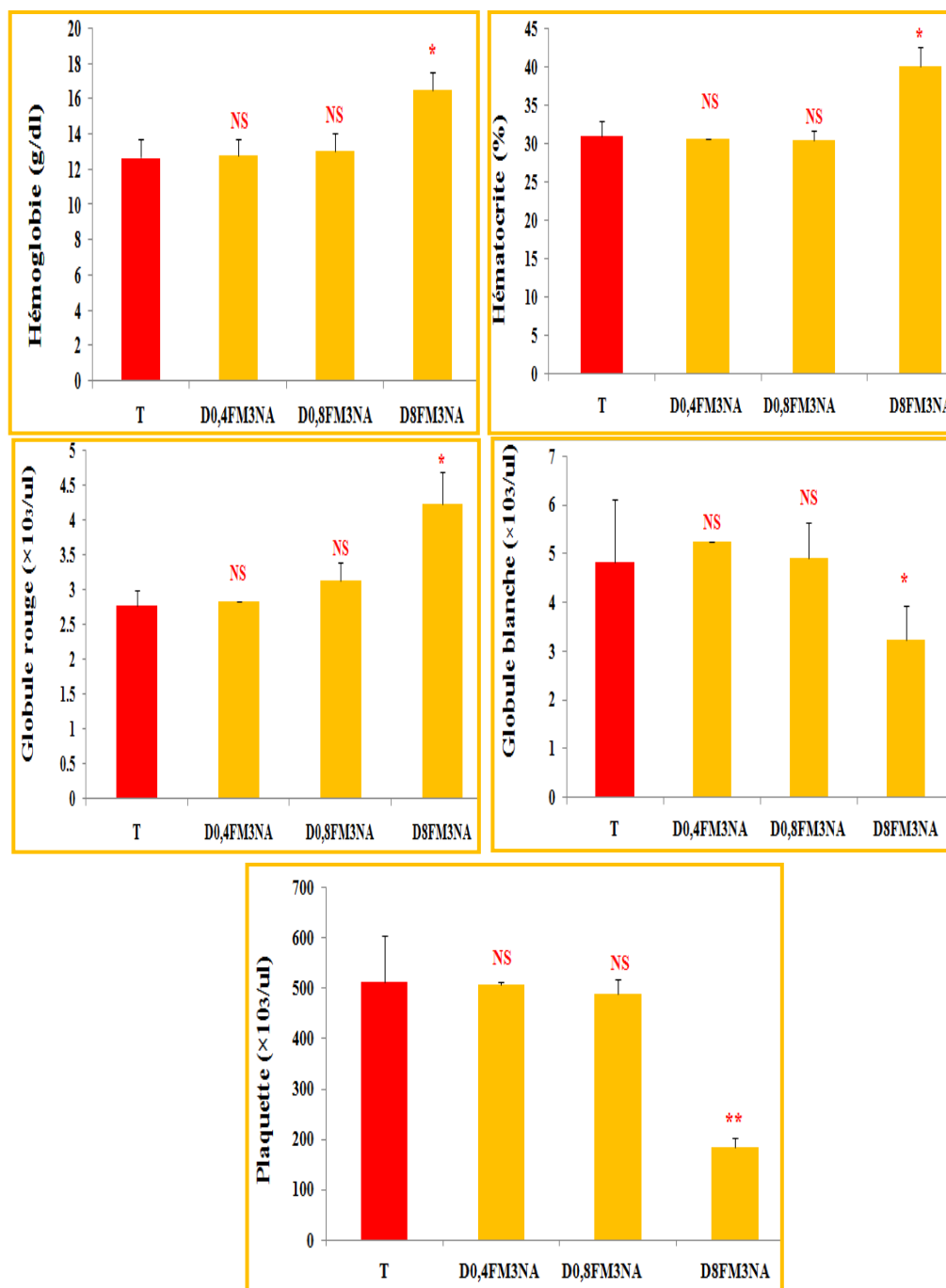


Figure 25: Dose-réponse du FM3NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (25) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) pour tous les paramètres hématologiques chez les groupes D0,4FM3NA et D0,8FM3NA. Mais chez le groupe D8FM3NA, les résultats présentent une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration d'hémoglobine, de nombre de globules rouges et de pourcentage d'hématocrite. Par contre, le nombre de plaquettes et de monocytes diminue

respectivement d'une façon significative ($p < 0,05$) et hautement significative ($p < 0,01$) par rapport au groupe témoin.

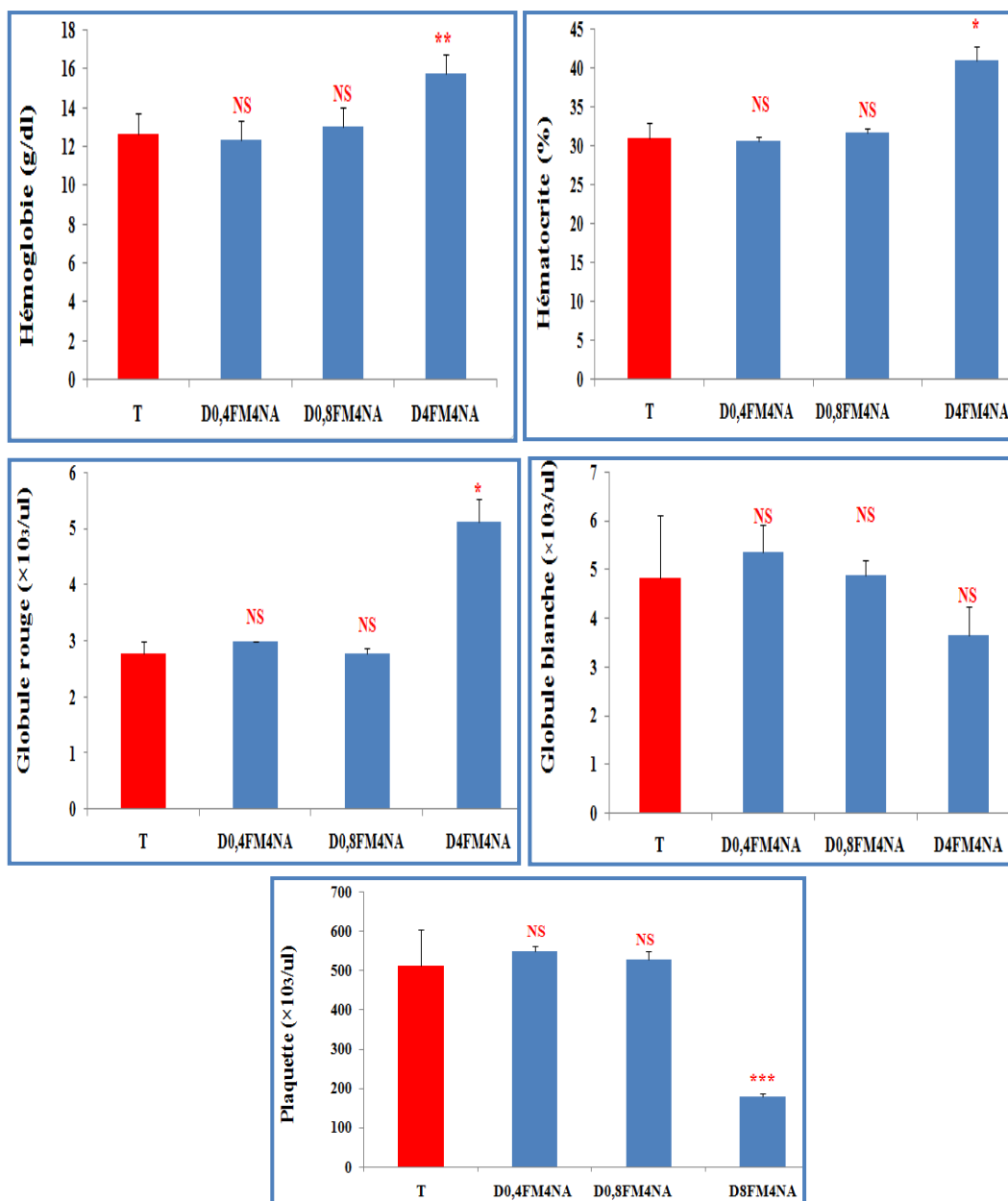
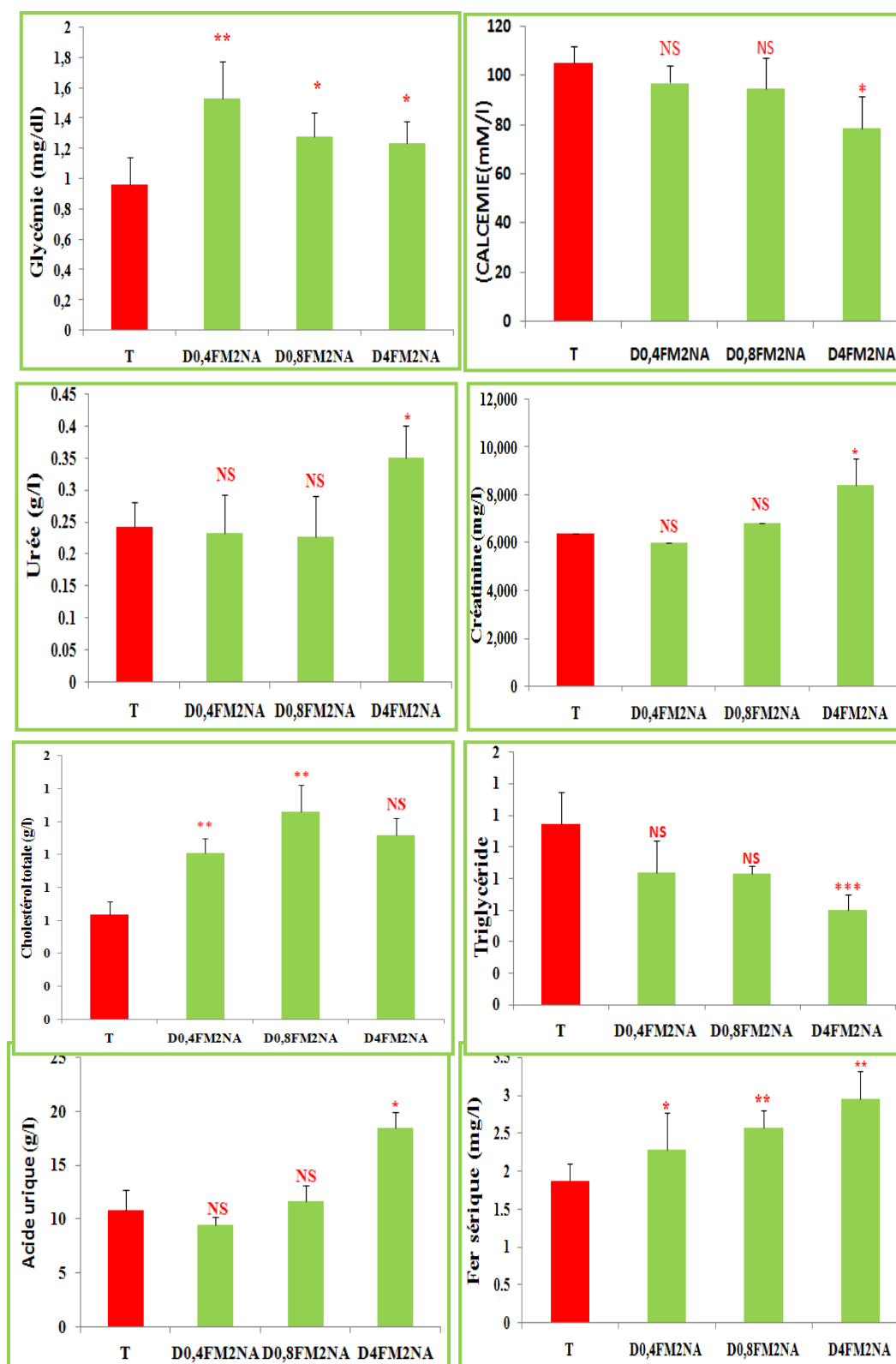


Figure 26: Dose-réponse du FM4NA sur les paramètres hématologiques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (26) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) pour tous les paramètres hématologiques chez les groupes D0,4FM4NA et D0,8FM4NA. En revanche, chez le groupe D4FM4NA, les résultats présentent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) de la concentration d'hémoglobine et significative ($p < 0,05$) de nombre de globules rouges et de pourcentage d'hématocrite. Par

contre, le nombre de plaquettes et de monocytes diminue respectivement d'une façon très hautement significative ($p < 0,001$) et non significative ($p > 0,05$) par rapport au groupe témoin.

C. Évaluation des paramètres biochimiques sériques



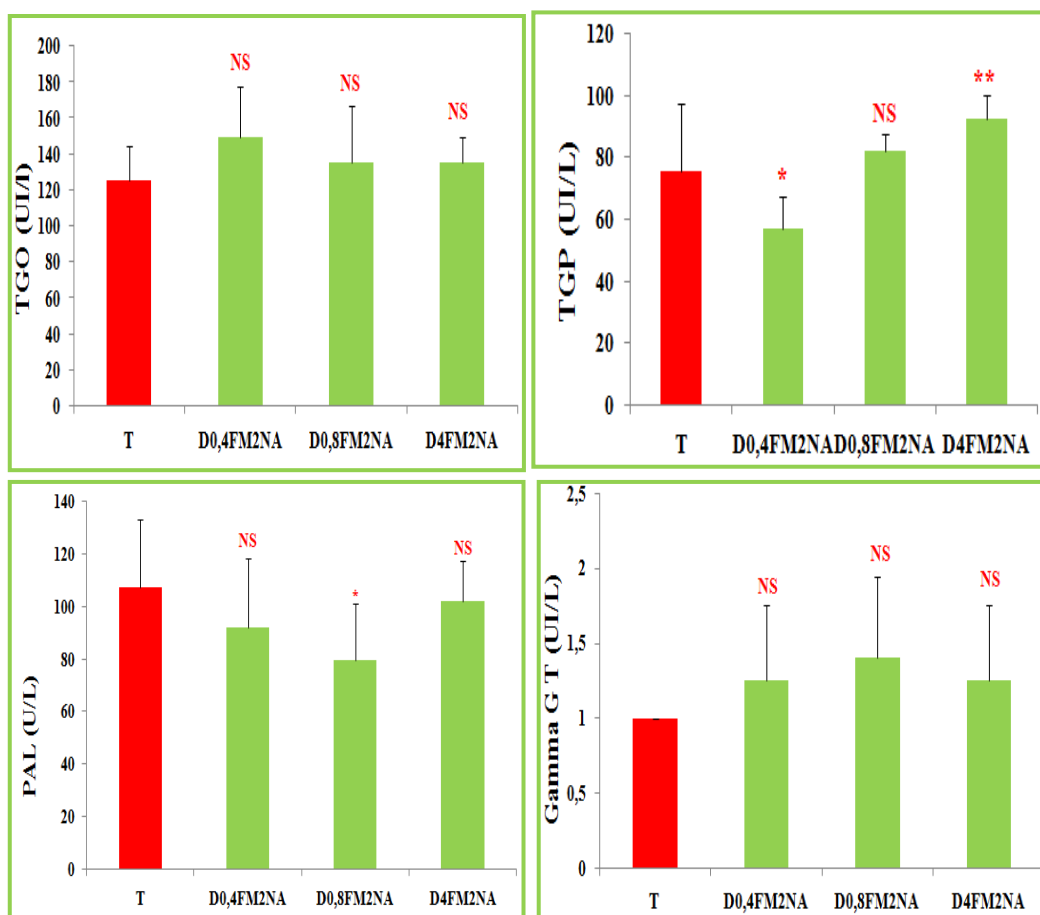


Figure 27: Dose-réponse du FM2NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

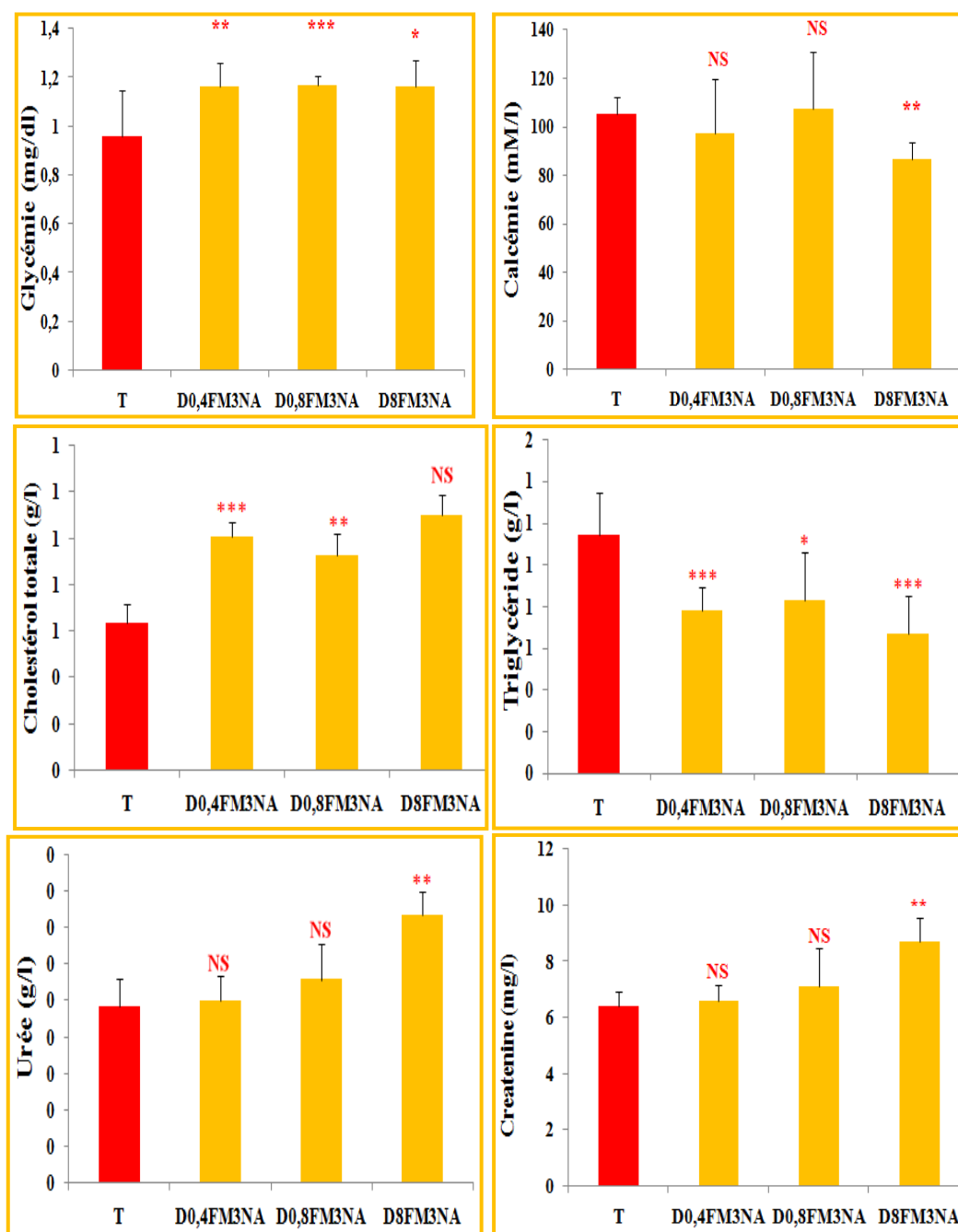
Les résultats présentés dans la figure (27) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de la concentration d'urée, créatinine et de l'acide urique chez les différents groupes à l'exception le groupe D4FM2NA qui présente une augmentation significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin .

