



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne
Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique



جامعة الشهيد حمزة لخطير 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

Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN

Présenté Par :

M^{me} Adaika Aicha

Soutenu le :

29/05/2016

Devant le jury composé de :

Président	:	M ^r . Kiram A.	M.A.A, Université d'El Oued.
Examineur	:	M ^r . Allali A.	M.A.A, Université d'El Oued.
Promoteur	:	M ^r . Lanez T.	Professeur, Université d'El Oued
Invité	:	M ^r . Saadani A.Z.	Médecin Oncologue, H. Ben Omor Djilani.

Dédicaces

Je dédié ce travail

A mes chers parents : Smail et Yasmina

A ma grand-mère : Zohra

A Mon mari : Ahmed

A mon cher fils Abdelmoez

A Mes frères et sœurs

A toute ma famille et ma belle famille

A tous ceux qui me sont chers...

Remerciements

*Je remercie en premier lieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse, il a été et sera toujours à côté de moi pour réussir à terminer n'importe quel travail.*

L'achèvement de ce travail laborieux n'aurait pu se faire sans la présence et la collaboration de plusieurs personnes. Chacune d'elles ayant été pour moi d'une grande importance tout le long de ce périple. Je tiens aujourd'hui à remercier tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

*Toute cette aventure n'aurait pas eu lieu si mon promoteur, le **Professeur LANEZ Touhami** directeur de laboratoire de recherche **VTRS** à l'université d'El oued, ne m'avait pas offert une place dans son laboratoire. Merci professeur d'avoir vu mon potentiel pour les études supérieures, mais également merci pour votre confiance et vos encouragements qui m'ont permis d'avancer durant mon master. En fin je vous remercie de m'avoir proposé un sujet si intéressant et si enrichissant.*

*Dans le laboratoire, j'ai bénéficié de plusieurs techniques déjà établies et maintes fois testées par les gens qui ont été présents avant moi. J'aimerais les remercier ainsi que tous ceux qui ont croisé mon chemin durant ces deux années, entre autres: **Dr.Hemmami hadia, Dr.Hénni meriem, Dr.Djaouadi assia, M^r Lanez hafnaoui et M^r Tliba ali***

Je désire remercier tout particulièrement:

*J'ai eu l'honneur de soumettre cette thèse au jugement d'une assemblée remarquable. Je remercie Monsieur **KIRAM Abderrazak**, Maitre assistant A au département de Biologie cellulaire et moléculaire d'avoir présidé ce Jury, Monsieur **ALLALI Ahmed**, maitre assistant A, fait un examinateur et je le remercie pour ses nombreux conseils et remarques. Je lui en suis très reconnaissante de même que pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.*

*Un merci particulier va à mes collègues de laboratoire, **Djamila, Sana, louiza, Karima, Hafida.** pour leur précieux conseils professionnels et de leur soutien technique.*

*J'aimerais également remercier les gens du service d'oncologie et la chimiothérapie de l'hôpital Ben Omor djilani: **Dr. SAADANI Ahmed Zaki** spécialiste en Oncologie, **M^{lle} Kaala saida**, pour m'avoir aider et donner plus d'information sur les médicaments de la chimiothérapie, je leur remercie énormément pour leur temps consacré pour moi, leur patience et leur précieuses conseils*

*Je réserve une mention particulière à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien et leur aide et tout particulièrement : **Dr. Chouikhe Atef, Mr Bouali noureddine, Mr.Hamad brahim, Mr Saadi hamza, Mr Medjour abdelhak et Dr. Acila smail** ainsi qu'a toutes les autres personnes que je n'ai pas citées.*

*Enfinement, je remercie mes meilleurs amies: **Karoui Radja, Medila Ifriqya, Nadji Nassima, Aouimer Meriem, Mahboub Nasma, Ghanabzia Imane, Zouiouiche Fatma, Boukhari Dalal, HadeF Leila, Farah Ramadane, Houmeri Nawel** pour leur très grand cœur, leur gentillesse et les supers bons moments passés ensemble pour leur simple présence qui font qu'aujourd'hui je les considère comme de véritables amis. Puisque chaque personne rencontrée a une influence sur nous, je suis convaincue que leur contact a fait de moi une personne meilleure.*

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

Synthèse bibliographique

Chapitre 1: ADN : un cible moléculaire des anticancéreux

I.1.1. Généralité	03
I.1.2. L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique	03
I.1.2.1. Définition	03
I.1.2.2 Structure de l'ADN	03
I.1.2.3 Fonction	04
I.1.2.3.1 La synthèse protéique	04
I.1.2.3.2 La transmission de l'information génétique.....	04
I.1.2.3.3 L'importance biologique des liaisons de faible énergie	05
I.1.2.4 Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique	05
I.1.2.4.1 Instabilité chimique d'ADN.....	05
I.1.2.4.2 Spectres des Ultra-violets (UV) des bases nucléiques	05
I.1.2.4.3 Les propriétés spectrales	06
I.1.2.4.4 Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN	06
I.1.2.5. Division cellulaire	06
I.1.2.6 Dommages à l'ADN (Tumorigenèse	07
I.1.3. Le cancer en tant que contexte de recherche.....	07
I.1.4. Origine possible du cancer	08

Chapitre 2: Mode d'action de la chimiothérapie sur l'ADN

I.2.1. Généralité	10
I.2.2. La chimiothérapie	10
I.2.2.1. Historique de la chimiothérapie	10
I.2.2.2. Principe de la Chimiothérapie.....	11
I.2.2.3. Classification.....	11
I.2.2.4. Mode d'interaction ADN-médicaments	12
I.2.2.4.1. Interaction covalente avec de l'ADN : Les agents alkylants	12
I.2.2.4.2. Interaction non covalente	13
I.2.2.5. Les principaux médicaments chimiothérapeutiques utilisés dans notre étude.....	14
I.2.2.5.1. Le Cisplatine	14

I.2.2.5.2. Dacarbazine.....	20
I.2.2.5.3. Doxorubicine.....	22
Chapitre 3: Techniques adoptés dans notre étude	
I.3.1. Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées	27
I.3.1.1. Méthode de Spectrophotométrie électronique en Ultra violette (UV-visible).....	27
I.3.1.2. Les méthodes d'analyse électrochimiques	28
Partie expérimentale	
Chapitre 1: Matériels et méthodes	
II.1. Matériels	32
II.1.1. Produits chimiques	32
Médicaments	32
b. Solutions Tampons.....	32
c. Produits utilisés dans les différents méthodes d'étude	32
II.1.2 Matériel biologique.....	33
II.1.3 Matériel non Biologique	33
II.2. Méthodes	33
II.2.1. Prélèvements sanguins.....	33
II.2.2. Extraction des acides nucléiques a partir du sang total	34
➤ Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de sa qualité.....	36
➤ Préparation de l'ADN dénaturé (monobrin.....	36
II.2.3. Les différents méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-médicament	36
II.2.3.1. Méthode spectroscopique UV-Visible.....	36
II.2.3.2. Méthode électrochimique	38
Chapitre 2: Résultats et discussion	
III.1. Quantification de la concentration d'ADN	41
III.1.1. Spectres d'absorption des acides Nucléiques.....	41
III.1.2. Spectres d'absorption d'ADN dénaturé	42
III.2. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Médicamen	42
III.2.1. Détermination Spectroscopique de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison	42
III.2.1.1. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Cisplatine.....	43
III.2.1.2. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Dacarba/Doxoleme	45
III.3. Etude electrochimique de l'interaction ADN-Médicamen.....	47
III.3.1. Etude voltamétrique d'interaction ADN-Cisplatine.....	47
III.3.1.1. Rapport des constantes de liaison.....	49
III.3.1.2. Constantes et énergies libres de liaison.....	51
III.3.1.3. Coefficient de diffusion.....	54
III.3.1.4. Taille des sites de liaison.....	56

III.3.2. Etudes voltamétriques d'interaction médicament-ADN	57
III.3.2.1. Etude de comportement de médicament avec de l'ADN	57
III.3.2.2. Rapport des constantes de liaison	61
III.3.2.3. Constantes et énergies libres de liaison	64
III.3.2.4. Coefficient de diffusion	68
III.3.2.4. Taille des sites de liaison	71
Discussion	73
Conclusion	80
Perspectives	82
Références bibliographiques	84
Annexes	91

Résumé

L'approche thérapeutique du cancer repose sur trois axes, constitués de la chirurgie, de la radio-oncologie et de la chimiothérapie. Dans ce dernier domaine, l'interaction entre les médicaments anticancéreux et ADN, ainsi que les applications des techniques expérimentales a un potentiel d'intérêt pharmaceutique. L'ADN est le cible principale de certain agents cytotoxiques anticancéreux depuis plusieurs années . Cependant, l'étude de l'interaction entre un anti-cancereux et l'ADN est devenu une domaine de recherche très active à l'interface de la chimie, la biologie moléculaire et la médecine. En effet, cette interaction présente le rôle vitale dans la détermination du mécanisme d'action et la conception de l'efficacité et la spécificité des ces médicaments. L'objectif de cette étude est de déterminer le type d'interaction entre un médicament anti-tumeur le plus utilisé en chimiothérapie le Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN double brin à un pH = 4 et 9 , cette interaction a été étudié par la technique spectroscopique UV-Visible et confirmé par la voltamétrie cyclique . Les résultats obtenus montrent qu'il ya une interaction spontanée entre ces médicaments avec l'ADN. En effet, Cisplatine se lie par liaison covalente (alkylation), en revanche, le Dacarbazine et Doxoleme se lient par liaison non covalente de type intercalation et/ou interaction électrostatique traduite par les paramètres d'interaction, la constante de liaison K , l'énergie libre ΔG . Les coefficients de diffusion des formes libres et celles liées avec l'ADN ont été déduits à partir de l'équation de Randles-Sevcik. Le calcul a révélé que les coefficients de diffusion des adduits sont inférieurs à ceux des doxoleme et dacarbazine libres et l'inverse pour le cisplatine. Ces résultats montrent une corrélation raisonnable entre ces paramètres expérimentaux. Les tailles des sites de liaison des médicament avec l'ADN ont été déterminées à partir des données électrochimiques, leurs ordres de grandeur confirme les types d'interaction mentionné ci-dessus

Mots clés : ADN, Anti-cancer, chimiothérapie, Voltamétrie cyclique, Spectroscopie UV-Visible, paramètres d'interaction K et ΔG , coefficient D , taille du site

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure I.1	ADN dans le noyau cellulaire.	03
Figure I.2	(A) Structure de l'ADN. (B) Appariement des bases nucléiques	04
Figure I.3	Dénaturation de l'ADN par la Température.	06
Figure I.4	Schéma général des premières étapes de la cancérisation.	08
Figure I.5	Représentation schématique de la cancérogenèse	09
Figure I.6	Représentations schématique de l'effet de la chimiothérapie conduisant à l'apoptose	11
Figure I.7	Différents types de la chimiothérapie	12
Figure I.8	Sites d'interaction à l'ADN de différents agents alkylants. Les agents surlignés en Jaune	13
Figure I.9	Formes isomères du dichlorodiammineplatine (II)	15
Figure I.10	Hydrolyse du Cisplatine en milieu aqueux.	15
Figure I.11	Nature des adduits bifonctionnels du Cisplatine formés avec l'ADN .	16
Figure I.12	hydrolyse du Cisplatine par substitution d'un ou deux chlores par l'eau apportant ainsi une ou deux charges positives.	17
Figure I.13	l'azote 7 de l'adénine (A) et de la guanine (B) réagissent avec le Cisplatine	17
Figure I.14	les trois formes d'interaction du cisplatine avec l'ADN, inter-brins (gauche), intra-brins (centre) et ADN-protéines (droite)	18
Figure I.15	Résumé des mécanismes de résistances vis-à-vis du Cisplatine, (A) diminution de l'entrée, (B) augmentation de sa sortie, (C) détoxification par le glutathion, (D) inhibition de l'apoptose, (E) augmentation de la réplication indépendamment des adduits, (F) augmentation des réparations de l'ADN.	19
Figure I.16	Structure de Dacarbazine	20
Figure I.17	La structure chimique de Doxorubicine	23
Figure I.18	Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine	23
Figure I.19	Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la Doxorubicine	24
Figure I.20	Mécanisme fonctionnel de la P-gp : la P-gp	25
Figure I.21	Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine	27
Figure I.22	Allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques	29
Figure II.1	spectrophotométrie UV-Visible SHIMADZU1800	38

Figure II.2	Dispositif expérimental voltampérométrique	39
Figure III.1	spectre d'absorption ADN extrait a partir du sang	41
Figure III.2	spectre d'absorption d'ADN monobrin	42
Figure III.3	Spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Cisplatin en présence des doses augmentés d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration de l'ADN : A. PH=4, B. PH=9.	45
Figure III.4	spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Dacarbazine en présence des doses augmentés d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration de ADN : A. PH=4, B. PH=9.	46
Figure III.5	spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Doxorubicine en présence des doses augmentés d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration d'ADN : A. pH =4, B. pH =9.	46
Figure III.6	Voltamogramme cyclique de médicament Cisplatine (0,00013mol/l) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.	48
Figure III.7	Voltamogrammes cycliques de médicament Cisplatine (0,00013mol/l) (ligne noire) et en présence de 16 et 12 μL d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.	50
Figure III.8	Voltamogrammes cycliques de médicament Cisplatine (0,00013mol/l) en présence d'ADN (2,4, 6, 8,10, 12, 14, 16 μL) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.4 V/s.	51
Figure III.9	Tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_p - i_{p0})$ selon l'équation 5	53
Figure III.10	Succession de voltamogrammes cycliques de 0,00013 mol/l du médicament Cisplatine à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0.1Vs^{-1} avec un saut de $0,1\text{Vs}^{-1}$. Les flèches verticales indiquent l'augmentation de vitesse de balayage	54
Figure III.11	Superposition de la tracé de i_{pa} en fonction de la racine carrée de vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 16 et 12 μM d'ADN (ligne rouge) selon l'équation 6, à	56

	pH = 4.0 et 9.0	
Figure III.12	tracé de C_i / C_n en fonction de [ADN]	57
Figure III.13	Voltamogramme cyclique de médicament Dacarbazine (0,00219mol/l) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et pH=9 à une vitesse de balayage du potentiel de 300 mV/s.	59
Figure III.14	Voltamogramme cyclique de médicament Doxoleme (2 mg/ml) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.	59
Figure III.15	Voltamogrammes cycliques de médicament Dacarbazine (10mg/ml) (ligne noire) et en présence de 1,8 mL d'ADN a pH=4 et 1 mL à pH=9(ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à une vitesse de balayage du potentiel de 300 mV/s.	60
Figure III.16	Voltamogrammes cycliques de médicament Doxoleme (0,00219mol/l) (ligne noire) et en présence de 5 μ l et 10 μ M d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.	60
Figure III.17	Voltamogrammes cycliques de médicament Dacarbazine (0,00219mol/l)(A) et Doxoleme (0,000147mol/l) (B) en présence d'ADN à différentes concentration enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et à pH=9 à une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.4 V/s.	64
Figure III.18	Tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_{p0} - i_p)$ selon l'équation 13 A :Dacarbazine, B : Doxoleme	67
Figure III.19	Succession de voltamogrammes cycliques de 0,00219 mol/l du médicament Dacarbazine à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0.1Vs ⁻¹ avec un saut de 0,1Vs ⁻¹ .	68
Figure III.20	Succession de voltammogrammes cycliques de 80 μ g/ml du médicament Doxoleme à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0.1Vs ⁻¹ avec un saut de 0,1 Vs ⁻¹ . Les flèches verticales indiquent l'augmentation de vitesse de balayage	69
Figure III.22	Superposition de la tracé de ip_a en fonction de la racine carrée de vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 18 μ M d'ADN pour Dacarbazine (A) et 10 μ M d'ADN pour Doxoleme (B) (ligne rouge) a pH = 4 et à pH=9 selon l'équation 5,	71
Figure III.23	tracé de C_i / C_n en fonction de [ADN], A :Dacarbazine, B : Doxoleme	72

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau II.1	Les différents médicament utilisés dans notre étude	32
Tableau III.1	Représentation des résultats des ratios DO260/DO280, lors de la purification des ADN extrait de leucocytes	41
Tableau III.2	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction du Cisplatin avec l'ADN à partir des données spectrophotométrique UV-Vis à pH=4 et pH=9	44
Tableau III.3	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction du médicament avec l'ADN à partir des données spectrophotométrique UV-Vis à pH=4 et pH=9	47
Tableau III.4	Potentiel et courant des pics anodiques et cathodiques de la forme non lié du médicament Cisplatine et celui lié avec ADN	48
Tableau III.5	Le décalage anodique et la diminution du courant des pics anodiques causés par l'addition d'ADN	49
Tableau III.6	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel et baisse de courant des pics du médicament CisPt et de l'adduit CisPt -ADN	50
Tableau III.7	Paramètres électrochimiques tirés du voltamogrammes de la figure III.8	51
Tableau III.8	Paramètres numériques de l'équation 4	52
Tableau III.9	Constantes et énergies de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_p - i_{p0})$	53
Tableau III.10	Courant des pics anodiques et cathodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel	54
Tableau III.11	Les coefficients de diffusion du médicament Cisplatine et de l'adduit CisPt-ADN	55
Tableau III.12	Détermination de la taille de site de liaison entre ADN-Cispt	55
Tableau III.13	Potentiel et courant des pics anodiques de la forme non lié du médicament et celui lié avec ADN	57
Tableau III.14	Le décalage anodique et la diminution du courant des pics anodiques causés par l'addition d'ADN	61
Tableau III.15	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel et baisse de courant des pics du médicament et de l'adduit médicament -ADN	61
Tableau III.16	Paramètres électrochimiques tirés du voltamogrammes de la figure	63

	III.17	
Tableau III.17	Paramètres numériques de l'équation 13	65
Tableau III.18	Constantes et énergies de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_{p0} - i_p)$	66
Tableau III.19	Courant des pics anodiques et cathodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel	67
Tableau III.20	Les coefficients de diffusion du médicament Dacarbazine et de l'adduit Dacarbazine -ADN déterminés en utilisant l'équation de Randles-Sevcik	68
Tableau III.21	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le médicament	69
Tableau III.22	Les coefficients de diffusion du médicament Dacarbazine et de l'adduit Dacarbazine -ADN déterminés en utilisant l'équation de Randles-Sevcik	70
Tableau III.23	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le médicament	72

Introduction générale

Il y a plusieurs siècles, le cancer n'était pas aussi fréquent car l'espérance de vie était moins élevée. La peste, la tuberculose ou encore la diphtérie représentaient les premières causes de mortalité. Depuis le 20^{ème} siècle, avec l'accroissement de l'espérance de vie et l'augmentation de l'exposition à des éléments cancérigènes (tabac, aliments riches, polluants chimiques...), le cancer est devenu un véritable problème de santé publique. Selon le rapport annuel de l'organisation mondiale de la santé (OMS), publié en Février 2015, cette maladie est devenue l'une des principales causes de mortalité dans le monde, et le nombre de cas devrait augmenter de 70% environ au cours de deux prochaines décennies(OMS,2015). La lutte contre le cancer représente donc plus que jamais un enjeu mondial d'importance. La recherche porte aujourd'hui sur la compréhension des bases moléculaires, énergétiques et génétiques impliquées dans les mécanismes de l'oncogenèse, la recherche de cibles diagnostique, pronostique et thérapeutique, et le développement d'un arsenal thérapeutique approprié.

A travers ces chiffres le cancer est une pandémie pour laquelle il faut trouver des solutions. L'un de ses traits caractéristiques est la prolifération rapide des cellules anormales formant une tumeur maligne. Ces cellules en division anarchique peuvent envahir des parties du corps adjacentes et essaimer dans d'autres organes formant des métastases. La formation de ces métastases est considérée comme un stade très avancé du cancer et la guérison est très limitée (Meijer , 2003).

L'ADN joue un rôle très important dans les processus de la vie car il porte l'information génétique et instruit la synthèse biologique des protéines et des enzymes nécessaires pour la réplication et la transcription de l'information génétique dans la vie cellulaire(Voet, 2005). Les mécanismes de liaison entre les petites molécules et l'ADN a été identifié comme un point essentiel durant des décennies. La compréhension de la propriété structural de l'ADN, mutations des gènes, l'origine de certain maladies, les mécanismes d'action de certains médicament anti-tumoral et antivirus pour désigné de nouvelles cible des médicaments au niveau de l'ADN(Lauzon,2008) .

L'approche thérapeutique du cancer repose sur trois axes, constitués de la chirurgie, de la radio-oncologie et de la chimiothérapie .dans ce dernier domaine, l'interaction entre les

médicaments anticancéreux et ADN, ainsi que les applications des techniques expérimentales a un potentiel d'intérêt pharmaceutique.

L'étude de l'interaction entre un anticancéreux et l'ADN est devenu un domaine de recherche très active à l'interface de la chimie, la biologie moléculaire et la médecine. En effet, cette interaction présente le rôle vitale dans la détermination du mécanisme d'action et la conception de l'efficacité et la spécificité de ces médicaments. Plusieurs mécanismes différents d'interaction des médicaments anticancéreux avec de l'ADN, ceux-ci incluent l'intercalation, liaison non covalente, liaison covalente/liaison croisée, clivage de l'ADN et incorporation des analogues de nucléoside. Le complexe formé entre le médicament et l'ADN résulte d'un changement de la stabilité thermodynamique, ainsi que de la propriété fonctionnelle de l'ADN, la compréhension de comment ce complexe affecte la structure et la propriété mécanique de l'ADN est une étape importante vers l'élucidation des mécanismes fonctionnels de l'interaction et peut donner plus d'information sur Drug design.

L'objectif de mon mémoire est d'étudier l'interaction entre les médicaments anti-tumoraux les plus utilisés en chimiothérapie : le Cisplatine, Doxorubicine et Dacarbazine avec de l'ADN double brin à différents pH par deux méthodes adoptées dans notre étude : la technique spectroscopique UV-Visible et confirmée par l'étude de la voltamétrie cyclique, pour répondre à deux questions : cette interaction est-elle spontanée ? Quel est le type de liaison entre ces deux molécules ?.

Notre travail se répartit en trois chapitres, une partie bibliographique comporte une étude détaillée sur l'ADN et les produits chimiothérapeutiques ainsi que leur mode d'action. Une seconde partie expérimentale qui comporte les matériels et méthodes adoptés dans notre étude, la première étape de cette partie consiste à extraire l'ADN à partir des cellules sanguines. Ensuite nous poursuivons de faire une étude sur cette interaction en déterminant les paramètres d'interaction, le constant de liaison K et la valeur de l'énergie libre ΔG . Finalement, en nous basant sur les éléments dégagés lors des études antérieures, nous cherchons à confirmer que le traitement par ces médicaments induit des activités antiprolifératives sur le développement du cancer par la forte ou la faible interaction avec de l'ADN. La troisième partie présente les résultats et la discussion de cette étude et une conclusion finale sur les résultats ainsi obtenus.

I.1.1. Généralité

Le contrôle de la structure topologique de l'ADN et de nombreuses fonctions liées à son métabolisme (transcription, réplication, recombinaison ...) s'effectue grâce à des enzymes spécialisées. Ces enzymes sont les cibles intracellulaires de plusieurs classes d'agents possédant des propriétés antitumorales ou antibiotiques, de ce fait aujourd'hui les mécanismes complexes expliquant les processus de la production de lésions dans l'ADN jusqu'à la mort cellulaire, ouvrant des perspectives prometteuses dans la mise au point de nouveaux agents antitumoraux plus sélectifs et plus performants. (Duguet et al., 1994)

I.1.2. L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique)

I.1.2.1. Définition

L'ADN joue un rôle central dans la vie cellulaire. Il est un bio-polymère universel présent dans toutes les cellules. Il se trouve dans le cytoplasme des cellules procaryotes, tandis qu'il se localise dans le noyau, les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. Par conséquent l'ADN est le support de l'hérédité (Swynghedauw et al. 2008).

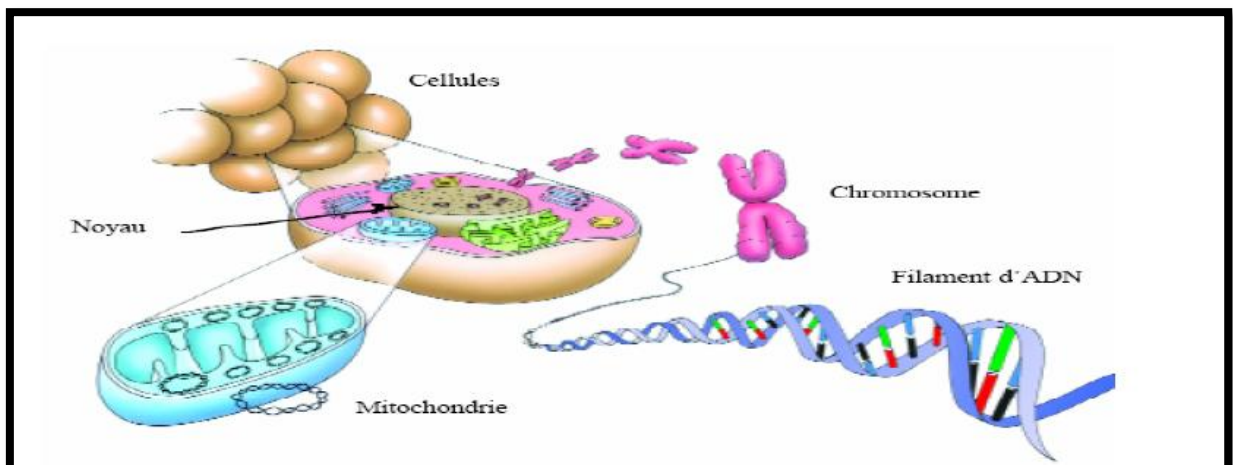


Figure I.1 : ADN dans le noyau cellulaire. (Chennouf, 2011)

I.1.2.2 Structure de l'ADN

L'ADN est le support de l'information génétique (Elrod et al., 2003), il est empaqueté sous forme de chromosomes par association à des protéines chromatinienne au sein des noyaux des cellules eucaryotes.

Selon le modèle de Watson et Crick, la molécule d'ADN est formée de deux brins complémentaires enroulés en hélice de façon antiparallèle donnant naissance à un grand et à un petit sillon (Voet, 2005), ces deux brins sont constitués d'un enchaînement précis d'unités élémentaires que sont les nucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Un nucléotide est

composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2'-désoxyribose, lui-même relié à une base azotée. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des bases puriques, la cytosine (C) et la thymine (T) des bases pyrimidiques (Weinman, 2004 ; Swynghedauw *et al.* 2008). Les liaisons hydrogènes qui lient les bases des deux brins complémentaires vont stabiliser la double hélice (Karp, 2004)

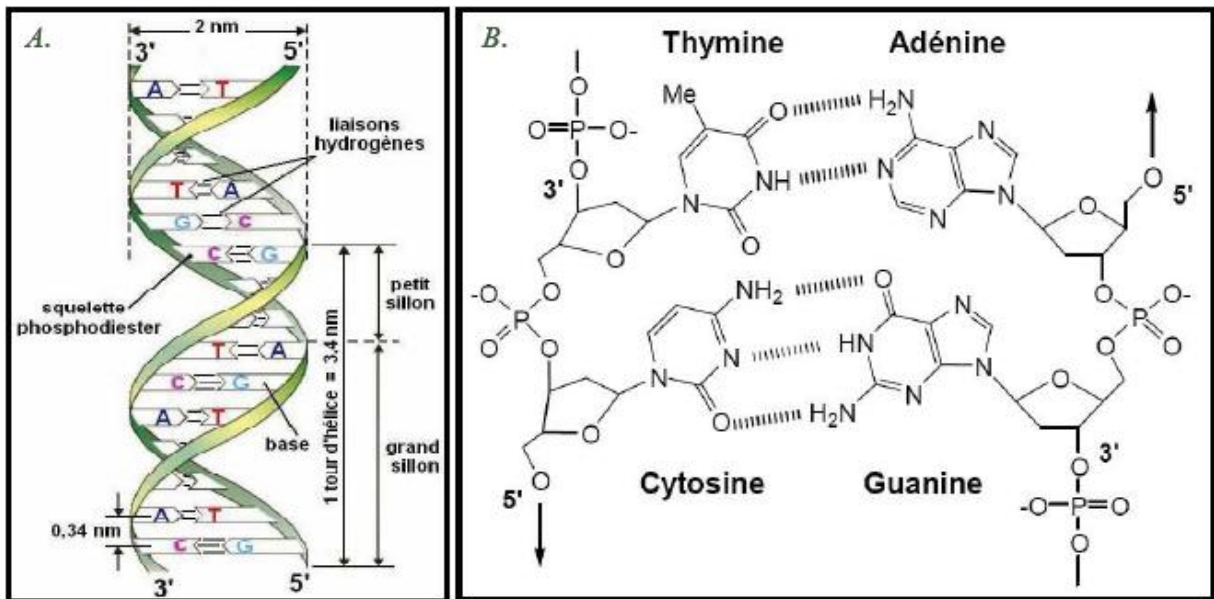


Figure I.2 : (A) Structure de l'ADN. (B) Appariement des bases nucléiques (Lenglet, 2010)

I.1.2.3 Fonction

L'ADN joue un rôle central dans la vie cellulaire. En effet, il est le détenteur de l'information génétique qui permet à la cellule de synthétiser continuellement ses protéines, sa réplication qui assure la transmission du message génétique au cours des générations cellulaires (Lodish, 1989).

I.1.2.3.1 La synthèse protéique

Les informations génétiques dans l'ADN sont continuellement déchiffrées par des systèmes protéiques sur la base d'un code à quatre lettres (A, T, G, C). Certaines régions des gènes, dites codantes, possèdent l'information nécessaire à la synthèse des protéines, alors que d'autres régions dites non-codantes permettent la régulation de l'expression des gènes, via la fixation de protéines régulatrices ayant une fonction répressive ou activatrice. Une molécule intermédiaire, l'ARN messager, permet le passage de l'information du noyau au cytoplasme (Swynghedauw *et al.* 2008).

I.1.2.3.2 La transmission de l'information génétique

Lors de la division cellulaire, la double hélice de l'ADN est répliquée à l'identique afin que chacune des deux cellules filles hérite de la même information génétique. La réplication est initiée par une hélicase qui sépare les brins de l'ADN. Chacun des brins est alors recopié en utilisant la complémentarité des bases par une ADN polymérase pour donner deux doubles hélices. La réplication est dite semi-conservative car chaque hélice contient un brin provenant de l'ADN modèle et un brin néo-synthétisé. Ainsi, l'information génétique est fidèlement transmise aux cellules filles (Weinman,2004).

I.1.2.3.3 L'importance biologique des liaisons de faible énergie

Les liaisons faibles (H) sont d'une importance capitale pour les processus biologiques. La séparation ou la dénaturation des deux brins de l'ADN, maintenus uniquement par des forces non covalentes, demande peu d'énergie ce qui permet à la réplication de se produire dans des conditions physiologiques. La dénaturation peut être provoquée par des agents chimiques ou agents physiques (Pottier,2003).

I.1.2.4 Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique

I.1.2.4.1 Instabilité chimique d'ADN

- L'ADN se décompose spontanément en solution. D'autre part, la présence du désoxyribose rend la liaison N-glycosidique fragile à l'hydrolyse, particulièrement celle des purines qui est 20 fois plus instable que celle des pyrimidines .
- Les fonctions amine exo-cycliques des bases peuvent être sujettes à des réactions d'hydrolyse à une température et un pH physiologiques .
- La base C, ainsi qu'une base plus rare, la 5-méthylcytosine, sont les bases les plus sensibles à ces réactions de désamination. Elles sont alors respectivement converties en U et T.
- La structure en double hélice de l'ADN assure une bonne protection contre ces réactions. L'A et la G sont alors transformées en hypo xanthine et xanthine respectivement (Swynghedauw et *al.*2008) .

I.1.2.4.2 Spectres des Ultra-violets (UV) des bases nucléiques

- Dans l'UV de très courte longueur d'onde presque toutes les solutions de molécules biologiques sont opaques.
- La plupart des molécules biologiques contenant des noyaux aromatiques absorbent les rayonnements UV à différentes longueurs d'onde, l'ADN et les protéines comme la mélanine absorbe préférentiellement dans l'UV et la lumière visible.

- Les zones d'absorption des quatre bases s'étalent de (240 à 280) nm de sorte que les acides nucléiques formés de ces types de nucléotides ont un maximum d'absorption à 260 nm. (Chennouf,2011)
- L'absorption de la lumière visible à 280 nm est caractéristique des protéines et sert à doser ces protéines (l'ADN en interaction permanente avec les protéines) (Pouget,2000).

I.1.2.4.3 Les propriétés spectrales

Les hétérocycles des différentes bases ainsi que leurs dérivés, nucléosides ou nucléotides, présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'UV, spectres dépendant du pH. L'aire de ces spectres dans cette région est plus élevée pour les purines : leurs absorptions sont donc plus importantes. Ces propriétés optiques sont communément utilisées pour la détection, le dosage et le contrôle de pureté d'acides nucléiques (Pottier, 2003).

I.1.2.4.4 Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

Lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion ou T_m (melting température), les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons H qui les maintiennent appariés. La T_m est la température où 50 % de l'ADN est déroulé. La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire, on dit que l'ADN est dénaturé (Muller,2002).

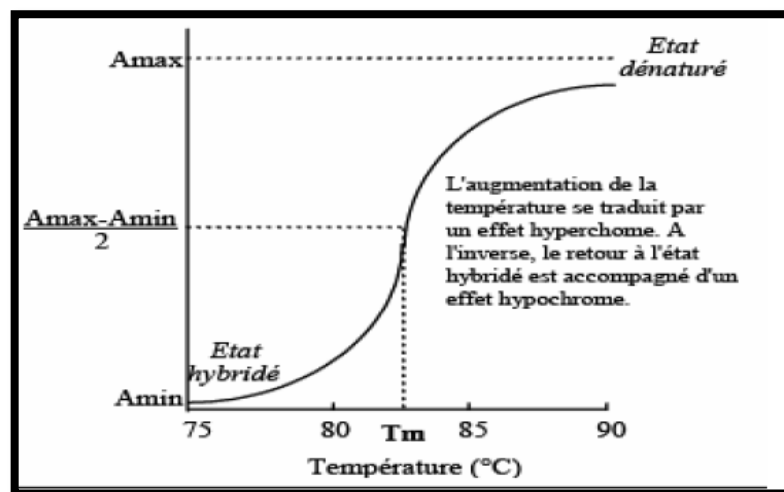


Figure I.3 : Dénaturation de l'ADN par la Température(Chennouf,2011).

I.1.2.5. Division cellulaire

Le cycle cellulaire est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les

chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles (Ernault, 2012). Tous les jours un milliard de cellules doivent être renouvelées, pour remplacer les cellules qui sont perdues de façon continue. Ce mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire (Wood et al., 2000). Il arrive occasionnellement qu'une anomalie de régulation de la division apparaisse dans une cellule en cycle. L'apparition de ces anomalies est favorisée par les produits cancérigènes (produits de combustion du tabac, amiante, etc.). Une fois les anomalies établies, la cellule devient « cancéreuse » (Hoeijmakers, 2003).

I.1.2.6. Dommages à l'ADN (Tumorigenèse) :

L'ADN est continuellement soumis à des agressions. Ces altérations sont soit dues à des facteurs internes (mutations, insertions ou délétions au niveau de la séquence d'ADN), soit dues à des facteurs externes (virus, bactéries, agents chimiques ou radioactifs, radiations électromagnétiques) (Wood et al., 2000). (Néanmoins, la majorité de ces altérations sont réparées grâce au différents système de réparation d'ADN. Mais dans de rares cas, une mutation peut subsister et modifier l'expression des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire, comme les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur; ces anomalies génétiques peuvent conduire à l'apparition d'un cancer (Lenglet, 2010).

I.1.3. Le cancer en tant que contexte de recherche

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases. Ces métastases sont la principale cause de décès par le cancer (Hamdan, 2013).

Chaque type de cancer a probablement des facteurs déclenchant, de promotion et de progression différents. Cependant d'une manière générale, on distingue schématiquement trois étapes majeures :

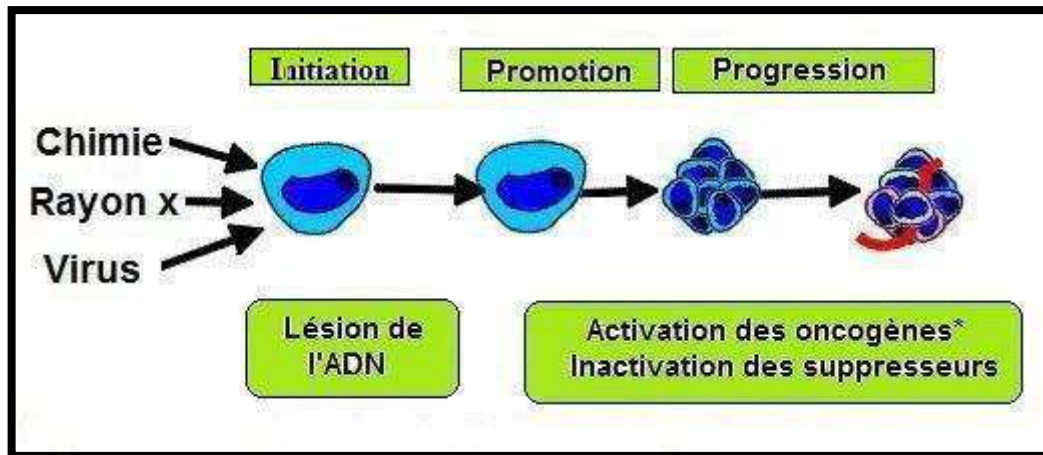


Figure I.4 : Schéma général des premières étapes de la cancérisation (Teste, 2008).

1. L'initiation : correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral, etc....).
2. La promotion : correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée.
3. La progression : correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique. (Teste, 2008).

I.1.4. Origine possible du cancer

Le cancer est le résultat d'une dérégulation des systèmes de contrôle de la croissance cellulaire, une dérégulation qui entraîne la prolifération anarchique et incessante des cellules, accompagnée de l'inhibition des processus de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Ozols, 1992).

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est un processus qui se déroule en plusieurs étapes, progressant le plus souvent d'une lésion précancéreuse vers une tumeur maligne. Cette cancérogenèse est résumée dans la **figure I.5** (Armand *et al.*, 2006).

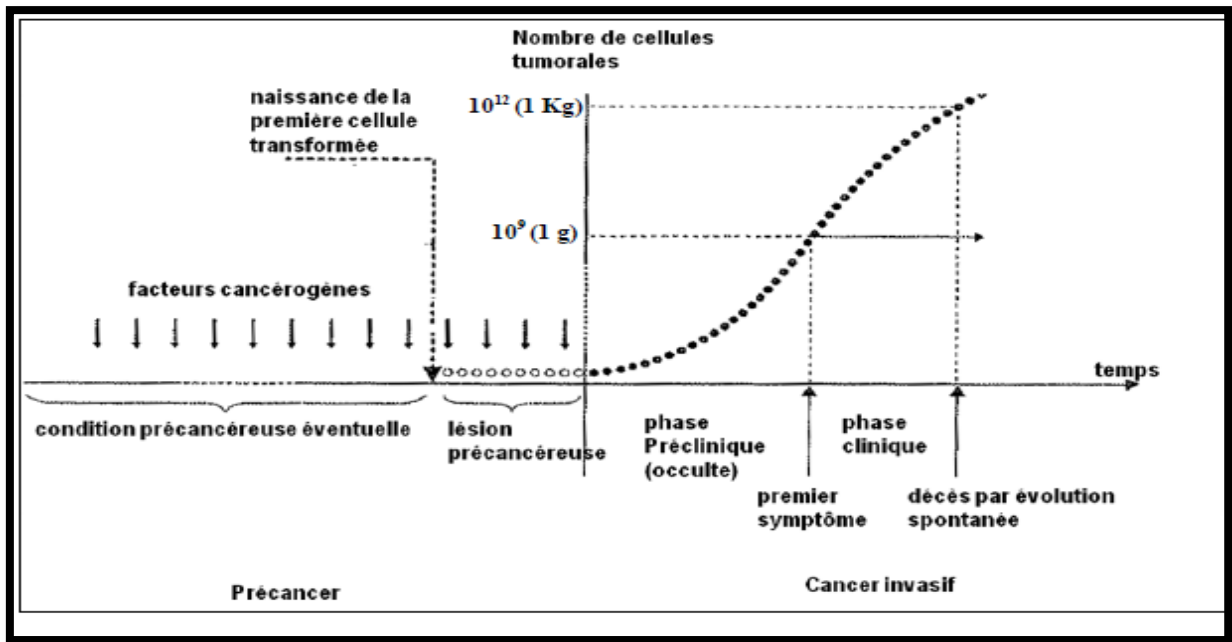


Figure I.5 : représentation schématique de la cancérogenèse : l'apparition d'un cancer commence avec l'influence de facteurs cancérogènes et l'apparition d'une première cellule transformée. A partir d'un certain stade, cette cellule et ses descendantes se multiplient en excès de façon indétectable jusqu'à atteindre environ un gramme de tissu, soit un milliard de cellules. A partir de ce moment la tumeur devient détectable. En absence de traitement, la croissance tumorale se poursuit jusqu'au décès du malade (Armand *et al.*, 2006).

I.2.1. Généralité

La diversité des agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse a permis d'augmenter le nombre de rémission et également leur durée mais les traitements restent lourds, difficiles à supporter et présentent de nombreux effets secondaires. C'est pourquoi il est urgent de trouver les molécules plus sélectives et non résistantes sur certains types de cancer.

I.2.2. La chimiothérapie

La connaissance des mécanismes moléculaires conduisant à la prolifération cellulaire incontrôlée a permis de mettre en place des traitements et d'identifier de plus en plus de cibles thérapeutiques (Haskell *et al.*, 2003). Grâce à toutes ces avancées, six thérapies existent : La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie, la photothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière constitue, un élément essentiel de l'arsenal thérapeutique anticancéreux d'aujourd'hui de tout programme de traitement anticancéreux multidisciplinaire efficace (Ozols *et al.*, 1991). Cependant, les produits anticancéreux ciblent la division cellulaire affectent aussi bien les cellules tumorales, que les cellules saines et particulièrement celles des tissus renouvelables, par conséquent, il existe toujours un problème de ciblage (Jegham, 2009).

I.2.2.1. Historique de la chimiothérapie

Loin d'être une maladie récente, les premiers écrits sur le cancer remontent à l'Égypte ancienne, dans lesquelles les cancers les plus faciles à déceler soit celui du sein, des lèvres et de la langue ont été décrits. Par la suite, Hippocrate (460-370 av. J-C) utilisa le terme *carcinoma* pour décrire le cancer. *Carcinoma* provient du mot grec *karkinos*, qui signifie crabe dont le mot cancer est la forme latinisée. Cette image représente bien la façon qu'ont les cellules cancéreuses à adhérer et à se répandre (ex: métastases). (Lauzon, 2008)

Au 19^{ème} siècle, diverses méthodes anticancéreuses étaient déjà à l'étude.

Au début du 20^{ème} siècle, P. Ehrlich montra l'affinité de certaines matières colorantes pour les cellules vivantes (tel que le bleu de méthylène pour le tissu nerveux), lui vaut d'être considéré comme le père de la chimiothérapie (Faguet, 2005).

Cependant, jusque aux années 80, la plupart des médicaments anticancéreux ont été sélectionnés et développés tout en ignorant bien souvent leur mécanisme d'action au niveau cellulaire. Il est important de développer de nouvelles molécules à large spectre d'action, il a

été estimé que plus de 60% des nouvelles entités chimiques introduites entre 1981 et 2006 étaient des produits naturels ou des dérivés de ces produits naturels (Hamdan,2013).

I.2.2.2. Principe de la Chimiothérapie

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des agents anticancéreux. Ceux-ci tuent les cellules cancéreuses en agissant sur l'ADN, sur l'ARN ou sur les protéines des cellules, pour bloquer certaines étapes de la division cellulaire (Jegham, 2009). Cependant, n'étant pas spécifiques, ces médicaments affectent aussi des cellules saines des tissus renouvelable. Cette cyto-toxicité conduit à des effets secondaires sérieux et parfois très handicapants (perte des cheveux, nausées, vomissements...) (Teste, 2008).

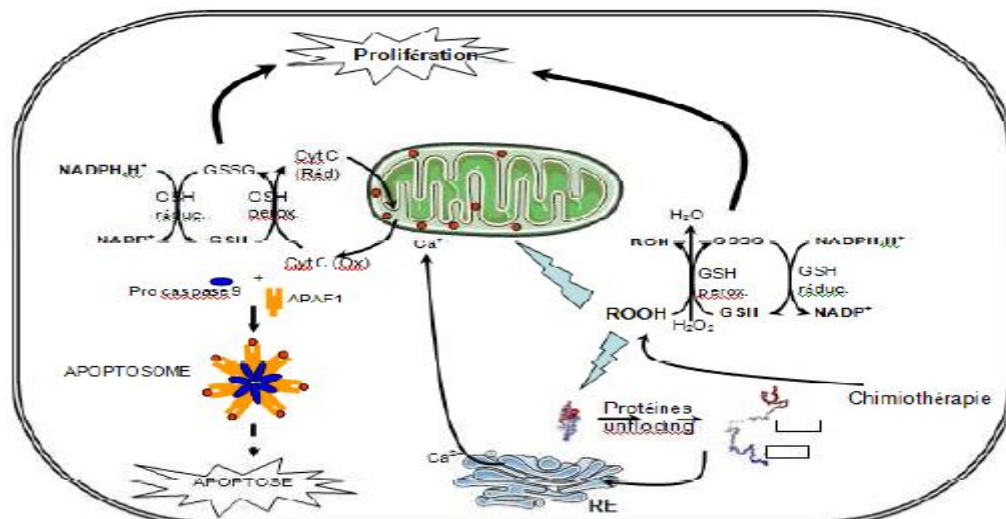


Figure I.6 : Représentations schématique de l'effet de la chimiothérapie conduisant à l'apoptose (Hamdan, 2013).

I.2.2.3. Classification

La classification des médicaments utilisés dans la chimiothérapie se fait principalement selon leur mode d'action, mais aussi selon leur structure chimique, accessoirement. Les mécanismes d'action des médicaments permettent de classer la chimiothérapie en trois groupes (Kalant et al., 2003):

1. Les inhibiteurs de la biosynthèse des nucléotides,
2. Les inhibiteurs du fuseau mitotique,
3. Les agents altérant l'ADN

Ce dernier groupe, les agents altérant l'ADN, est divisé en trois sous-groupes :

1. Les agents alkylants, dont le Cisplatine fait partie (ils établissent des liaisons covalentes ou de coordinations avec l'ADN)
2. Les agents intercalants qui se fixent réversiblement sur l'ADN tel que la Doxorubicine, (ils s'intercalent entre deux plateaux de paires de bases successifs dans la double hélice d'ADN)
3. Les agents modifiant la conformation de l'ADN (ils inhibent les topoisomérases I, II) (Antimétabolites) (Jeghan,2009).

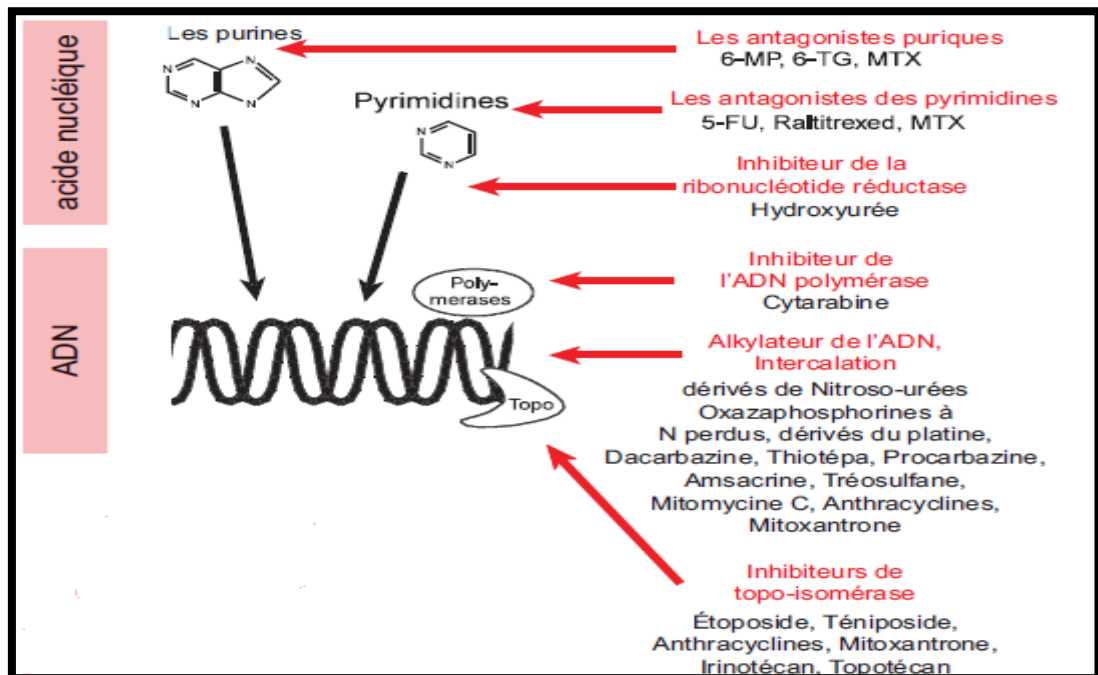


Figure I.7 : Différents types de la chimiothérapie (Mertelsmann et *al.*,2011)

I.2.2.4.Mode d'interaction ADN-médicaments

I.2.2.4.1. Interaction covalente avec de l'ADN : Les agents alkylants

Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines ne présentent que deux sites (N7 et N3)(Wang et *al.*, 2005). L'azote N7 de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevés : O6- guanine et N3-adénine N2-guanine, N3 guanine et N7-adénine (Lenglet, 2010)

a. Alkylant de grande sillon

Le Cisplatine réagit avec N7-guanine mais aussi avec d'autres sites du grand sillon d'ADN comme O6-guanine et N7-adénine. Les lésions les plus rencontrées sont les cross links intra-brin d(GpG) (65%) ou encore d(ApG) (25%) (Sedletska, 2007).

On observe seulement 5 à 10% de cross links interbrins (ICL)s (entre deux guanines) et 5 à 10% de cross links intra-brin sur la séquence d(GpNpG)(Wang et *al.*,2005). Même quand il est lié à des structures biologiques, le Cisplatine conserve sa disposition planaire de conformation *cis*, essentielle à son activité.

L'interaction du Cisplatine va également induire des altérations structurales de la double hélice puisqu'il entraîne des courbures et des déroulements plus ou moins importants de l'ADN (Mischina et *al.*,2006).

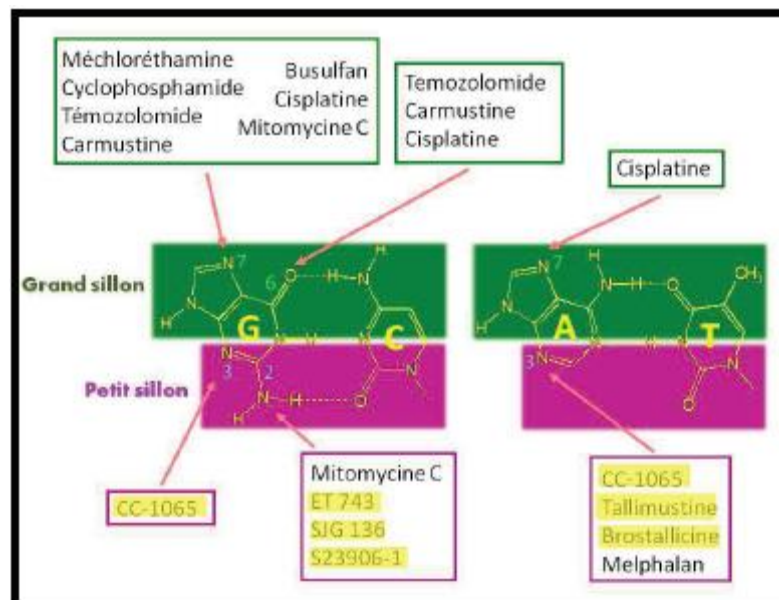


Figure I.8: Sites d'interaction à l'ADN de différents agents alkylants. Les agents surlignés en Jaune (Lenglet,2010)

b. Alkylant de petit sillon

Certain médicament bloque la progression de la phase S conduisant à une accumulation des cellules en phase G2/M, via une inhibition de la transcription des gènes essentiels à la progression du cycle, et engendre ainsi une apoptose indépendante de p53. Ainsi, contrairement aux autres agents alkylants, certains induisent des DSBs (cassures doubles brins de l'ADN) (Soares et *al.*,2007).

I.2.2.4.2. Interaction non covalente :

a-Agents intercalants de l'ADN

Ce sont des molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés, de dimension et structure telles qu'elles provoquent une détorsion de la molécule d'ADN et donc

un empêchement de la progression des ARN et ADN polymérase ainsi qu'une inhibition de la réplication et de la transcription. La présence de substance intercalée entre les deux brins de l'ADN peut perturber aussi l'action de l'ADN topoisomérases I et II et provoquer des cassures mono- et bi-caténaire (Sirajuddin et al.,2013).

Ces molécules génèrent pour certains des radicaux libres (quinones, diols, époxydes, superoxydes, peroxyde d'hydrogène) pouvant altérer les membranes plasmiques et s'associer à l'ADN en tant qu'alkylant. Certains inhibiteurs de topoisomérase II, comme la Doxorubicine (Pendyala et al., 1995).

b- les ligands du petit ou grand sillon

Les ligands du petit sillon correspondent à une famille d'agents anti- cancéreux qui se lient par des interactions van der Waals et peuvent faire des liaisons hydrogène typiquement avec N₃ de A et O₂ de T. ces interactions sont spécifique des régions riche en AT (Sirajuddin et al.,2013). Grâce à leur structure, ils interagissent avec la double hélice en venant se positionner dans le petit sillon. Ils reconnaissent préférentiellement les enchainement riches en bases AT, ce qui a pour conséquence d'inhiber les enzymes qui se fixent sur es sites, comme les topoisomérases (Pottier,2003).

c-Interaction externe avec l'ADN

Ce type d'interaction est de nature électrostatique, certains ligands peuvent former aussi des liaisons non-spécifique avec le squelette de ADN. ce mode usuellement se fait lorsque le ligand forme des agrégats par auto-association. Certains métal aussi peuvent faire des complexe et interagit avec de l'ADN par interaction externe (complexe chargé positivement se lie avec le squelette d'ADN chargé négativement (Sirajuddin et al., 2013).

I.2.2.5. Les principaux médicaments chimiothérapeutiques utilisés dans notre étude

I.2.2.5.1. Le Cisplatine

Le *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) (Cisplatine), comme son isomère stable *trans*dichlorodiammineplatinum (II) (Transplatine), est une molécule inorganique de structure plan carré qui possède deux groupements chlorure labiles, deux groupements ammoniac inertes de conformation *cis* reliés à un atome de platine central (Sedletska, 2007 ;Sasada et al., 1999).

Parmi les dérivés du platine testés, le Cisplatine s'est avéré être très efficace pour bloquer la croissance des cellules à division rapide telles que les cellules tumorales (Deepa et al., 2012).

Actuellement, le Cisplatine est le médicament le plus utilisé en chimiothérapie humaine, notamment contre les cancers des testicules, des ovaires, de la vessie (Steffensen et al., 2000).

La formation d'adduits sur l'ADN, ses effets biochimiques sur la réplication, la transcription et la réparation ainsi que la reconnaissance de ces adduits par des protéines cellulaires permettent de penser que l'ADN est la cible pharmacologique du Cisplatine (Fourrier, 2003).

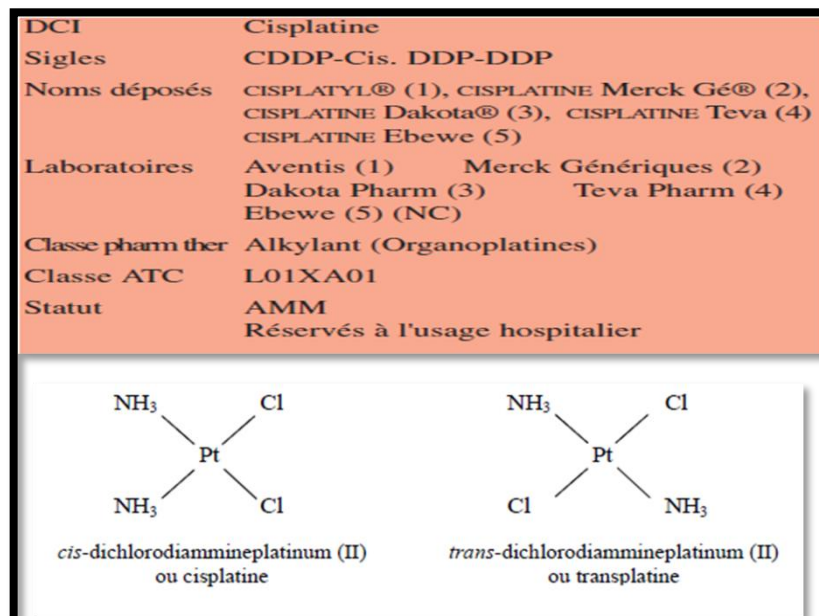


Figure I.9 : Formes isomères du dichlorodiammineplatine (II) (Anonyme, 2016)

a. Le Cisplatine et l'ADN

✓ *Réactivité du Cisplatine*

Le Cisplatine, inactif dans le milieu extracellulaire, perd ses ions Cl⁻ substitués par des groupements OH ou H₂O pour former des espèces monoqua et diaqua chargées positivement (Sadowitz et al., 2002). A pH physiologique, ces espèces cationiques vont réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN, l'ARN et des protéines (Essigmann, 1994)

Dans le noyau, le Cisplatine réagit avec les N7 des guanines et des adénines pour former des adduits bifonctionnels (Lippard et al., 1992).

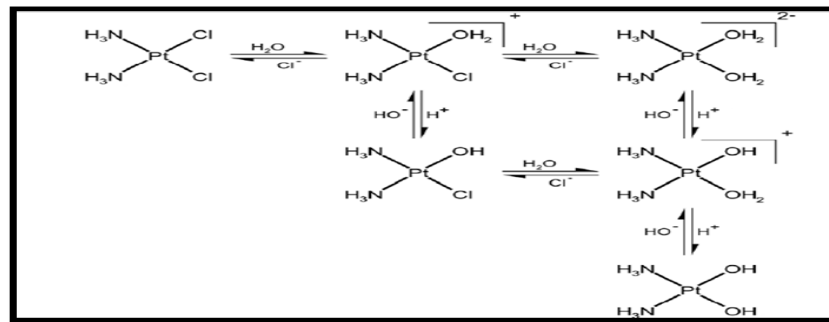


Figure I.10 : Hydrolyse du Cisplatine en milieu aqueux (Lippard, 1995).

✓ *Les adduits du Cisplatine*

a) Les adduits monofonctionnels

La réaction du Cisplatine avec l'ADN se fait en deux étapes. Après formation de la liaison covalente entre un groupement OH et l'azote N7 d'une purine, l'adduit monofonctionnel, instable en solution aqueuse, va évoluer en 2-3 heures vers un adduit bifonctionnel après hydrolyse du second groupement chloro(Jamieson et al., 1999). La nature transitoire de ce type d'adduits ne permet pas de déterminer sa structure (Sedletska, 2007).

b) Les adduits bifonctionnels :

Les pontages intrabrin formés entre deux purines présentes sur le même brin d'ADN sont les adduits majoritaires du Cisplatine (Topping et al., 2009). Les adduits 1,2 se forment entre deux purines adjacentes tandis que les adduits 1,3 se forment avec deux purines séparées par une base. Les pontages interbrins se font dans le site d(GC/GC) entre les deux guanines présentes chacune sur un brin d'ADN. La guanine est dix fois plus réactive avec le Cisplatine que l'adénine(Brabec et al., 2002) .

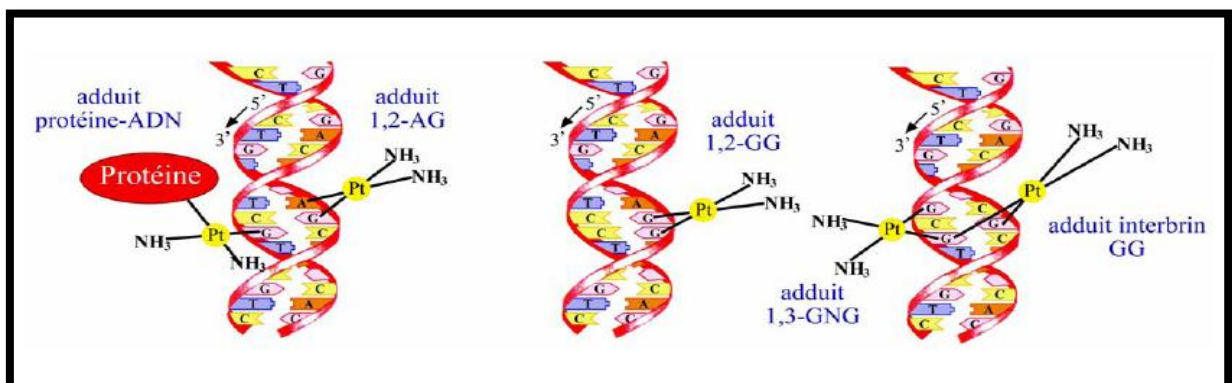


Figure I.11 : Nature des adduits bifonctionnels du Cisplatine formés avec l'ADN (Pendyala et al., 1995).

b. La cible du Cisplatine

l'activité du Cisplatine dépendait de son interaction avec l'ADN et son degré de platination (Roberts *et al.*, 1979). La co-localisation des facteurs protéiques d'expression ou de réparation de l'ADN et des adduits formés par le Cisplatine a indiqué le lien direct entre la drogue et l'ADN (Pil *et al.*, 1992, Treiber *et al.*, 1994). Ces interactions altèrent la structure normale de l'ADN bloquant ainsi la DNA polymérase donc la réplication. Si la cellule n'arrive pas à corriger tous les adduits formés, elle entre en apoptose (SiddiK *et al.*, 2003). Le Cisplatine peut induire aussi la mort cellulaire par apoptose en interagissant avec l'ADN mitochondrial (Zhu *et al.*, 2007).

b. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action cytotoxique du Cisplatine n'est pas complètement élucidé. Il se lie d'une manière covalentes avec l'ADN, l'ARN et les protéines, *cross-linking*; il interfère spécifiquement dans la phase G1/S de cycle cellulaire. Les modifications structurales provoquées par le pontage du Cisplatine sur l'ADN sont certainement à l'origine de ce mécanisme, car leur présence perturbe les étapes de réplication et de transcription de l'ADN et modifie le comportement de protéines cellulaires qui reconnaissent ces lésions (Sedletska, 2007). Le Cisplatine subit une hydrolyse avant de réagir avec ces différentes cibles. Les deux atomes de chlore seront substitués par une ou deux molécules d'eau (**Fig. I.12**) (Mertelsmann *et al.*, 2011).