Ainsi, les résultats montrent une augmentation non significative ($p > 0,05$) pour la concentration de TGO et de γ -GT chez les différents groupes. Alors que le taux de TGP augmente d'une façon non significative ($p > 0,05$) et hautement significative ($p < 0,01$) respectivement chez les groupes D0,8FM2NA et D4FM2NA et diminue d'une façon significative ($p < 0,05$) chez les groupes D0,4FM2NA par rapport au groupe témoin .

D'autre part, la concentration de glycémie à une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les groupes D0,8FM2NA et D4FM2NA et très hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe D0,4FM2NA. En revanche, le taux de fer sérique augmente d'une façon significative ($p < 0,05$) chez le groupe D0,4FM2NA et très hautement significatif ($p < 0,001$) chez les groupes D0,8FM2NA et D4FM2NA. Aussi pour la concentration du cholestérol total

augmente d'une façon hautement significative ($p < 0,01$) chez les groupes D0,4FM2NA et D0,8FM2NA et non significative ($p > 0,05$) chez les groupes D4FM2NA par rapport au groupe témoin.

En revanche, il ya une diminution non significative ($p > 0,05$) de la concentration de calcémie et de triglycéride chez les groupes D0,4FM2NA et D0,8FM2NA, d'une façon significative ($p < 0,05$) de la concentration de calcémie et très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration de triglycéride chez le groupe D4FM2NA. Aussi la concentration de PAL diminue d'une façon non significative ($p > 0,05$) chez le groupe D0,4FM2NA et D4FM2NA et d'une façon significative ($p < 0,05$) chez le groupe D0,8FM2NA.



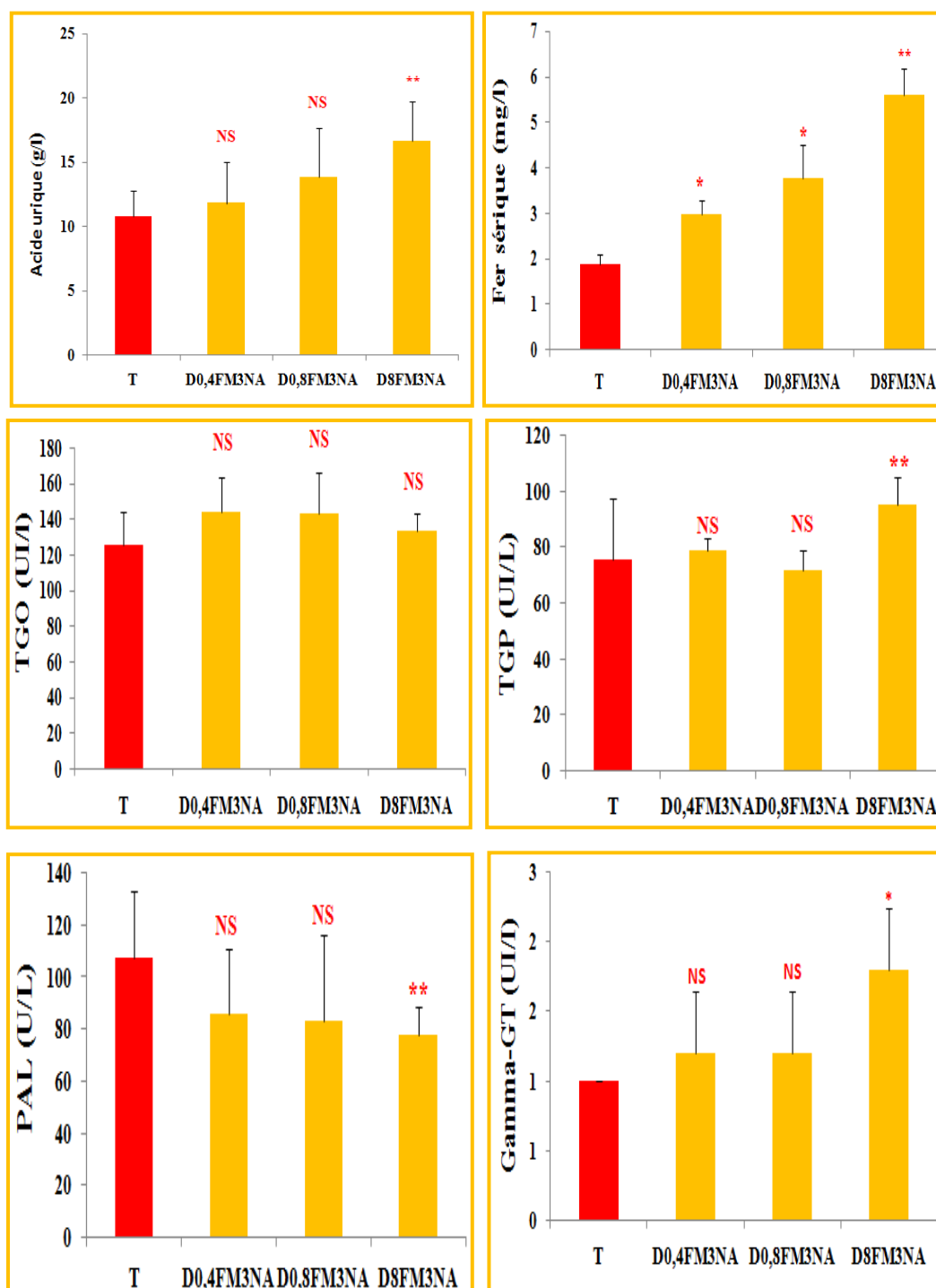


Figure 28: Dose-réponse du FM3NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

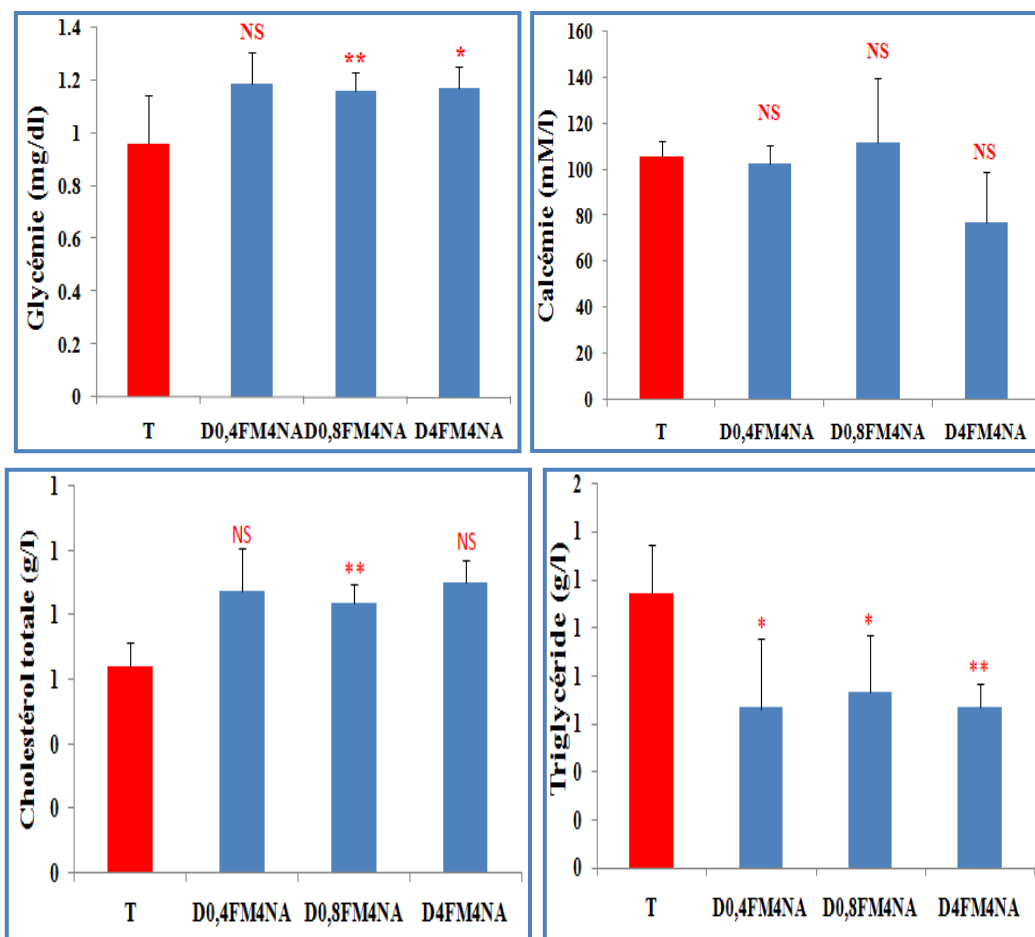
Les résultats présentés dans la figure (28) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de la concentration d'urée, créatinine, acide urique, TGP, calcémie et de γ -GT chez les groupes D0,4FM3NA et D0,8FM3NA, mais il ya une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) pour tous de ces paramètres à l'exception de γ -GT qui augmente d'une

façon significative ($p < 0,05$) et de calcémie qui diminue d'une façon hautement significative ($p < 0,01$) chez les groupe D8FM3NA.

Aussi, la concentration de TGO augmente d'une façon non significative ($p > 0,05$) chez tous les groupes par rapport au groupe témoin.

En revanche, Les résultats montrent une diminution non significative ($p > 0,05$) de la concentration de PAL chez les groupes D0.4FM3NA et D0.8FM3NA et significative ($p < 0,05$) chez les groupes D8FM3NA. Aussi la concentration de triglycéride diminue d'une façon hautement significative ($p < 0,01$) chez les groupe D0.4FM3NA et D8FM3NA mais d'une façon significative ($p < 0,05$) chez les groupe D0.8FM3NA.

D'autre part, la concentration de glycémie à une augmentation significative ($p < 0,05$), hautement significative ($p < 0,01$) et très hautement significative ($p < 0,001$) respectivement chez les groupes D8FM3NA, D0,4FM3NA et D0,8FM3NA, mais le taux de fer sérique augmente d'une façon significatif ($p < 0,05$) chez les groupes D0,4FM3NA et D0,8FM3NA et hautement significative ($p < 0,01$) chez le groupe D8FM3NA. Aussi pour la concentration de Cholestérol total augmente d'une façon non significative ($p > 0,05$), hautement significative et très hautement significative ($p < 0,001$) respectivement chez les groupes D8FM3NA, D0,8FM3NA et D0,4FM3NA par rapport au groupe témoin.



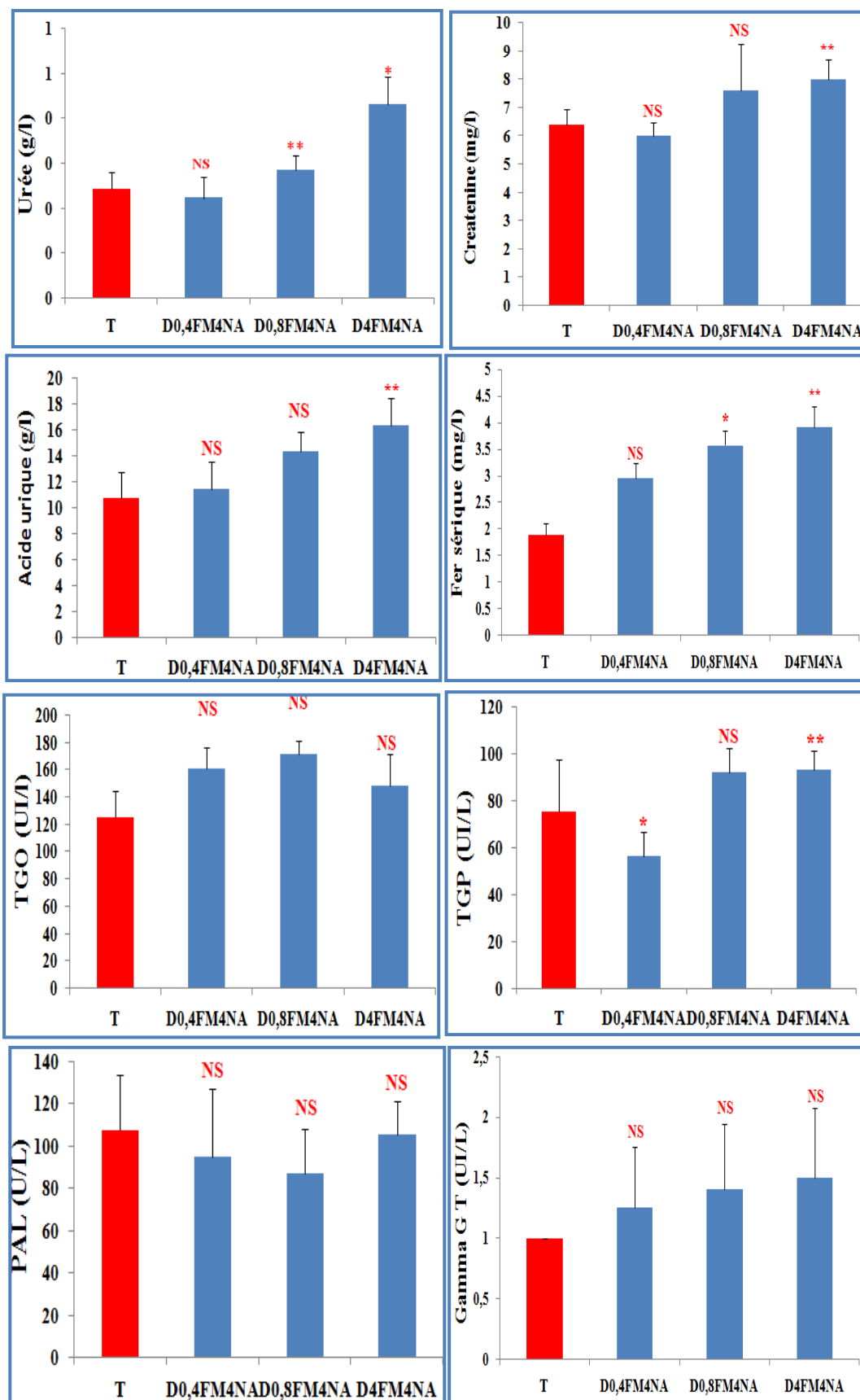


Figure 29: Dose-réponse du FM4NA sur les paramètres biochimiques sériques des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

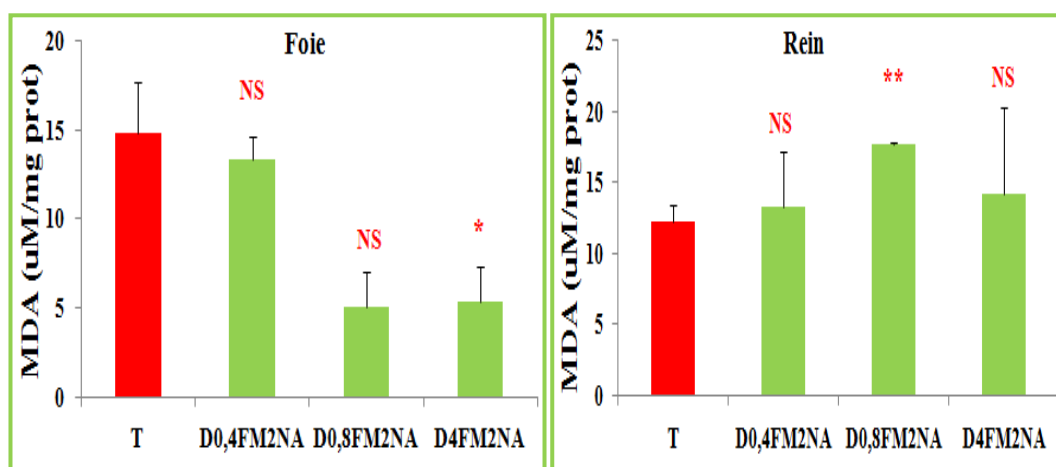
Les résultats présentés dans la figure (29) montrent une augmentation non significative chez les groupes traités à différentes doses de FM4NA de la concentration de TGO et de γ -GT et chez le groupe D0.8FM4NA pour la concentration de TGP qui augmente d'une façon hautement significative ($p<0,01$) et diminue d'une façon significative ($p<0,05$) respectivement chez les groupes D4FM4NA et D0.4FM4NA.