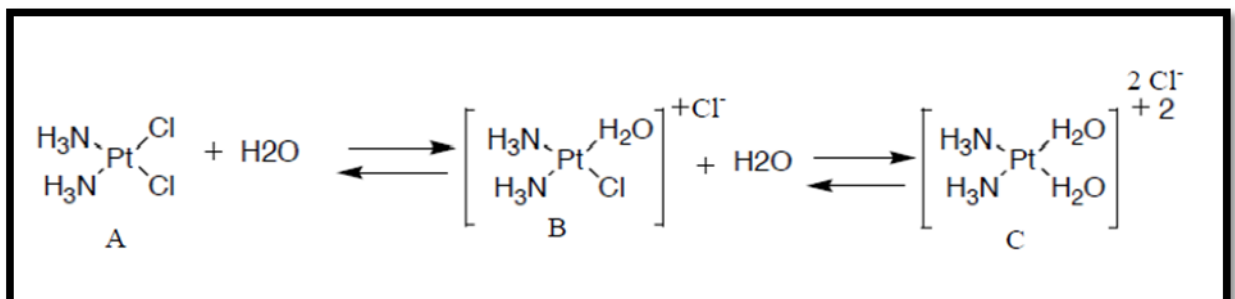


Figure I.12 : Hydrolyse du Cisplatine par substitution d'un ou deux chlores par l'eau (Lippard *et al.*, 1987).

Cette hydrolyse est facilitée par la concentration intracellulaire faible en ions chlorures (dans le sang autour de 100 mM et dans la cellule entre 3 et 20 mM) (Lippard *et al.*, 1987). Les complexes électrophiles ainsi formés (**Fig I.12 B et C**), espèces très réactives, (Baik *et al.*, 2003), réagissent avec l'ADN principalement au niveau de N7 de la guanine et de l'adénine (**Fig I.13**).

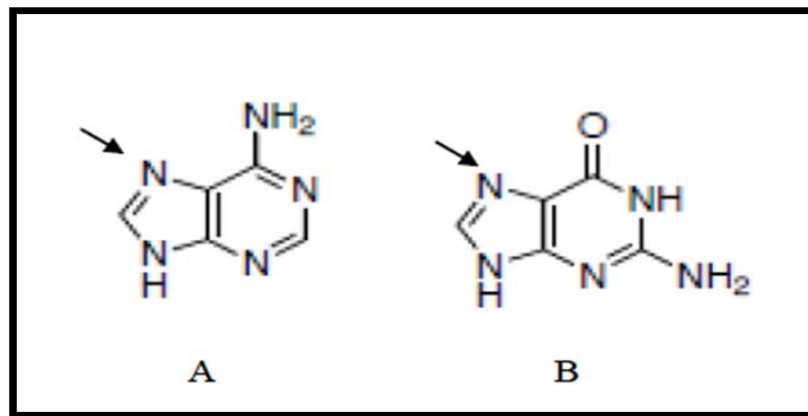


Figure I.13 : L'azote 7 de l'adénine (A) et de la guanine (B) réagissent avec le Cisplatine

Ainsi le Cisplatine forme des ponts (adduits) en intra-brins entre deux purines adjacentes (guanines principalement) (Legendre *et al.*, 2002. Hagemester *et al.*, 2002). Trois modes d'interaction ont été décrits (**Fig I.14**) : interaction intra-brins (entre deux GG, ou GXG ou GA sur le même brin), interaction inter-brins (entre deux GG ou GA sur deux brins différents) et l'interaction ADN-protéine (entre G et protéines soufrées) (Chvalova *et al.*, 2007).

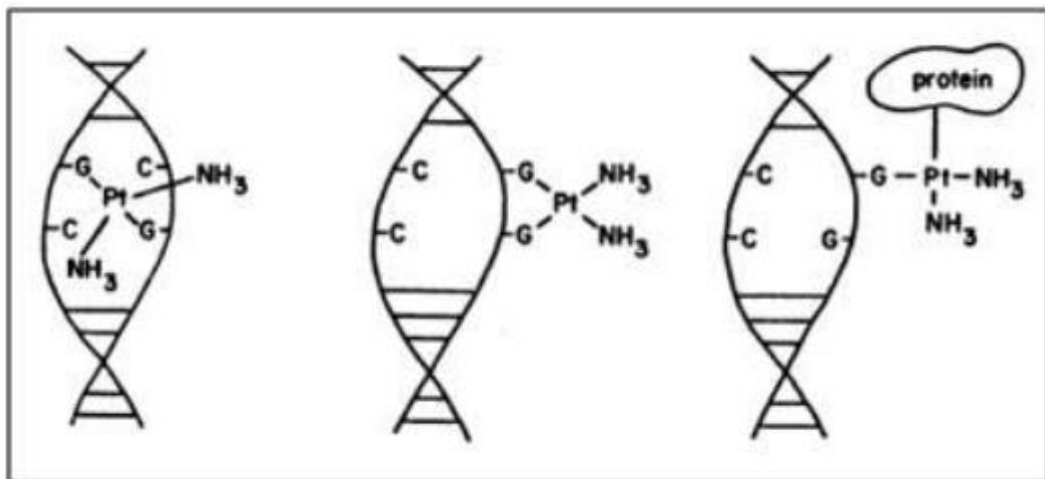


Figure I.14 : Trois formes d'interaction du Cisplatine avec l'ADN, inter-brins (gauche), intra-brins (centre) et ADN-protéines (droite) (Lippard *et al.*, 1987)

Le Cisplatine hydrolysé (**Fig I.12 A et B**) est capable de réagir avec l'ensemble des sites nucléophiles dans la cellule. Ainsi, la majorité de la drogue interagit avec les protéines et les composés soufrés tels que le glutathion dans la cellule (Chvalova *et al.*, 2007). Il est susceptible aussi de réagir avec l'oxygène (O₆) de la guanine, impliqué dans une liaison hydrogène avec la cystéine induisant des mutations G par A (Baik *et al.*, 2003)

d. Mécanismes de résistance

Lors du premier traitement des cancers ovariens, Ozols R.F. et son équipe ont remarqué que plus de 70 % des patientes répondaient favorablement. Or, après 5 ans, le traitement avec la même drogue ne permit d'obtenir que 15 à 20 % de réponse (Ozols *et al.*, 1991). Ces observations indiquent que les cellules cancéreuses développent et ce, parfois d'une façon très rapide, des résistances vis-à-vis des médicaments utilisés (Ozols *et al.*, 1992). Une fois que le Cisplatine est entré dans la cellule, il réagit avec toutes les molécules nucléophiles présentes telles l'ADN, l'ARN, les protéines, les lipides membranaires, etc (Borst *et al.*, 2000). Les cellules utilisent certaines de ces molécules pour réduire l'action du Cisplatine sur l'ADN. De nombreux autres mécanismes ont été proposés pour expliquer les résistances développées comme la diminution du Cisplatine présent dans les cellules, la régulation de l'apoptose, la réparation des adduits d'ADN formés et l'augmentation de la détoxification des cellules et par conjugaison avec le glutathion par l'intermédiaire de la glutathion-S-transférase, (**Fig I.15**) (Stordal *et al.*, 2007).

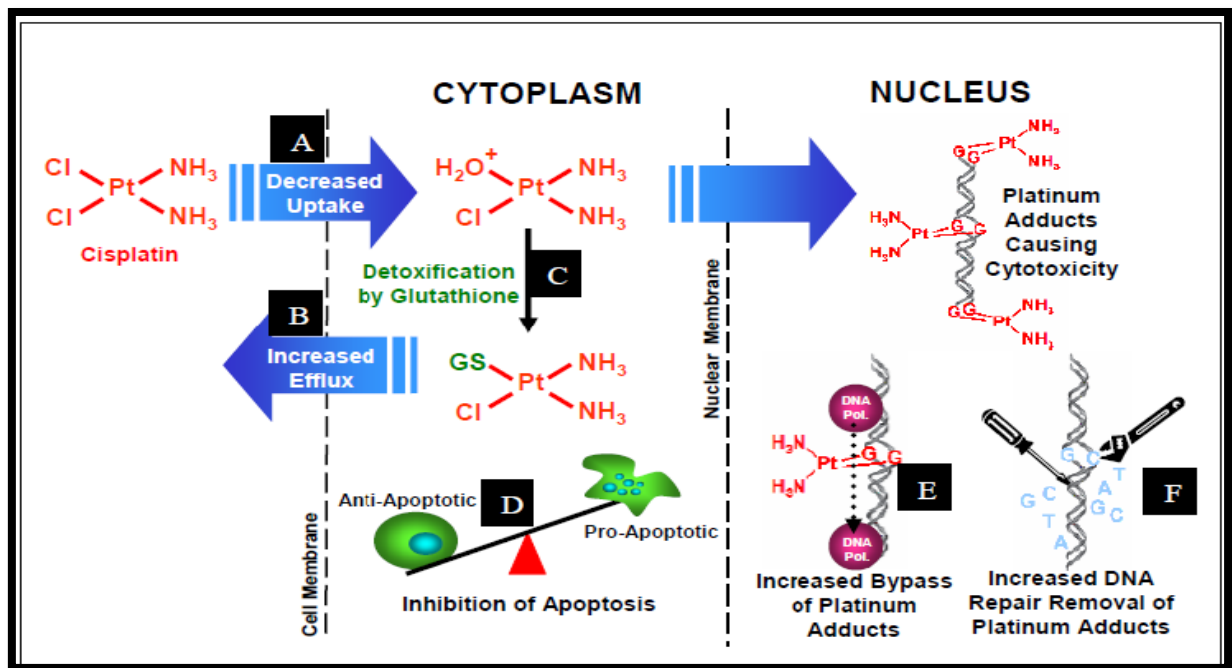


Figure I.15 : Des mécanismes de résistances vis-à-vis du Cisplatine, (A) diminution de l'entrée, (B) augmentation de sa sortie, (C) détoxification par le glutathion, (D) inhibition de l'apoptose, (E) augmentation de la réplication indépendamment des adduits, (F) augmentation des réparations de l'ADN (Stordal *et al.*, 2007).

e. Pharmacocinétique

La pharmacocinétique du Cisplatine est compliquée par la présence concomitante de formes libres et de formes liées aux protéines.

Le platine total (libre + fixé aux protéines) a une cinétique bi ou triphasique (Kaiser, 2001).

➤ **Distribution**

Faible passage dans le LCR avec une liaison aux protéines plasmatiques : très forte (90 %) (Kaiser, 2001).

➤ **Élimination**

Faible élimination biliaire (<10 %). Élimination rénale (30 % sur 24 heures) par sécrétion tubulaire sous forme métabolisée, d'abord rapide, puis très lente. Cependant, La clairance du platine ultrafiltrable est de l'ordre de 300 à 500 ml/min/m² et sa demi-vie terminale peut être très longue (3 à 8 jours)(Zhou et *al.*, 2010).

La demi-vie du platine ultrafiltrable est très courte, de l'ordre de 30 minutes. (Kaiser,2001)

f. Les effets secondaires

Les observations cliniques montrent que les patients traités avec le Cisplatine présentent des effets secondaires plus au moins importants et parfois d'une façon irréversible. Ces observations ont poussé les cliniciens à réduire les doses de traitement et ce, avec un risque d'inefficacité. Les effets secondaires souvent notés en clinique sont : des nausées et vomissements, des irritations de la bouche, la diarrhée, des modifications de la peau (rougeurs, démangeaisons...), une chute des cheveux, etc. Tous ces effets secondaires sont provoqués par des toxicités hématologiques, rénales et neurologiques (Fourrier, 2003).

I.2.2.5.2.Dacarbazine

La Dacarbazine(5-(3,3-diméthyl-1-triazényl)-imidazole-4-carboxamide) est un agent chimiothérapeutique anticancéreux utilisé dans le traitement de divers cancers, dont le mélanome malin, le lymphome hodgkinien, le sarcome touchant les cellules des îlots et le cancer du pancréas(Temerik et *al.*, 2014). La Dacarbazine est normalement administrée par injection ou par perfusion intraveineuse (Kaiser, 2001)

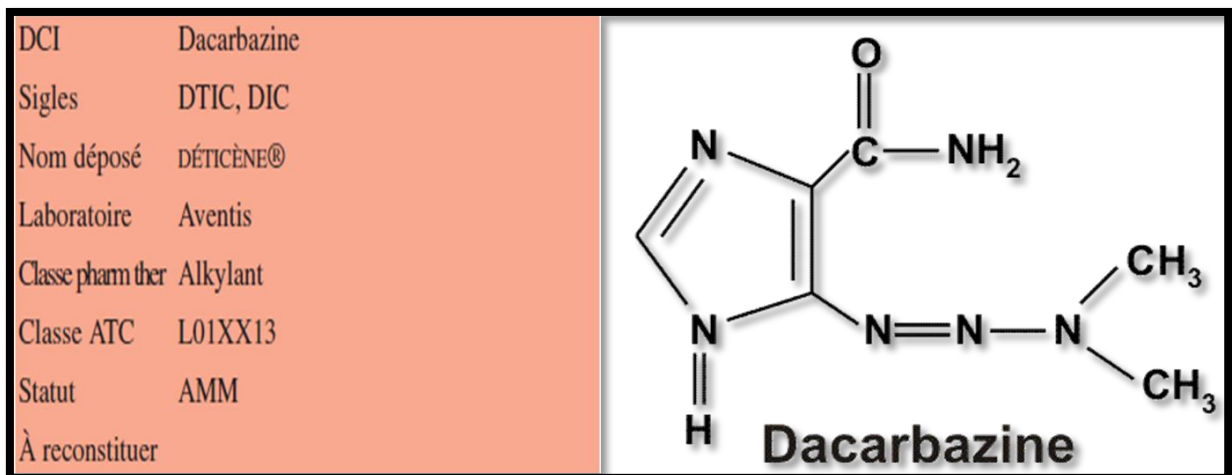


Figure I.16: Structure de Dacarbazine (Anonyme, 2016)

a. la Dacarbazine et l'ADN

La structure de la Dacarbazine a une ressemblance frappante avec celle du métabolite 5-aminoimidazole 4-carboxamide (AIC) qui est transformé en acide inosinique par les enzymes concernés par la synthèse des bases puriques. (Kaiser, 2001)

Il est supposé qu'elle agit comme un antimétabolite, en inhibant le métabolisme purique et la synthèse des acides nucléiques (Temerk *et al.*, 2014). Toutefois, la similarité des structures est peu pertinente puisque la Dacarbazine est considérablement métabolisée dans le foie par le système du cytochrome P450 par réaction de N-déméthylation. Le dérivé monométhyl se divise ensuite spontanément pour donner le métabolite AIC et un composé intercalaire, probablement le diazométhane, qui se décompose pour former un ion méthyl-carbonium (Temerk *et al.*, 2014). Cet ion se fixe sur les groupes nucléophiles des acides nucléiques et d'autres macromolécules (Mertelsmann *et al.*, 2011).

b. Mécanisme d'action

La Dacarbazine intervient dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines mais sa cytotoxicité ne se rapporte pas à une phase spécifique du cycle cellulaire. En général, elle est particulièrement efficace dans l'inhibition de la synthèse de l'ARN. La Dacarbazine détruit lentement les cellules et il n'a pas été observé qu'elle avait une action immunodéprimante chez l'homme. La Dacarbazine subit une photodégradation spontanée à la lumière et se décompose en 5-diazoimidazole-4-carboxamide et en diméthylamine. Le 5-Diazoimidazole-4-carboxamide peut attaquer les groupes nucléophiles de l'ADN et subit également une réorganisation structurelle pour former de la 2-azahypoxanthine (Kaiser, 2001).

c. Mécanisme de résistance

Activité importante en O6-alkylguanine-ADN-alkyltransférase, enzyme qui répare les dommages induits sur l'ADN(Kaiser, 2001).

d. Propriétés pharmacocinétiques

Le volume de distribution de la Dacarbazine est supérieur au volume d'eau corporel, ce qui suggère une localisation dans certains tissus corporels, probablement le foie. La Dacarbazine ne se fixe que peu (environ 5 %) sur les protéines plasmatiques. Sa demi-vie plasmatique après administration par voie intraveineuse est d'environ 35 minutes. La Dacarbazine est éliminée lors de son passage dans les tubules rénaux plutôt que par filtrage glomérulaire. Il traverse la barrière hémato-encéphalique en petite quantité. Il n'existe pas de données confirmant que la Dacarbazine traverse le placenta et passe dans le lait (Anonyme, 2016).

✓ *Distribution*

Liaisons aux protéines plasmatiques : 20 % sa diffusion dans le LCR : 14 % de la concentration plasmatique (Kaiser, 2001)

e. Effet secondaire

Comme de nombreux médicaments de la chimiothérapie, la Dacarbazine peut avoir de nombreux effets secondaires graves, car elle interfère avec la croissance des cellules normales, ainsi que la croissance des cellules cancéreuses. Parmi les plus graves effets secondaires possibles, il y a les malformations à la naissance des enfants conçus ou portés par la mère au cours du traitement, la stérilité (qui peut être permanente) ou la déficience immunitaire (Anonyme, 2016).

I.2.2.5.3. Doxorubicine

La Doxorubicine (également appelée Adriamycine ou hydroxydaunorubicine) est un médicament anticancéreux de la famille des anthracyclines. Produite tout naturellement par des actinobactéries de genre *Streptomyces*, elle a été isolée pour la première fois en 1960 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (Hande, 1998; Minotti *et al.*, 2004). Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides . Son administration se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée (Hande, 1998).

a. la Doxorubicine et l'ADN

La Doxorubicine appartient au groupe de médicaments qui combattent le cancer et que l'on appelle *antineoplasiques* (Partha et al., 2014). Est un agent intercalant qui entre dans l'espace entre les paires de bases de l'ADN. De plus ces molécules sont des inhibiteurs des ADN topoisomérases de type II, enzymes impliquées dans le maintien de la structure tridimensionnelle de l'ADN lors des phénomènes de transcription et de réplication. Les complexes brins d'ADN/topoisomérase seront stabilisés empêchant ainsi la réplication de l'ADN.(Lauzon,2008)

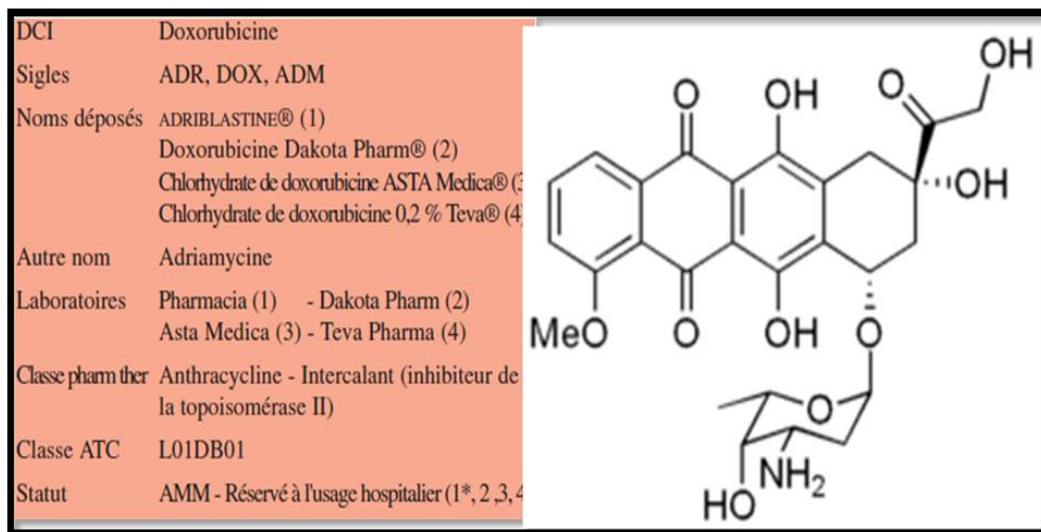


Figure I.17 : La structure chimique de Doxorubicine (Anonyme, 2016).

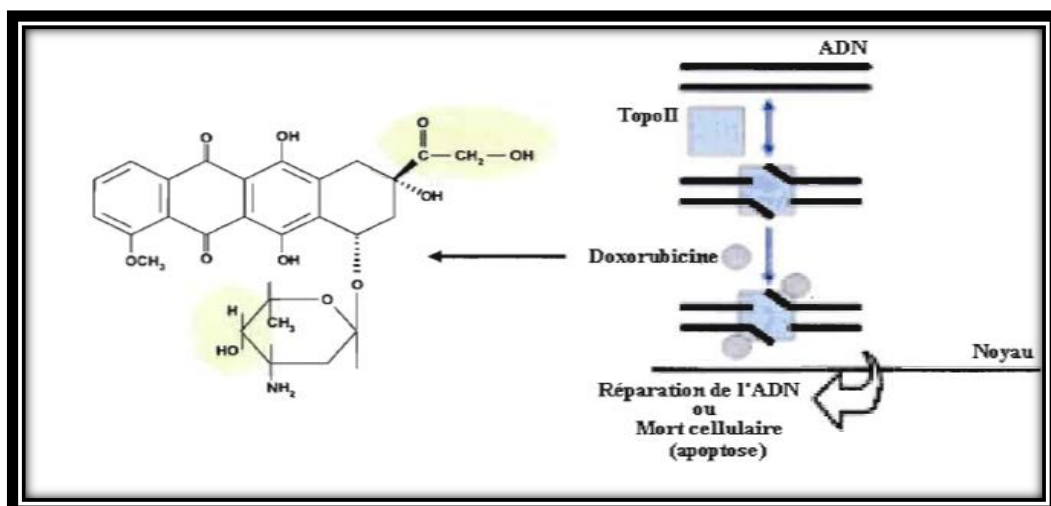


Figure I.18 Mécanisme de toxicité cellulaire de la Doxorubicine :

La stabilisation et l'inhibition de l'activité de l'enzyme topoisomérase II par la doxorubicine mène à l'arrêt du cycle cellulaire qui permet l'activation de la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire par apoptose, si les dommages à l'ADN sont irréparables (Hande, 1998).

b. Mécanisme d'action

La substance active de Doxorubicine est le chlorhydrate de Doxorubicine un antibiotique cytotoxique. Son mécanisme d'action lui permet de s'insérer dans la classe des *anthracyclines* (Partha *et al.*, 2014). La Doxorubicine prévient la croissance des cellules cancéreuses en parasitant l'action du matériel génétique (ADN) qui est nécessaire à leur reproduction (Lauzon, 2008 ; Mertelsmann, 2011).

Il agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN. Sa structure plane, lui permettrait de s'insérer entre deux paires de bases azotées préférentiellement entre G-C à la suite de la formation de liaisons hydrogène spécifiques entre la Doxorubicine et la guanine modifiant ainsi la structure de l'ADN (Hande, 1998; Iarussi *et al.*, 2001). Cette modification inhiberait l'action de la topoisomérase II, qui est un enzyme nucléaire chargée de modifier l'ADN lors de la transcription, la réplication et la mitose (Potter et Rabinovitch, 2005). La stabilisation de l'enzyme par l'intercalation de la Doxorubicine causerait l'arrêt du cycle cellulaire par activation de « check points », responsables d'activer la réparation de l'ADN ou si les dommages sont trop importants, d'activer la mort de la cellule par apoptose. Finalement, les composés de dégradation de la Doxorubicine entraîneraient la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyl ($^{\bullet}OH$) (Singal *et al.*, 1997). Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Iarussi *et al.*, 2001).

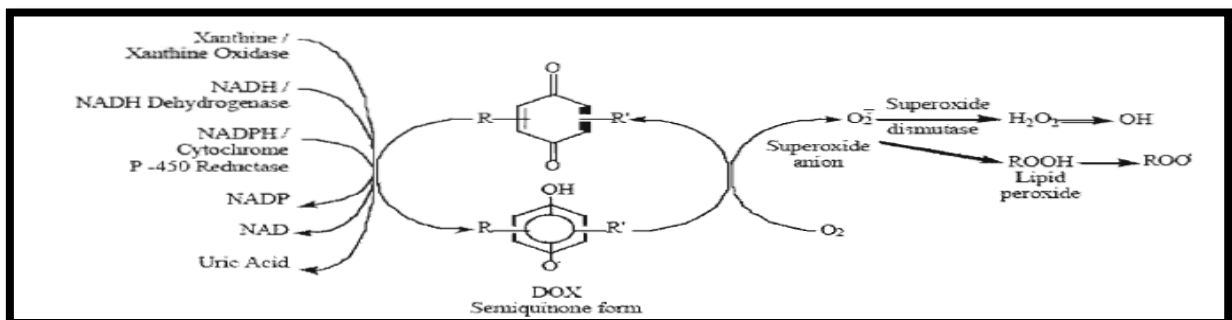


Figure I.19 : Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la Doxorubicine : La forme quinone est la forme initiale de la Doxorubicine et peut être réduite en forme semiquinone par le gain d'un électron. Cette réduction peut être générée par des enzymes réductases telles que la xanthine oxydase, la NADH déshydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase. L'électron perdu par la semiquinone de la Doxorubicine lors de son oxydation peut être transféré à une molécule d'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde (O_2^-) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A ce stade, le H_2O_2 peut entraîner la formation de radicaux hydroxyls ($^{\bullet}OH$), un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase (Iarussi *et al.*, 2001).

c. Mécanisme de résistance

Les mécanismes de résistance sont croisés avec ceux des autres anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche et les épipodophyllotoxines :

- Résistance de type "résistance pléiotropique" MDR .
- Résistance par modifications qualitatives ou quantitatives de la topoisomérase II,
- Résistance liée à l'expression de la protéine (Kaiser,2001).

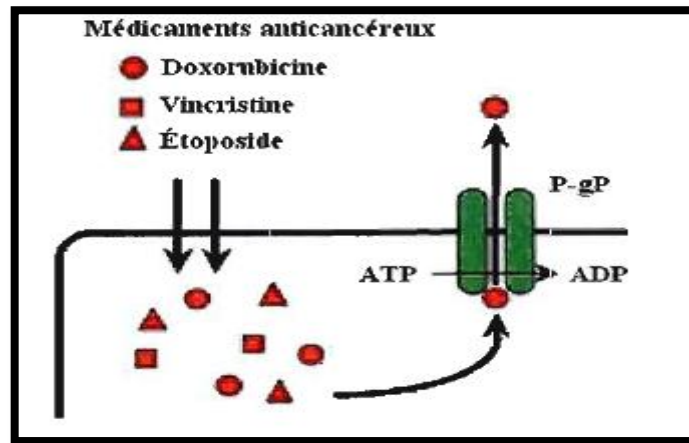


Figure I.20: Mécanisme fonctionnel de la P-gp : la P-gp est située à la membrane plasmique et permet l'expulsion ATP- dépendante, entre autres des médicaments anticancéreux, hors de la cellule(tsuruo et al., 2003)

La P-gp appartient à la catégorie des transporteurs ABC (Leslie *et al.*, 2005). Afin de définir le mécanisme d'action de la P-gp, des études de transfection du gène MDR1 ont été effectuées dans des liposomes . De ces études, il a été découvert que la P-gp interagissait directement avec les médicaments hydrophobes contenus dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et les **ATP** transporterait vers l'extérieur de la cellule, de manière énergie dépendante nécessitant l'hydrolyse de l'ATP (Figure I.20) (Ling, 1997). Ce mécanisme est encore envisagé de nos jours, mais il se pourrait également que la P-gp permette seulement le passage des médicaments hydrophobes du feuillet interne au feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique et donc l'expulsion du médicament. De plus, la P-gp ne serait pas seulement présente au niveau de la membrane plasmique, mais dans plusieurs autres compartiments cellulaires comme l'appareil de Golgi et plus récemment, les mitochondries (Gong *et al.*, 2000; Solazzo *et al.*, 2006).

d. Pharmacocinétique

La cinétique est triphasique, linéaire et indépendante de la dose et du schéma d'administration. La courbe d'élimination plasmatique du produit est triphasique avec une phase initiale rapide, d'une demi-vie d'environ 5 minutes et une phase terminale lente, d'une demi-vie 36 heures. La Doxorubicine est éliminée essentiellement par l'excrétion biliaire

sous forme de produit inchangé et de métabolites (40 à 50 % de la dose en 7 jours). L'excrétion urinaire est négligeable (environ 10 % de la dose, principalement sous forme de produit inchangé) (Vidal, 2016). La glycoprotéine P diminue l'activité de la Doxorubicine en la sortant activement des cellules tumorales

✓ ***Distribution***

Liaisons aux protéines 80 %. Tissulaire et rapide sa volume de distribution est de 500 à 1 000 l/m² (Kaiser,2001).

✓ ***Métabolisme***

La Doxorubicine est métabolisée en doxorubicinol (dérivé 13 dihydrogéné) très peu actif. Des aglycones peuvent se former dans le foie mais leur présence dans le plasma ou les urines est faible, inconstante et transitoire(vidal, 2016).

✓ ***Élimination***

Essentiellement hépatique, cumulative 45 % en 7 jours ; urinaire 10 % ses demi-vies : 5 minutes, 1 heure, 30 heures et la clairance plasmatique est 30 l/h/m²(Kaiser,2001) .

I.3.1. Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées

Notre travail vise à déterminer le type d'interaction entre les médicaments chimiothérapeutiques et l'ADN, cette interaction peut être étudiée par différentes techniques d'analyse, parmi ceux-ci les plus utilisés dans ce type de test est la spectroscopie UV-Visible et l'électrochimie (Shah, 2010).

En ce qui concerne la mesure électrochimique peu de méthodes sont actuellement disponibles pour la détection de l'interaction entre l'ADN et les substances bioactives. Par conséquent, ce mémoire n'est pas un mémoire de chimie pure, mais plutôt un mémoire de chimie des substances bioactives appliquée à la résolution d'une problématique biologique, justifiant par là sa dénomination de master de bio-chimie appliquée. En effet, Un rappel des principes de base de la mesure électrochimique est également présenté en mettant un accent sur la voltammétrie, privilégiée dans ce travail.

I.3.1.1. Méthode de Spectrophotométrie électronique en Ultra violette (UV-visible) :

Un spectre ultra violet est une courbe, précisant les variations d'absorption d'énergie d'une substance soumise au rayonnement ultraviolet. Le tracé de cette courbe représente, en effet l'intensité de l'absorption en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence.

✓ Loi de BEER-LAMBERT :

À une longueur d'onde spécifique pour une substance donnée, il y a un rapport entre l'absorbance A , le nombre de molécules (la concentration) c , la longueur du chemin traversé l appelé aussi le trajet optique (l'épaisseur de l'échantillon) exprimée en cm, et une constante appelée le coefficient d'extinction spécifique qui indique l'intensité de l'absorption. Ce dernier est appelé coefficient d'extinction molaire (l'absorptivité molaire). Cependant cette loi est définie par l'équation suivante (Zhong et al. 2001): $\text{Log}(I_0/I) = \epsilon.l.c = A$

D'où :

A : l'absorbance à 260 nm

ϵ : le coefficient d'extinction molaire ($6600\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

l : largeur de cuve de spectrophotométrie en (cm)

C : concentration de l'ADN

Cette loi exprime le fait que la diminution de l'intensité lumineuse est proportionnelle au nombre de particules qui s'absorbent (Lacombe, 2007).

I.3.1.2. Les méthodes d'analyse électrochimiques

Les méthodes électrochimiques sont basées sur des réactions d'oxydoréductions qui sont le siège d'un échange d'électrons entre l'oxydant et le réducteur (Can et *al.*, 2014).

L'utilisation de techniques électrochimiques est pour avoir plus d'information sur les molécules de médicaments et leur mécanisme d'action (Sirajuddin et *al.*, 2013), en outre est l'une des phases les plus importantes de la découverte de médicaments. Les mécanismes Electrochimiques sont importants pour toute la chimie des réactions redox y compris les systèmes biologiques. Les Réactions des systèmes sont généralement étudiées avec des techniques électrochimiques voltamétrie cyclique (CV) (Lacombe, 2007). En fait, la puissance des résultats CV est de fournir rapidement des informations considérables sur la thermodynamique des processus redox des réactions chimiques couplées. Ces techniques sont parmi les moyens les plus sensibles pour l'évaluation direct des concentrations; ils peuvent être largement utilisés pour l'analyse des très faible concentrations, en particulier sur les composés pharmaceutiques (Burcu et *al.*, 2014).

L'électrochimie est la discipline qui a pour objet l'étude des interfaces entre des conducteurs électroniques (métaux, polymères conducteurs...) et des conducteurs ioniques (solutions électrolytiques, sels fondus, électrolytes solides...) (Devilliers & Mahé, 2003).

a- Principe

La Voltampérométrie cyclique permet de connaître le comportement d'un système redox, est une méthode potentiodynamique très utilisée en électrochimie (Can et *al.*, 2014). Elle apporte par une expérience simple et rapide de nombreuses informations sur le comportement du système redox fixé à la surface de l'électrode. Cette méthode consiste à appliquer à l'électrode un potentiel variant linéairement en fonction du temps par rapport à une électrode de référence (Shah, 2010).

Où : $E = E_i + \nu t$

E : potentiel de l'électrode indicatrice (*volt*).

E_i : potentiel initial appliqué à l'électrode.

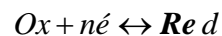
ν : vitesse de balayage, $\nu = dE/dt$ (v/s).

t : temps (s).

Le principe général de cette méthode est l'obtention d'une réponse (le courant) à l'excitation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant un balayage de potentiel.

Dans la voltampérométrie cyclique, la diffusion est le seul mode de transport mis en jeu pour les substances actives, la migration est toujours assurée par un électrolyte support (Lacombe, 2007). Elle permet d'apprécier le degré de réversibilité du processus électrochimique en appliquant un signal triangulaire à une électrode immobile dans une solution non agitée (Fananir, 2009). L'allure de la courbe voltampérométrique ainsi que ces principales grandeurs sont représentées sur la figure I.21

D'après le voltamogramme obtenu dans le cas d'un système réversible, on déduit les paramètres i_{pa} et i_{pc} correspondant respectivement au courant de pic cathodique et au courant de pic anodique ainsi que les deux potentiels associés E_{pc} et E_{pa} . Le rapport $[Ox]/[Red]$ à la surface de l'électrode obéit à tout moment à l'équation de Nernst (Shah, 2010) :



$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)}$$

Avec R constante des gaz parfaits, F le Faraday (96485 Coulomb), T la température absolue et E^0 le potentiel standard, (Ox) et (Red) sont respectivement les activités relatives des espèces oxydante et réductrice.

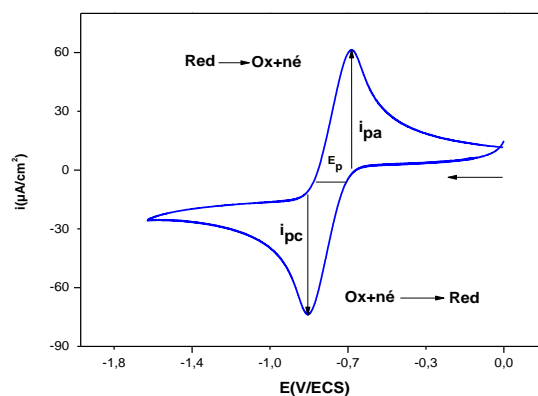


Figure I.21 : Allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques (Original)

i_{pa} , i_{pc} : Courants de pic anodique et cathodique.

E_{pa} , E_{pc} : Potentiels de pic anodique cathodique.

$E_{pa}/2, E_{pc}/2$: Les potentiels à mi- hauteur des pic anodique et cathodique.

ΔE_p : Différence de potentiel entre E_{pa} et E_{pc} .

Au départ, seule l'espèce R_{ed} est en solution, le potentiel initial est choisi pour qu'aucune conversion électrochimique n'ait lieu. Lorsque le potentiel augmente, l'équation de Nernst impose l'augmentation de la concentration en espèce Ox et on observe donc une augmentation du courant anodique au fur et à mesure que la conversion R_{ed} -Ox est fait. Le courant augmente jusqu'à ce que le potentiel devienne suffisamment positif pour que la concentration en R_{ed} soit négligeable à la surface de l'électrode a ce moment, l'intensité diminue car la concentration en R_{ed} est uniquement maintenue par la diffusion depuis la solution (Fenanir, 2009).

La comparaison de l'allure des courbes cathodique et anodique permet de déterminer si l'échange électronique à l'électrode correspond à un processus réversible ou non. Ainsi, lorsque l'échange électronique à l'électrode de travail est suffisamment rapide et que les coefficient de diffusion des formes oxydante et réductrice sont voisins, le couple est électrochimiquement réversible. Dans ce cas, le potentiel standard apparent E'_0 est égal à $(E_{pa}+E_{pc})/2$. La séparation entre les deux pics permet de déterminer le nombre n d'électrons échangé au cours de la réaction. En effet, lors de balayage en potentiels successifs, i_{pc} décroît et i_{pa} croît jusqu'à l'obtention d'un régime stationnaire (Shah, 2010). Dans ces conditions, à 25°C, nous avons :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{0.058}{n} \quad \text{à} \quad 298K$$

d. Electrode redox.

Elle est composée d'un matériau inattaquable (platine, or, carbone, ...) immergé dans une solution renfermant les formes oxydées et réduites d'un couple redox (Lacombe, 2007).

✓ Détection électrochimique :

Les techniques électrochimiques reposent sur la possibilité d'oxyder/réduire la molécule d'intérêt, convertissant ainsi une information chimique (nature de l'espèce et concentration) en information électrique (courant à un potentiel donné). Ainsi, elles offrent la possibilité d'une détection extracellulaire sans contact et avec une résolution spatiale et cinétique en temps réel, comme dans le cas de la synapse artificielle (Sirajuddin et al., 2013).

L'étude des propriétés électrochimiques de l'ADN et de ces médicaments a été effectuée par voltampérométrie cyclique dans une cellule en verre à double paroi thermostatée à 25°C

sous atmosphère. Cette cellule est munie d'un couvercle permettant l'introduction de trois électrodes : Etr, Eau et Eref (Devilliers & Mahé,2003).

L'enregistrement des courbes intensité –potentiel sont assuré par un potentiostat type Voltalab 32 (Radiomètre) assisté par micro-ordinateur.

Pour décrire un voltamogramme, on effectue un balayage de potentiel en modifiant progressivement la valeur de la tension de consigne contrôlée par le potentiostat. La vitesse de balayage ne doit pas être trop élevée pour permettre l'établissement en permanence d'un régime de diffusion aussi voisin que possible du régime stationnaire (Fenanir, 2009).

L'électrode de travail est nettoyée par polissage à l'aide de papier émeri de faible granulométrie. Elle est ensuite rincée avec de l'eau distillée puis avec l'acétone et enfin séché avec du papier Josef, avant chaque manipulation.

II.1. Matériels

II.1.1. Produits chimiques

a. Médicaments

Les différentes expériences de ce travail sont réalisés sur des médicaments qu'ont été fourni par le service d'oncologie et de la chimiothérapie de l'hôpital Ben Omor Djilani, d'El oued.

Un questionnaire a été réalisé avec le médecin spécialiste en cancérologie D^r SAADANI ahmed zaki pour chaque médicament afin d'enregistrer toute les informations nécessaires à notre étude.

Notre choix du médicament a porté sur trois médicaments les plus utilisés en chimiothérapie d'après le service concerné et qui ont un mode d'action différents sur l'ADN

Tableau II.1 : Les différents médicament utilisés dans notre étude

	Cisplatine	Doxoleme	Dacarbazine
Concentration initial	1mg/ml	2mg/ml	10mg/ml
Nom chimique	Cis-diamminedichloroplatinum(ii)	Doxorubicine	5-(diméthylaminohydrazinylid)carboxamide
Masse molaire	300,051 g/mol	543,519g/mol	182,18g/mol
concentration dans la cellule	0,00013 mol/L	0,000147 mol/L	0,00219 mol/L

b. Solutions Tampons

Solution	Compositions
Tampon PH=4	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ ajusté par HCl
Tampon PH=9	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ ajusté par NaOH
Solution de lyse de globule rouge (TLR)	(NH ₄ Cl 155 mM ; NaHCO ₃ 12 mM ; EDTA 0,1 mM)
Solution de lyse de globule blanc (TLB)	(Tris 10 mM à pH=7,4 ; EDTA 100 mM ; NaCl 150 mM)

c. Produits utilisés dans les différents méthodes d'étude :

Les produits utilisés	
Produits	Fournisseur
• Ethanol (C ₂ H ₅ -OH) (95%)	• Sigma ALDRICH

• SDS	• Sigma
• NaHCO ₃	• ALFA AESAR.
• Tris (99%)	• (Sigma)
• EDTA (99%)	• Fluka analytique
• NaCl(99%)	• Sigma
• Isopropanol	• (ALFA AESAR).
• K ₂ HPO ₄ (99%)	• (ALFA AESAR)
• KH ₂ PO ₄ (99%)	• (ALFA AESAR)
• Eau Ultra pure et eau bi-distillé.	• VTRS
• NH ₄ Cl(99%) Production par	• (ALFA AESAR)

II.1.2 Matériel biologique

Le matériel biologique de base pour ce travail est constitué du sang collecté à partir des volontaires saines. L'extraction de l'ADN génomique a été faite à partir de ce sang entier et congelé.

II.1.3 Matériel non Biologique

- Agitateur thermo- programmable .
- Micropipettes ajustables avec des embouts stériles.
- Bain de glace ou blocs de refroidissement pour tubes.
- portoir pour tubes spéciaux de centrifugation.
- Vortex pour mixer L'ADN.
- Centrifugeuse sigma
- Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0. 1 mg)
- Papier abrasif p 4000
- Une cellule électrochimique à trois électrodes
- Un Potentiostat /Galvanostat Model PGZ 301(radiomètre analytical SAS).
- UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU) cuves de Quartz
- Un pH mètre 210 MeterLAB.

II.2.Méthodes

II.2.1. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube à EDTA un tube en présence d'EDTA, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes nucléases, une quantité d'environ 10 ml est prélevé le matin à jeun de préférence et conservés directement dans la glace. Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ADN est extrait des échantillons de sang de manière sécuritaire et constante, tout en éliminant les risques de contamination et la perte de l'intégrité moléculaire et structurale. La constance dans la procédure est importante pour obtenir des résultats de tests comparables et fiables. Les étapes suivantes sont basées sur les procédures suivies par le Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer) du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

II.2.2. Extraction des acides nucléiques à partir du sang total

La plupart des études génétiques nécessitent la disponibilité des acides nucléiques et les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et des méthodes de biologie moléculaire et électrochimique utilisées ultérieurement.

➤ Séparation des leucocytes par hémolyse

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges.

Le sang prélevé est traité selon les étapes suivantes :

- Ajouter 1 volume de solution de lyse des globules rouges par 1 volume de sang (1:1), incubé de 20 à 30 min à 4°C ;
- Centrifuger à 1500 g pendant 15 min à 4°C ;
- Enlever le surnageant;
- Ajouter 1 ml de tampon de lyse des globules rouges au culot, bien agiter par vortex et incubé 20 min à 4°C ;
- Centrifuger dans les mêmes conditions, que précédemment ;
- Éliminer le surnageant et recueillir le culot ;
- Sur ce culot, la même opération est effectuée une autre fois ;
- A la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante.

Au dernier lavage, le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine. Le culot obtenu des leucocytes est utilisé pour l'extraction de l'ADN .

➤ **Extraction d'ADN**

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN, celle adoptée dans notre étude est la technique du relargage des protéines à force ionique élevée : la technique de salting-out (Technique au chlorure de sodium saturé).

- *Lyse des leucocytes.*

- Ajouter au culot 1 ml de solution de lyse de GB et vortexer ;
- Ajouter 150 µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)20% pour détruire la membrane
- Incuber l'extrait à 55°C pendant 1 h 30 sous agitation.

- *Précipitation des protéines*

Un volume de 200 µl de Na Cl à 6M a été ajouté à l'extrait après le refroidissement; La suspension obtenue est vortexée vigoureusement jusqu'à avoir un aspect laiteux. Cette dernière est par la suite centrifugée 10 mn à 13000 trs/mn afin de précipiter les protéines. On obtient ainsi une phase inférieure organique contenant les débris (protéines, lipides...), une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN et l'interface contient en majorité des protéines et peu l'ADN. Le surnageant, contenant l'ADN dispersé, est récupéré dans un tube de 5 ml propre.

- *Précipitation de l'ADN*

Un volume égal d'isopropanol à haute force ionique (99%) a été ajouté au surnageant récupéré précédemment. On laisse l'ADN se précipiter par agitation douce en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une méduse; on récupère l'ADN dans un tube en verre (5 ml) ; la méduse d'ADN ainsi condensée est lavée 3 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels : a chaque lavage, ajouter 1 ml l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sel. cependant, l'éthanol peut fausser les analyses réalisées sur l'ADN ainsi extrait. on laisse donc le tube ouvert toute la nuit a température ambiante pour que l'éthanol s'évapore et la pelote séchée.

- *Dissolution de l'ADN*

Quand l'ADN est en pelote sèche, il ne peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire. On doit donc réhydrater l'ADN dans un volume d'eau distillée stérile qui sera choisi en fonction de la taille de la méduse. Cette solubilisation nécessite une agitation

continue pendant une nuit à 42 °C ; L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. Après dissolution complète, la DO de la solution d'ADN obtenu est mesurée à 260 nm et à 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait. L'ADN dissout peut être conservé à +4°C pendant quelques jours ou à - 20°C pour une conservation à plus long terme. D'ailleurs, l'ADN pure se conserve à - 20 °C, plus de 10 ans.

➤ **Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de sa qualité.**

L'estimation de la quantité et la qualité d'ADN étaient indispensables après son extraction. Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN.

L'estimation de la DO se fait dans une cuve en quartz contre de l'eau distillée à 260 nm et 280 nm afin de pouvoir calculer le rapport DO_{260} / DO_{280} , ce rapport renseigne sur le degré de pureté de l'ADN et sa contamination éventuelle par des protéines. Un rapport compris entre 1.6 et 2 indique que l'ADN est propre (Sirajuddin et *al.*, 2013).

Les concentrations d'ADN a été estimées à 260 nm Selon La loi de Beer Lambert

➤ **Préparation de l'ADN dénaturé (monobrin)**

La solution de ADN préparé précédemment dans l'eau bouillante 90°C pendant 30min ,tout de suite après transférer dans l'eau glacé (choc thermique), après 30min dans la glace, l'ADN naturel double brins vas être dénaturé en simple brins (séparation de deux brins de ADN) (Bao-Xian et *al.*, 2003).

II.2.3.Les différents méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-médicament

Plusieurs méthodes pour l'étude de des paramètres d'interaction entre les substances bioactifs sont utilisés actuellement. Nous avons deux méthodes les plus sensibles, les méthodes spectrophotométriques dans l'UV et le visible sont un premier mode de détection, mais les mesures les plus délicate requièrent le plus souvent les méthodes électrochimiques qui sont très utiles dans ce cas. L'électrochimie offre de nombreuses possibilités dans le choix de la méthode pour la mesure des paramètres d'interaction.

II.2.3.1.Analyse spectroscopique UV-Visible

Les méthodes spectrophotométriques dans UV- visible requièrent le plus souvent un conditionnement et un traitement des échantillons à analyser qui impliquent des réactions chimiques avant la détection Les données acquises permettent ainsi une étude d'interaction (Lacombe, 2007).

a-Protocole expérimentale

- **Appareillage**

Le test est réalisé grâce au spectrophotomètre de type UV visible SHIMADZU 1800 lié à un ordinateur doté avec un logiciel de visualisation et acquisition des données (Logiciel UV probe Spectrum), La réaction se fait dans des cuves en quartz, l'appareil contient double emplacement des cuves en quartz, une pour le blanc (solution tampon approprié) comme référence et le deuxième pour l'échantillon (médicament seul ou avec l'adduit d'ADN).

- **Échantillon**

Les solutions tampons sont préparés à l'avance, les médicaments étudiés ainsi que les différentes concentrations de ADN sont stockés à +4°C. toutes les concentrations sont calculés par rapport au volume de cuve (2ml)

- **Déroulement**

1. Allumer le spectrophotomètre à l'avance, attendre que l'appareil se mette en route et attendre qu'il ait fini sa phase d'initialisation, connecter l'appareil au port série de l'ordinateur
2. Appuyez sur **Entrer** puis **F4** pour être connecté avec l'ordinateur
3. Ouvrir le module d'acquisition Via Spectrum et suivre les instructions de logiciel et cliquez sur connecter.
4. Choisir le mode lecture Absorbance et choisir le domaine de la longueur d'onde (plage spectrale 200-900nm correspond à l'étude de notre échantillon).
5. Mettre le blanc (2ml de tampon approprié selon le pH choisi) dans les deux cuves puis dans leur emplacement et cliquer sur START.
6. Cliquez sur Auto Zéro pour éliminer le bruit de fond.
7. Cliquez sur Baseline pour éliminer les pics non désirés.
8. Puis clic sur Start pour confirmer que le blanc est bien nul et aucun pic apparaît.
9. Ensuite Lire la DO des échantillons en ajoutant une concentration précise du médicament, en appuyant sur START, une fois les données acquises, sauvegarder les pics.
10. Ajouter ensuite les différentes doses d'ADN, à chaque fois sauvegardez les données acquises après avoir obtenu le spectre.
11. Traitez les données avec le logiciel d'analyses Origin8 afin de déterminer les paramètres d'interaction ADN-médicament ensuite à l'aide de pack office Excel 2007.



Figure II.1 : Spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800).

II.2.3.2.Méthode électrochimique

La mise en place d'un système de mesures électrochimiques n'est pas, en elle-même, particulièrement compliquée et quelques conseils peuvent suffire pour réaliser un montage expérimental connu. La réelle complexité réside dans l'adaptation d'un système de mesure à l'objet mesuré(Lacombe, 2007). Il s'agit alors de bien appréhender les techniques de mesure pour les utiliser à bon escient. Nous introduirons ici quelques notions fondamentales qui nous permettront de comprendre et d'optimiser l'intégration de mesures électrochimiques dans nos systèmes.

Protocole expérimental

- **Appareillage**

La voltamétrie cyclique est réalisée à partir d'un potentiostat Galvanostat Model PGZ 301(radiomètre analytique). Les voltamogrammes sont enregistrés dans une cellule de mesure à trois électrodes(Shankara et *al.*, 2008) :

- ✓ Une électrode en carbone vitreux, surface 3 mm^2
- ✓ Une électrode de référence Hg/HgCl₂/KCl saturé (3 mol L^{-1}).
- ✓ Une électrode auxiliaire en platine diamètre 3 mm^2

Tous les potentiels sont donnés par rapport à l'électrode de référence.

- **Echantillon**

Le travail est effectué sur quatre médicaments cités ci-dessus. L'ADN extrait par la méthode NaCl saturé et conservé dans un congélateur à -4°C est Décongelé à température

ambiante. Les échantillons d'ADN devraient être dilués pour atteindre une concentration comprise entre 1 à 18 μM .

- **Préparation du milieu réactionnel**

Le milieu réactionnel de chaque manipulation comprend tous les constituants nécessaires à la réalisation d'une cellule électrochimique .

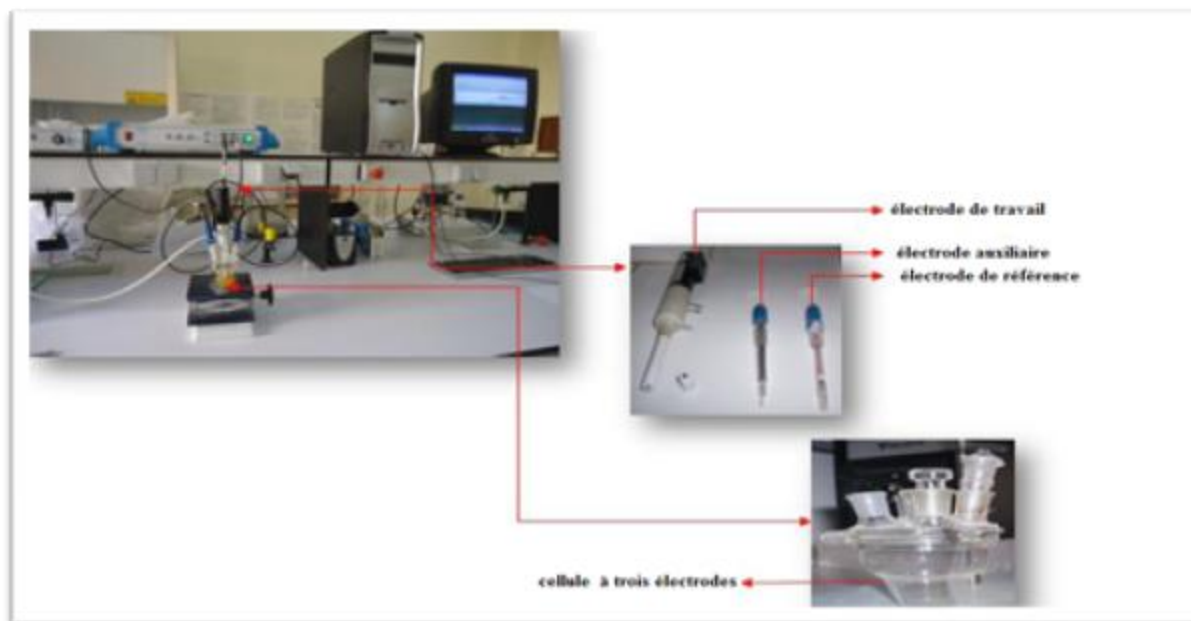


Figure II.2 : Dispositif expérimental voltampérométrique

- **Déroulement**

1. Allumer le potentiostat à l'avance.
2. Préparer l'électrode de travail (carbone vitreux), l'auxiliaire et l'électrode de référence
3. L'électrode de travail en carbone vitreux sera nettoyer avec le papier abrasif avant toute mesure électrochimique.
4. Programmer la voltamaster 4 sur voltamétrie cyclique en déterminant la vitesse de balayage, domaine de balayage, nombre de cycle, température 25°C .
5. Préparer les surfaces de travail en les désinfectant avec de l'eau de javel à 10%.
6. Préparer la cellule électrochimique (25 ml de tampon a pH approprié), placer les trois électrodes dans la cellule puis faire un voltamogramme qui doit être nulle (blanc) afin de vérifier que la cellule ne contient pas de débris.
7. Injecter ensuite une concentration précise selon le médicament dans la cellule, bien mélanger et tracer les pics à différents vitesses de balayage.

-
8. Injecter successivement l'adduit d'ADN ($25 \times 10^{-6} \mu\text{M}$) à la cellule électrochimique à l'aide d'une seringue 1 ml, Bien mélanger en évitant la formation de bulles d'air.
 9. Le balayage successif enregistré dans le même domaine de potentiel de chaque échantillon (médicament + les différents doses d'adduit d'ADN, à différentes vitesses de balayage allant de 100mv à 400mv.
 10. Vérifier que les voltamogrammes de nos échantillons sont bien tracés et enregistrer.
 11. Fermer l'appareil, nettoyer la cellule et l'électrode de travail à l'eau distillée puis de l'acétone pour éliminer toute trace de médicament et ADN.
 12. Calculer les différents paramètres électrochimiques (densité et potentiel du courant anodiques et cathodiques) à l'aide d'un logiciel (ORIGIN8).

- **Les logiciels et calculs statistiques**

Tous ces paramètres ont été calculés par le Logiciel Microsoft office Excel 2007. Les voltamogrammes sont visualisés par un logiciel voltaMaster4 version 7.08 (*logiciel* d'acquisition de données électrochimique), les spectres aussi sont obtenus par un logiciel UV-prob spectrum.

Les valeurs obtenues sont prises par les courbes des pics et voltamogrammes obtenues par un logiciel OriginPro 8 (*Logiciel* de traitement et d'analyse de données scientifiques) ainsi que pour les droites de régression et les facteurs de corrélation.

III.1. Quantification de la concentration d'ADN

III.1. 1. Spectres d'absorption des acides Nucléiques

Le spectre d'absorption UV-Visible de ADN présente une bande d'absorption maximale autour de 260nm, cela résulte de l'existence de groupement chromophorique des purine (Adénine et Guanine) et pyrimidine (Thymine et Cytosine) et un signal croissant à $\lambda < 220$ nm responsable des transitions électronique (**Fig. III.1**).

Ces transitions électronique peut être dû aux poids moléculaire du coefficient d'extinction molaire qui est de l'ordre de $10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, la technique qui permet de déterminer la concentration molaire de ADN est basé sur la mesure de la densité optique à 260nm, le rapport d'absorption $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ peut donner une description sur la pureté de l'ADN, (Sirajuddin et al.2013) celui-ci doit être compris entre 1.6-2 pour avoir un ADN libre des protéines.

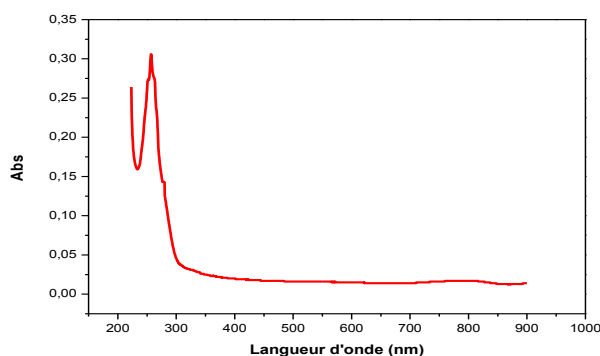


Figure III.1 : spectre d'absorption ADN extrait a partir du sang

Le **tableau III.1** présent les valeurs de DO à 260 nm et 280nm ainsi que le rapport de pureté. En effet, le dosage des échantillons d'ADN à 260nm donne en moyenne une concentration comprise entre 43 et 224 μM , sachant que la pureté de nos échantillons d'ADN (Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}} / \text{DO}_{280\text{nm}}$) est égal à 1.836 en moyenne.

Tableau III.1 : représentation des résultats des ratios $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$, lors de la purification des ADN extrait de leucocytes

Longueur d'onde (nm)	D. O. ADN		
	260	0.281	0.563
280	0.142	0.318	0.946
Ratio = $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$	1.97	1.77	1.86

III.1.2. Spectres d'absorption d'ADN dénaturé

Les résultats montrent que l'absorbance de l'ADN nature est moins que l'absorbance de l'ADN dénaturé. En effet, lorsque le double brin de l'ADN se transforme en simple brin, pour lequel l'absorptivité molaire (ϵ) est beaucoup plus élevée que celle de l'ADN à double brin (Pottier, 2003). Alors que l'absorptivité molaire augmente, l'absorbance (densité optique) augmente certainement (loi de Beer-Lambert).

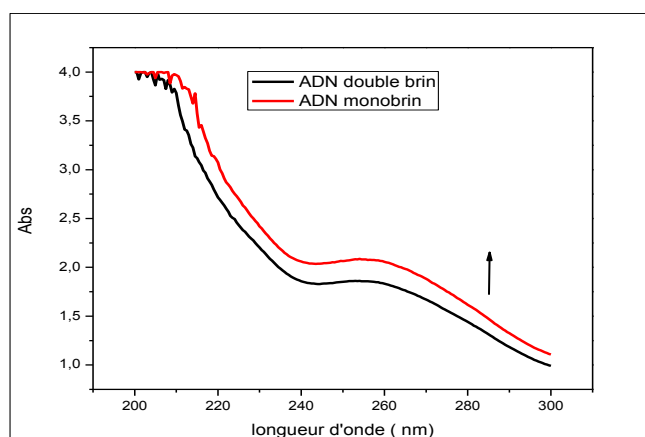


Figure III.2 : spectre d'absorption d'ADN monobrin

III.2. Etude de l'interaction ADN-Médicament par spectroscopie UV-Visible

L'étude de l'interaction médicament-ADN pourrait être déterminée par le changement d'absorbance de médicament ou l'ADN. Généralement les molécules utilisées comme ligands montrent une plage d'absorbance dans la région visible, cela peut faciliter la détermination des paramètres d'interaction par la comparaison de la position de pic du médicament libre dans la solution avec celui lié avec de l'ADN (Nahid et al. 2014).

III.2.1. Détermination Spectroscopique de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec l'ADN, l'absorbance et la longueur d'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition de l'ADN. La variation d'absorbance et de longueur d'onde peut être utilisée pour la détermination des paramètres de liaison. Il est bien connu dans la littérature scientifique que les techniques spectroscopiques UV-visible sont particulièrement utilisées pour l'étude de l'interaction des ligands comme les médicaments avec l'ADN.

Le changement de la variation d'absorbance de même pic en augmentant la concentration de ADN, est exploité par l'évaluation de la constante de liaison a travers d'après l'équation de Benesi-Hildebrand (1) suivante (Li et *al.*2005 ; Aslanoglu, 2006)

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} \frac{1}{K [DNA]} \quad (1)$$

où A_0 est l'absorbance du composé libre, A l'absorbance de l'adduit, ε_0 et ε sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire.

La constante de liaison, K est évaluée à partir du rapport pente/interception du tracé du terme $A_0 / A - A_0$ de l'équation ci-dessus en fonction de $1/[DNA]$.

Dans ce qui suit, les résultats de mesure des constantes de liaison K et des énergies libres de liaison ΔG des adduits médicament-ADN obtenus par spectroscopie ont été validés par la l'électrochimie. Ces deux paramètres ont été déterminés par l'étude de la variation d'absorbance médicaments en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN. Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisée par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans une solution tampon de phosphate 0.2 M à différentes pH, la gamme des longueurs d'ondes balayée était de 200 à 900 nm.