Concernant le groupe de D0.4FM4NA il y a une augmentation non significative de la concentration de glycémie, de cholestérol total et de fer sérique mais aucune différence significative de la concentration de calcémie, créatinine, urée et d'acide urique et une diminution significative ($p<0,05$) et non significative respectivement de la concentration de triglycéride et de PAL.

D'autre part, concernant le groupe de D0.8FM4NA il y a une augmentation non significative de la concentration de créatinine et d'acide urique, significative ($p<0,05$) de la concentration de fer sérique et hautement significative ($p<0,01$) de la concentration de glycémie, cholestérol total et d'urée mais aucune différence significatif de la concentration de calcémie, alors qu'il existe une diminution significative ($p<0,05$) de la concentration de triglycéride et non significative de la concentration de PAL.

En fin, concernant le groupe de D4FM4NA il y a une augmentation non significative de la concentration de cholestérol total, significative ($p<0,05$) de la concentration de glycémie et d'urée et hautement significative ($p<0,01$) de la concentration de créatinine, acide urique et de fer sérique mais aucune différence significative de la concentration de PAL, alors qu'il existe une diminution non significative de la concentration de calcémie et hautement significative ($p<0,01$) de la concentration de triglycéride.

E. Évaluation des paramètres de stress oxydatif



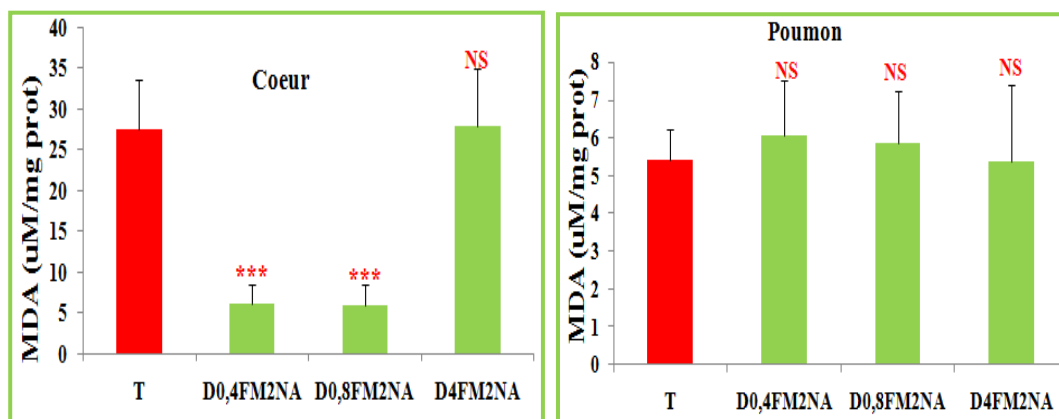


Figure 30: Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (30) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité de Malondialdéhyde (MDA) chez tous les groupes dans le poumon, chez le groupe D0,4M2NA dans le foie et les reins, et chez le groupe D4FM2NA dans les reins et le cœur. Mais il ya une augmentation hautement significative chez le groupe D0,8FM2NA dans les reins. Par contre, il ya une diminution non significative et significative respectivement chez les groupes D0,8FM2NA et D4FM2NA dans le foie et très hautement significative chez les groupes D0,4M2NA et D0,8FM2NA dans le cœur.

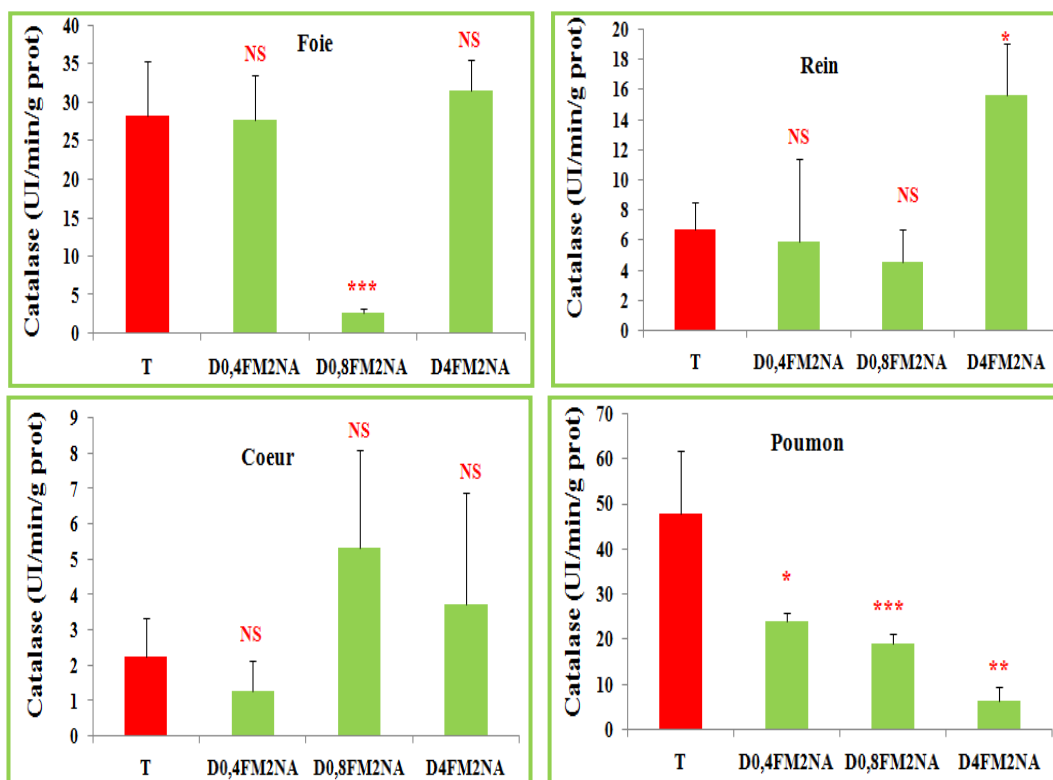


Figure 31: Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de la catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (31) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de catalase chez les groupes D0,4M2NA et D4FM2NA dans le foie, chez les groupes D0,4M2NA et D0,8FM2NA dans les reins et chez le groupe D0,4M2NA dans le cœur. Mais il ya une augmentation non significative et significative respectivement chez les groupes D0,8FM2NA et D4FM2NA dans le cœur et chez le groupe D4FM2NA dans les reins. Par contre, il ya une diminution significative, hautement significative et très hautement significative respectivement chez les groupes D0,4M2NA, D4FM2NA et D0,8FM2NA dans le poumon et une diminution très hautement significative chez le groupe D0,8FM2NA dans le foie.

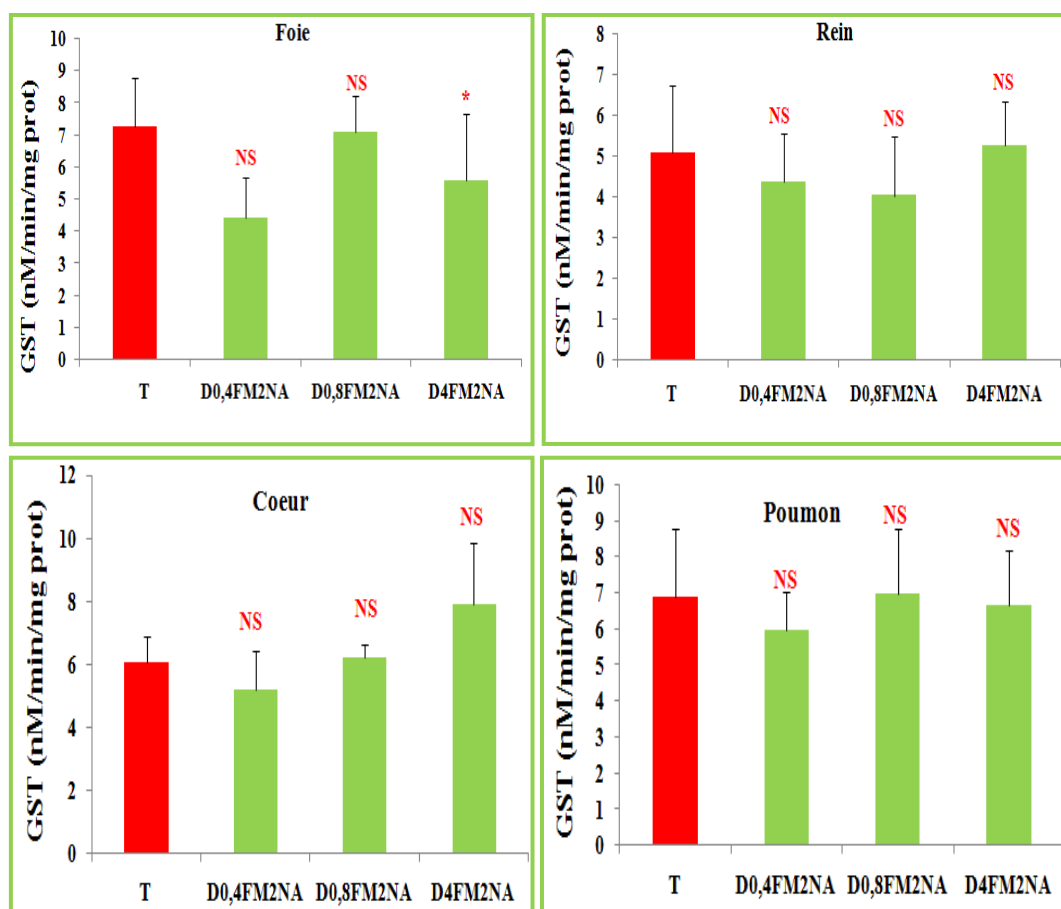


Figure 32: Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (32) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de Glutathion S Transférase (GST) chez tous les groupes dans le poumon, chez le groupe D4FM2NA dans les reins et chez le groupe D0,8FM2NA dans le foie et le cœur.

Aussi, les résultats montrent que cette activité augmente d'une façon non significative chez le groupe D4M2NA dans le cœur par contre diminue d'une façon non significative chez le groupe D0,4FM2NA dans le foie et le cœur et chez les groupes D0,4FM2NA et D0,8FM2NA dans les reins, cependant, il diminue d'une façon significative chez le groupe D4FM2NA dans le foie .

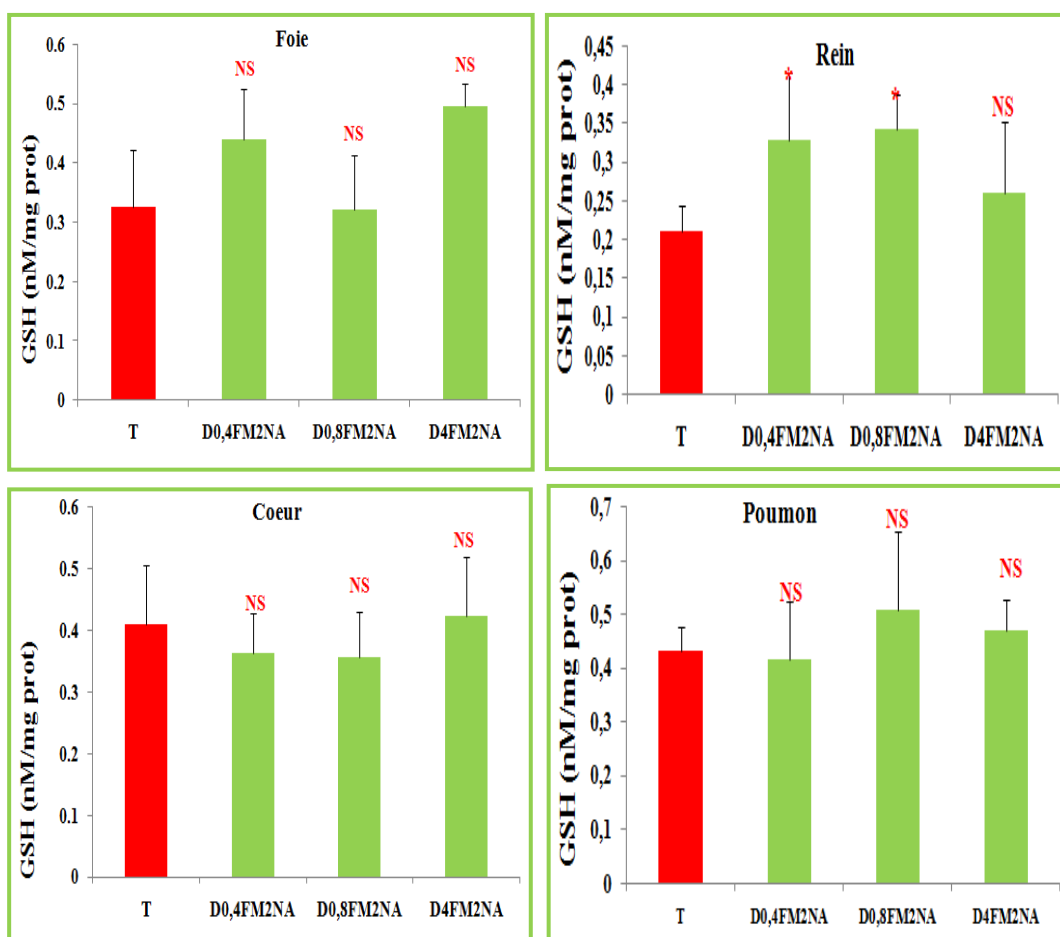


Figure 33: Dose-réponse du FM2NA sur les concentrations hépatique ,rénale, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentées dans la figure (33) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité tissulaire de glutathion réduit (GSH) dans le cœur et le poumon chez tous les groupes, chez les groupes D0,8FM2NA dans le foie, les groupes D4FM2NA dans les reins.

Ainsi les résultats montrent que cette activité augmente d'une façon non significative et significative respectivement chez les groupes D0,4M2NA et D4FM2NA dans le foie, D0,4FM2NA et D0,8FM2NA dans les reins.

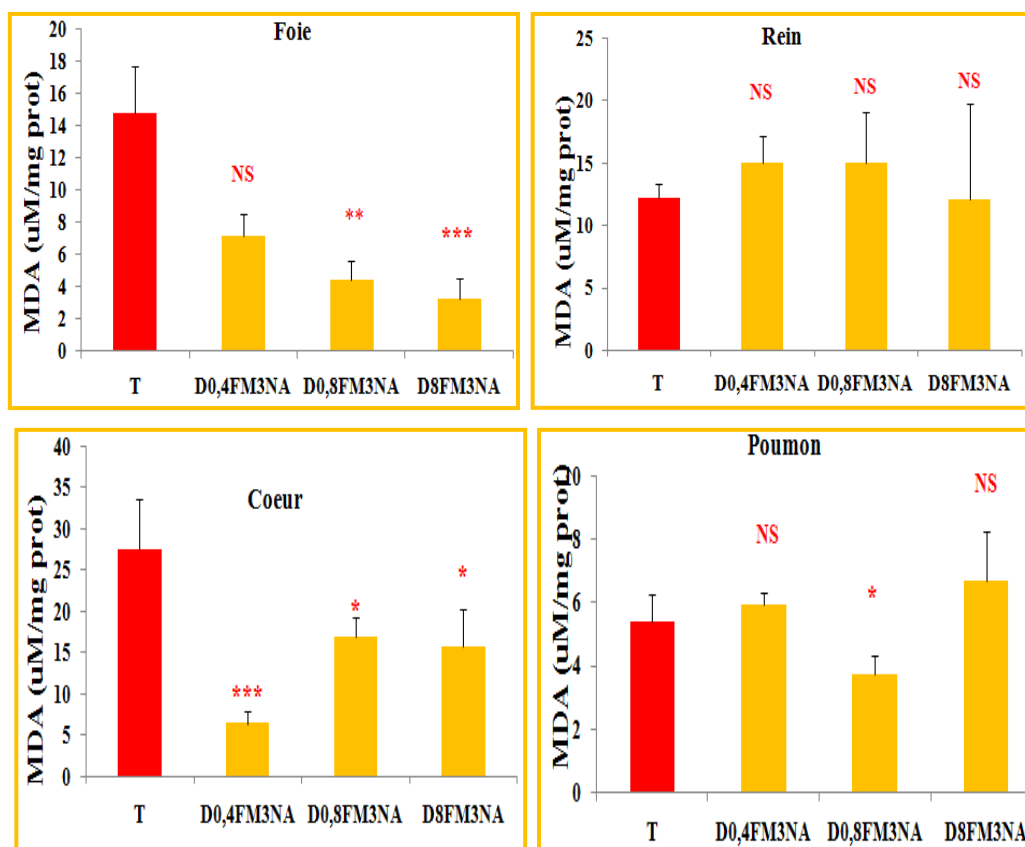
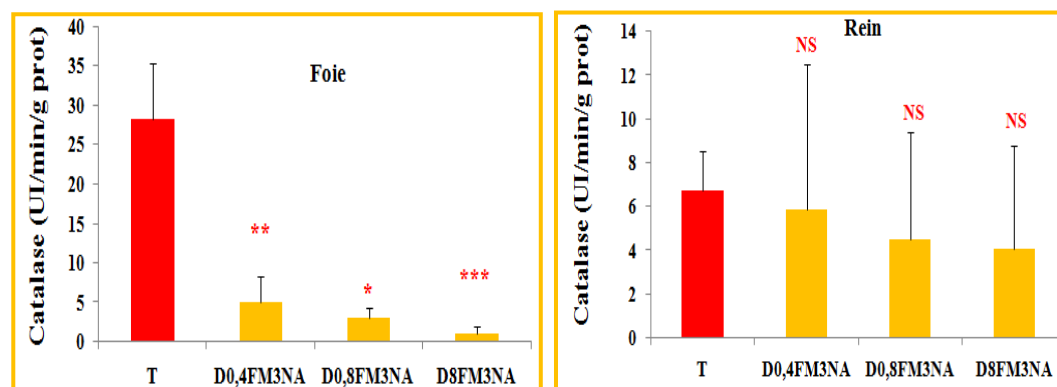


Figure 34: Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (34) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité tissulaire de Malondialdéhyde (MDA) dans les reins chez le groupe D8FM3NA et dans le poumon chez les groupes D0,4M3NA et D8FM3NA.