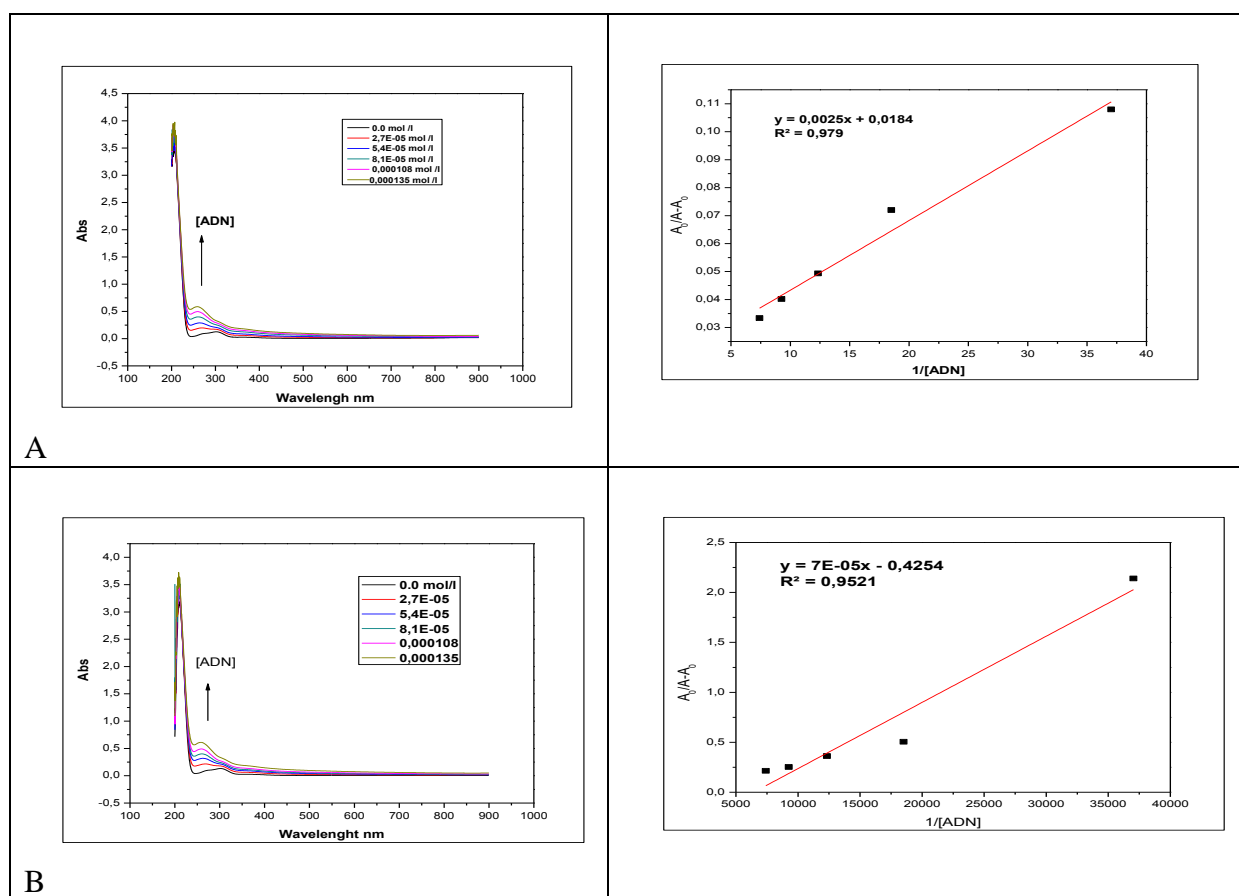
Les spectres électroniques à pH = 4 en absence d'ADN sont caractérisé, dans la gamme des longueurs d'onde étudiée, par une bande d'adsorption stable et bien définit. Les bandes d'absorption pour le Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme ont été apparus à 298.3, 323.1 et 485.4 nm respectivement, les bandes d'absorption associées à ces longueurs d'onde sont respectivement égale à 0.126, 2.464 et 2.680. En revanche à pH=9 les bandes d'absorption pour les mêmes médicaments ont été observé à des longueurs d'ondes : 303.9, 331.5 et 499.64 nm respectivement , qui correspondent a des absorbances égale à 0.148 , 1.628 et 2.108.

III.2.1.1. Etude de l'interaction ADN-Cisplatine par spectroscopie électronique

La figure III.3 ci-dessous présente la variation de l'absorbance de Cisplatine en fonction de la concentration d'ADN ajoutée. Les spectres électroniques (Fig.III.3) révèlent que quelque soit la quantité d'ADN ajoutée, il y a toujours une augmentation de l'absorbance moléculaire accompagnée d'un déplacement de longueur d'onde vers les valeurs les plus forte.

Tableau III.2 : valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction du Cisplatin avec l'ADN à partir des données spectrophotométrique UV-Vis à pH=4 et pH=9

Adduit	pH	1/[ADN]	A/(A ₀ -A)	K (mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)
Cisplatine-ADN	4	37037,037	0,107	9,2x 10 ³	-22,629
		18518,518	0,071		
		12345,679	0,049		
		9259,259	0,040		
		7407,407	0,033		
	9	37037,037	2,139	6,07x 10 ³	-21,600
		18518,518	0,505		
		12345,679	0,362		
		9259,259	0,252		
		7407,407	0,214		
		37037,037	2,139		

**Figure III.3** : Spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Cisplatin en présence de doses augmentées d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration de l'ADN : **A. PH=4, B. PH=9.**

III.2.1.2. Etude de l'interaction ADN-Dacarba/Doxoleme par spectroscopie électronique

Les résultats de cette étude montrent une diminution de pic spectroscopique en ajoutant des doses augmentés de ADN dans la solution de médicament quelque soit la dose d'ADN ajouté accompagnée d'un déplacement de longueur d'onde vers les valeurs les plus faibles. cela s'explique par l'interaction entre les molécules du médicament et de l'ADN.

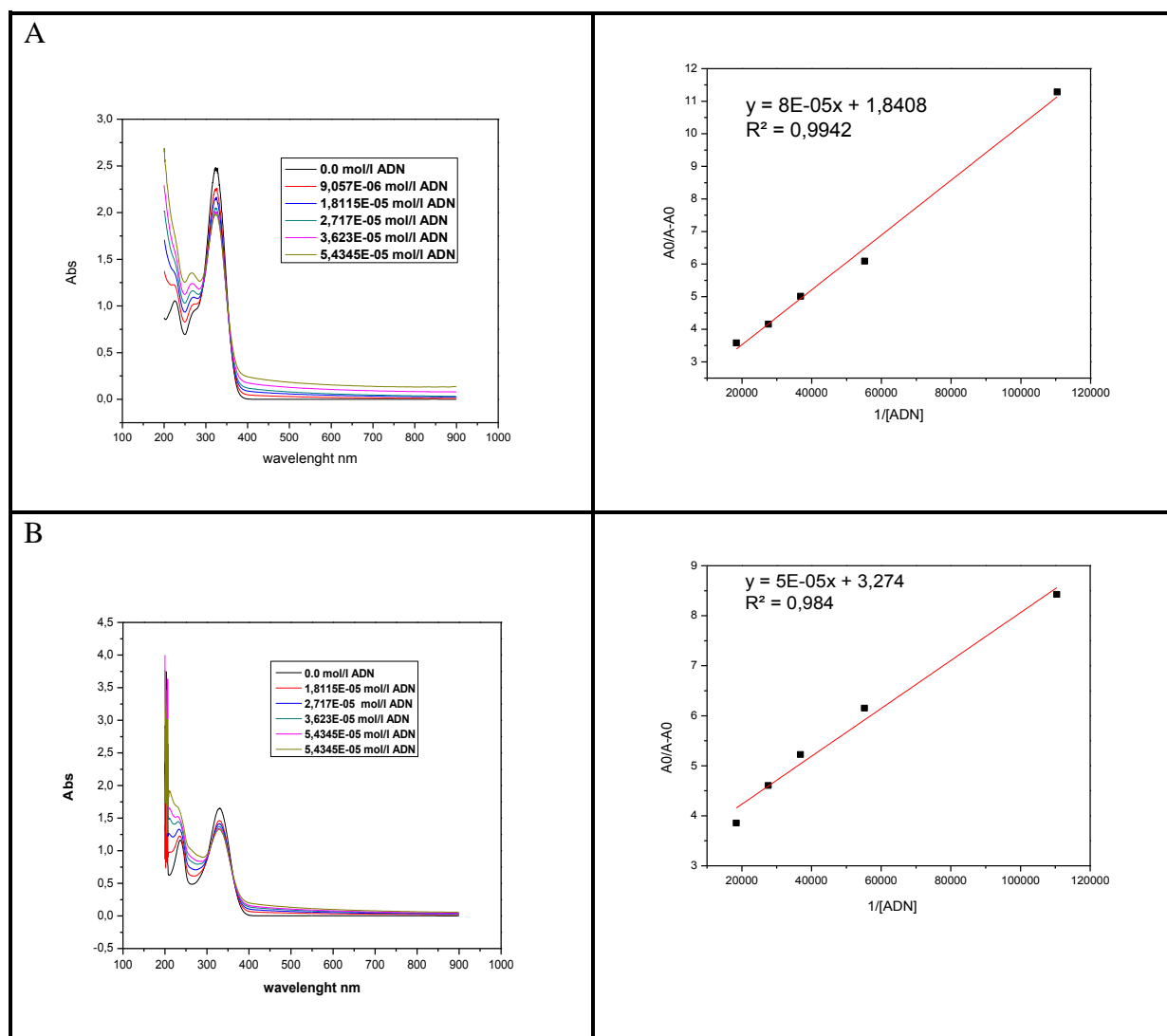


Figure III.4 : Spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Dacarbazine en présence des doses augmentées d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration de ADN : **A. PH=4, B. PH=9.**

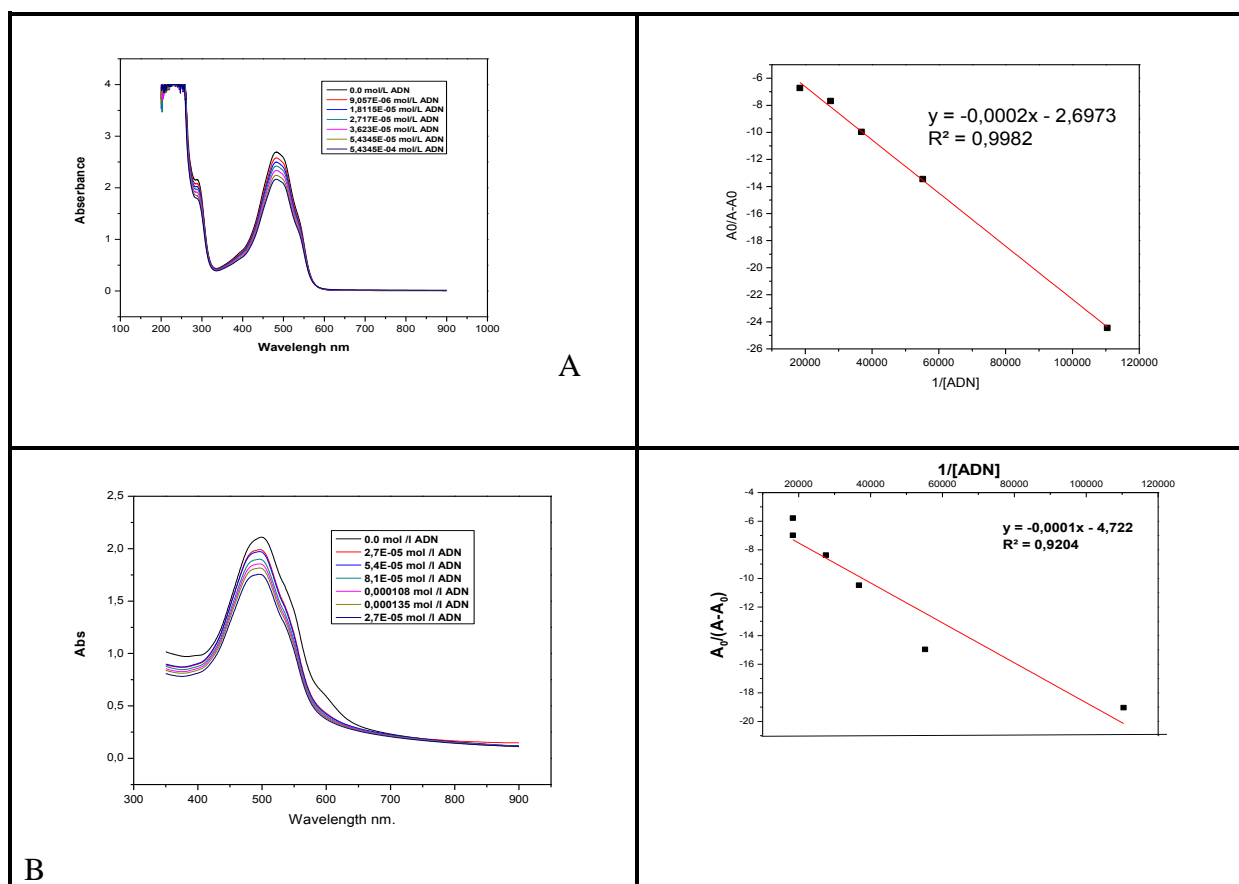


Figure III.5 : spectre d'absorption UV-Vis de l'adduit Doxolime en présence des doses augmentés d'ADN ainsi que la droite de régression de l'absorbance en fonction de l'inverse du concentration d'ADN : **A.** pH =4, **B.** pH =9.

Tableau III.3 : valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction du médicament avec l'ADN à partir des données spectrophotométrique UV-Vis à pH=4 et pH=9

Adruit	pH	1/[ADN]	$A_0/(A-A_0)$	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Dacarbazine-ADN	4		0	2,3x10⁴	-24,902
		110411,83	0,2		
		55202,87	0,3465		
		36805,29	0,4085		
		27601,43	0,4765		
		18400,95	0,5365		
	9		0	6,54x10⁴	-27,49
		500000	0,173		
		250000	0,228		
		166666,67	0,262		
		125000	0,291		
		100000	0,336		
Doxoleme-ADN	4		-24,45	1,34x10 ⁴	-23,570
		110411,83	-13,45		
		55202,87	-9,963		
		36805,29	-7,685		
		27601,43	-6,725		
		18400,95			
	9		-19,039	4,72x10 ⁴	-26,684
		110411,83	-14,962		
		55202,87	-10,47		
		36805,299	-8,379		
		27601,435	-6,982		
		18400,956	-5,781		

III.3. Etude électrochimique de l'interaction ADN- Médicament

III.3.1. Etudes voltamétriques d'interaction ADN-Cisplatine

Le comportement anodique du médicament Cisplatine a été étudié par voltamétrie cyclique dans une solution tampon à pH = 4 et 9, la fenêtre du potentiel était du -3.0 à 2.5 V dans la direction de balayage positif avec une vitesse de balayage égale à 0.4 V.s⁻¹. Les voltamogrammes cycliques étaient initialement débutés à -3.00 V et inversés à 2.50 V.

Deux pics anodiques ont été observés à 0.75 V et 1.55 V à pH=4 et 1.088V à pH=9, en renversant la direction de balayage de potentiel deux autres pics cathodiques s'apparaissent à -0,81 V à pH =4 et - 1.14V et -2.007V à pH=9, (**figure III.6**).

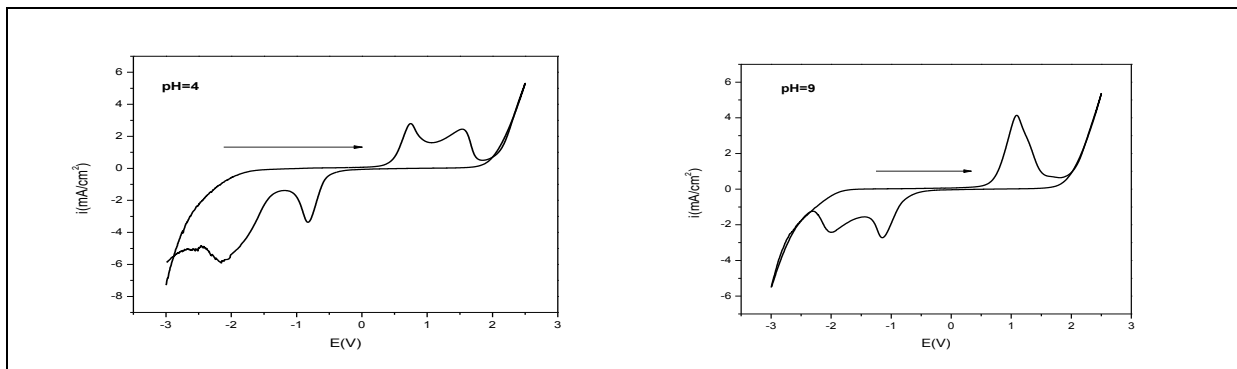


Figure III.6. Voltammogramme cyclique de médicament Cisplatine (0,00013mol/l) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.

En ajoutant 16 μL d'ADN à pH4 et 12 μL à pH9, le potentiel des pics anodiques et cathodiques a été décalé par ΔE vers les valeurs du potentiel le plus positives associées avec une augmentation significative du courant de pic anodique et cathodique Δi_{p_a} , cela confirme l'interaction du médicament Cisplatine avec l'ADN.

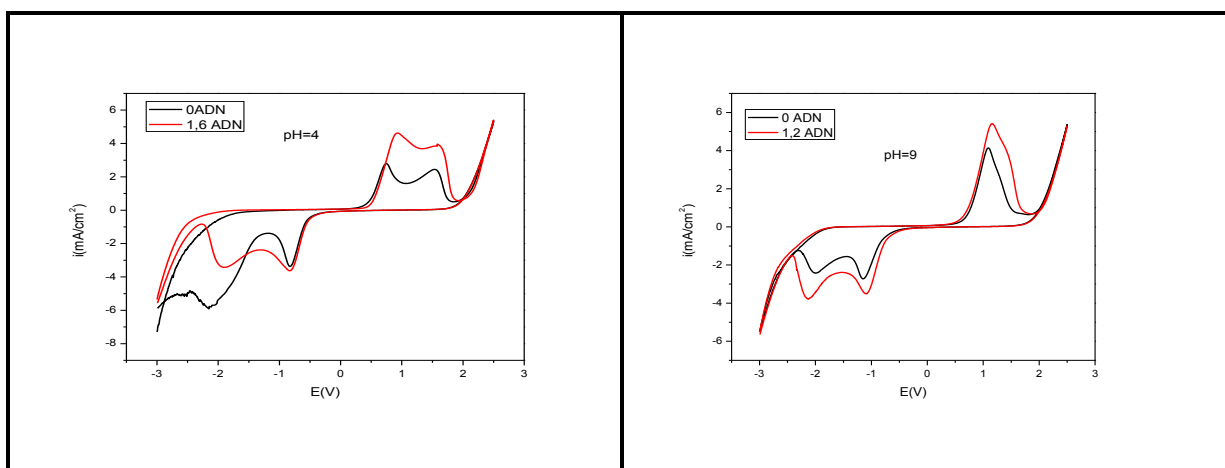


Figure III.7. Voltammogrammes cycliques de médicament Cisplatine (0,00013mol/l) (ligne noire) et en présence de 16 et 12 μL d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.

Les valeurs de potentiel de pics anodiques sont tabulées dans le **tableau III.4**

Tableau III.4. Potentiel et courant des pics anodiques et cathodiques de la forme non lié du médicament Cisplatine et celui lié avec ADN

pH	V (ml)	E_{pa1} (mV)	ip_{a1} (mA.cm ⁻²)	E_{pa2} (mV)	ip_{a2} (mA.cm ⁻²)
4	0	1560	2,37	730	2,68
	1,6	1580	3,87	910	4,54
9	0	1090	4,05	-	-
	1,2	1159	5,48	-	-

Les valeurs de ΔE et celles de Δip_a sont regroupées dans le **tableau III.5**.

Tableau III.5 : Le décalage anodique et la diminution du courant des pics anodiques causés par l'addition d'ADN

pH	Adduit	ΔE_{pa1} (mV)	Δip_{a1} %	ΔE_{pa2} (mV)	Δip_{a2} %
4	Cispl –ADN	20	38,7596	180	40,969
9	Cispl –ADN	69	26,0948		

L'augmentation de courant de pics anodiques et cathodiques est attribuée à la séparation de deux brin de DNA suite à la formation de l'adduit CisPt-ADN qui se diffuse plus rapidement (Sirajuddin et *al.*, 2013).

L'augmentation du courant des pics anodiques en présence d'ADN peut être utilisée pour le calcul de la constante de liaison, tandis que le déplacement de valeurs de potentiel des pics peut être exploité pour la détermination du mode d'interaction.

III.3.1.1. Rapport des constantes de liaison

Le mode d'interaction Cispt-ADN peut être évalué à partir de la variation du potentiel formel. En général, le décalage anodique du potentiel formel (déplacement vers les valeurs les plus positives) est causé par l'alkylation du médicament étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN (Aslanoglu, 2006).

Ainsi, le décalage positif du potentiel de pic (décalage anodique) dans le comportement de CV du médicament Cisplatine peut être attribué à la liaison chimique formée entre la forme anionique du médicament Cisplatine chargé positivement avec l'ADN polyanionique. Le

décalage de potentiel de pic vers les valeurs les plus positives indique en outre que l'anion Pt(II) du médicament est plus difficile de s'oxyder en présence d'ADN parce que sa forme oxydée est moins fortement lié à l'ADN que sa forme réduite (forme neutre). Pour un tel système, où les deux formes du médicament réagissent avec l'ADN, le schéma **III.1** ci-dessous peut être appliqué (Chu et *al.*, 1998)

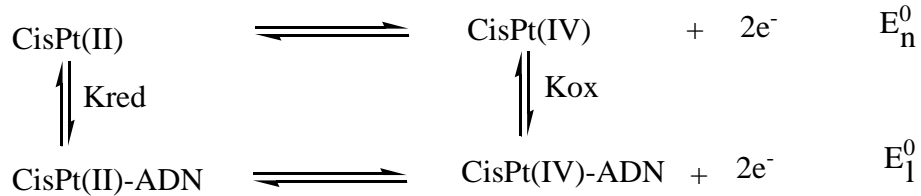


Schéma **III.1** : Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de Cisplatine libre et celui lié à l'ADN

Avec E_n est le potentiel redox de la forme Cisplatine non liée à l'ADN, E_n^0 est son potentiel redox standard, $[CisPt(IV)]$ et $[CisPt(II)]$, $[CisPt-ADN(IV)]$ et $[CisPt-ADN(II)]$ sont respectivement les concentrations de la forme oxydée et réduite du médicament Cisplatine non lié et celui lié à l'ADN, et K_{ox} et K_{red} sont respectivement leurs constantes de liaison.

L'application de la relation de Nernst au processus électrochimique de la forme non lié avec l'ADN donne la relation 2 suivante (Li et *al.*, 2005)

$$E_n = E_n^0 + 0.059 \log \frac{[CisPt(IV)]}{[CisPt(II)]} \quad (2)$$

Pour la forme liée on obtient la relation 3 suivante,

$$E_l = E_l^0 + 0.059 \log \frac{[CisPt(IV)-ADN]}{[CisPt(II)-ADN]} \quad (3)$$

A l'équilibre on a $E_n = E_l$ et on obtient la relation 4,

$$\Delta E^0 = E_l^0 - E_n^0 = 0.059 \log \frac{K_{red}}{K_{ox}} \quad (4)$$

Les valeurs de déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques et l'augmentation de leurs courants ainsi que le rapport des constantes de liaison sont tabulées dans le tableau III.6.

Tableau III.6. Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel et baisse de courant des pics du médicament CisPt et de l'adduit CisPt -ADN

pH	Adduit	E_{pa1} (mV)	E_{pc1} (mV)	E^0 (V)	ΔE^0 (mV)	K_{red} / K_{ox}
4	Cisplrt	1560	-850	0,355	-	-
	CisPt -ADN	1580	-840	0,37	15	1,7957
9	CisPt	1090	-1170	-0,04	-	-
	CisPt -ADN	1159	-1100	0,0295	69,5	15,06489

L'augmentation du courant de pics anodique et cathodique est attribuée à la dénaturation de la double hélice de DNA en monobrin à la formation de l'adduit CisPt-ADN qui se diffuse plus rapidement. L'augmentation du courant des pics anodique en présence d'ADN peut être utilisée pour le calcul de la constante de liaison, tandis que le déplacement de valeurs de potentiel des pics peut être exploité pour la détermination du mode d'interaction. En effet, La forme oxydée du médicament Cisplatine réagit à pH = 4, 2 fois et à pH=9, 15 fois plus forte que celle de la forme réduite.

III.3.1.2. Constantes et énergies libres de liaison

Les voltamogrammes de la figure III.8 sont enregistrés dans une solution tampon phosphate en présence d'une concentration croissante d'ADN. On remarque que l'addition de l'ADN provoque une augmentation de courant des pics anodiques accompagné d'un déplacement du potentiel des pics vers les valeurs les plus positives.

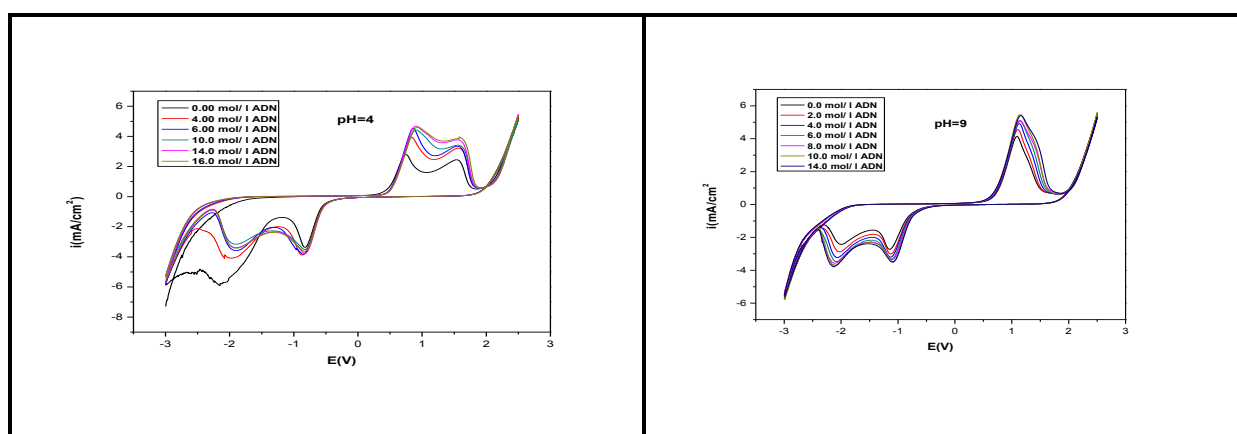


Figure III.8. Voltamogrammes cycliques de médicament Cisplatine (0,00013 mol/l) en présence d'ADN (2,4, 6, 8,10, 12, 14, 16 μ L) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.4 V/s.

Tableau III.7. Paramètres électrochimiques tirés du voltamogrammes de la **figure III.8**

pH	[ADN] (μM)	E_{pa1} (mV)	i_{pa1} ($\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$)	E_{pa2} (mV)	i_{pa2} ($\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$)
4	0	1560	2,31	733	2,62
	4	1578	3,20	847	3,94
	6	1554	3,34	864	4,53
	10	1570	3,40	920	4,38
	14	1584	3,75	890	4,64
	16	1580	3,93	928	4,63
9	0	1090	4,13	-	-
	2	1104	4,53	-	-
	4	1141	4,89	-	-
	6	1157	5,06	-	-
	8	1158	5,10	-	-
	10	1163	5,41	-	-
	12	1159	5,42	-	-

En se basant sur l'augmentation du courant de pics anodiques du médicament Cisplatine suite à l'addition de différentes concentrations d'ADN allant de 2 à 16 μM (figure III.8), la constante de liaison a été calculé selon l'équation 5 (Feng et *al.*, 1997).

$$\log \frac{1}{[\text{ADN}]} = \log K + \log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p} \quad (5)$$

Où $[\text{ADN}]$ est la concentration de l'ADN, K est la constante de liaison, i_0 et i sont respectivement les densités de courant anodiques ou cathodiques en absence et en présence de l'ADN. Les valeurs obtenues sont tabulées dans le tableau III.8.

Tableau III.8. Paramètres numériques de l'équation 4

pH	[ADN] (M)	Log1/[ADN]	$i_{p_{a_1}}$	$i_{p_{a_2}}$	$\log i_p / (i_{p_0} - i_p)$	
					$\log i_{p_{a_1}} / (i_{p_{a_1}} - i_{p_{a_0}})$	$\log i_{p_{a_2}} / (i_{p_{a_2}} - i_{p_{a_20}})$
4	0		2,31	3,20		
	0,000004	5,39794	3,34	3,40	0,5557	0,4749
	0,000006	5,2218	3,75	3,93	0,5109	0,3750
	0,00001	5	2,62	3,94	0,4940	0,3959
	0,000014	4,8538	4,53	4,38	0,4156	0,3611
	0,000016	4,7958	4,64	4,63	0,3848	0,3623
9	0		4,13			
	0,000002	5,6989	5,06		1,054	
	0,000004	5,3979	5,42		0,808	
	0,000006	5,2218	-3,15		0,7356	
	0,000008	5,0969	-3,47		0,7207	
	0,00001	5	-2,84		0,6259	
	0,000012	4,9208	-3,59		0,6234	

Les valeurs des constantes et des énergies de liaison à pH =4.0 et 9 sont calculé à partir du tracé de $\log_1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_p - i_{p_0})$ (Figure III.9), les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau III.9.

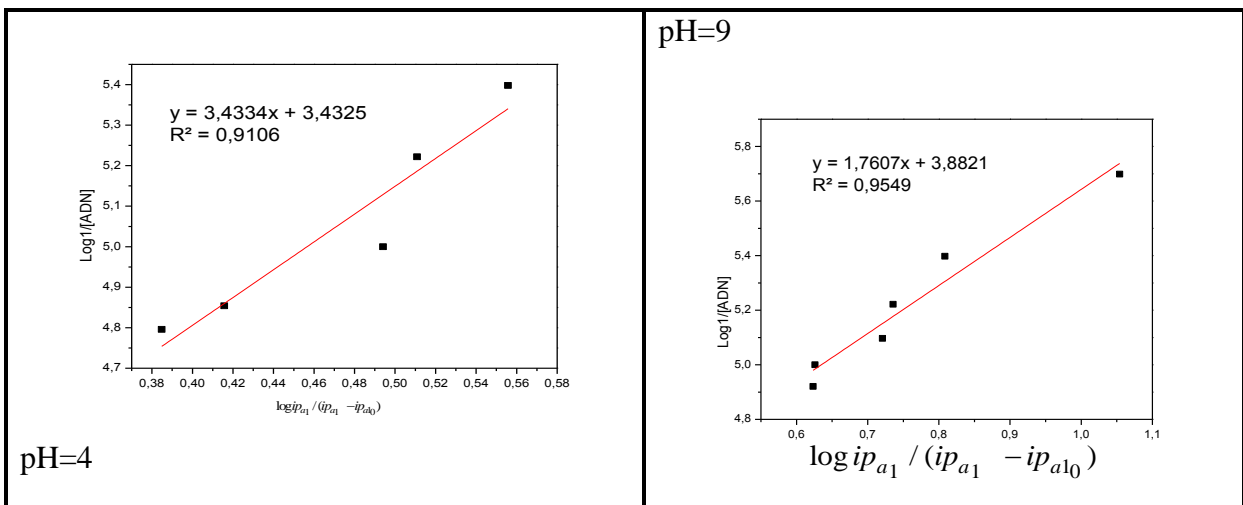


Figure III.9. Tracé du $\log_1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_p - i_{p_0})$ selon l'équation 5

Les valeurs de l'énergie libre de liaison ainsi que celles de la constante liaison de l'adduit CisPt-ADN obtenu à partir du tracé de l'équation 5 sont listées dans le tableau III.9.