Aussi les résultats montrent que cette activité diminue d'une façon non significative et hautement significative respectivement chez les groupes D0,4M3NA et D0,8FM3NA dans le foie, significative chez les groupes D0,8FM3NA dans le rein et très hautement significative chez le groupe D8FM3NA dans le foie et D0,4FM3NA dans le cœur; par contre augmente d'une façon non significative dans les reins chez les groupes D0,4FM3NA et D0,8FM3NA et dans le cœur chez les groupes D0,8FM3NA et D8FM3N.



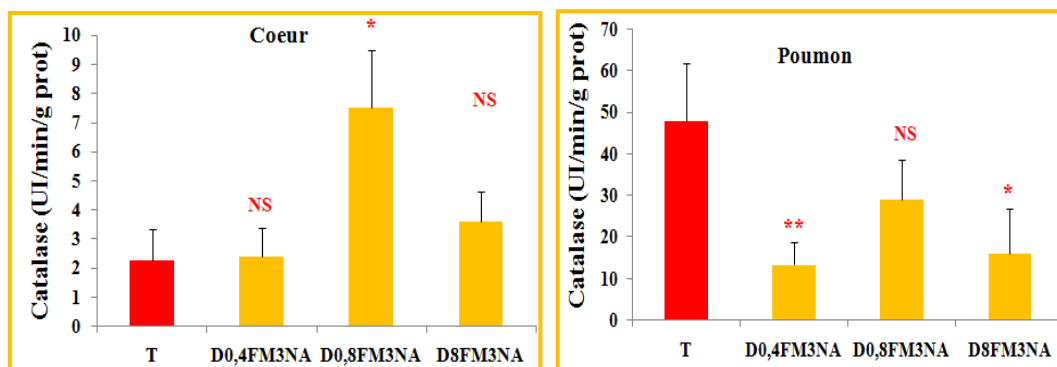


Figure 35: Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans et la figure (35) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité tissulaire de catalase dans le cœur chez les groupes D0,4M3NA et D8FM3NA.

Cependant, les résultats montrent que cette activité diminue progressivement d'une façon non significative chez tous les groupes dans les reins, significative, hautement significative et très hautement significative respectivement chez les groupes D0,4M3NA et D0,8FM3NA et D8FM3N dans le foie, il ya aussi une diminution dans le poumon d'une façon non significative chez le groupe D0,8FM3NA, significative chez le groupe D8FM3N, hautement significative chez le groupe D0,4FM3NA. Par contre, cette activité augmente d'une façon significative dans le cœur chez le groupe D0,8FM3NA.

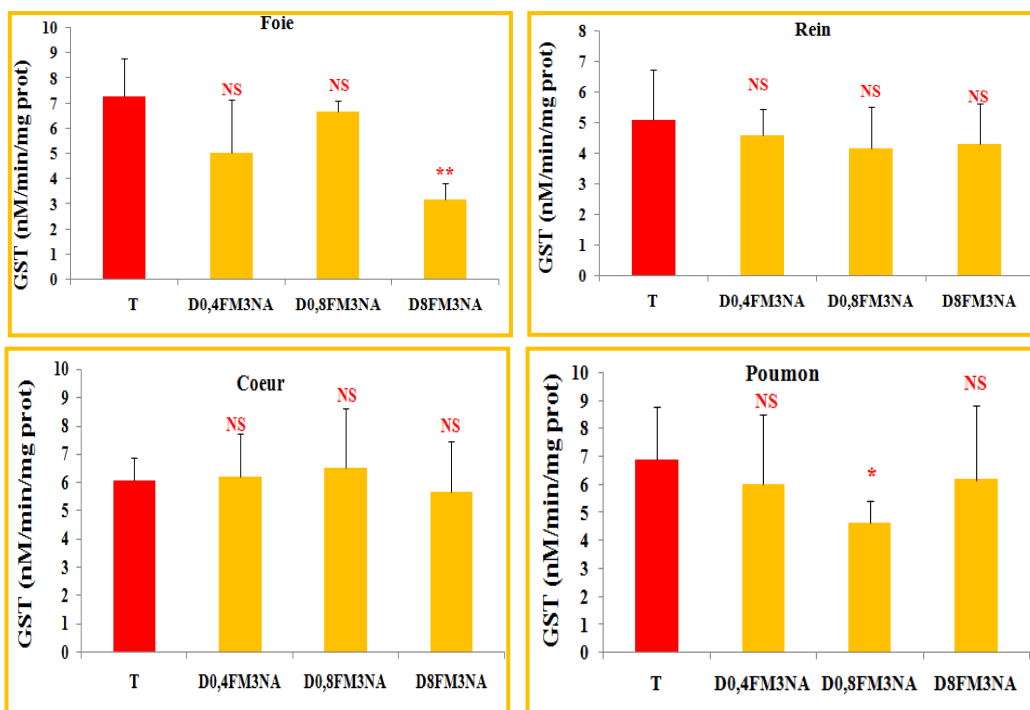


Figure 36: Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (36) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de Glutathion S Transférase (GST) dans le cœur chez tous les groupes et dans le foie chez le groupe D0,8FM3NA.

D'ailleurs, les résultats montrent que cette activité diminue d'une façon non significative chez tous les groupes dans les reins, le groupe D0,4FM3NA dans le foie et chez les groupes D0,4FM3NA et D8FM3NA dans le poumon mais diminue d'une façon significative et hautement significative respectivement chez le groupe D0,8FM3NA dans le poumon et le groupe D0,8FM3NA dans le foie.

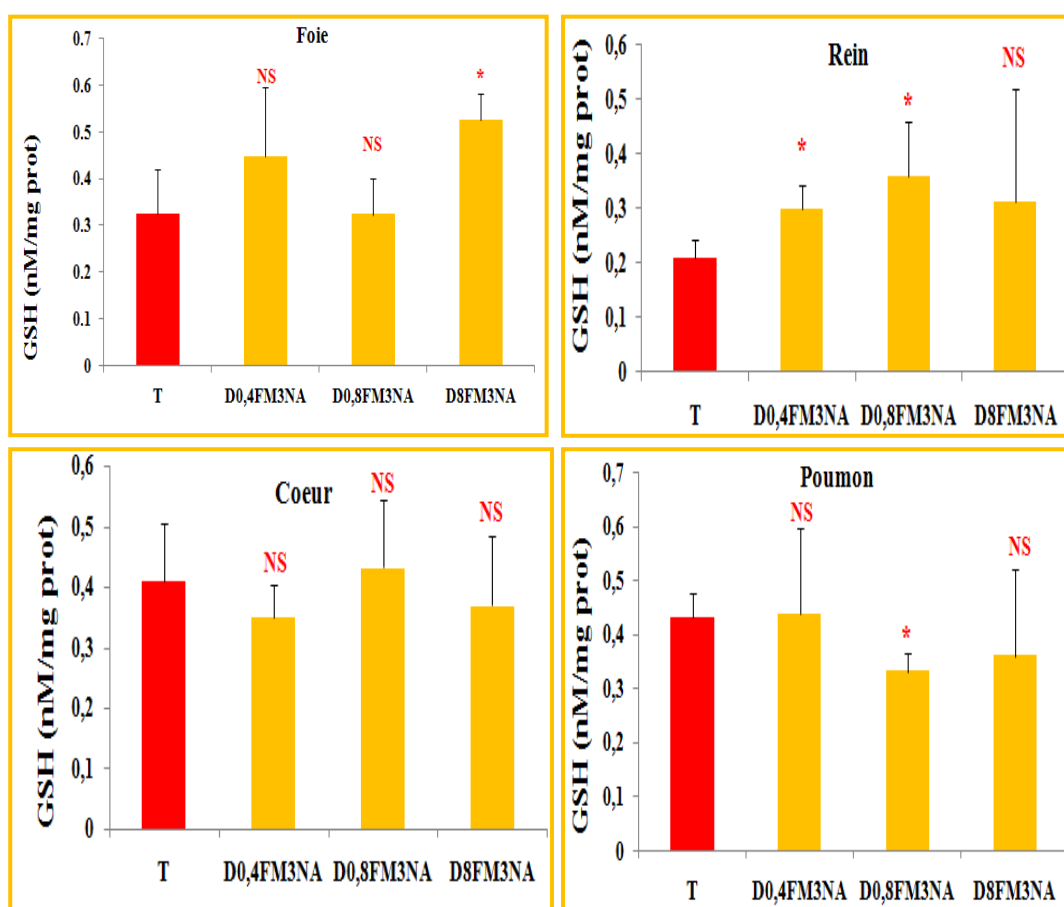


Figure 37: Dose-réponse du FM3NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (37) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de glutathion réduit (GSH) dans le cœur chez tous les groupes, dans le foie chez le groupe D0,8M3NA et dans le poumon chez les groupes D0,4FM3NA et D8FM3NA.

Cependant, cette activité diminue d'une façon significative chez les groupes D0,8FM3NA dans le poumon et augmente d'une façon non significative chez le groupe

D0,4FM3NA dans le foie et chez le groupe D8FM3NA dans les reins et significative chez le groupe D0,4FM3NA et D0,8M3NA dans les reins et chez le groupe D8M3NA dans le foie.

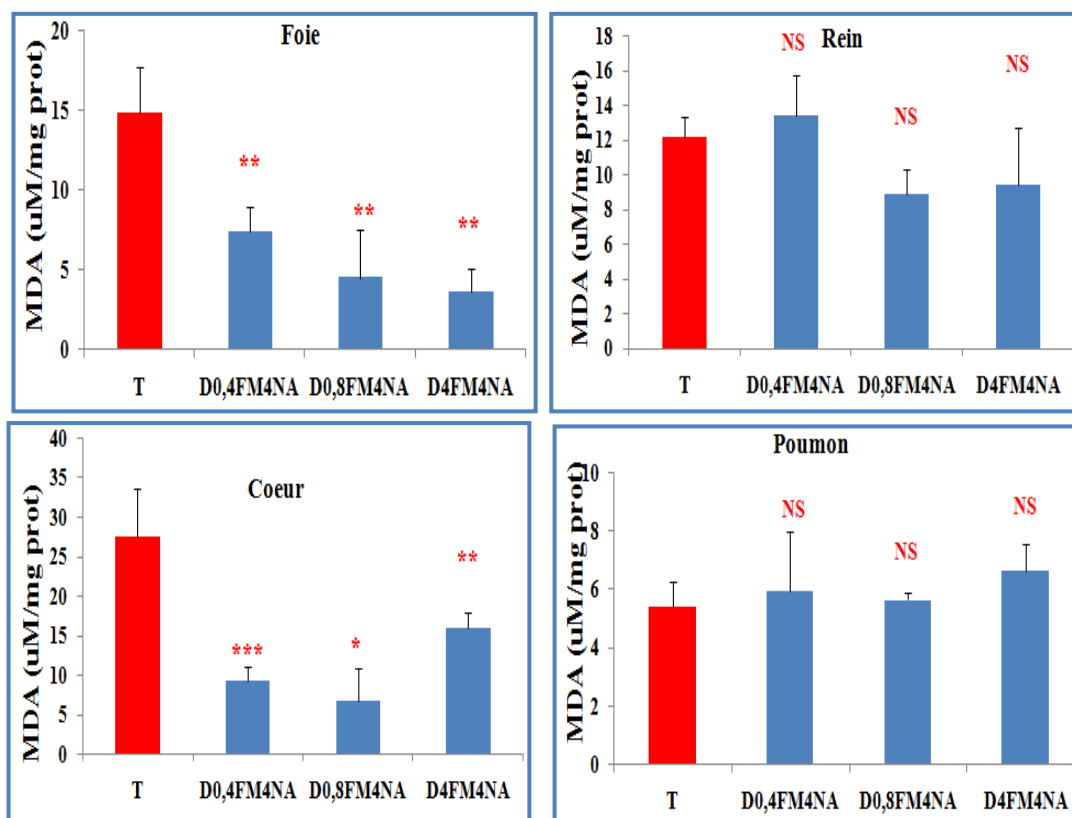
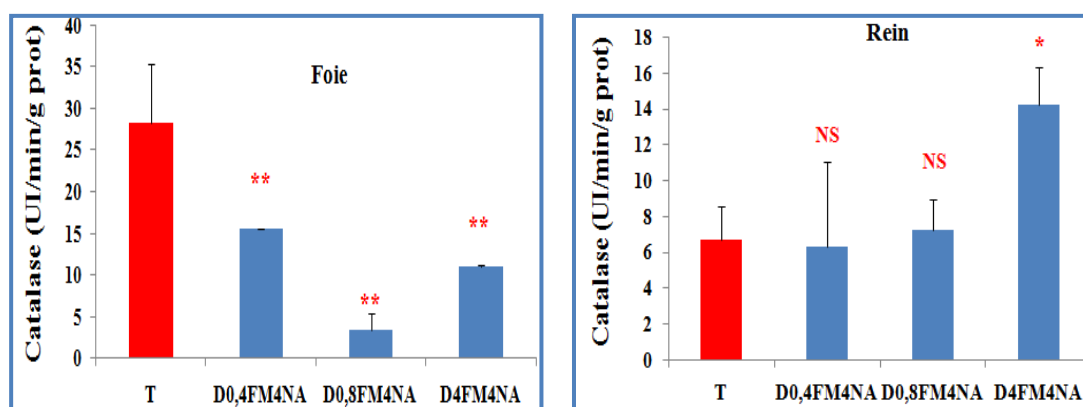


Figure 38: Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique, rénal, cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (38) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité tissulaire de Malondialdéhyde (MDA) dans le poumon chez tous les groupes et chez le groupe D0,4FM4NA dans les reins. Cependant, que cette activité diminue d'une façon non significative chez les groupes D0,8M4NA et D4FM4NA dans les reins, significative dans le cœur chez le groupe D0,8FM4NA, hautement significative dans le foie chez tous les groupes et dans le cœur chez le groupe D4FM4NA et très hautement significative dans le cœur chez le groupe D0,4FM4NA.



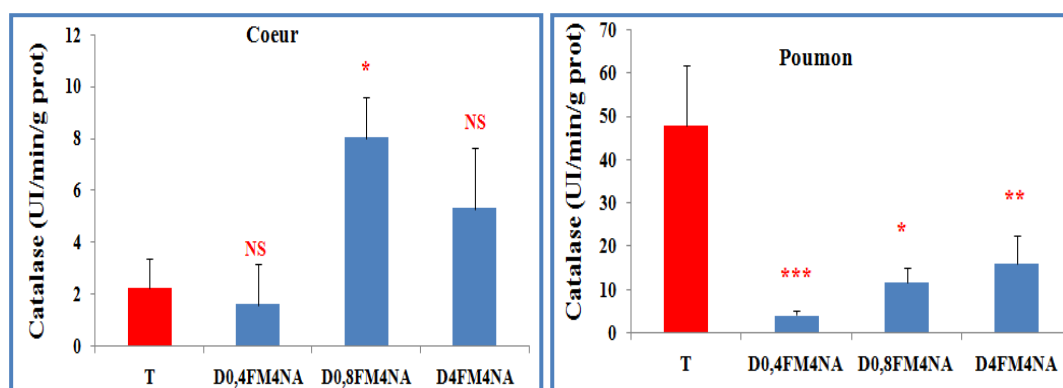


Figure 39: Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de catalase des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentées dans la figure (39) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) de l'activité tissulaire de catalase dans les reins chez les groupes D0,4FM4NA et D0,8M4NA et dans le cœur chez le groupe D0,4FM4NA, cette activité diminue d'une façon significative, hautement significative et très hautement significative respectivement chez les groupes D0,8M4NA , D4FM4NA et D0,4FM4NA dans le poumon, et d'une façon hautement significative chez tous les groupes dans le foie. Par contre, augmente d'une façon non significative chez le groupe D4FM4NA dans le cœur et significative chez le groupe D0,8FM4NA dans le cœur et chez le groupe D4M4NA dans les reins.