Tableau III.9. Constantes et énergies de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_p - i_{p0})$

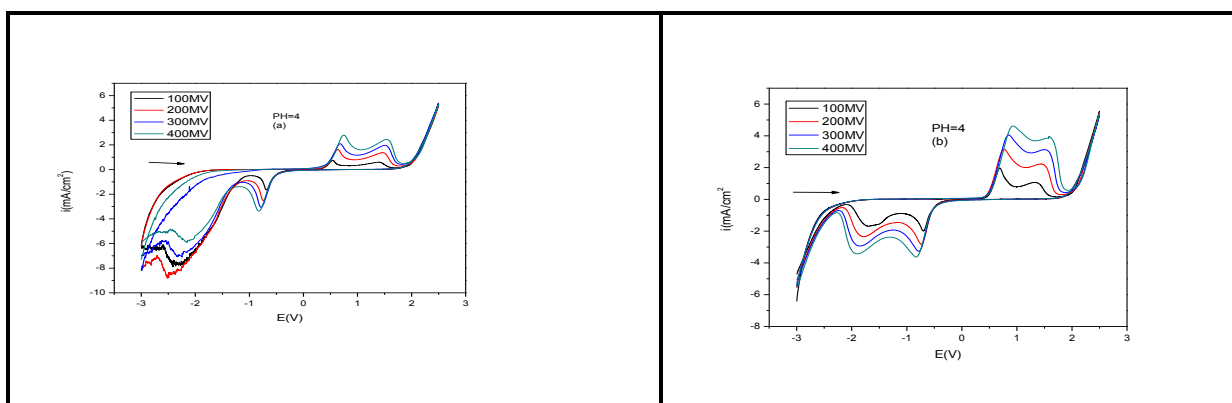
pH	équation	R ²	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
4	$y = 3,433x + 3,432$	0,9106	$2,707 \times 10^3$	-19,595
9	$y = 1,760x + 3,882$	0,9549	$7,622 \times 10^3$	-22,162

Tableau III.10. Comparaison entre K et ΔG de l'Adduit Cisplatine obtenus par CV et UV-Vis

Adduit	pH	K (mol ⁻¹)		ΔG (KJ.mol ⁻¹)	
		Spectro UV-Vis	Electrochimie	Spectro UV-Vis	Electrochimie
Cisplatine	4	$9,2 \times 10^3$	$2,707 \times 10^3$	-22,629	-19,595
	9	$6,07 \times 10^3$	$7,622 \times 10^3$	-21,600	-22,162

III.3.1.3. Coefficient de diffusion

Afin de calculer les coefficients de diffusion du médicament Cisplatine et celui de l'adduit CisPt-ADN, plusieurs voltammogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400 mV/s en présence et en absence d'ADN, les voltammogrammes obtenus sont représentés dans la **figure III.10**, celle-ci présente le comportement électrochimique du médicament Cisplatine et de l'adduit CisPt-ADN à différentes vitesses de balayage. Les voltammogrammes contenaient un couple aux pics redox très stables et très clairs. En outre, cette figure montre clairement que les potentiels de pics ne sont pas sensiblement affectés par la variation de la vitesse de balayage.



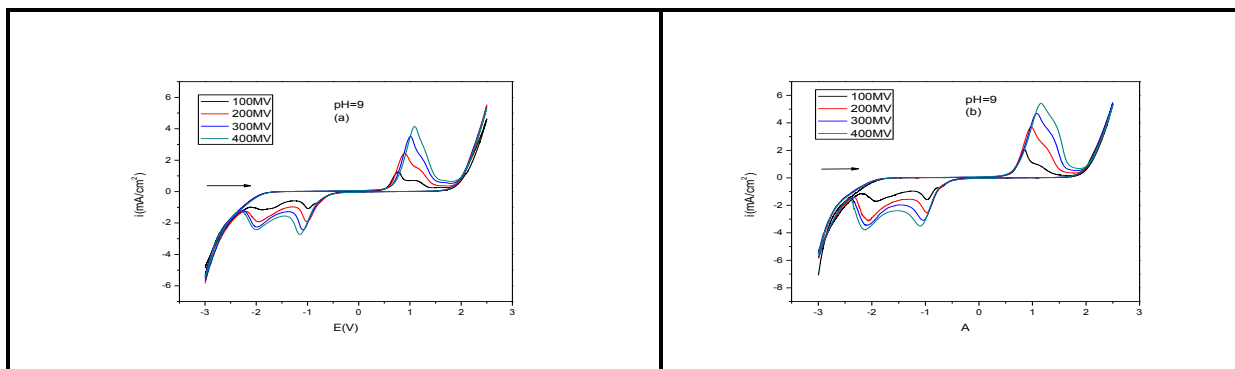


Figure III.10. Succession de voltamogrammes cycliques de 0,00013 mol/l du médicament Cisplatine à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0,1 Vs^{-1} avec un saut de 0,1 Vs^{-1} . Les flèches verticales indiquent l'augmentation de vitesse de balayage

Les résultats tirés des voltamogrammes sont tabulés dans le **tableau III.10**.

Tableau III.11. Courant des pics anodiques et cathodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel.

pH	$\sqrt{v}(\text{V} / \text{s})$	Cisplatine	Cisplatine –ADN
		$i_{p_{a_1}} (\text{mA/cm}^2)$	$i_{p_{a_1}} (\text{mA/cm}^2)$
4	10	0,748	1,934
	14,142	1,509	3,114
	17,32	2,150	3,959
	20	2,791	4,639
9	10	1,170	2,077
	14,142	2,218	3,581
	17,32	3,480	4,543
	20	4,062	5,443

Pour confirmer davantage l'interaction du médicament Cisplatine avec l'ADN, le courant des pics anodiques et cathodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel avant et après l'addition de l'ADN, en utilisant l'équation de Randles–Sevcik (Brett et *al.*, 1993),

$$i = 2,69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Les coefficients de diffusion du médicament Cisplatine et de l'adduit CisPt-ADN ont été déterminés en utilisant l'équation ci-dessus.

Tableau III.12 : Les coefficients de diffusion du médicament Cisplatine et de l'adduit CisPt-ADN

pH	Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
4	CisPt	y = 0,203x - 1,318	0,996	1,94107E-07
	CisPt –ADN	y = 0,271x - 0,749	0,993	3,54829E-07
9	CisPt	y = 0,299x - 1,865	0,989	4,33157E-07
	CisPt –ADN	y = 0,334x - 1,225	0,998	5,40748E-07

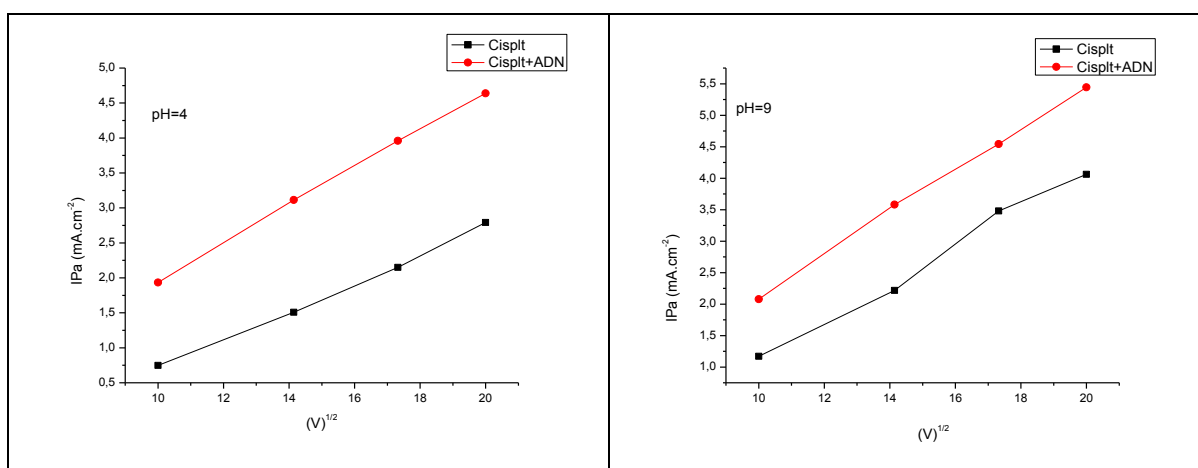


Figure III.11 : Superposition de la tracé de i_{p_a} en fonction de la racine carrée de vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 16 et 12 μM d'ADN (ligne rouge) selon l'équation 6, à pH = 4.0 et 9.0

On remarque que le coefficient de diffusion de l'adduit CisPt-ADN est légèrement inférieur à celui du médicament Cisplatine.

III.3.1.4. Taille des sites de liaison

La taille des sites de liaison du médicament Cisplatine avec l'ADN peut être déterminée à partir les données électrochimiques en utilisant de l'équation suivant (Aslanoglu et *al.*,2005)

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{s} \quad (7)$$

Avec (s) est la taille de site de liaison en termes de paires de bases, C_n est la concentration de l'espèce libre, C_l est la concentration des espèces d'ADN lié, K est la constante de liaison. La concentration des paires de base peut être exprimée en tant que $[ADN]/2$, l'équation précédente peut être écrite comme suit,

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[ADN]}{2s} \quad (8)$$

Le rapport des concentrations C_l / C_n est déterminé à partir de l'équation ci-dessous (Aslanoglu et al.,2004)

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{i_0 - i}{i} \quad (9)$$

Le tracé de l'équation 8 donne une ligne droite, (**figure III.12**)

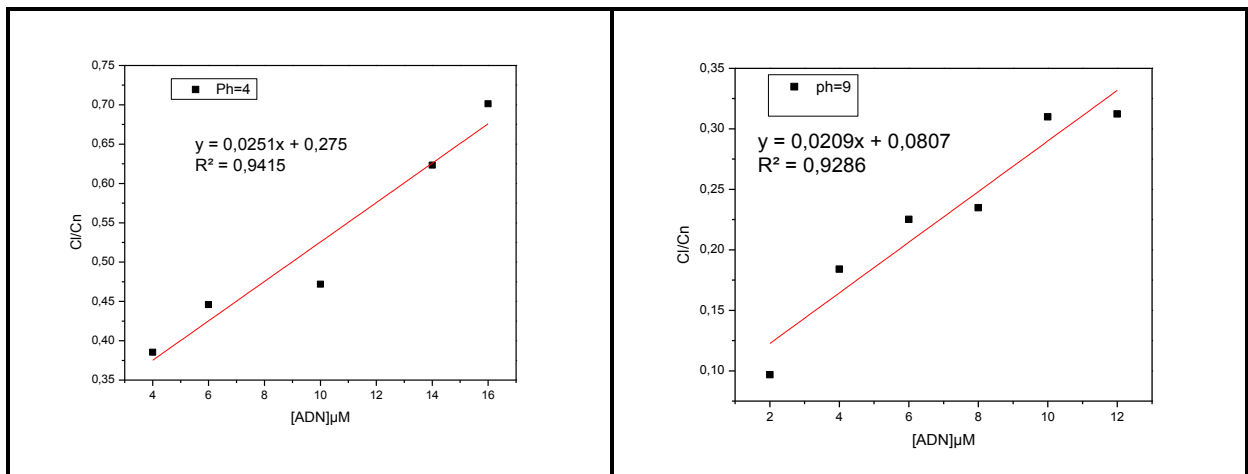


Figure III.12 : tracé de C_l / C_n en fonction de $[ADN]$

La taille des site de liaison déterminée à partir de la pente de la figure III.12 , en mettant :

$$\frac{K}{2s} = \text{pente} \text{ on obtient alors}$$

Tableau III.13. Détermination de la taille de site de liaison entre ADN-Cispt

Adduit	pH	K	pente	S (bp)
Cisplatine	4	$2,707 \times 10^3$	0,0251	0,05392bp
	9	$7,622 \times 10^3$	0,0209	0,1823bp

III.3.2.Etudes d'interaction ADN-médicament par voltamétrie cyclique

III.3.2.1. Etude de comportement de médicament avec de l'ADN**a- Dacarbazine-ADN**

Le comportement anodique du médicament a été étudié par voltamétrie cyclique dans une solution tampon de phosphate 0.2 M à pH = 4 et 9, la fenêtre du potentiel était du -3.0 à 2.5 V dans la direction de balayage positif avec une vitesse de balayage égale à 0.3 V.s⁻¹. Les voltamogrammes cycliques étaient initialement débutés à -3.00 V et inversés à 2.50 V.

Deux pics anodiques ont été observés à 1.69 V et 0.6 V à pH= 4 et 0.768 V à pH=9, en renversant la direction de balayage de potentiel deux autres pics cathodiques s'apparaissent à -0.66 V et -1.92 V à pH=4 et -0.98V et -1.39 à pH=9 , **figure III .13**

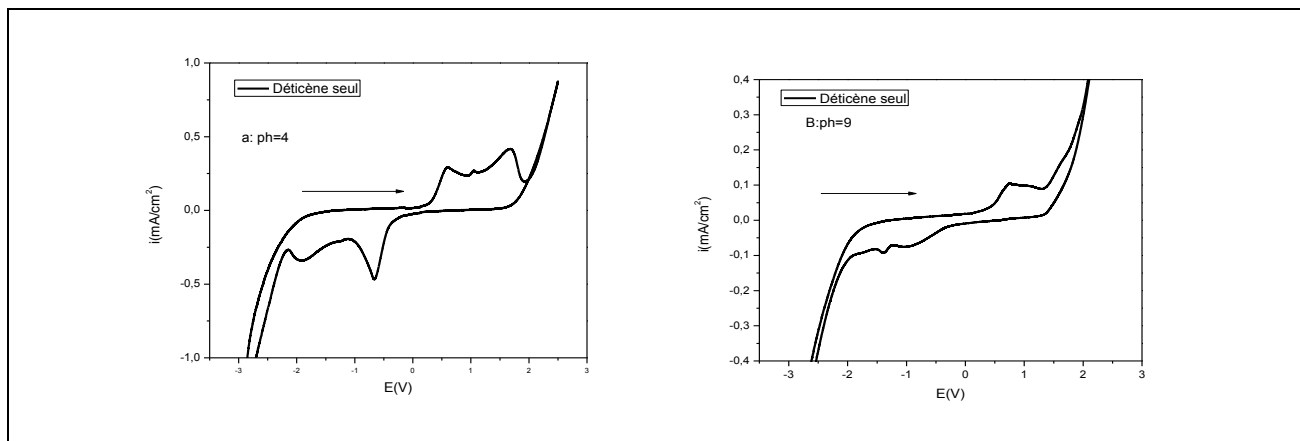


Figure III.13. Voltamogramme cyclique de médicament Dactacazine (0,00219mol/l) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et pH=9 à une vitesse de balayage du potentiel de 300 mV/s.

b-Doxoleme-ADN

Le comportement anodique du médicament Doxoleme a été étudié par voltamétrie cyclique dans une solution tampon de phosphate 0.2 M à pH = 4 et 9, la fenêtre du potentiel était du -3.0 à 2.5 V dans la direction de balayage positif avec une vitesse de balayage égale à $0.4 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les voltamogrammes cycliques étaient initialement débutés à -3.00 V et inversés à 2.50 V. Deux pics anodiques ont été observé à 0.912 V et 1.824 V à pH=4 et 1.576 V à pH=9, en renversant la direction de balayage de potentiel deux autres pics cathodiques s'apparaissent à -2,08 V et -0,956 V à pH =4 et -0,898 à pH=9, (**figure III.14**).

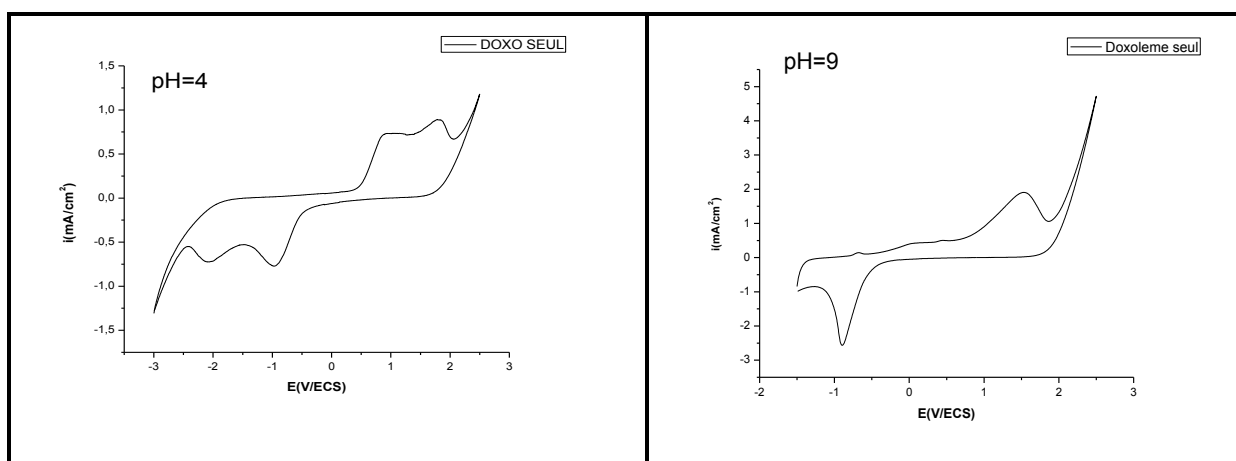


Figure III.14. Voltamogramme cyclique de médicament Doxoleme (2 mg/ml) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.

En ajoutant 18 μL , 10 μL et 6 μL d'ADN, le potentiel des pics anodiques a été décalé par ΔE vers les valeurs du potentiel le plus positives associées avec une diminution significative du courant de pic anodique Δi_{p_a} , cela confirme l'interaction du médicament avec l'ADN.

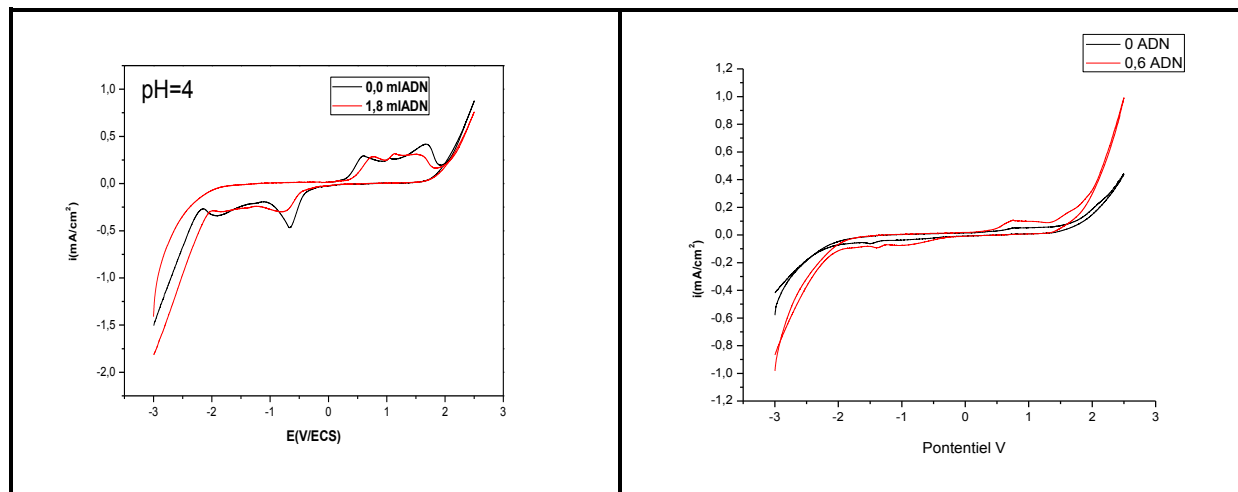


Figure III.15. Voltammogrammes cycliques de médicament Dacarbazine (10mg/ml) (ligne noire) et en présence de 1,8 mL d'ADN a pH=4 et 1 mL à pH=9 (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à une vitesse de balayage du potentiel de 300 mV/s.

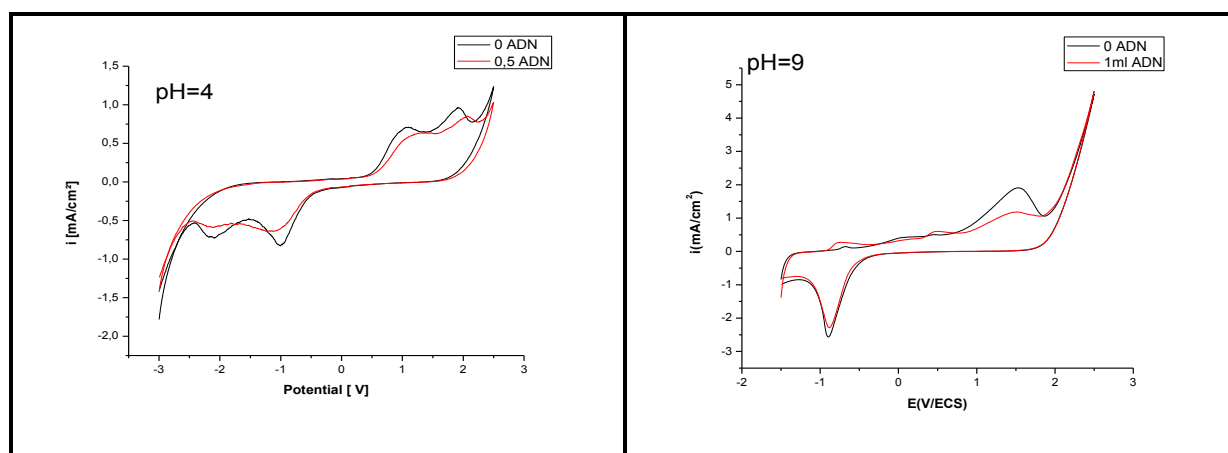


Figure III.16. Voltammogrammes cycliques de médicament Doxoleme (0,00219mol/l) (ligne noire) et en présence de 5 μL et 10 μM d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M à pH = 4 et 9 à une vitesse de balayage du potentiel de 400 mV/s.

Les valeurs de potentiel de pics anodiques sont tabulées dans le tableau III.14

Tableau III.14. Potentiel et courant des pics anodiques de la forme non lié du médicament et celui lié avec ADN

Adduit	pH	V (ml)	E_{pa1} (mV)	ip_{a1} (mA.cm ⁻²)	E_{pa2} (mV)	ip_{a2} (mA.cm ⁻²)
Dacarbazine	4	0	1678.77	0.406	596.96	0.276
		1,8	1632.08	0.29	758.62	0.274
	9	0	747,67	0,102	-	-
		1	848,8	0,046	-	-
Doxoleme	4	0	1925	0,955		
		5	2060	0,84		
	9	0	1550	1,92		
		10	1450	1,15		

Les valeurs de ΔE et celles de Δip_a sont regroupées dans le **tableau III.15**.

Tableau III.15 : Le décalage anodique et la diminution du courant des pics anodiques causés par l'addition d'ADN

Adduit	pH	Adduit	ΔE_{pa1} (mV)	Δip_{a1} %	ΔE_{pa2} (mV)	Δip_{a2} %
Dacarbazine	4	Dacarbazine – ADN	46,69	28,57	161,66	0,724
	9	Dacarbazine – ADN	101,13	54,90		
Doxoleme	4	Doxoleme –ADN	-135	12,042	12,042	12,042
	9	Doxoleme –ADN	100	40,105	40,105	40,105

La baisse de courant de pics anodiques est attribuée à la diminution de concentration en médicament Dacarbazine ou Doxoleme suite à la formation de l'adduit soit Dacarbazine – ADN ou Doxoleme-ADN qui se diffuse plus lentement.

III.3.2.2. Rapport des constantes de liaison

Le mode d'interaction Dacarbazine –ADN ou Doxoleme-ADN peut être évalué à partir de la variation du potentiel formel. En général, le décalage anodique du potentiel formel (déplacement vers les valeurs les plus négatives) est causé soit par l'intercalation du

médicament étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN ou par la l'interaction électrostatique (Aslanoglu, 2006).

Ainsi, le décalage négatives du potentiel de pic anodique dans le comportement de CV du médicament Dacarbazine ou Doxoleme peut être attribué à la liaison formée entre la forme anionique du médicament Dacarbazine chargé positivement avec l'ADN polyanionique. Le décalage de potentiel de pic vers les valeurs les plus positives indique en outre que la molécule du médicament est plus difficile de s'oxyder en présence d'ADN parce que sa forme oxydée est moins fortement lié à l'ADN que sa forme réduite (forme neutre). Pour un tel système, où les deux formes du médicament réagissent avec l'ADN, le schéma III.2 et III.3 ci-dessous peuvent être appliqué .

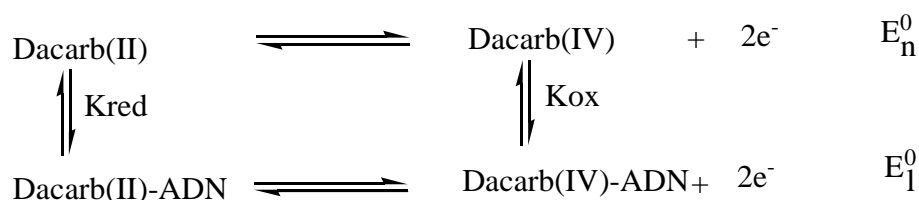


Schéma III.2. Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de Dacarbazine libre et celui lié à l'ADN

Avec E_n est le potentiel redox de la forme Dacarbazine non liée à l'ADN, E_n^0 est son potentiel redox standard, $[Dacar(IV)]$ et $[Dacar(II)]$, $[Dacar-ADN(IV)]$ et $[Dacar-ADN(II)]$ sont respectivement les concentrations de la forme oxydée et réduite du médicament Dacarbazine non lié et celui lié à l'ADN, et K_{ox} et K_{red} sont respectivement leurs constantes de liaison.

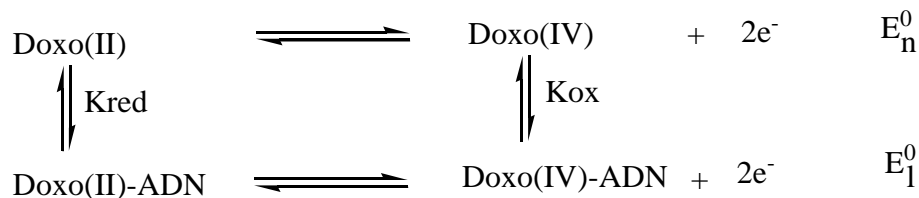


Schéma III.3. Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de Doxoleme libre et celui lié à l'ADN

Avec E_n est le potentiel redox de la forme Doxoleme non liée à l'ADN, E_n^0 est son potentiel redox standard, $[Doxo(IV)]$ et $[Doxo(II)]$, $[Doxo-ADN(IV)]$ et

$[Doxo - ADN(II)]$ sont respectivement les concentrations de la forme oxydée et réduite du médicament Doxoleme non lié et celui lié à l'ADN, et K_{ox} et K_{red} sont respectivement leurs constantes de liaison.

L'application de la relation de Nernst au processus électrochimique de la forme non lié avec l'ADN donne la relation 10 suivante :

$$E_n = E_n^0 + 0.059 \log \frac{[Dacarbazine(IV)]}{[Dacarbazine(II)]}$$

$$E_n = E_n^0 + 0.059 \log \frac{[Doxo(IV)]}{[Doxo(II)]} \quad (10)$$

Pour la forme liée on obtient la relation 11 suivante :

$$E_l = E_l^0 + 0.059 \log \frac{[Dacarbazine(IV) - ADN]}{[Dacarbazine(II) - ADN]}$$

$$E_l = E_l^0 + 0.059 \log \frac{[Doxo(IV) - ADN]}{[Doxo(II) - ADN]} \quad (11)$$

A l'équilibre on a $E_n = E_l$ et on obtient la relation 12 :

$$\Delta E^0 = E_l^0 - E_n^0 = 0.059 \log \frac{K_{red}}{K_{ox}} \quad (12)$$

Les valeurs de déplacement du potentiel des pics anodiques et la baisse de leurs courants ainsi que le rapport des constantes de liaison sont tabulées dans le **tableau III.16**.

Tableau III.16. Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel et baisse de courant des pics du médicament et de l'adduit médicament -ADN

Adduit	pH	Adduit	Epa ₁ (mV)	Epc ₁ (mV)	E ⁰ (mV)	ΔE ⁰ (mV)	K _{red} / K _{ox}
Dacarbazine	4	Dacarbazine	1678.77	-660.9	508.935		
		Dacarbazine -ADN	1632.08	-757.37	437.355	71.58	16,33
	9	Dacarbazine	747,67	-1406,5	-319,35		
		Dacarbazine -ADN	848,7	-1602,84	-377,07	57,72	9,51
Doxoleme	4	Doxoleme	1925	-990	0,467		
		Doxo -ADN	2060	-1200	0,43	0,037	4,321
	9	Doxoleme	1550	-870	0,34		
		Doxo -ADN	1450	-890	0,28	0,06	10,397

La baisse de courant de pics anodique est attribuée à la diminution de concentration en médicament Dacarbazine suite à la formation de l'adduit Dacarbazine-ADN qui se diffuse plus lentement.

La forme oxydée du médicament Dacarbazine réagit à $\text{pH} = 4$, 16 fois plus forte que celle de la forme réduite. et 10 fois plus fort à $\text{pH} = 9$. En revanche, la forme oxydée du médicament Doxoleme réagit à $\text{pH} = 4$ 4 fois et à $\text{pH} = 9$, 10 fois plus forte que celle de la forme réduite.

III.3.2.3. Constantes et énergies libres de liaison

Les voltamogrammes de la **figure III.17** sont enregistrés dans une solution tampon phosphate en présence d'une concentration croissante d'ADN. On remarque que l'addition de l'ADN provoque une diminution de courant des pics anodiques accompagné d'un déplacement du potentiel des pics vers les valeurs les plus négatives.

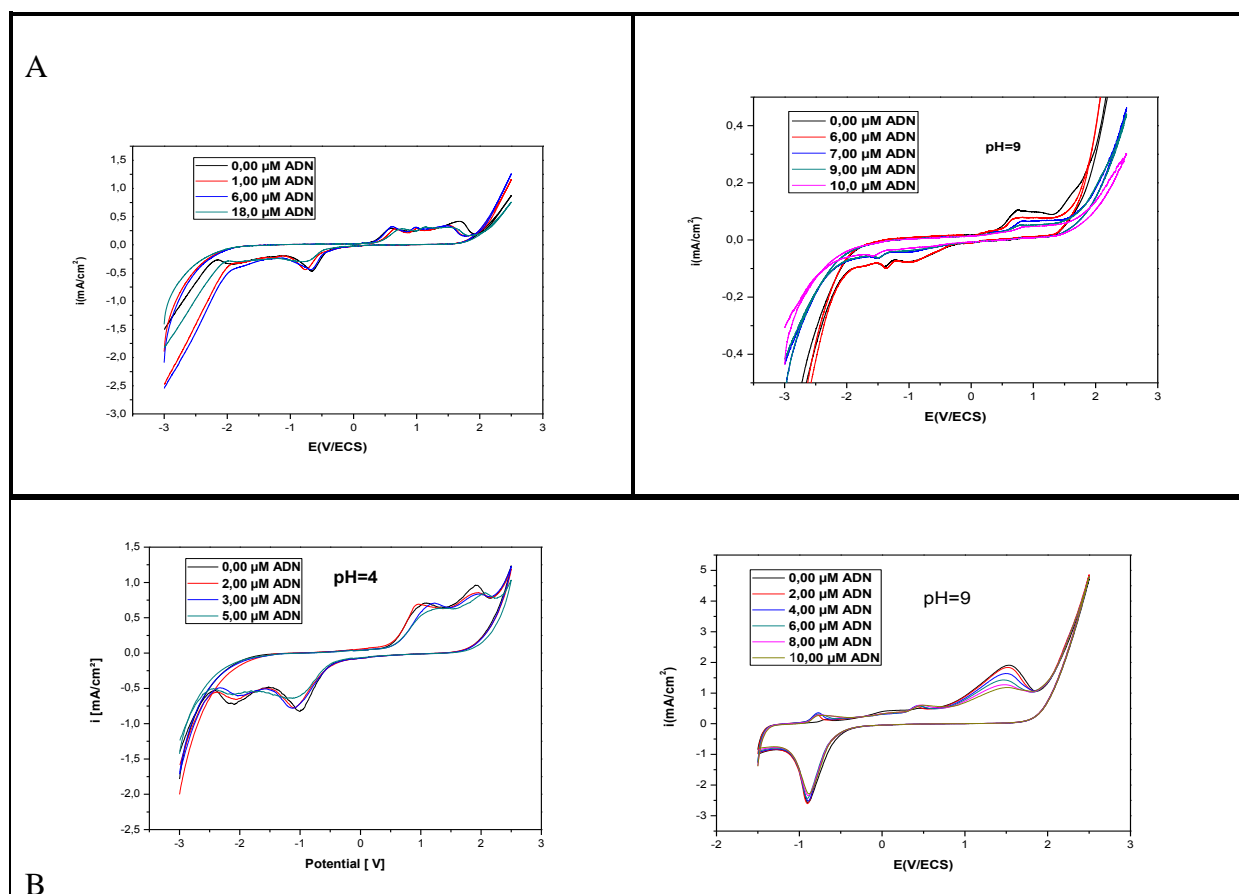


Figure III.17. Voltamogrammes cycliques de médicament Dacarbazine ($0,00219\text{mol/l}$) (A) et Doxoleme ($0,000147\text{mol/l}$) (B) en présence d'ADN à différentes concentration enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) $0,2\text{ M}$ à $\text{pH} = 4$ et à $\text{pH} = 9$ à une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.4 V/s .