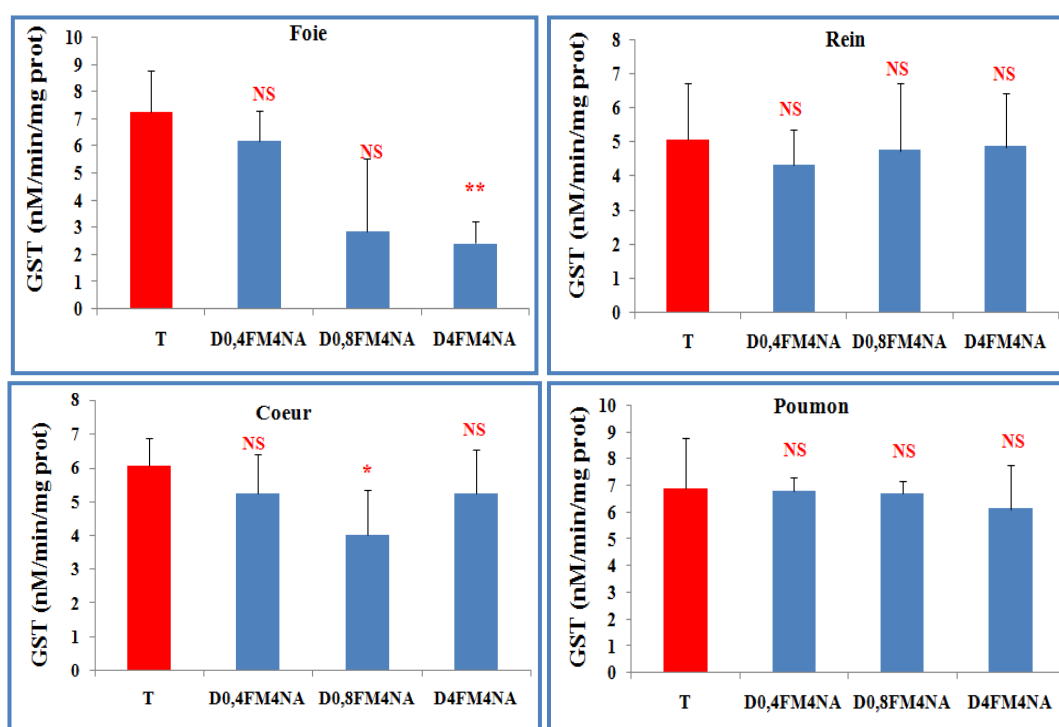


Figure 40: Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique ,rénal, cardiaque et pulmonaire de Glutathion S Transférase (GST) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (40) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de Glutathion S Transférase (GST) dans le poumon chez tous les groupes, celle-ci diminue d'une façon non significative dans le foie, les reins et le cœur chez tous les groupes à l'exception chez le groupe D4FM4NA qui diminue d'une façon hautement significative dans le foie et d'une façon significative dans le cœur chez le groupe D0,8FM4NA.

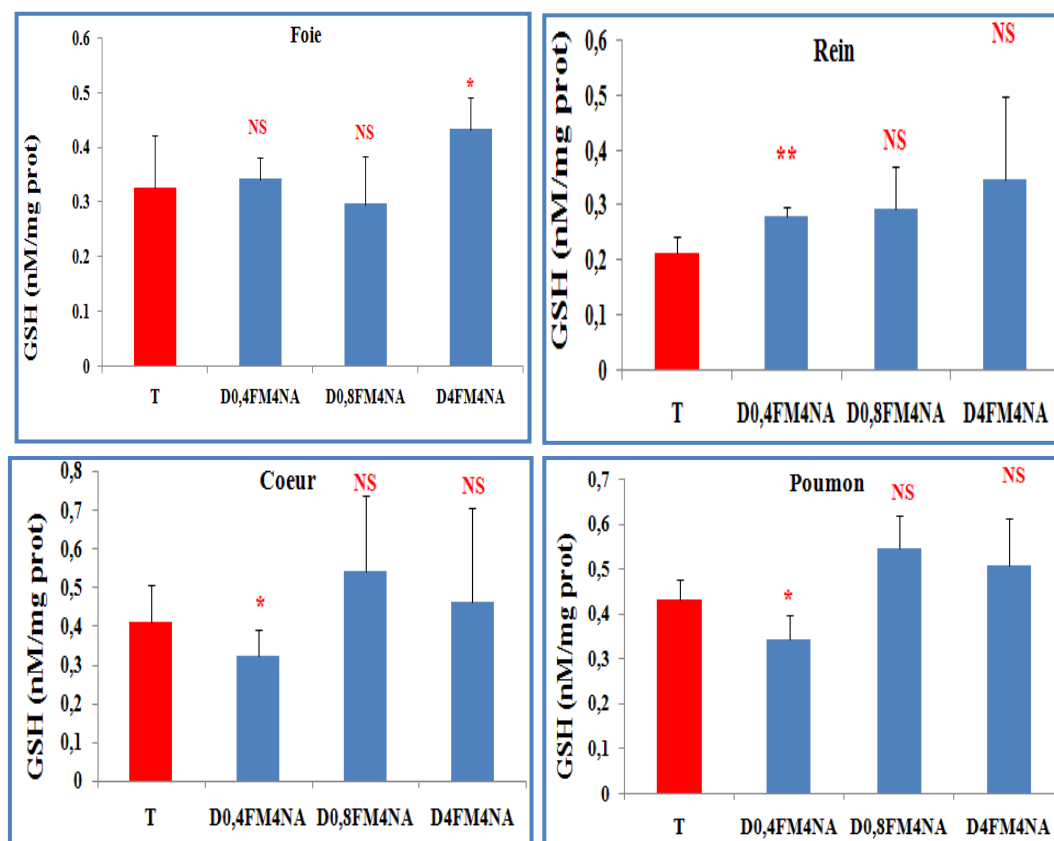


Figure 41: Dose-réponse du FM4NA sur les concentrations hépatique, rénale, cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) des groupes traités comparés avec le groupe témoin.

Les résultats présentés dans la figure (41) ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de glutathion réduit (GSH) chez les groupes D0,4FM4NA et D0,8FM4NA dans le foie, mais il y a une augmentation non significative chez les groupes D0,8FM4NA et D4FM4NA dans le reins et significative chez le groupe D4FM4NA dans le foie, les cœurs et les poumons. Par contre, il y a une diminution significative chez le groupe D0,4FM4NA dans le cœur et le poumon.

E. Étude histologique des organes :

Les organes des rates témoins et traités ont été conservé dans le formol a fin de réaliser une étude histologiques , les résultats obtenues sont présentés dans les figures (42,43,44) ci-dessous

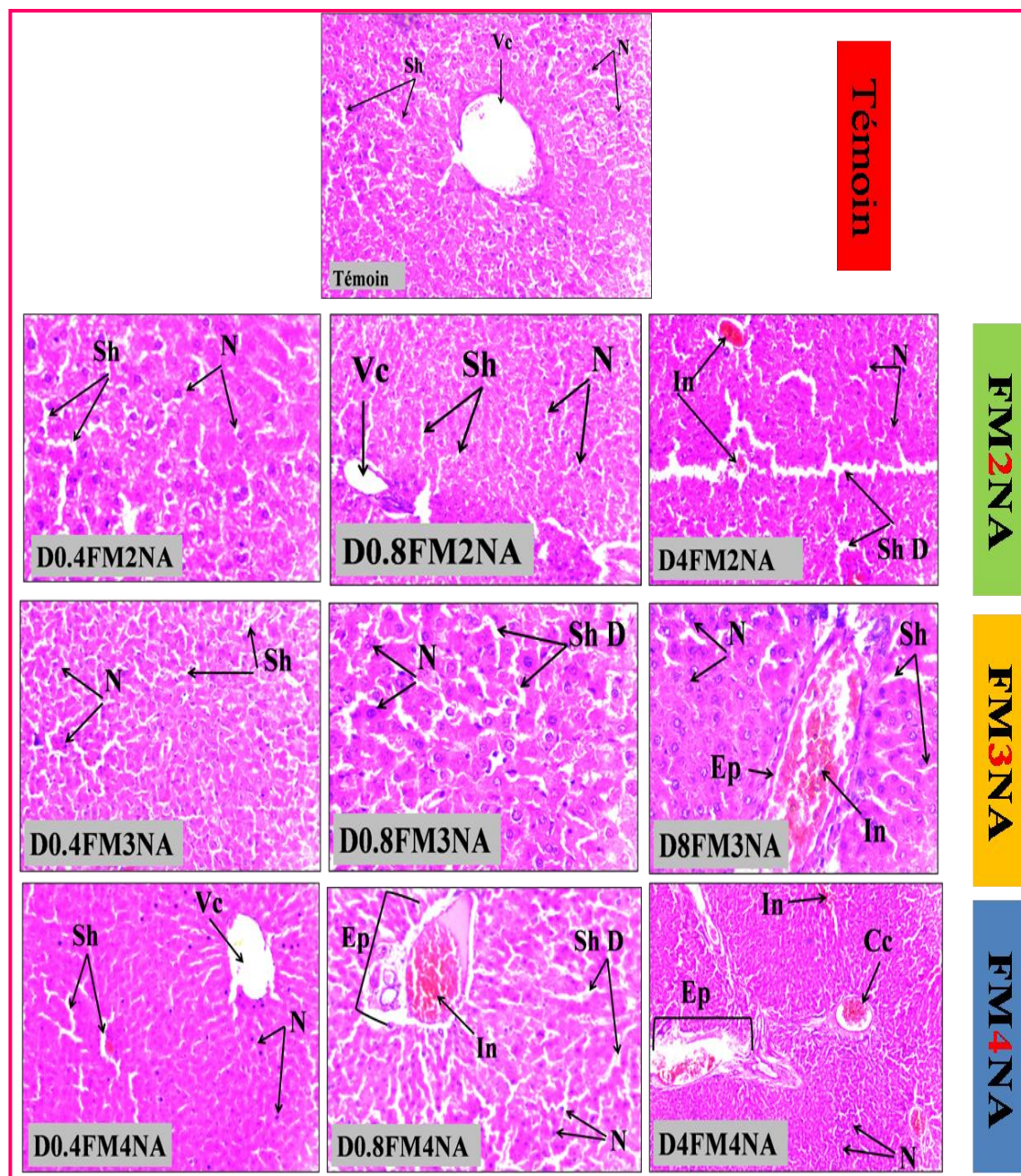


Figure 42 : Observation microscopique d'une coupe histologique des foies des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40, **(photo originale,2018)**. **Vc:** Veines centro-lobulaires. **In :** Inflammation. **Sh :** Sinusoïde hépatique. **Sh D:** Sinusoïde hépatique Dilatée. **Cc :** Congestion centro-lobulaire. **Ep :** espace porte. **N :** noyau

Chez les animaux du lot témoin, la structure hépatique (Figure 42) montre des cellules polyédriques (hépatocytes), avec un noyau rond et un nucléole bien visible. Les hépatocytes forment des travées bien agencées autour de la veine Centro-lobulaire. Ces travées sont séparées par des sinusoides.

Les résultats de l'étude histologique de foie des différents groupes traités par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA) ne montrent aucune différence par rapport au groupe témoin, sauf les groupes traités par les doses élevées des dérivés ferrocéniques FM4NA et D8FM3NA montrent la présence des dilatations des sinusoides, des veines centro-lobulaires dilatées et apparition de congestion centro-lobulaire, inflammations autour des espaces portes et des veines centro-lobulaires.

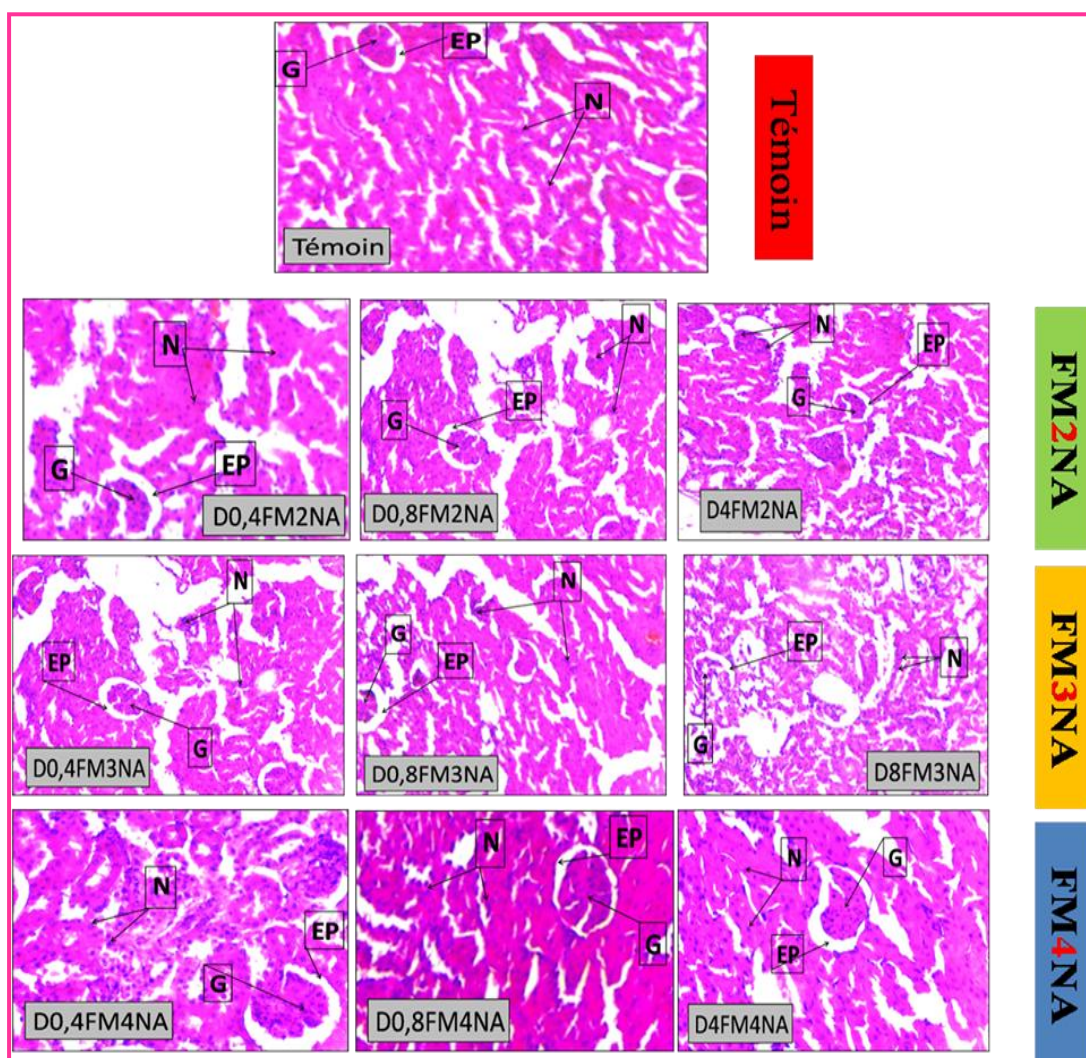


Figure 43 : Observation microscopique d'une coupe histologique des reins des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40, (photo originale, 2018). *G*: glomérule. *N*: noyau. *EP*: espace de Bowman

Chez les rates du lot témoin, la structure rénal (Figure 43) montre le glomérule entourée par l'espace de Bowman.

Les résultats de l'étude histologique des reins des différents groupes traités par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA) ne montrent aucune différence par rapport au groupe témoin

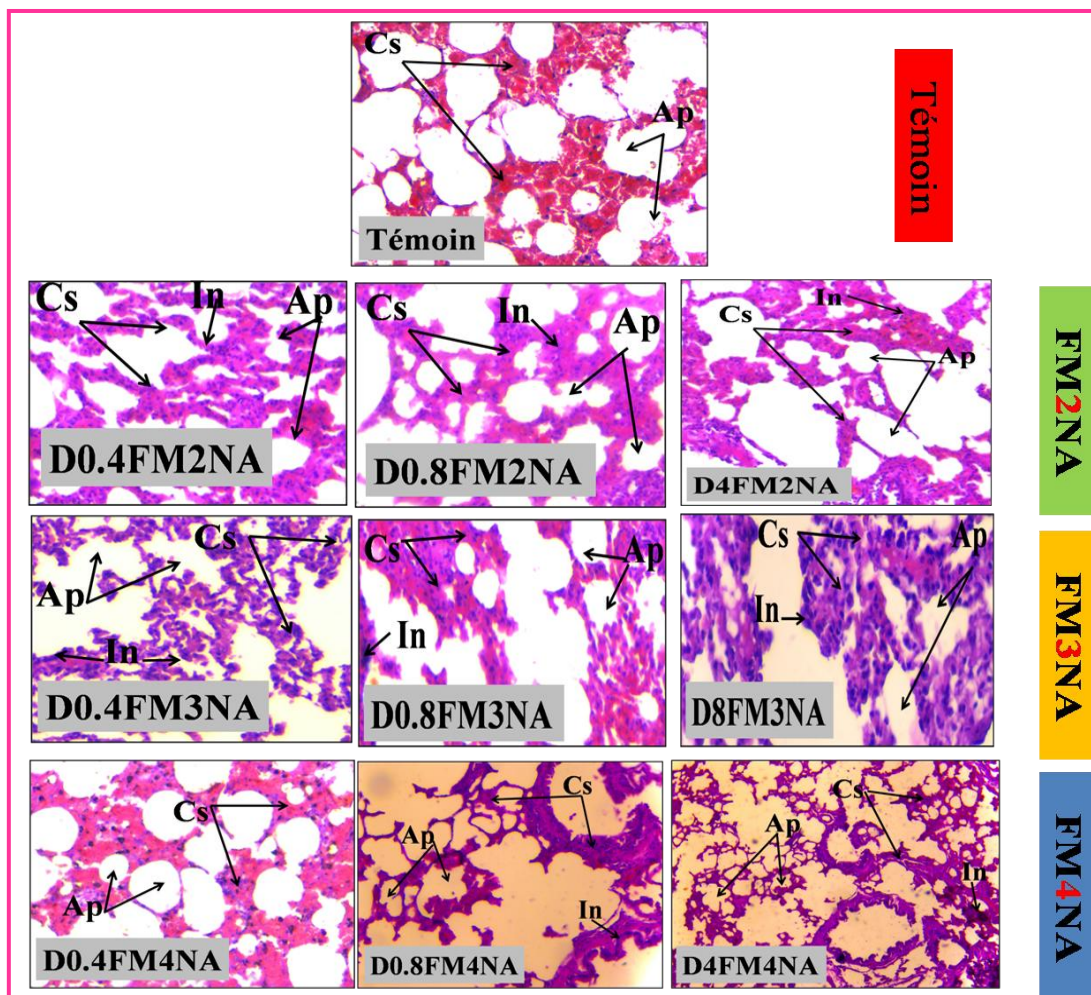


Figure 44 : Observation microscopique d'une coupe histologique des poumons des rates traitées par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA), agrandissement x40 (**photo originale,2018**). **Cs :** capillaires sanguins. **Ap:** alvéoles pulmonaires. **In :** Inflammation.

Chez les animaux du lot témoin, la structure pulmonaire (Figure 44) montre la présence des alvéoles pulmonaires dont la paroi est riche en capillaires sanguins.

Les résultats de l'étude histologique de poumon des différents groupes traités par différentes doses des dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA et FM4NA) ne montrent des différences considérables par rapport au groupe témoin. Just la présence des inflammations .

II.2.2. Discussion

L'interaction entre les trois dérivés ferrocéniques étudiées et l'ADN a été déterminé par différents méthodes d'études (*in vitro*, par la spectroscopie UV-Visible et l'électrochimie et leurs toxicité par approche, *in vivo*).

Pour confirmer l'efficacité biologique de ces dérivés ferrocéniques nous avons étudiés cette interaction théoriquement, *in silico* par amarrage moléculaire.

In silico, l'étude de l'interaction entre les dérivés ferrocéniques et l'ADN révèle que les dérivés ferrocéniques interagissent avec l'ADN d'une façon spontané (**Friedli, 2002**). En effet, les trois dérivés ferrocéniques étudiées se lier à l'ADN en formant des liaisons hydrogènes : 2FMNA-ADN forme deux liaisons hydrogènes avec l'énergie libre ($\Delta G = -22,7392$), 3FMNA-ADN forme une liaison hydrogène avec l'énergie libre le plus négative ($\Delta G = -24,871$) et 4FMNA-ADN forme trois liaisons hydrogènes avec l'énergie libre le plus négative ($-24,871$). Nos résultats sont en accord avec l'étude de **Lanez, (2016)** qui ont montré par docking l'interaction de même dérivés ferrocéniques étudiées avec l'ADN, ainsi l'étude de **Hemmami, (2017)** a confirmé cette interaction *in vitro* par la spectroscopie UV-Visible et l'électrochimie (**tableau 13**). Cependant, l'interaction électrostatique entre les dérivés ferrocéniques étudiées avec les radicaux libres, cette interaction avec l'ADN et les radicaux libres rend les trois dérivés étudiées agissent comme antioxydant ou bien antimutagène.

Nous avons tenté dans le cadre de cette étude, d'évaluer la toxicité des trois dérivés ferrocéniques sur des rates Wistar. Pour une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques, hématologiques, et histologiques en cause, les résultats obtenus sont analysés et discutés en fonction de travaux relatés dans plusieurs monographies.

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition.

Notre étude montre que l'exposition des rates aux trois dérivés ferrocéniques étudiées (FM2NA, FM3NA, FM4NA) a affecté le poids relatif des certaines organes des groupes des rates, en effet, nous n'avons remarqué aucune différence significative dans tous les organes chez le groupe D4FMNA. Par contre, on enregistre une diminution du poids relatif de foie et de poumon chez les groupes D0,4 et D0,8 pour les trois dérivés étudiées et chez le groupe D8FM3NA. En revanche, les travaux de **Simons et al., (1995)** qu'ont signalé que l'augmentation de poids relatifs des organes des animaux est une indicatrice de la toxicité des substances utilisées. Cela peut expliquer que ces dérivés n'ont pas une toxicité apparue.

L'analyse de nos résultats a montré que le traitement des rates par les trois dérivés ferrocéniques de FMNA a provoqué une augmentation de nombre de globules rouges,

d'hémoglobine et d'hématocrite et une diminution de nombre globules blancs chez les groupes traités par les doses D4 et D8 des différents dérivés ferrocéniques et aucune différence chez les groupes D0,4FMNA et D0,8FMNA. En effet, On a révélé un effet protecteur de ces molécules contre l'hémato-toxicité, et indique que ces molécules peuvent protéger contre l'anémie. C'est en accord avec une étude dit «Développé dans l'ancienne USSR pour le traitement de l'anémie ferriprive, un sel de sodium de l'o-carboxybenzoyl ferrocène est bien toléré pour l'administration orale, et a également été prescrit pour les maladies des gencive » (**Görmen, 2010**). D'autre part, *in vivo*, la décomposition spontanée de l'hydroxyferrocène qui échappe à la conjugaison avec le sulfate ou l'acide glucuronique libère du fer qui est utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine (25% du fer absorbé sous forme de ferrocène se retrouvent dans l'hémoglobine) (**Chavain, 2008**).

Aussi il y a une diminution remarquable de nombre de plaquettes chez les groupes traités par les doses D4 et D8 mais aucune différence significative chez les groupes traités par les doses D0,4 et D0,8 des différents dérivés ferrocéniques par rapport au groupe témoin. Selon l'étude de (**Park et al.,2013**), le nombre de plaquettes inversement corrélée avec le fer sérique et la transferrine. Peut expliquer par le fait que le fer peut diminuer mégacaryopoïèse. La mégacaryopoïèse est le système de production et de régulation de la production des plaquettes. Donc la diminution des plaquettes à cause de la diminution de mégacaryopoïèse par l'augmentation de fer. Autre cause qui peut induire la diminution de nombre des plaquettes est via le stress oxydatif, qui peut causer par l'augmentation de fer, selon l'étude de **Manasa et Vani (2016)**, le stress oxydatif est l'une des causes de la diminution de l'efficacité et la durée de vie des plaquettes (**Begat & Korti, 2016**).

Pour les analyses biochimiques, nos résultats montrent une augmentation significative de glucose sérique chez les rats traités par les trois dérivés ferrocéniques. Cette hyperglycémie peut être causée par l'effet de ces dérivés ferrocéniques (**Massanyi et al.,1995**) qui inhibe la production de l'insuline par les îlots de Langerhans (**Dormer et al.,1973**; **Kechrid et al.,2006**) ou il bloque l'utilisation du glucose par les cellules et mène à la présence d'une concentration élevée d'insuline (**Sunderman et al., 1976**) ou en raison de perturbation dans la sécrétion de glucagon et mène à la dégradation élevée du glycogène, offre nouvelle production de glucose à partir d'autres sources non glucidique comme les protéines (**Massanyi et al.,1995**). Ces résultats sont en accord avec les études de **Massanyi et al. (1995)**, **Rana et al. (1996)** chez les lapins et les rats.

D'après nos résultats, les paramètres lipidiques ont été perturbés par les trois dérivés ferrocéniques. En effet, nous avons enregistré l'augmentation des concentrations sériques du

cholestérol chez les groupes traités par les différents doses des trois dérivés ferrocéniques, cet effet peut être expliqué par la réduction de la sécrétion des hormones thyroïdiennes T3 et T4 confirmé par les travaux de **Jahreis (1991) et Simon (2000)**. En effet, certains troubles de métabolisme des lipides sont rapportés à un dysfonctionnement thyroïdien. Tandis que le taux des triglycérides est diminués chez tous les rates par rapport aux témoins, ce qui en contraire avec l'étude de **Cempel et Janicka (2002)** qui a signalé que l'augmentation des concentrations sériques de triglycérides est du à la dégradation des tissus adipeux du corps.

L'analyse des résultats n'a montré aucune différence significative des taux sériques de l'urée et de la créatinine chez les groupes traités par D0,4 et D0,8 et une augmentation chez les rates traités par D4 et D8. Sachant que l'urée et la créatinine sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Finco, 1997**).

De plus, l'augmentation de l'urée dans le sérum est corrélée avec l'augmentation de catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine (**Harper et al., 1979**).

L'augmentation de la concentration sérique de l'acide urique dans notre étude pour les rates traitées par les trois dérivés ferrocéniques surtout chez les groupes traités par D4 et D8 peut expliquer par la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN)(**Liao et Freedman, 1998**). Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre le stress, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (**Becker ., 1993**).

Nos résultats montrent une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (TGP et TGO) pour les groupes traités par trois dérivés ferrocéniques surtout les groupes D4FMNA et D8FMNA. Dans ce cas, on peut suggérer que la forte activité enzymatique de la TGO et de la TGP indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma due à l'altération de la perméabilité membranaire (**Navarro et al., 1993**). Ces résultats sont conformés par les coupes histologiques des foies qui montrent des altérations au niveau des hépatocytes.

L'évolution des concentrations sériques de γ -GT montre, elle aussi, une élévation non significative chez les rates traitées par les trois dérivés ferrocéniques . cette augmentation peut être considérés comme de bons indicateurs de la cytolysé hépatique et de l'atteinte des cellules épithéliales des canaux biliaires (**Djahra, 2014**).

Ainsi, l'analyse des résultats a montré une diminution non significative de la phosphatase alcaline (PAL) dans le sérum du plupart des rates traitées par les trois dérivés ferrocéniques. Ces résultats ne sont pas compatibles avec l'étude de **(Pratt & Kaplan, 2000)** qui indique que le dommage du foie induit une augmentation de l'activité de phosphatase alcaline, on pourra dire alors que ces dérivés n'ont pas une toxicité apparue.

Nos résultats montrent une augmentation progressive de la concentration de fer sérique chez les groupes traités par D0.4, D0.8, D4 et D8. Cette augmentation est probablement due à l'augmentation de l'absorption intestinale de Fe **(Vayenas et al., 1998)**.

En comparant avec le témoin, le taux sérique du calcium montre une diminution chez les rates exposées au D4FMNA et D8FMNA. Cette diminution peut être due à l'inhibition de l'absorption gastro-intestinale du Ca^{+2} **(Kathryn, 1974)**. Par contre, l'étude de toxicité de cadmium montre que l'augmentation de la calcémie chez les rats contaminés au cadmium peut être expliquée par la compétition du cadmium vis-à-vis du calcium sur les récepteurs des macromolécules ainsi que les canaux membranaires du transport calcique et par conséquent il ne permet pas son utilisation cellulaire **(Barbier et al., 2004)**.

Les radicaux libres peuvent endommager l'ADN, les protéines, les polysaccharides et les lipides *in vivo* **(Kadiiska et al., 1995)**. La réaction des radicaux libres avec les lipides de la membrane donnant lieu à des produits de dégradation, y compris le malondialdéhyde (MDA), catalase, glutathion- s-transférase (GST) **(Singh et al., 2010)**.

Nos résultats présentent des perturbations des paramètres de stress oxydatif tissulaire dans les différents organes des rates traitées par les différentes doses des trois dérivés ferrocéniques. En effet, on a remarqué une diminution de la concentration de MDA tissulaire de foie et de cœur, une augmentation non significative dans les reins et aucune différence significative dans le poumon par rapport aux témoins. Ces résultats sont inversés avec l'étude de **Bouameur & Rouabah (2015)**, qui montrent que l'élévation significative du MDA chez l'animal reçu du cisplatine, ce qui explique alors le lien entre l'administration du cisplatine et la lipoperoxydation, et par conséquent les dégâts au niveau des tissus par la formation excessive des radicaux libres.

La réduction de l'activité de la CAT est observée dans le foie et le poumon et aucune différence significative dans les reins et le cœur chez les différents groupes traités par les trois dérivés ferrocéniques à l'exception dans les reins chez le groupe D4FMNA et dans le cœur chez le groupe D0,8FMNA qui montrent une augmentation. En effet, les études antérieures montrent que les antioxydants enzymatiques, à savoir la catalase, jouent un rôle essentiel dans le processus de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces

enzymes convertissent les molécules d'oxygène actif en composés moins toxiques. La catalase est une protéine qui subit une oxydation divalente alternative et une réduction de son site actif, en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Linquette, 1973**). Dans ce contexte, la diminution de l'activité de la catalase pourrait être attribuée à l'inhibition de la biosynthèse de l'hème (**Prasanthi et al., 2009**). Autre étude indique la diminution significative sous l'effet de la toxicité aigue induite par le cisplatine peut expliquer une production intense de H_2O_2 (**Bouameur & Rouabah 2015**).

Nos résultats ne montrent aucune différence significative de la concentration de GSH dans le cœur et le poumon chez la plupart des groupes traités par les trois dérivés ferrocéniques étudiées. Cependant, la concentration tissulaire de GSH augmente dans les reins et le foie. Une fonction majeure de GSH est la détoxication et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Ces composés sont conjugués avec GSH soit spontanément, soit par voie enzymatique dans des réactions catalysées par la GSH-S-transférase (GSTs). On peut expliquer cette augmentation par l'effet de stress oxydatif causée sur l'expression de la synthèse de GSH. Selon l'étude de Shelly et Lu (2009), le stress oxydatif est bien connu pour induire l'expression d'enzymes synthétiques de GSH. Le glutamate cystéine ligase(GCL), un des enzymes clés dans la synthèse de GSH, est composé d'une sous-unité catalytique (GCLC) et une sous-unité modificatrice (GCLM) et ils sont réglementés à des niveaux multiples et parfois différemment. Le stress oxydatif est peut associé à une augmentation des niveaux de GSH cellulaires, de l'activité du GCL, des niveaux de GCLC ARNm et de transcription du gène GCLC (**Yamane et al., 1998**).

Aussi, autre cause, qui peut expliquer la diminution de l'activité de GSTs des reins et de foie, est l'augmentation de la concentration tissulaire de GSH, car le GSTs entre dans le voie enzymatique de conjugaison de GSH.

En effet, le glutathion joue un rôle de donneur d'électrons, c'est le principal antioxydant dans les cellules car il se lie par son pôle (SH) aux métabolites toxiques (**Aouacheri et al., 2005; Bruno, 2006**). La réaction est catalysée par des glutathion S-transférases ; le glutathion conjugué peut être éliminé par voie biliaire ou urinaire (**Boukerche et al., 2006; Vialia, 1998**).

En général, et d'après les résultats de l'activité tissulaire des antioxydants suggèrent que chaque organe a un effet antioxydant spécifique (**Galleano et al., 1994**), ce qui rend la gravité de l'attaque oxydative différente entre les organes, c'est pourquoi on trouve que la variation des antioxydants diffère d'un organe à autre.

Les études histologiques ont été largement utilisées comme biomarqueurs pour les investigations toxicologiques (**Uzun et al., 2009**).

Les résultats des coupes histologiques au niveau des reins et le poumon ne montrent aucune différences par rapport au groupe témoin à l'exception des coupes histologiques de foie qui montrent quelques altérations.

Le foie est le principale organe cible dans les études toxicologiques. Les altérations histologiques observées au niveau des hépatocytes surtout chez les groupes des rates qui traitées par la dérivé ferrocénique FM4NA sont caractérisées par l'apparition des dilatations des sinusoides, les veines centro-lobulaires dilatées et apparition de congestion centro-lobulaire, inflammations autour des espaces portes et des veines centro-lobulaires... L'observation des coupes histologiques que nous avons réalisée révèle que l'effet des dérives ferrocéniques s'est manifestée par des atteintes tissulaires sans équivoque, au niveau du foie. Ces altérations peut-être induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires(**Milton et al., 2011**) . De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (**Thevenod, 2003**) . En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (**Layachi, 2013**). En outre, **Layachi (2013)** dans d'étude de hépato-toxicité par le chlorpyrifos ont démontré que des changements histologiques similaires dans le foie de rates. Par ailleurs, les études toxicologiques *in vivo* sur les dérivés du ferrocène n'ont pas montré des niveaux de toxicité clair, malgré des problèmes hépatiques dans certains lots (**Görmen, 2010**).

En fin, les coupes histologiques ne présentent aucune altérations graves qui indiquent une toxicité, c'est juste des altérations simples qui peuvent être due a une inflammation.

Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

Les résultats obtenus par l'étude in silico montrent qu'il y a une interaction spontanée entre les dérivés (N-(ferrocenylmethyl)-2,3,4 -nitroaniline) et l'ADN qui se lie par intercalation ou par liaison électrostatique traduite par l'ordre de grandeur de la constante de liaison K et l'énergie libre de liaison ΔG . Les trois dérivés ferrocéniques ont formés des liaisons d'hydrogène avec les différentes nucléotides de l'ADN. Ce résultat indique que les trois dérivés étudiés ont présenté des activités biologiques (antioxydante et antimutagène) très importantes.