Tableau III.17. Paramètres électrochimiques tirés du voltamogrammes de la figure III.17

Adduit	pH	[ADN](μM)	E_{pa1} (mV)	ip_{a1} (mA.cm ²)	E_{pa2} (mV)	ip_{a2} (mA.cm ²)
Dacarbazine	4	0	1678,77	0,406	596,96	0,276
		1	1519,54	0,346	660,8	0,28
		6	1476,8	0,333	597,23	0,284
		18	1632,08	0,29	758,62	0,274
	9	0	747,67	0,105	-	-
		6	736,11	0,08	-	-
		7	811,19	0,065	-	-
		9	796,75	0,044	-	-
		10	3,388	0,048	-	-
	Doxoleme	4	0	1923	0,955	0,955
2			1945	0,848	0,848	0,848
3			1946	0,835	0,835	0,835
5			2060	0,84	0,84	0,84
9		0	1550	1,92	1,92	1,92
		2	1532	1,853	1,853	1,853
		4	1505	1,583	1,583	1,583
		6	1490	1,38	1,38	1,38
		8	1456	1,282	1,282	1,282
		10	1450	1,15	1,15	1,15

En se basant sur la diminution du courant de pics anodiques du médicament Dacarbazine suite à l'addition de différentes concentrations d'ADN allant de 1 à 18 μM (figure III.17), la constante de liaison a été calculé selon l'équation 13 (Feng et *al.*, 1997).

$$\log \frac{1}{[\text{ADN}]} = \log K + \log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p} \quad (13)$$

Les valeurs obtenues sont tabulées dans le tableau III.18.

Tableau III.18. Paramètres numériques de l'équation 13

Adduit	pH	[ADN] (M)	Log1/[ADN]	$i_{p_{a_1}}$	$\log i_p / (i_{p_0} - i_p)$
					$\log i_{p_{a_1}} / (i_{p_{a_{10}}} - i_{p_{a_1}})$
Dacarbazine	4	0		0,406	
		0,000001	6	0,346	0,760
		0,000006	5,22	0,333	0,659
		0,000018	4,744	0,29	0,397
	9	0	0	0,105	
		0,000006	5,22	0,08	0,505
		0,000007	5,154	0,065	0,2108
		0,000009	5,045	0,0448	-0,128
		0,00001	5	0,048	-0,074
	Doxoleme	4	0	0	0,96
0.00000021			6,677	0,848	0,899
0.0000003			6,523	0,835	0,842
0.00000051			6,292	0,84	0,845
9		0	0	1,92	
		0.00000021	6,677	1,853	1,442
		0.00000042	6,377	1,583	0,672
		0.00000063	6,201	1,38	0,407
		0.00000084	6,075	1,282	0,303
		0.0000010	6	1,15	0,398

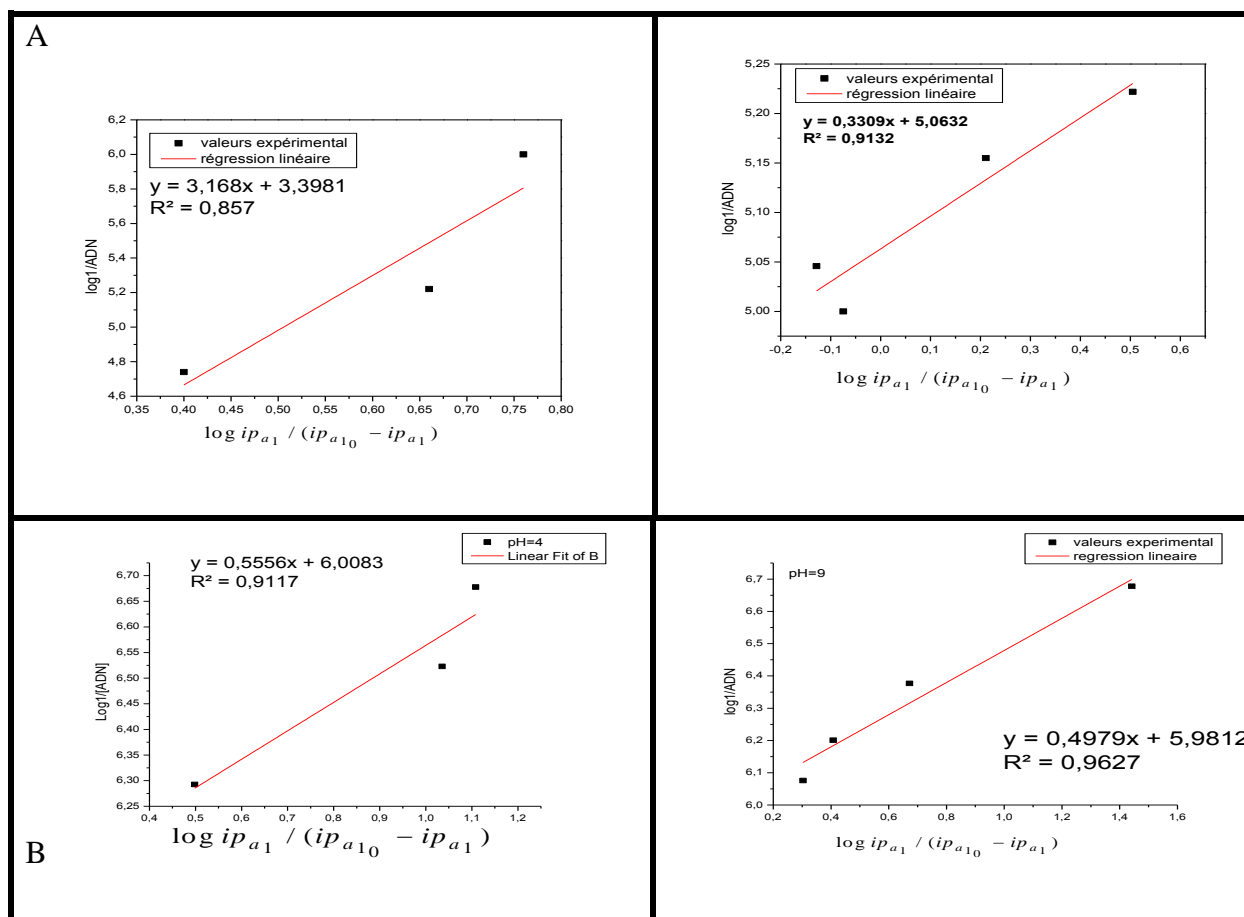


Figure III.18. Tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_{p0} - i_p)$ selon l'équation 13

A : Dacarbazine, **B** : Doxoleme

Les valeurs de l'énergie libre de liaison ainsi que celles de la constante liaison de l'adduit Dacarbazine -ADN obtenu à partir du tracé de l'équation 4 a pH=4 et 9 sont listées dans le tableau III.19.

Tableau III.19. Constantes et énergies de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log i_p / (i_{p0} - i_p)$

Adduit	pH	équation	R^2	K	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Dacarbazine	4	$y = 3,168x + 3,398$	0,857	$2,500 \times 10^3$	-19,398
	9	$y = 0,33x + 5,06$	0,91	$1,1481 \times 10^5$	-28,887
Doxoleme	4	$y = 0,555x + 6,008$	0,912	$5,092 \times 10^5$	-24,035
	9	$y = 0,478x + 5,515$	0,989	$6,42 \times 10^5$	-32,816

Tableau III.20. Comparaison entre K et ΔG de l'Adduit Dacarbazine et Doxoleme obtenus par CV et UV-Vis

Adduit	pH	K (mol^{-1})		ΔG ($KJ.mol^{-1}$)	
		Spectro UV-Vis	Electrochimie	Spectro UV-Vis	Electrochimie
Dacarbazine	4	$2,3 \times 10^4$	$2,500 \times 10^3$	-24,902	-19,398
	9	$6,54 \times 10^4$	$1,148 \times 10^5$	-27,49	-28,887
Doxoleme	4	$1,34 \times 10^4$	$5,092 \times 10^5$	-23,570	-24,035
	9	$4,72 \times 10^4$	$6,42 \times 10^5$	-26,684	-32,816

III.3.2.4. Coefficient de diffusion

Afin de calculer les coefficients de diffusion du médicament et celui de l'adduit médicament -ADN, plusieurs voltamogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400 mV/s en présence et en absence d'ADN, les voltamogrammes obtenus sont représentés dans la **figure III.19**.

Les voltamogrammes contenaient un couple aux pics redox très stables et très clairs. En outre, les figures ci-dessous montrent clairement que les potentiels de pics ne sont pas sensiblement affectés par la variation de la vitesse de balayage.

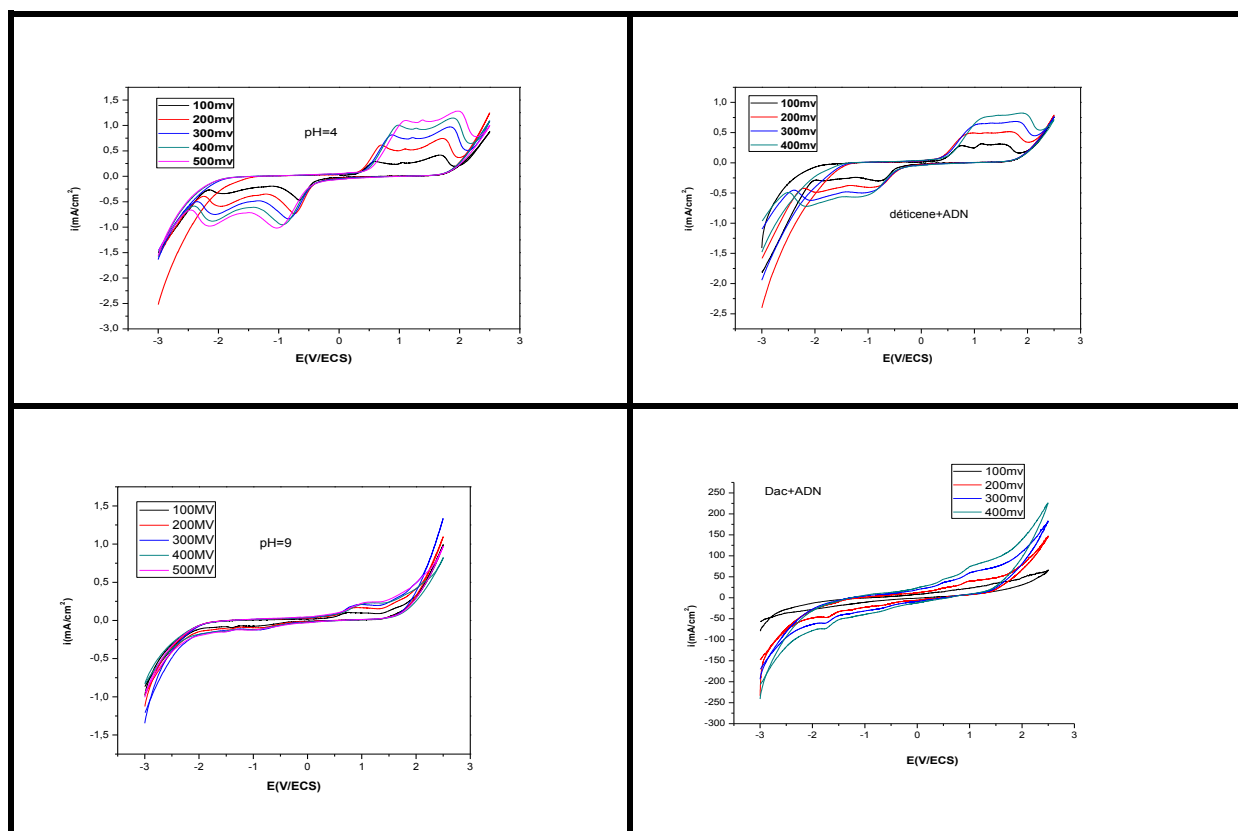


Figure III.19. Succession de voltamogrammes cycliques de 0,00219 mol/l du médicament Dacarbazine à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0,1 Vs^{-1} avec un saut de 0,1 Vs^{-1} .

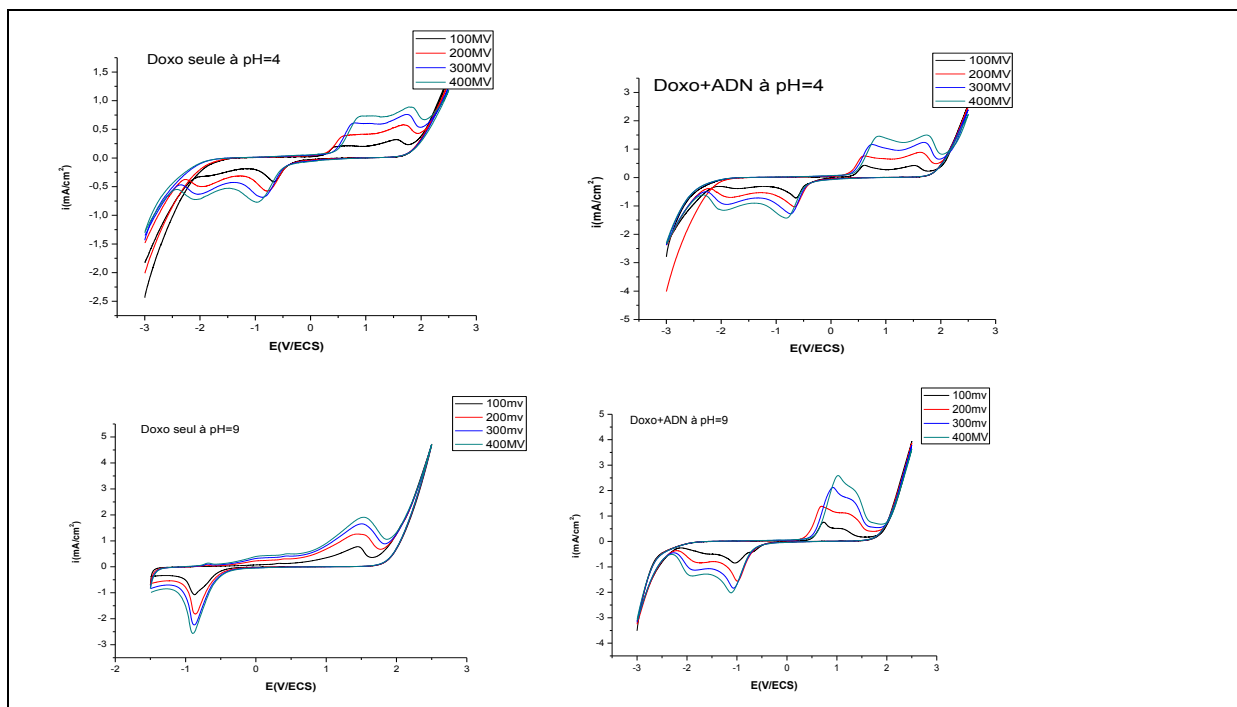


Figure III.20. Succession de voltammogrammes cycliques de 80 µg/ml du médicament Doxoleme à différentes vitesses de balayage allant de 0,4 à 0,1 Vs⁻¹ avec un saut de 0,1 Vs⁻¹. Les flèches verticales indiquent l'augmentation de vitesse de balayage.

Les courants des pics anodiques à différentes vitesses de balayage du potentiel sont tabulés dans le tableau III.21.

Tableau III.21. Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel

Adduit	pH		Médicament		Médicament –ADN
Dacarbazine	4	$\sqrt{v} (V / s)$	$i_{p_{a_1}} (mA)$		$i_{p_{a_1}} (mA)$
		10	0,413		0,305
		14,142	0,752		0,529
		17,32	0,967		0,680
	20	1,44		0,815	
	9	10	0,093		0,029
		14,142	0,160		0,039
		17,32	0,212		0,061
20		0,239		0,809	

Doxoleme	4	10	0,439	0,296
		14,142	0,852	0,601
		17,32	1,205	0,771
		20	1,553	0,844
	9	10	0,758	0,738
		14,142	1,398	1,279
		17,32	2,078	1,615
		20	2,577	1,921

Pour confirmer d'avantage l'interaction du médicament Dacarbazine ou Doxoleme avec l'ADN, le courant des pics anodiques a été tracé en utilisant l'équation de Randles-Sevcik cité auparavant (Brett et *al.*, 1993). Ensuite Les coefficients de diffusion du médicament et de l'adduit médicament-ADN ont été déterminés .

Tableau III.22 : Les coefficients de diffusion du médicament Dacarbazine et de l'adduit Dacarbazine -ADN déterminés en utilisant l'équation de Randles-Sevcik

Médicament	PH	Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
Dacarbazine	4	Dacarbazine	$y = 0,097x - 0,607$	0,955	1,62413E-10
		Dacarba -ADN	$y = 0,051x - 0,198$	0,999	4,39995E-11
	9	Dacarbazine	$y = 0,015x - 0,0527$	0,992	3,78524E-12
		Dacarba -ADN	$y = 0,0052x - 0,027$	0,946	4,61028E-13
Doxoleme	4	Doxoleme	$y = 0,110x - 0,689$	0,996	4,62475E-08
		Doxo-ADN	$y = 0,058x - 0,258$	0,981	1,27832E-08
	9	Doxoleme	$y = 0,184x - 1,124$	0,995	1,2777E-07
		Doxo-ADN	$y = 0,117x - 0,418$	0,997	5,16612E-08

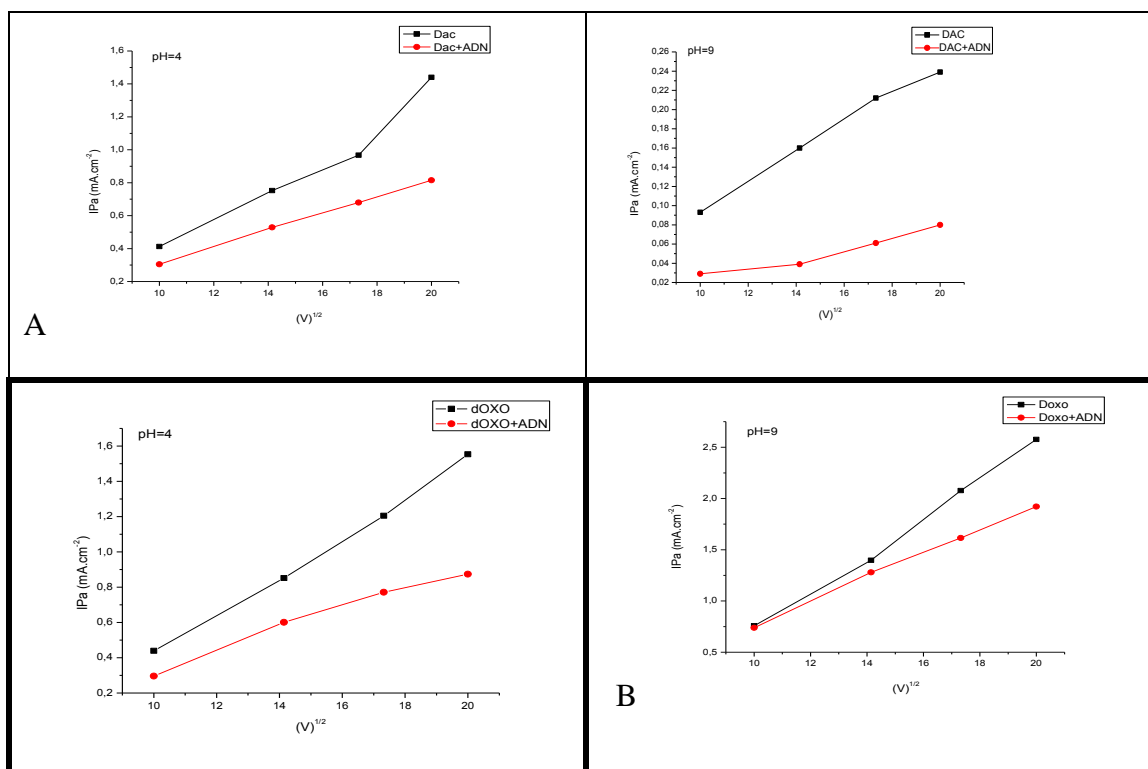


Figure III.22. Superposition de la tracé de i_{p_a} en fonction de $V^{1/2}$ en absence (ligne noire) et en présence de $18\mu\text{M}$ d'ADN pour Dacarbazine (A) et $10\mu\text{M}$ d'ADN pour Doxoleme (B) (ligne rouge) à $\text{pH} = 4$ et à $\text{pH}=9$ selon l'équation 5,

On remarque que le coefficient de diffusion de l'adduit Dacarbazine -ADN est légèrement supérieur à celui du médicament Dacarbazine.

III.3.2.4. Taille des sites de liaison

La taille des sites de liaison du médicament Dacarbazine avec l'ADN peut être déterminée à partir des données électrochimiques en utilisant de l'équation suivante (Aslanoglu et *al.*, 2005)

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{s} \quad (14)$$

l'équation précédente peut être écrite comme suit, $\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[\text{ADN}]}{2s}$ (15)

Le rapport des concentrations C_l / C_n est déterminé à partir de l'équation ci-dessous

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{i_0 - i}{i} \quad (16) \text{ (Aslanoglu et } al., 2004)$$

Le tracé de l'équation 15 donne une ligne droite, (**figure III.23**)

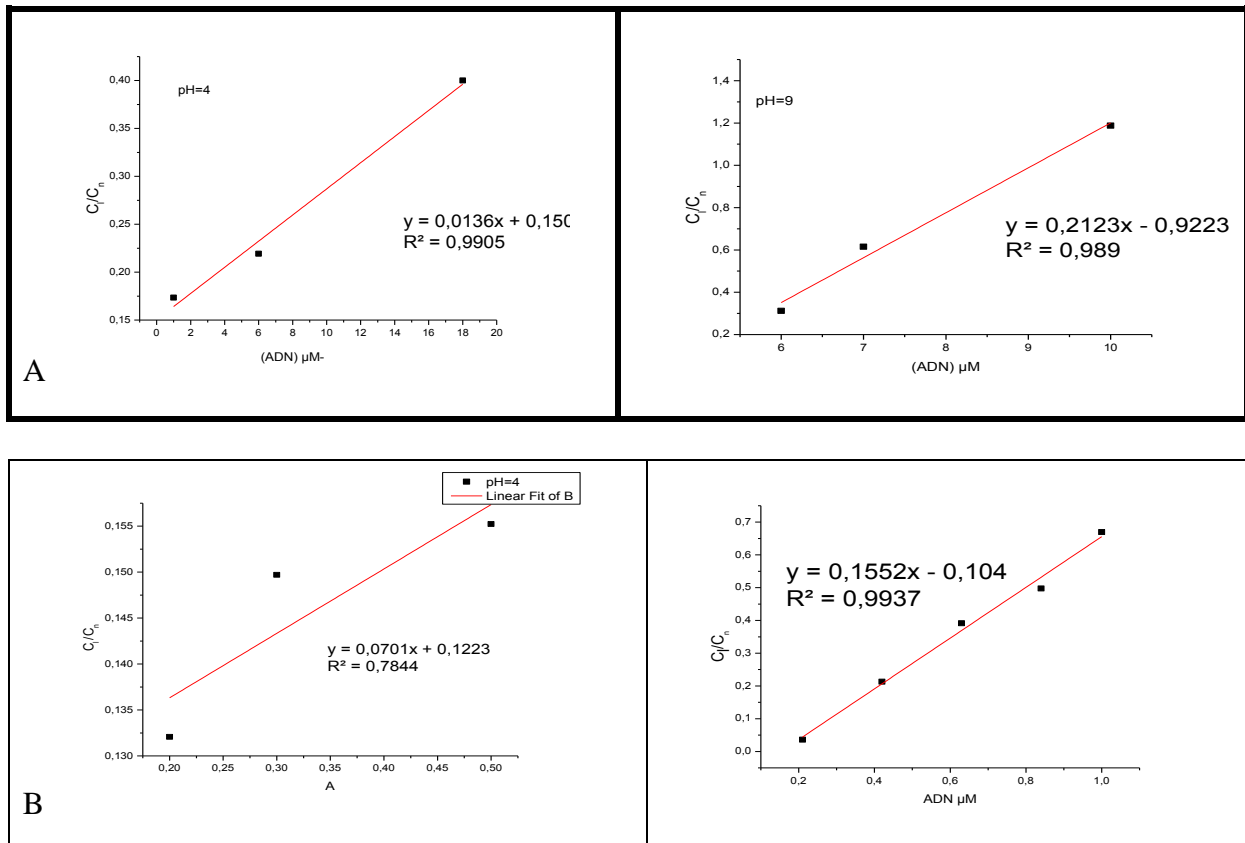


Figure III.23. tracé de C_1 / C_n en fonction de [ADN], **A** :Dacarbazine, **B** : Doxoleme

La taille des site de liaison (S) est déterminée à partir de la pente de la figure III.23, sachant que : $\frac{K}{2S} = \text{pente}$

Tableau III.23 : détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le médicament

Adduit	pH	K	pente	S (bp)
Dacarbazine	4	$2,500 \times 10^3$	0,0136	0,092bp
	9	$1,14815 \times 10^5$	0,2123	0,27bp
Doxoleme	4	$5,09 \times 10^5$	0,0701	3,63pb
	9	$9,57 \times 10^5$	0,1552	3,08pb

Discussion

L'interaction entre les médicaments anticancéreux et de l'ADN double brins est un aspect des études biologiques et de développement des processus pharmaceutiques. Celle-ci a été étudiée par l'addition des doses augmentées d'ADN avec le pH de la réaction a été déterminé dans l'eau. Le pH a été ajusté à l'aide des solutions d'acide chlorhydrique et de l'hydroxyde de sodium. Les solutions aqueuses ont été jugées à pH 4 et 9 ces deux pH présentent le domaine de réactivité des médicaments utilisés.

Nous étudions dans ce mémoire l'interaction de cisplatine, dacarbazine et doxoleme avec de l'ADN. Plusieurs méthodes sont appliquées pour détecter et caractériser cette interaction, dans notre mémoire, nous avons utilisés deux méthodes de mesures spectroscopique UV-Visible et électrochimique. L'une des applications pratiques de cette dernière est la détermination des procédés électrode redox pour clarifier le mécanisme d'oxydation possible de médicament et de l'adduit sur électrode de carbone vitreux en utilisant CV, elle peut fournir un utile qui complète les méthodes spectroscopiques (Shah, 2010). Le principe de tests électrochimiques consiste à mesurer la réponse en courant du ligand lié à l'ADN suite à l'imposition d'un potentiel variable. L'expérience permet de calculer les paramètres d'interaction telle que la constante et l'énergie libre de liaison, les coefficients de diffusion, et les sites de liaison. Ces tests renseignent donc sur la liaison ADN-médicament mais pas sur la nature des sites actifs de liaison. La diminution ou l'augmentation de la densité du courant des pics anodiques du ligand en présence de l'ADN est exploitée pour la mesure des paramètres de liaison ADN-médicament. Le déplacement du potentiel de pics anodiques en présence d'ADN permet la détermination de type de liaison. Ces tests ne déterminent que les paramètres de liaison entre le site de fixation du récepteur et le ligand et pas la réponse biologique ou pharmacologique, et elle ne permettent pas de définir l'activité du ligand. Ces deux méthodes, montrent une variation dans les valeurs de la constante de liaison ainsi les valeurs de l'énergie libre de Gibbs et la taille de site d'interaction.

Les valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -RT \ln K$) indiquent la spontanéité de l'interaction de ces médicaments avec l'ADN.

A pH=4 deux pics anodiques apparaissent en présence de médicament ou l'adduit, en revanche, à pH=9 un seul pic anodique est présent pour une réaction électrochimique impliquant le transfert de deux électrons et deux protons, en effet, un des pics anodiques

disparaît avec l'augmentation du pH cela a été observé aussi dans la littérature scientifique (Burcu et *al.*, 2014).

Il existe plusieurs types d'interactions des médicaments qui se lient à l'ADN. Ceux-ci comprennent, entre action électrostatique (généralement non spécifique) avec la structure chargée négativement d'acide nucléique sucre-phosphate, l'intercalation, et l'interaction de liaison avec le petit ou le grand sillon d'ADN (Sirajuddin et *al.*, 2013).

Les résultats indiquent que l'interaction entre l'ADN et le Cisplatine se fait par des liaisons covalentes par alkylation est celle de Dacarbazine et Doxoleme se lient par l'intermédiaire d'intercalation et/ou d'interaction électrostatique (liaison non covalente) dans la double hélice d'ADN.

En général, quand une petite molécule interagit avec l'ADN et forme un complexe, les changements d'absorbance (effet hypochrome ou hyperchrome) et / ou changement de longueur d'onde (rouge ou décalage vers le bleu) se produisent. Généralement, lorsque les molécules se lient à l'ADN avec une forte interaction tels que intercalation, l'intensité de l'absorption diminue et décalage vers le rouge est observé (Can et *al.*, 2014).

L'hypothèse d'intercalation, initialement proposée par Leonard Lerman en 1961 suggère que le chromophore plane (partie active UV-Vis) de la molécule médicamenteuse devient inséré entre les deux paires de bases adjacentes d'une manière d'intercalation. Le chromophore de la drogue est stabilisée par des liaisons Van der Waals avec les paires de bases qui l'entourent. Cependant, il est évident que l'intercalation d'ailleurs, la partie non plane du médicament peut se lier à grand ou petit sillon de l'ADN. Le médicament est alors dit d'interagir par le mode de liaison mixte (Shah, 2010).