L'études toxicologique in vivo sur les trois dérivés du ferrocène incluant l'évaluation des analyses biochimiques , hématologiques, histologiques et les paramètres de stress oxydatif tissulaires n'ont pas montré des niveaux de toxicité claire, malgré des problèmes hépatiques dans certains lots.

En perspective, il serait intéressant de développer ce recherche d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de la toxicité des dérivées ferrocéniques de l'organisme. Ces travaux ouvrent certain nombre de perspectives qu'il serait souhaitable de:

- ☞ Étudier des différents niveaux de toxicité aux dérivés (N-(ferrocenylmethyl)-2,3,4 -nitroaniline) et l'identification de dose létale DL50.
- ☞ Prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires pourraient aboutir à l'apparition des pathologies.
- ☞ Aussi, le travail doit s'orienter vers l'étude in vitro sur la toxicité des dérivés ferrocéniques étudiés pour valider nos résultats.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abdelhamid, K. (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 .Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider, Biskra, Algerie.pp1-6.
2. **Acevedo-Morantes, C. Y. Meléndez, E. Singh ,S. P & E Ramírez-Vick, J. (2012).** Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines, *J Cancer Sci Ther*, 4.9.
3. **Al Khalyfeh, K.(2016).**Ferrocene-Based Monomers, Oligomers and Polymers as Electro-Active Materials. Thèse du doctorate, Technischen Universität Chemnitz genehmigte.p143.
4. **Alain, D.(2002)** .Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris.
5. **Baba, A. F.Z., Merzouk, H., Bouanane, S., Benkalfat, N.B., Merzouk, S.A., Mulengi, J.K. & Narce, M.(2010).** Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar, *Annales de Toxicologie Analytique* 2010; 22(3): 115-121.
6. **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.
7. **Barbara, F.(2015).** Ferrocene in agriculture: from agrochemicals and soil remediation to selective chemosensors.[*Chemical and Biological Technologies in Agriculture*](#). doi.org/10.1186/s40538-015-0038-0.
8. **Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P. & Cougnon, M. (2004).** Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *American Journal of Physiology* 287:pp 1067-75.
9. **Barham, & Trinder, (1972).** *Analyst*, 97, 142. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20091.
10. **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.

11. **Bechki, L., Bechki, M. K. & Lanez T., (2013).** Synthèse et propriétés électrochimiques de 1-hydroxyéthylferrocène et de métanitrophénylferrocène. *Afrique SCIENCE* 09(1) (2013) 16 – 22.
12. **Bechki, M. K.(2012).** Etude du comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanol et nitrophenyleferrocenes. Mémoire du Magister, Université Kasdi MerbahOuargla, Algérie, p18-19 .
13. **Becker, B.F. (1993).** Towards the physiological function of uric acid. *Free. Radic. Boil. Med.* 14:pp 615-13.
14. **Beggat, K. & Korti, N.(2016).** Etude de l'effet toxique des nanoparticules de l'oxyde de fer et l'effet antidote du quercétine chez les lapins. Mémoire de master, Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED.
15. **Ben Alaya, M.,(2008).** Synthèse et étude de la biodistribution d'une nouvelle molécule marquée par le technétium-99m. Diplome national d'ingénieur, Université du 7 novembre a carthag,76p.
16. **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.
17. **Bensalah, F. (2014).** Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubium vulgare L. Mémoire de Master, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen,p6 .
18. **Benzidane, CH. (2012).** Effet toxique des résidus des pesticides utilisés sur la flore de la région de Sétif. Mémoire de Magister, Université du Ferhat Abbas Sétif, 87P
19. **Bismuth, C., Baud, F., Fréjaville, P.P. & Garnier, R.(1987).** Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, p 956.
20. **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003).** Radicaux libres et antioxydants. Delattre, J., Durand, G., & Jardillier, J.C. (Eds) (2003). Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. France: Médecine Sciences Publications.
21. **Bouameur, K.(2001).**Détermination des effets électroniques des ferrocenes substitues par des groupemets aminomethyle. Mémoire magister, Universite de Ouargla. p4.

22. **Bouameur, S. & Rouabah, L.(2015).** L'effet neuroprotecteur de la vitamine E dans la toxicité induite par le cisplatine chez les souris. Mémoire master, Université des Frères Mentouri, Constantine.
23. **Boubekri, C., Khelef, A., Terki, B. & Lanez, T. (2015).** Synthesis and electrochemical properties of N-(ferrocenylmethyl) aminobenzonitrile and N-(ferrocenylmethyl) nitroaniline derivatives. VPRS Laboratory, University of Ouargla, B.P.511, 30000, Ouargla, Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* .Vol 49 p 27-34.
24. **Bouchema, A.(2008).** Etude électrochimique des dérivés de la nitropyridine. Memoire de magister, Université Mentouri , Constantine,80p.
25. **Boukebbous K.(2009).**étude de complexes métalliques des ligands soufrés, Azotés et d'autres molécules halogénés . Mémoire de magister, Université mentouri ,constantine.p14.
26. **Boukerche, S., Aouacheri, W. & Saka, S.(2006).** Effect of short-term alphamethrine treatment on hepatic glutathione redox system in rats. *Arab J Pharm Sci* ; 3 : pp 25-30.
27. **Boulouiz, H. (2016).** Etude phytochimique et recherche d'effet hémolytique des extraits isolés des feuilles de Nerium oleander L (laurier rose). Mémoire de Master, Université de Tlemcen, P8.
28. **Boutlelis, A.D.(2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat, Université BADJI MOKHTAR , ANNABA.
29. **Cempel, M. & Janicka, K.(2002).**Distribution of nickel, zinc, and copper in rat Organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol. Trace. Elem. Res.* 90 (1): pp 215–226.
30. **Chavain, N.(2008).** Conception, Synthèse, Analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de la ferroquine. Thèse de doctorat, Université des sciences et technologies de lille.pp9-10-253 .
31. **Chavan, VU., Melinkeri, RR. (2013).** Study of protein carbonyl group, nitric oxide and MDA (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Natl J Community Med.*4(2)(294-9).
32. **Chem, J.(2011).** Organometallic anticancer compound. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*; 54(1): 3–25.

33. **Claiborne, A. (1985).** Catalase activity. Green Wald, R.A. (Ed.) (1985). CRC Hand book of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press.
34. **Comhair, S.A.A. & Erzurum, S.C.(2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 283(2): pp246-255.
35. **Corinne, H.(2008).** Recherche d'inhibiteurs de haute affinite de l'adn polymerase beta par criblage virtuel et rmn, Thèse de doctorat, Université de Toulouse,249p.
36. **Crapo, JD.(1997).** Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 17: pp 393-403.
37. **Cyril, K.(2010).**Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateur sélectroactifs basés sur le couple ferrocène/ferrocenium. Thèse pour l'obtention du titre de docteurès Science, Université de Neuchâtel, France. p12.
38. **Delattre, J., Beaudeux, J.L. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.
39. **Dormer, R.L., Kerbey, A.L., McPherson, M., Manley, S., Ashcroft, S.J.H., Schofield, J.G. & Randle, P.J. (1973).** The effect of nickel on secretory systems: Studies on the release of amylase, insulin and growth hormone. Biochemistry 140:pp 135-140.
40. **Drew, H.R., Wing, R.M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S. & Itakura. (1981).** structure of a b-dnadodecamer: conformation and dynamics, DOI:10.2210/pdb1bna/pdb.
41. **Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82. pp47-95.
42. **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.
43. **Durackova, Z.(2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Gvozdjakova, A. (Ed.) (2008). Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and therapy. USA: Springer.

44. **Edwars, E. I. Epton R. & Marr, G. (1976).** A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenyl-penicillins and-cephalosporins, *journal of organometallic chemistry*, 107: 351-357.
45. **Edwars, E. I. Epton, R. & Marr, G. (1975).** Organometallic derivatives of penicillins and cephalosporins a new class of semi- synthetic antibiotics, *journal of organometallic chemistry*, 85: 23-25.
46. **Farell, E C., Kaplan, A & al.(1984).**Calcium. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; pp1051-1255 et 418.
47. **Finco, D.R. (1997).** Kidney function. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruce, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic press, San Diego, California. pp 462-478.
48. **Friedli, C. (2002).** Chimie générale pour ingénieur, PPUR presses polytechniques, 747p.
49. **Galleano, M., Farre, S.M., Turrens, J.F., & Puntarulo, S. (1994).** Resistance of rat kidney mitochondrial membranes to oxidation induced by acute iron overload. *Toxicology*, 88, 141-149. doi:10.1016/0300-483X(94)90116-3.
50. **Gao, L.M. Hernandez, R. Matta, J. & Melendez, E. (2009).** Synthesis, structure, electrochemistry, and cytotoxic properties of ferrocenyl ester derivatives, *Metal-Based Drugs*, p 10: 8.
51. **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*, 270, 91-96.
52. **Gérard, J. et al.(2004).** *Current Medicinal Chemistry*, 11,2505-2517.
53. **Gilles, G. (2004).** Notions de Toxicologie. Québec : Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec. 67 p.
54. **Görmen, M.(2010).** Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocénophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate. Thèse de doctorat, Université de Pierre et Marie Curie (Paris VI).p244.
55. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62(10), 628-638.
56. **Halliwell, B. (2006).** Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol*, 141(2), 312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073.

57. **Hanzab, N. & Houas, M. (2013).** Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocenyl-2-nitrobenzène mono et bis-substitué., mémoire du master académique, Université Kasdi Marbah, Ouargla, Algérie, 24p.
58. **Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A., Cochrum, K.C., Grodsky, G.M., Martin, D.W., Jr., Tyler, D.D. & Wallin, J.D. (1979).** Review of Physiological Chemistry, 17th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, California, USA Illus Paper, XV p 702.
59. **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.
60. **Henni, M., (2017).** Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl) aminobenzonitrile . Thèse du doctorat, Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED, Algérie. p4.
61. **Holmberg, B., Högberg, J. & Johanson, G. (2000).** La Toxicologie. Définitions et Concepts. In Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail. Organisation Internationale du Travail, Genève.
62. **Jahreis, H.(1991).** Nitrate induced hypothyroidism is associated with a reduced concentration of growth hormone releasing factor in hypothalamic tissue of rat. *Exp Clin Endocrinol* 1991 ; 9 : pp 109-12.
63. **Jannie, C., Swarts, Theunis, G., Vosloo., Sarina, J.C.; (INA) Du Plessis., W.C. Constance, E.J., Van, R., Elke, K. , Johan, E. & Van, L. (2008).** Cytotoxicity of a Series of Ferrocene-containing-Diketones. *Anticancer research*, 28, 2781-2784.
64. **Jerina, D.M. & Daly, J.W. (1974).** Science. 185, 573-582.
65. **Kadiiska, M.B., Burkitt, M.J., Xiang, Q.H. & Mason, R.P. (1995).** Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest*, 96, 1653-1657. doi: 10.1172/JCI118205.
66. **Kathryn, R. (1974).** Nutritional factors and susceptibility to lead toxicity. Environmental health perspectives. *EnvironHealth Perspect*, 7: pp107-112. [pmc/articles/PMC1475135/pdf/envhper00497-0105.pdf](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1475135/pdf/envhper00497-0105.pdf).
67. **Kealy, T. J., Pauson, P. L., (1951).** A New Type of Organo-Iron Compound, dans *Nature*, vol. 168, 1951, p. 1039.

68. **Köpf-Meyer, P., Köpf, H. & Neuse, W. (1984).** Ferricenium complexes: a new type of water soluble antitumor agent. *J Cancer Res Clin Oncol*, 108: 336–340.
69. **Kopp, C.(2010).** Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électro actifs basés sur le couple « ferrocène-ferrocénium ». Thèse de doctorat, Université de Neuchatel, Faculté des sciences.
70. **Lanez, H.(2016).** Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de Master, Université Mohamed Khider, Biskra. p31.
71. **Lanez, T. & Lanez, H. (2016).** Guide d'utilisation AutoTools 4.2.6 Amarrage AND-Dérivé ferrocénique. Université d'El Oued , Faculté des sciences exactes, Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes.
72. **Laroche, L.H.(2001).** Toxicologie générale : 25.
73. **Layachi, N.(2013).** L'effet combiné des vitamines c (acide ascorbique) et e (α -tocophérol) sur la toxicité du cadmium chez les rats wistar. Thèse de doctorat , Université BAJI MOKHTAR , ANNABA.
74. **Liao, V.H. & Freedman, J.H. (1998).** Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J. Biol. Chem.* 273:31962-31970.
75. **Liquette, M.(1973).** *Précis d'endocrinologie*. Paris : Masson.
76. **Lu, F.C. (1992).** Toxicologie : Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation à du risque. Paris : Masson. 360 p
77. **Mac Key, E.M., Rackeyll, J. (1927).** Clin. Invest, J. Clin. Invest., 4, 295. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20141.
78. **Mahmoudi, N. & Nems, A.(2009).** Etude du comportement anodique de Nphényl-N-benzoylferrocénylméthylamine. Mémoire de licence académique. Centre Universitaire d'EL-OUED, Algérie. p48.
79. **Manasa, K., & Vani. R. (2016).** Influence of oxidative stress on stored platelets. *Advances in Hematology*, 2016, 1-6. doi. 10.1155/2016/4091461.
80. **Marie, H.,(2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, l'obtention du grade de maître ès sciences, université laval, p9
81. **Martínez-Cayuela, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77, 147-161. doi:10.1016/0300-9084(96)88119-3.
82. **Massanyi, P., Toman, R., Valent, M. & Cupka, P.(1995) .** Evaluation of selected parameters of a metabolic profile and levels of cadmium in reproductive

- organs of rabbits after an experimental administration. *Acta Physiologica et Hung* 83: pp 267–273.
83. **Milton, Prabua, S., Shagirthab, K. & Renugadevia, J. (2011).** Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 1: 1–7.
84. **Monserat, J-P. (2011).** Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocéniques des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Thèse de doctorat en Chimie Bioorganométallique ,université Pierre et Marie Curie (Paris VI).
85. **Moulay, Y.(2012).** Investigation Phytochimique de l'Acacia arabica Aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. Mémoire de magister, Université kasdi merbah, Ouargla, p18.
86. **Murray, R.L.(1984a).** Creatinine In: *Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation*, Kaplan, L.A. and A.J. Pesce (Eds.). CV Mosby Co., St. Louis, pp: 1247-1253.
87. **Murray, R.L.(1984b)** .Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. *Clin chem the C.V. Mosby Co. St louis. toronto. Princeton*:1112-116. Cité par fiche technique SPINREACT, Réf:1001160.
88. **Murray, R.L.(1984c).**Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. *Clin chem the C.V. Mosby Co. St louis. Toronto. Princeton*:1088-1090. Cité par fiche technique SPINREACT, Réf: 1001170.
89. **Navarro, C.M., Montilla, P.M. Martin, A., Jimenez , J . & Utrilla, P.M. (1993).** Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of rosmarinus. *Plant. Med.* 59: pp 312-314.
90. **Navneet, C., Pawan, K., Chetan, S., Kamal, R., Aneja, Pawan, K. & Sharma.(2012).** Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Thiazolylyhydra-zinomethylideneferrocenes as Antimicrobial Agents . *Letters in Drug Design & Discovery* .Department of Chemistry, Kurukshetra University, Kurukshetra-136 119, India. Vol. 9, No. 1
91. **Neghmouche, N S. Khelef, A. & Lanez, T. (2009).**Electrochemistry characterization of ferrocene/ferricenium redox couple at glassy carbon electrode. *J Fundam Appl Sci.* 2009,1(2), p23-30.

92. **Neghmouche, N. S . & Lanez T.(2013).** Electrochemical properties of ferrocene in aqueous and organic mediums at glassy carbon electrode. *Recent Trends in Physical Chemistry :An International Journal*. ISSN: 2249-0353 p1-3.
93. **Neghmouche, Ns., Khelef, A. & Lanez T.(2010).** Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques. VTRS laboratory, Institute of sciences and technology, Université Centre d'El-Oued, B.P.789, 39000, El-Oued, Algeria. vol 1, p76
94. **Nielsen, P. & Heinrich, HC.(1993).** *Biochem. Phamacol.* ,45,385-391.
95. **Ocde.(2008).** Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In : Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris : OCDE. pp1-14.
96. **Oliver, J. A. (1986).** Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In *Chemicals Testing and Animal Welfare* (The National Chemicals Inspectorate). Sweden : Solna. pp119-142.
97. **Park, M.J., Park, P.W., Seo, Y.H., Kim, K.H., Park, S.H., Jeong, J.H., & Ahn, J.Y. (2013).** The relationship between iron parameters and platelet parameters in women with iron deficiency anemia and thrombocytosis. *Platelets*, 24, 348-351. doi: 10.3109/09537104.2012.699641.
98. **Powers, SK. & Lennon, SL.(1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58. pp1025-1033.
99. **Prasanthi, J., Huls, A., Thomasson, S., Thomspon, A., Schommer, E. & Ghribi, O.(2009).** Differential effects of 24- hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β -amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener* ; 4,1.
100. **Pratt, D.S. & Kaplan, M.M. (2000).** Evaluation of abnormal liver-enzyme results in a symptomatic patients. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1266-1271. doi: 10.1136/pmj.79.932.307.
101. **Rabovsky, A., Cuomo, J. & Eich, N. (2006).** Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clin Chim Acta*, 371, 55-60. doi:10.1016/j.cca.2006.02.020.
102. **Rahim, O., Khelef, A., Terki, B., Sadok, M.M. & Lanez T.(2012).**N-Ferrocenylmethyl-2-nitroaniline. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*.E68, m1318 DOI: 10.1107/S1600536812039177.

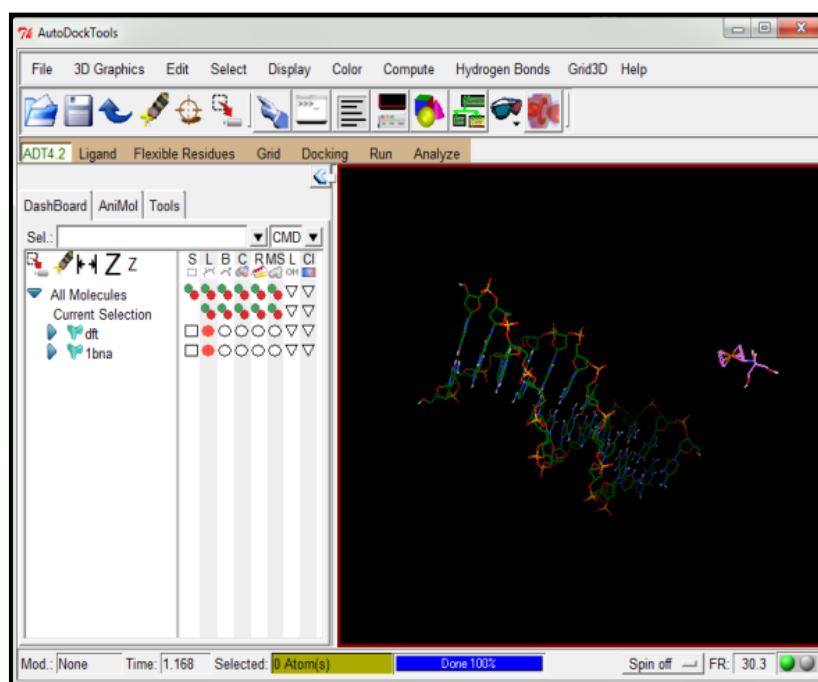
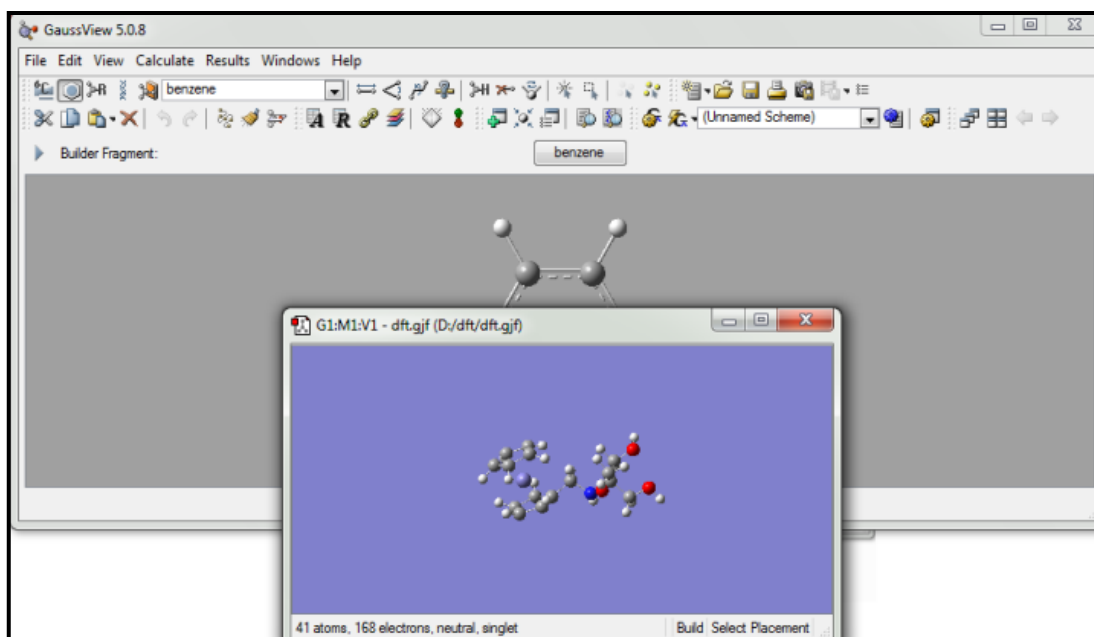
- 103. Rana, S.V., Rekha, S. & Seema, V.(1996).** Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. *Indian Journal of Experimental Biology* 34: pp 177–179.
- 104. Renuka, B., Rajurkar, Z. & Govind, T. (2003).** Studies on levels of glutathione S transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science*, 85 (9), pp1355-1360.
- 105. Ron, D.(2001).** Fifty years of ferrocene chemistry. *Chemical and Engineering News*.vol 79. n° 49. p 37–38 . DOI: 10.1021/cen-v079n049.p037.
- 106.Roxana, B., Dorin, B., Steliana, C & Ion, B (2006).**Additif antidetonant a base de fer pour l'essence auto . *Scientific study & research* _ vol. vii (2) no. 39 _ 2006 _ issn 1582-540x.
- 107. Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P. & Cillard, J. (2000).** Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49: pp689-695.
- 108. Shelly, C. & Lu, M.D. (2009).** Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(2), 42-59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005.
- 109. Shubik, P. & Sicé, J.(1956).** Chemical carcinogenesis as a chronic toxicity test. *Cancer Res.* pp16-728.
- 110. Siden, T. et al.(1997).** *Journal of Organometallic Chemistry*, , 541, 355-361.
- 111. Simon, C.(2000).** Juvenile goiter in a goat herd in northwest Germany. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2000 ; 142 : pp 750-69.
- 112. Simons, J.E., Yang, R.S.H & Berman, E.(1995).** Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organic metals: advantages and disadvantages of the use of real-world complex mixtures. *Environ. Health. perspect.* 103: pp 67-71.
- 113. Singh, N., Jenkinsa, G.J.S., Asadib, R., & Doaka, S.H. (2010).** Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1, 1-15. doi: 10.3402/nano.v1i0.5358.
- 114. Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-662. doi:10.1016/j.crv.2004.05.007.
- 115. Sunderman, J.r., Kasprzak, K.S., Horak, E., Giltz, P. & Onkelinx, C. (1976).** Effect of triethylenetetramine upon the metabolism and toxicity of $^{63}\text{NiCl}_2$ in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 38:pp 177-188.
- 116. Tabbi, G., Cassino, C., Cavigliolio, G., Colangelo, D., Ghiglia, A., Vivano, I. & Osella D.(2002).** Water stability and cytotoxic activity relationship of a series

- of ferrocenium derivatives. ESR insights on the radical production during the degradation process. *J Med Chem*, 45: 5786-5796.
- 117. Teniou, S.(2012).**Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire de magistère, Université Mentouri, Constantine. pp43-45.
- 118. Terki, B.(2007).**Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl-N'alkylferrocenyl méthyle hydrazide. Thèse de doctorat, Université de HADJ LAKHDAR, Batna. p4-5.
- 119. Thevenod, F. (2003).**Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium.*Nephron. Physiol.* 93: pp 87-93.
- 120. Tian, H.,Tang, R.,Li, S. & Luo, Y.(2013).** Synthesis, characterization and electrochemical recognition of metal ions of three new ferrocenyl derivatives containing pyridyl moiety. School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China. DOI:10.1007/s11771-013-1862-7.
- 121. Tron, I., Piquet, O., Baert, A. & Mouton, C. (2002).** Toxon Manuel de Toxicologie. Guide technique. ADEME: Angers. 128p.
- 122.Uzun, F.G., Kalender, S., Durak, D., Demir, F. & Kalender, Y., (2009).** Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E.*Food Chem. Toxicol.* 47, 1903–1908.
- 123. Vayenas, D.V., Repanti, M., Vassilopoulos, A., & Papanastasiou, D.A. (1998).** Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain. *Int J Clin Lab Res*, 28(3), pp 183-186.
- 124. Vertuani, S., Angusti, A. & Manfredini, S. (2004).** The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*, 10, 1677-1694.
- 125.Viau, C. & Tardif, R.(2003).** Toxicologie. In : Environnement et santé publique –fondements et pratiques. Paris. pp119-143.
- 126.Weckbercker, G., & Cory, J.G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters.*, 40(3), 257-264.
- 127. 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 an

- inhibitor of Alzheimer's A β -fibril formation in vitro, *inorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 5818–5821.
- 128. Wilkinson G.(1975).**The iron sandwich a recollection of the first four months. *Journal of Organometallic Chemistry*. 100 (1975) 273-278.
- 129. Williams et al.(1977).**Clin. Chem., 23, 237. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20061.
- 130. Woodward, R. B., Rosenblum, M., & Whiting, M. C.(1952).** *A new aromatic system, journal of the American chemical society*, Vol 74(13),p3458–3459.DOI: 10.1021/ja01133a543.
- 131. Yamane, Y., Furuichi, M., Song, R., Van, N.T., Mulcahy, R.T., Ishikawa, T., & Kuo, M.T. (1998).** Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and γ - glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem*, 273, 31075- 31085.
- 132. Yong-hua, G. (2007).** Etudes de synthèse électrochimiques et de fluorescence de nouveaux dérivés de la 1,2,4,5-tétrazines en tant que sondes moléculaires pour des anions et des composés riches en électrons et étude de synthèses électrochimiques de sels de ferrocène à base de pyridinium. Thèse du doctorat, Ecole normale supérieure de Cachan- ENS, Cachan .p183.
- 133. Zelko, I.N., Mariani, T.J. & Folz R.J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol. Med.* 33(3): pp337-345.
- 134. Zerargui, F.(2015).** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1,p52.
- 135. Zerari, A (2013).** Synthèse, Séparation et Identification de m-nitrophenylferrocene mono et bis-substituée. Mémoire master, Université KASDI MARBAH, Ouargla.p3-4.
- 136. Zhihua, J., Elias, S., Ying, M., Linda, J., Jinming, S., Siqi, Z., Shujun, L., Ruiying, W., Tianzhu, Z., Ganglin, Y., Junqiu, L., Jiacong, S., & Guimin, L. (2004).** Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 321(1). pp94-101.

Annexes

Annexes 01

**Figure 1 :** Logiciel AutodockTools.**Figure 2 :** Logiciel Gaussian 09.

Annexes 02



Figure 3: Rates au cours de l'expérience (Photo originale, 2018).



Figure 4: Cages des rates (Photo originale, 2018).



Figure 5 : Les trois dérivés ferrocéniques sous forme poudre (Photo originale, 2018).

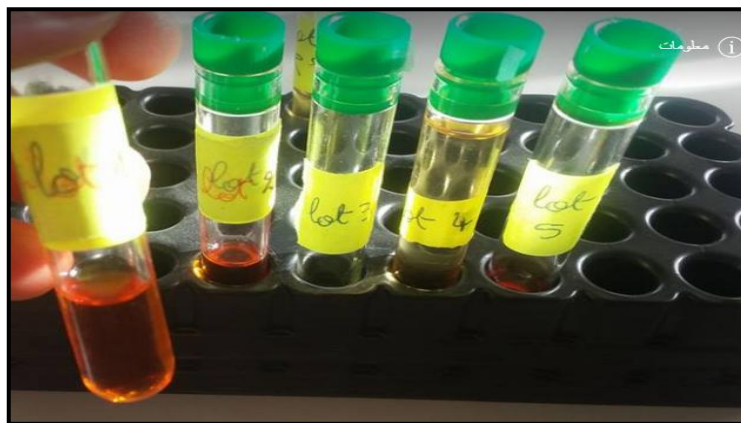


Figure 6 : Les trois dérivés ferrocéniques solubilisé dans une huile végétale (l'huile de tournesol) (Photo originale ,2018).

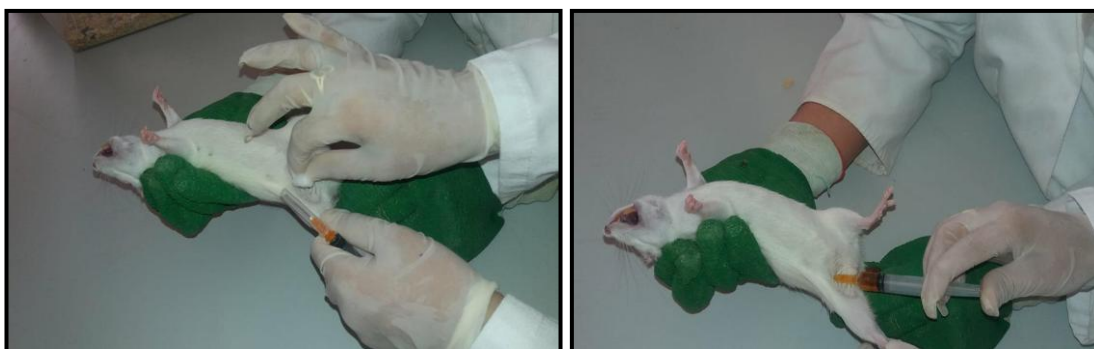


Figure 7: Injection intra-péritonéal (Photo originale, 2018).



Figure 8: Sacrifice, dissection et prélèvement de sang et des organes (photo originale, 2018).

Annexes 03

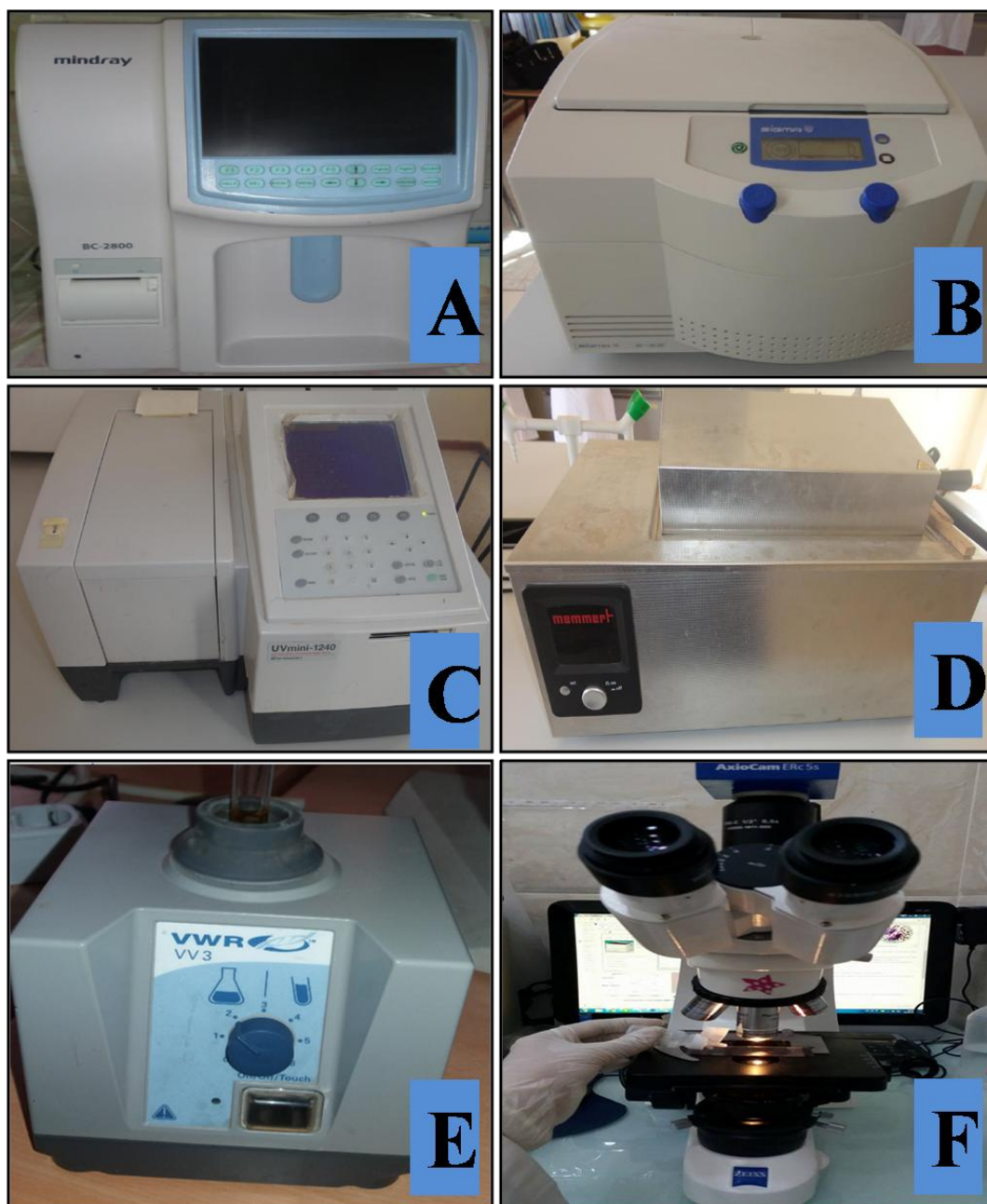


Figure 9: Les appareils utilisés au cours de l'expérimentation (photos originales, 2018).

A: Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800. B: Centrifugeuse horizontale de type SIGMA. C: Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240.

D : Bain-marie de type MEMMERT. E: Vortex. F: Microscope optique avec appareil photo (camera).