En outre, l'augmentation de l'absorbance ou du courant de pic anodique est généralement due à l'interaction covalente entre le Cisplatine et l'ADN. Quand il y a une augmentation de l'absorbance ou du courant de pic anodique du médicament avec l'ajout de l'ADN, cela signifie que le double brin de l'ADN est converti en simple brin due à la rupture de la liaison hydrogène dans l'ADN suite à la réaction du Cisplatine avec l'ADN via le mode d'interaction par liaison covalente (Rauf et *al.*, 2004). Et lorsque le double brin de l'ADN se transforme en simple brin, pour lequel l'absorptivité molaire (ϵ) est beaucoup plus élevée que celle de l'ADN à double brin. Alors quand l'absorptivité molaire augmente l'absorbance (densité optique) augmente certainement (loi de Beer-Lambert).

L'augmentation du courant de pic anodique en voltamétrie cyclique est due à l'augmentation de coefficient de diffusion (D) de l'ADN à simple brin. Il pourrait aussi être due à l'augmentation de

la concentration de l'ADN dans la cellule électrochimique suite à la diminution de la masse molaire de l'ADN à simple brin (Sirajuddin et *al.*, 2013). Cela s'explique aussi par le fait que Les liaisons hydrogènes qui stabilisent les deux brins d'ADN sont réversibles, les molécules qui interagissent avec l'ADN de manière covalente ou non peuvent alors désorganiser la double hélice de différentes manières. Cependant, à ce jour très peu de composés présentent cette capacité de déstabilisation de la double hélice. Par conséquent, le Cisplatine peut prévenir les cellules cancéreuses de se diviser et produire davantage de cellules cancéreuses par inhibition de la reproduction de l'ADN et présente en même temps son effet toxique dans un certain mesure (Wang et *al.*, 2006).

Lenglet et *al.*, (2010) ont publié les agents connus qui présentent une activité de déstabilisation. Nous retrouvons notamment les agents alkylants comme certains dérivés platinés. La déstabilisation de l'ADN pourra modifier le recrutement des protéines de réparation et de réplication de l'ADN mais aussi l'expression de certains gènes. La déstabilisation serait une « lésion » supplémentaire de l'ADN qui modifierait alors des processus cellulaires différents (Lenglet, 2010).

Ces résultats ont été confirmés lorsqu'on a refait la même expérience en utilisant l'ADN monobrin avec le Cisplatine, d'ailleurs, les observations notées indiquent qu'il y a une augmentation d'absorbance ou du pic de courant anodique. En effet, ces résultats confirment bien la déstabilisation de deux brins d'ADN lorsqu'il se lie avec le Cisplatine.

Deepa et ses collaborateurs (2012) ont observé que les atomes de carbone de tous les agents alkylants sont les plus fortes charges positives qui sont dues à leur liaison avec les atomes d'oxygène. La présence d'électronégatif dans les médicaments de platine facilite son interaction avec les molécules d'ADN par liaison hydrogène avec les paires de bases GC et AT. Il a également été constaté que les liaisons hydrogène entre le NH₃ du Cis - Pt et O₆ de paires de bases GC est jugée relativement faible dans le cas paires de base AT. Ces résultats révèlent que cette interaction a une plus grande incidence sur la configuration d'adduits d'ADN, ce qui est essentiel pour la stabilité et l'activité cytotoxique. Ces résidus se lient à l'ADN en position N7 des bases azotées puriques GC pour former majoritairement des adduits intra-brins 1,2-Pt(DACH)-d(GpG) entre 2 guanosines adjacentes, minoritairement des adduits intra-brins 1,2-Pt(DACH)-d(ApG) entre une adénosine et une guanosine et rarement des adduits inter-brins (Fink et *al.*, 1998). Les adduits Pt-ADN distordent alors la structure de la double hélice d'ADN et perturbent plusieurs processus cellulaires. L'arrêt de la réplication

de l'ADN a longtemps été considéré comme le mécanisme clé de la cytotoxicité des sels de platine(Lin *et al.*, 2006).

D'un coté biologique, La quantification des adduits ADN-Cisplatine en présence ou en absence d'inhibiteurs de GSH montre une augmentation importante après déplétion de glutathion (Sadowitz *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'étude de la sélection des cellules résistantes au Cisplatine a révélé une corrélation parfaite entre le degré de résistance et la quantité de GSH dans la cellule (Godwin *et al.*, 1992).

Les voltammogrammes cycliques typiques de dacarbazine, dans le balayage aller, un seul pic anodique est observée a pH=9, ce qui correspond à l'oxydation du dacarbazine, probablement au niveau du groupe -NH- de cycle imidazole. Le composé est oxydé en un à deux électrons sur électrode de carbone vitreux, pour donner le produit final, le 5-hydroxyimidazol-4-carboxamide. Un mécanisme probable de l'oxydation de la molécule dacarbazine pourrait avoir lieu. Dans le balayage inverse, aucun pic cathodique est observée, ce qui indique que le processus est irréversible. Lors que l'ADNdb est ajouté à une solution de dacarbazine, une diminution de courant de pic anodique est marqué et les changements de potentiels de pic à plus de valeurs positives sont observées. Pour montrer que la diminution du courant de pic est due à la diffusion de Dacarbazine-ADN. Il semble que la diminution du courant de pic de dacarbazine après addition d'ADN bicaténaire est provoquée par l'intercalation de dacarbazine à la masse d'ADNdb, qui résulte une augmentation considérable du coefficient de diffusion apparent. (Temerk *et al.*, 2014).

La force ionique fait varier en changeant le pH 4 et 9. Les résultats suggèrent qu'il y avait une apparente diminution de la réponse en courant lorsque la concentration en ADN augmente. Dans des conditions de faible force ionique, on peut supposer que le mécanisme de réaction comprend l'attraction électrostatique des groupes phosphate chargés négativement sur l'extérieur la double hélice de l'ADN avec dacarbazine. Dans une solution de haute force ionique, le blindage ionique des charges négatives sur l'ADN a été réalisé et donc dacarbazine ne peut plus interagir avec l'ADN électrostatiquement, et le signal électrochimique ne peut être attribué à dacarbazine qui intercale dans la double hélice d'ADN entre la base empilés des paires d'ADN. On a également observé que le potentiel du pic est décalé vers les valeur plus positives(Radi *et al.*, 2014). Cela indique le passage de la nature de l'interaction entre dacarbazine à partir des interactions électrostatiques pour intercalation avec l'augmentation de la force ionique (Rauf *et al.*, 2004).

Les spectres d'absorption UV-VIS de acarbazine enregistré en présence des quantités croissantes d'ADNdb dans un solution tampon à pH 4 et 9 montrent une diminution de la capacité d'absorption sans changement de position de la bande en ajoutant l'ADN. L'hypochrome évidente laisse penser que l'effet est dû à l'interaction entre les états électroniques du chromophore du médicament intercalant et ceux de la base de l'ADN. Un tel comportement spectral est généralement associé à l'intercalation en tant que mode de liaison dominant. (Radi et *al.*, 2014). En effet, les méthodes spectroscopiques et voltamétriques actuelles décrites ici ont permis de conclure que dacarbazine lie évidemment à l'ADN double brin par un effet combiné de l' intercalation et l'interaction électrostatique.

La liaison de petites molécules à l'ADN implique , l'interaction électrostatique avec l'acide nucléique chargé négativement la structure du sucre -phosphate (qui est généralement non spécifique) ; intercalation de systèmes cycliques aromatiques planaires entre les paires base (molécules organiques planes contenant plusieurs cycles aromatique souvent, les anneaux condensés se lient à l'ADN dans un mode d'intercalation (Raouf et *al.*, 2004). Les anthraquinone dont la doxoleme s'intercalent entre les paires de bases d'ADN par $\pi - \pi$ empilement et l'interaction hydrophobe . Son grand axe est à peu près perpendiculaire à l'axe de la double hélice. Le sucre aminé interagit avec les groupes phosphate chargé négativement dans le grand sillon d'ADN. En outre l'intercalation est stabilisé par liaison hydrogène entre les bases d'ADN et le médicament. L'intercalation provoque un changement dans la forme d'ADN double brin, empêchant ainsi la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN. Dans la cellule, l'ADN nucléaire est associé à des protéines variés qui forme un complexe de nucléoprotéine appelé chromatine. Ces données suggèrent que ce type de médicaments interagit avec la chromatine conduisant au dépliage de la chromatine et l'agrégation qui provoque un changement dans la structure et la fonction de celle-ci. La perturbation structurelle est susceptible d'interférer avec les processus métaboliques de l'ADN (de réplication et de transcription) contribuant à l'apoptose induite par ces médicaments dans les cellules cancéreuses (Chandor, 2009). En outre, à l'intérieur de la cellule, le médicament doxoleme réagit avec le cytochrome réductase en présence de la nicotinamide adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH) pour former des radicaux semiquinone intermédiaires qui participent à des réactions d'oxydoréduction générant des radicaux libres superoxyde anions ($O_2 \cdot^-$) Qui sont convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH \cdot$). Les radicaux libres induisent une peroxydation lipidique de la membrane, scission de brin d'ADN et l'oxydation directe des bases purine-pyrimidine, thiols, et amines.

cette cellule étant dépourvue de la glutathion peroxydase est incapable de convertir les radicaux superoxydes à l'oxygène, elle est donc handicapé à cet égard. (Partha et *al.*, 2014).

Le taille de site de liaison implique seulement un site par deux paires de bases, donnant la preuve d'une intercalation de médicament dans l'ADN selon le modèle voisin d'exclusion, puisque la liaison électrostatique entraîne habituellement un taille de site élevé (Shah et *al.*, 2010).

Pour connaître davantage l'interaction de médicament avec l'ADN, la représentation linéaire du pic des courants de médicament libre et lié sur la racine carrée de la vitesse de balayage suggère que la réaction d'oxydo-réduction est cinétiquement contrôlée par l'étape de diffusion. Les coefficients de diffusion de médicament libre est souvent inférieur de celle du médicament lié à l'ADN. En outre, Le coefficient de diffusion du médicament lié est supérieur de celle du médicament libre.

Dans les travaux antérieurs le coefficient de diffusion en présence d'ADN est inférieur a celle du médicament libre cela peut être due a la formation d'adduits médicament – ADN qui deviennent lourd. Généralement les molécules à grande masse moléculaires ont faible coefficient de diffusion c'est-à-dire se diffusent lentement à la surface de l'électrode (Shah, 2010).

Nos résultats est comparable avec les études passés. En effet, le coefficient de diffusion du médicament seul est plus élevé que le médicament lié cela due au fait que la masse molaire du médicament est moins que la masse de l'adduit (formation du complexe médicament-ADN).

En revanche, les résultats du médicament cisplatine ont tendance inverse, sachant que le coefficient de diffusion de médicament lié est plus élevé que celle de médicament libre cela peut être due a la rupture de la double hélice qui influence la valeur de D.

D'un autre coté, les valeurs de la constante de liaison K a pH=4 sont plus faibles par comparaison avec les valeurs à pH=9.

Sachant que la plus grande constante de liaison de l'ADN-médicament correspond aux groupes ayant la capacité d'intercalation efficace (Shah, 2010).

D'après nos résultats, nous pouvons dire que l'interaction de médicament avec l'ADN se fait au mieux a pH=9 (alcaline) qu'à pH=4 (acide).

La liaison de ces médicaments avec l'ADN peuvent provoquer des altérations dans l'appareil génétique de l'ADN qui pourraient conduire à l'échec de la cellule cancéreuse de se répliquer(Chandor,2009).

En fin, les valeurs de la taille du site de liaison qu'ont été obtenus montrent une taille de site de liaison de cisplatine et dacarbazine plus petit. En revanche, pour doxoleme la taille de site est plus grand, ces résultats s'expliquent par le fait que le cisplatine et dacarbazine se lient plus fortement à l'ADN que doxoleme . La petite taille de site de liaison de dacarbazine confirme son intercalation dans l'ADN.

Conclusion

L'interaction d'ADN avec des ligands tels que les anticancéreux sont important pour de nombreux domaines de la science. En fait, beaucoup des procédés intracellulaire tels que la division cellulaire et l'expression des gènes dépend de la topologie de l'ADN, qui, à son tour, dépend des propriétés mécaniques de la molécule d'ADN. Cependant, certains médicaments tels que le cisplatine, dacarbazine et doxoleme présentent une forte affinité pour l'ADN des cellules cancéreuses. Lorsque ces médicaments se lient à l'ADN, ils peuvent inhiber sa réplication, l'arrêt de la croissance tumorale.

Dans notre mémoire nous avons utilisé la méthode spectroscopie UV-VIS qui est la technique la plus courante pour étudier cette interaction ensuite elle est confirmé par l'étude électrochimique en utilisant une électrode en carbone vitreux. Par conséquent, l'interaction peut être étudiée en fonction de la comparaison des bandes des spectres ou des pics des voltamogrammes avant et après la réaction. Ces méthodes utilisées pour déterminer le type de la liaison et le mode d'interaction ainsi que les caractéristiques de cette interaction. En effet, dans toutes les études mentionnées ci-dessus, il a été confirmé que les trois médicaments ont des réactions spontanées exergoniques en raison des valeurs de ΔG négative, d'un autre coté, le Cisplatine se lie avec l'ADN par des liaisons chimique en jouant le rôle d'un agent alkylant. En revanche, le doxoleme et le dacarbazine s'intercale dans l'hélice ADNdb et forme des liaisons électrostatiques.

Le dispositif expérimental de cette étude a permis de déterminer la constante de liaison, le coefficient de diffusion ainsi que la taille de site de liaison de l'interaction. Il y avait une corrélation raisonnable entre les trois paramètres expérimentaux, comme la prédiction de l'efficacité du médicament. Celle-ci peut être en mesure d'interférer d'une manière dépendante avec les fonctions biologique telles que l'activité de la topoisomérase, etc., et cette capacité conduit à l'altération de gène d'expression. Cet effet pourrait avoir d'importantes pratiques des applications spéciales de la thérapie expérimentale des pathologies humaines.

En fin l'ordre de grandeurs de la taille de site de liaison(S) a pH4 est $S_{\text{cisplatine}} < S_{\text{dacarbazine}} < S_{\text{doxoleme}}$, cela peut conclure que le cisplatine se lie fortement par l'ADN selon S et le médicament ayant un site plus grand se lie moins fortement (dacarbazine et doxoleme)

Les résultats suggèrent que les techniques électrochimiques peuvent être utilisés avec succès pour la détermination du mécanisme des réactions d'oxydo-réductions . Le mécanisme d'action proposé pour les composés biologiquement importants devraient fournir des idées profondes dans la compréhension des voies mécanistiques inexplorées par laquelle ces médicaments exercent leur action biochimique.

Perspectives

L'apparition d'une résistance aux thérapies anticancéreuses ou la survenue d'effets indésirables grave est un obstacle majeur dans le traitement des pathologies néoplasiques. Les recherches menées dans le domaine de la pharmacogénomique des anticancéreux présentent non seulement un intérêt purement médical, mais aussi économique. En effet, la génomique fonctionnelle a incontestablement amélioré notre compréhension de la biologie du cancer. D'un point de vue clinique, l'utilisation de signatures géniques pour prédire la réponse au traitement paraît particulièrement intéressante.

Une nouvelle étude serait souhaitable afin de valider ces résultats par la bioinformatique en utilisant l'amarrage moléculaire pour mieux déterminer le lien d'interaction et la conformation de celle-ci.

Ainsi l'étude de la structure d'ADN en interaction avec ces molécules permet de déterminer les types des mutations apparaît lors de cette interaction.

L'utilisation de la technique de dichroïsme circulaire permettra de calculer des autres paramètres qui peuvent préciser aux mieux le type d'interaction entre ces molécules et l'ADN.

- **Alexia, Chandor-Proust. (2009)**. Reparation de l'ADN par une protéine " Radical-SAM " : Etude de la Spore Photoproduct Lyase. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier Grenoble I, France.
- **Anonyme. (2016)**.<https://www.vidal.fr/Medicament/deticene-4989.htm>.
- **Anonyme. (2016)**. L'activité anticancéreuse des complexes de platine.
- **Armand, JP., Brugère, J., Le Bourgeois, JP., Martin J., Robert, J. (2006)**. Dictionnaire des cancer. Editions Frison-Roche. P : 115.
- **Aslanoglu, M. (2006)**. Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Interaction of Proflavine with DNA. Anal. Sciences , 22, 439.
- **Baik, MH., Friesner, RA., Lippard SJ. (2003)**. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc.* 125(46): 14082-92.
- **Bao-xian, ye., Cui-hong Wang., Ai-hua, Jiang. (2003)**. interaction of the anticancer Drug 8-Azaguanine with DNA journal of the Chinese chemical Society 50, 457-464.
- **Bhatt, K., Zhou, L., Mi, QS., Huang, S., She, JX., Dong, Z. (2010)**. microRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival. *Mol Med. Apr* 9.
- **Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000)**. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 92(16): 1295-1302.
- **Burcu, Dogan-Topal., Burcin, Bozal-Palabiyik., Sibel, A. Ozkan., Bengi, Uslu. (2014)**. Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques, *Sensors and Actuators B* 194 (2014) 185– 194.
- **Can, Ozluer., Hayriye, Eda., Satana, Kara. (2014)**. Approche Electrochimique peut-il fournir un nouvel aperçu de la conception rationnelle de médicaments et conduirait à une meilleure compréhension de la mécanisme d'interaction entre les médicaments anti-cancéreux et de l'ADN, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier 138 (2014) 36–42.
- **Chennouf, F. (2011)**. thèse de magister, L'influence de la chaleur sur l'ADN, université mentouri constantine, faculté des sciences exactes, département de physique

- **Chu, X.; Shen, G.L.; Jian, J.H.; Kang, T.F.; Xiong, B.; Yu, R.Q. (1998).** Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications. *Anal. Chim. Acta.*, 373, 29
- **Chvátlovà, K., Brabec, V., Kaspárková, J. (2007).** Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res.* 35(6): 1812-21.
- **Deepa, P., Kolandaivel, P., Senthilkumar, K. (2012).** Structural properties and the effect of platinum drugs with DNA base pairs *Struct Chem. Springer* . 24:583–595.
- **Didier, Devilliers., Éric, Mahé. (2003).** Cellules électrochimiques : aspects thermodynamiques et cinétiques, l'actualité chimique Laboratoire LI2C-Électrolytes et électrochimie UMR CNRS 7612, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05 université pierre et marie curie. DOI 10.1007/s11224-012-0087-y,
- **Duguet, M., Riou, J.F. (1994).** SYNTHÈSE : De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux, paris ,vol. 1 0, médecine/sciences ; 1 0 : 962- 72.
- **Elrod, S., Standfield, W. (2003).** « Génétique », 4ème édition, Paris : Dunod, P 79.
- **Emilie, Ernoult. (2012).** Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine: approche protéomique quantitative. Thèse de doctorat Cellular Biology. Université d'Angers, 2011. French.
- **Faguet, G.B. (2005).** *The war on cancer.* Springer Editors.
- **Fenanir F. (2009).** Synthèse et caractérisation de nouvelles molécules à effet thérapeutique contenant des ligands (base de schiff) thèse de magistère de l'université ferhat abbas de setif.
- **Feng, Q.; Li, N. Q.; Jiang, Y.Y. (1997).** Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA. *Anal. Chim. Acta.* , 344, 97
- **Fink, D., Nebel, S., Norris, PS., Baergen, RN., Wilczynski, SP., Costa, MJ., Haas, M., Cannistra, SA., Howell, SB. (1998).** Enrichment for DNA mismatch repair-deficient cells during treatment with cisplatin. *Int J Cancer.* 77(5): 741-6.
- **Godwin, AK., Meister. A., O'Dwyer, PJ., Huang, CS., Hamilton, TC., Anderson, ME. (1992).** High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(7): 3070-4.
- **Gong, Y., Wang, Y., Chen, F., Han, 1., Miao, J., Shao, N., Fang Z., Yang, R. Ou. (2000).** «Identification of the subcellular localization of daunorubicin in multidrug-resistant K562 cellline». *Leuk Res.* vol. 24, no 9, p. 769-774.
- **Groupe Vidal. (2016).** <https://www.vidal.fr/fiches-medicaments/>.

- **Hagemeister, T., Linscheid, M. (2002).** Mass spectrometry of cis-diamminedichloroplatinum (II) adducts with the dinucleosidemonophosphates d(ApG), d(GpG) and d(TpC) in an ion trap. *J Mass Spectrom.* 37(7):731-47.
- **Hamdan, L. (2011).** Resvératrol et dérivés ciblés : Extraction, Synthèse et Pharmacologie, thèse de doctorat, spécialité chimie bioorganique et thérapeutique université de tlemcen.
- **Hande, K. R. (1998).** «Clinicat applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II>>. *Biochim Biophys Acta.* vol. 1400, no 1-3, p. 173-184.
- **Haskell, CM., Berek, JS. (2003).** Cancer treatment. 5ème edition. Edition W.B Saunders Company. PP: 3-52.
- **Hoeijmakers, JH. (1987).** Characterization of genes and proteins involved in excision repair of human cells. *J Cell Sci Suppl.* 6: 111-25.
- **Hoeijmakers, J.H., Engl, N., Med, J. (2009).** *DNA damage, aging, and cancer.* 361(15): p. 1475-85.
- **Iarussi, D., Indolfi, P., Casale, F., Coppolino, P., Tedesco, M. A., Tullio, M. T. Di. (2001).** «Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood». *Curr Med Chem.* vol. 8, no 13, p. 1649-1660.
- **Jamieson, ER., Lippard, SJ. (1999).** Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.* 99: 2467-2498.
- **Jegham, H. (2009).** Etude de l'activite biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux mémoire de maîtrise en physiologie-endocrinologie departement de medecine moleculaire faculté de médecine université laval québec.
- **Kaiser, J.M. (2001).** Médicaments utilisés en cancérologie (4ème édition) Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament, Publication bimestrielle , XXII, 1-2.
- **Kalant, H., Roschlau, WHE. (2003).** Principles of medical pharmacology. 6ème édition. Edition Oxford university Press Inc. PP: 759-774.
- **Karp, G. (2004).** « Biologie cellulaire et moléculaire », 2ème édition, Paris : Dunod, P 79.
- **Lacombe, Marielle. (2007).** Méthodes électrochimiques pour l'analyse in situ de composes bioactifs en milieu océanique. Thèse de doctorat, Spécialités : Océanographie Chimie, l'universite paul sabatier – Toulouse iii.

- **Laurence, Fourier-Bauchet. (2003).** Mécanisme d'action de la drogue anticancéreuse cis dichlorodiammineplatine (II) : étude de l'interaction entre les protéines de réparation des mésappariements et l'ADN platine. Biomolécules. Université d'Orleans, French.
- **Lauzon, K. (2008).** ÉTUDE DES MÉCANISMES DE TOXICITÉ INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE ET SENSIBILISATION DES CELLULES CANCÉREUSES PAR LE CHOC THERMIQUE thèse de doctorat de l'université du québec à montréal.
- **Legendre, F., Bas, V., Kozelka, J., Chottard, JC. (2000).** A complete kinetic study of GG versus AG plantination suggests that the doubly aquated derivatives of cisplatin are the actual DNA binding species. *Chemistry*. 6(11):2002-10.
- **Lenglet, G., (2010).** Mecanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les proteines. Human health and pathology. Universit_e du Droit et de la Sant_e - Lille II, French.
- **Lerman, L. S. (1961).** "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines", *J. Molecular Biology*3(1): 3-18. [doi:10.1016/S0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80004-1)
- **Leslie, E. M., Oeeley, R. G., Cole, S. P. (2005).** «Multidrug resistance proteins: role of Pglycoprotein, MRP 1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense». *Toxicol Appl Pharmacol*. vol. 204, no 3, p. 216-237.
- Li, N. ; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yan, X. (2005).**Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *BiopHys. Chem.* , 116, 199.
- Lin, X., Howell, SB. (2006).** DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance. *Mol Cancer Ther.* 5(5): 1239-47.
- **Ling, V. (1997).** «Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance». *Cancer Chemother Pharmacol*. vol. 40 Suppl, p. S3-8.
- **Lippard, SJ. (1987).** Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs *Pure & Appl. Chem.*, 59(6). 731—742.
- **Liping, Wang., Lin, L., Baoxian Ye. (2006).** Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42 (2006) 625–629.
- **Lodish, H., Darnell, J., Baltimore, D. (1989).** « La cellule, biologie moléculaire » 3ème édition, Paris, P 80.
- **Martin, LP., Hamilton, TC., Schilder, RJ. (2008).** Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res.* 14(5): 1291-5.

- **Meijer, L. (2003).** Le cycle de division cellulaire et sa régulation, *Oncologie*, © Springer-Verlag 5: 311-326.
- **Mertelsmann, R., Engelhardt, M., Berger, D. P. (2011).** Précis d'hématologie et d'oncologie, Springer Paris Heidelberg New York © Springer-Verlag France, Paris, ISBN-13 : 978-2-287-99341-1.
- **Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004).** «Anthracyclines: molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity». *Pharmacol Rev.* vol. 56, no 2, p. 185-229.
- **Mishina, Y., Duguid, E.M., He C. (2006).** *Direct reversal of DNA alkylation damage.* *Chem Rev*, 106(2): p. 215-32.
- **Muller, E. (2002).** « Synthèse d'oligonucléotides modifiés pour l'étude de la réparation et de la réplication de lésions radio-induites simples et doubles de l'ADN », Thèse de Doctorat de l'Université Joseph Fourier Grenoble I, P 10.
- **Nahid, Shahabadi., Amiri, S. (2014).** Spectroscopic and computational studies on the interaction of DNA with pregabalin drug, Department of Chemistry, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran. *ACTA Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.104>, S1386-1425(14)01601-1.
- **Ozols, RF., Young, RC. (1991).** Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin Oncol.*18(3): 222-32.
- **Ozols, RF. (1992).** Ovarian cancer, Part II: Treatment. *Curr Probl Cancer.* 16(2): 61-126.
- **Partha Sarathi Guin., Saurabh, Das. (2014).** Exploration of Electrochemical Intermediates of the Anticancer Drug Doxorubicin Hydrochloride Using Cyclic Voltammetry and Simulation Studies with an Evaluation for Its Interaction with DNA, *International Journal of Electrochemistry* Volume 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/517371>, *Kolkata 700032, India* Article ID 517371, 8 p.
- **Pendyala, L., Creaven, PJ., Perez, R., Zdanowicz, JR., Raghavan, D. (1995).** Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 36(4): 271-8.
- **Pil, PM., Lippard, SJ. (1992).** Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science.* 256(5054):234-7.

- **Potter, A. I., Gouahon, K. A., Palanca, B. J., Harbert, M. J., Choi, Y. M., Moskovitz, A. H., Potter, J. D., Rabinovitch, P. S. (2002).** «Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin». *Carcinogenesis*. vol. 23, no 3, p. 389-401.
- **Pottier A. (2003).** conception, synthese et evaluation pharmacologique de pyrrol[3,4,b]quinoleine condensées ligand potentiel de l'ADN, these de doctorat, université de science et technologie lile1, nstitut de chimie pharmaceutique Albert lespagnol LILE2.
- Pouget, J-P. (2000).** « Effets du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées », Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI, P13.
- Radi, Abd-Elgawad., Alsayed, Eissa., Hossam, M., Nassef. (2014).** Voltammetric and spectroscopic studies on the binding of the antitumor drug dacarbazine with DNA, elsevier Journal of Electroanalytical Chemistry 717–718 (2014) 24–28.
- Raufa, S., Goodingb, J.J., Akhtara, K., Ghauria, M.A., Rahmana, M., Anwara, M.A., Khalida, A.M., (2004).** Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 205–217.
- **Roberts, J.J., Thomson, A.J. (1979).** The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*;22:71-133.
- Sadowitz, PD., Hubbard, BA., Dabrowiak, JC., Goodisman, J., Tacka, KA., Aktas, MK., Cunningham, MJ., Dubowy, RL., Souid, AK. (2002).** Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs. *Drug Metab Dispos.* 30(2): 183-90.
- Sasada, T., Nakamura, H., Ueda, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Gon, Y., Takabayashi, A., Spyrou, G., Holmgren, A., Yodoi, J. (1999).** Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Free Radic Biol Med.* 27(5-6): 504-14. 24.
- **Sedletska, Yuliya. (2007).** Signalisation moleculaire par le systeme de reparation des mesappariements de l'ADN et l'agent anticancereux cisplatine : etude des interactions proteine MutS-compose de lesion du cisplatine. domain other. Universite d'Orleans,. French.
- **Shah, A. (2010).** Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electro active Compounds Quaid-i-Azam University, Islamabad.
- **Shankara, S., Kalanur, Jaldappagari Seetharamappa., Gangeenahalli, P., Mamatha., Manjunatha, D., Hadagali., Pradeep, B., Kandagal. (2008).** Electrochemical Behavior of

an Anti-Cancer Drug at Glassy Carbon Electrode and its Determination in Pharmaceutical Formulations, India , *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3 (2008) 756 – 767.

- **Siddik, ZH. (2003)**. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*.22(47):7265-79.

- **Sirajuddin, M., Saqib, Ali., Amin, Badshah. (2013)**. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence, spectroscopies and cyclic voltamètrie, Elseviers, journal of photochemistry and photobiology B: Biology science direct 124(1-19).

- **Soares, D.G., (2007)**. *Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strandbreak formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(32): p. 13062-7.

- **Soiazzo, M., Fantappie, O., Lasagna, N., Sassoli, C., Nosi, D., Mazzanti, R. (2006)**. «P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drugresistant cell lines». *Exp Cell Res.* vol. 312, no 20, p. 4070-4078.

-**Steffensen, K. D., M. Waldstrøm, A. (2009)**. Association of ERCC1 protein expression to platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 27(15): 820-5 25.

- **Stordal, B., Davey, M. (2007)**. Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life.* 59(11): 696-9.

-**Swynghedauw, B., Silvestre J.S. (2008)**. Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires, 3^{ème} édition, Paris : DUnod, P21-22.

- **Temerk, Yassien., Hossieny, Ibrahim. (2014)**. Binding mode and thermodynamic studies on the interaction of the anticancer drug dacarbazine and dacarbazine–Cu(II) complex with single and double stranded DNA Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 95 (2014) 26–33.

- **Teste, K. (2008)**. *Synthèses et évaluations biologiques d'agents alkylants hétérocycliques thèse de doctorat*, université de limoges Ecole doctorale Sciences-Technologique-Santé Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.

-**Topping, RP., Wilkinson, JC., Scarpinato, KD. (2009)**. Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 284(21): 14029-39.

- **Treiber, DK., Zhai, X., Jantzen, HM., Essigmann, JM. (1994)**. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12):5672-6.

-**Voet, D., Voet, J. (2005)**. « Biochimie », 2^{ème} édition, Paris : de Boeck, P 161.

- **Wang, D., Lippard, S.J. (2005).** *Cellular processing of platinum anticancer drugs.* Nat Rev Drug Discov, 4(4): p. 307-20.
- Weinman S. (2004).** TOUTE LA BIOCHIMIE Dunod, Paris, : Dunod ,P 341.
- Wood, RD., Araújo, SJ., Ariza, RR., Batty, DP., Biggerstaff, M., Evans, E., Gaillard, PH., Gunz, D., Köberle, B., Kuraoka, I., Moggs, JG., Sandall, JK., Shivji, MK. (2000).** DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 65: 173-82.
- **Zhong,W., Jun-Sheng, Y., Welong, H., Kunyi, N., Yingqiu, L. (2001).** Spectroscopic studies of interaction of chlorobenzylidine with DNA. Depatement of chemistry, Biospectroscopy, Vol.62, 315-323.
- **Zhu, J., Yang, Y., Wu, J. (2007).** Bcl-2 cleavages at two adjacent sites by different caspases promote cisplatin-induced apoptosis. *Cell Res.* May;17(5):441-8.