



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 لخضر الوادي

N série:.....

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

Evaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de
dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane

Présentés Par :

M^{elle} Boudebia Ouafa

M^{elle} Boutera Sabrine

Devant le jury composé de :

- | | |
|---|----------------------------------|
| ➤ Président : M ^r Ben Ali Abdelhi | M.A.A, Université d'El Oued. |
| ➤ Examineur : M ^r Medjour Abdelhak | M.A.A, Université d'El Oued |
| ➤ Promoteur : M ^r Lanez Touhami | Professeur, Université d'El Oued |
| ➤ Co-Promoteur : M ^{me} Adaika Aicha | M.A.A, Université d'El Oued |

Dedicaces

Je dédie ce travail

À mon cher père ☺ Boudebia Abdallah

Qui m'a appris le succès et la patience.... Qui a habité sa tombe ..., avant de me voir porter le chapeau de succès Le moment qui a attendu trop longtemps Miséricorde de Dieu vous



À ma chère mère ☺ Boudebia Meriem

J'aimerais toujours te remercier pour tous ce que tu as fait jusqu'à notre jours-là pour assurer l'éducation et la formation de tous tes enfant .Je me rappel vraiment de tous tes efforts avec moi dès mon jeune âge, chère mère j'avoue vraiment que tu as été pour moi la lumière qui me guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite. J'espère que mon travail sera le témoignage de ma gratitude et mon respect le plus profond.

À deuxième maman ☺ Boudebia Noura « Dada ». Merci d'être dans ma vie.

À mes chers frères : Messaoud, Abderahman, Belgacem, Aymen.

À mes chers soeurs : Zakia, Zina, Safia, Laila, Zohra, Naima, Bechira.

Àux deuxièmes soeurs : Sara, Iman, Weam.

Et à mes chers neveux : Abderraouf, Badreddine, Omar, Khaoula, Aya, Oumaima,

Ouafa

Dedicaces

*À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma
vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de
ma vie ma mère **betibèche Zina** qui m'a apporté son appui durant toutes mes années
d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.
À mon cher père **mohammed** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long
de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses
encouragements.*

À la deuxième maman

Jâta Nora

*À mes sœurs : **Ubtissam , Farra ; Fouad ; Aya Et Rihab***

*À mes deuxièmes sœurs : **Chaima ; Aida ; Djihad ; Djumana , Ouedjdane***

*et mes frères **abdallah , Ibrahim Et Ismail***

Ammi Salah ; Hamza ; Abdallah ; Ayoub ; Kamel Et Saber

À toute ma famille, proche ou éloignée

À mes amis.

Sabrina

Remerciements

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

À notre encadreur de mémoire le Professeur **Lanez Touhami** directeur de laboratoire de recherche **VTRS** à l'université d'El oued, pour avoir accepté de nous encadrer, pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils, nous ont permis d'avancer plus loin dans nos recherches.

À notre co-encadreur **M^{me} Adaïka Aïcha**, de nous avoir accordé sa confiance en nous acceptant pour travailler sur ce sujet avec lui. Elle a suivi nos travaux avec intérêt tout en nous prodiguant des conseils toujours justes et elle a su nous redonner courage et aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Aussi pour son soutien, son attention, son qualités humaines. Pour tout cela, nous tiens à lui exprimer toute nos gratitude et tout particulièrement à le remercier profondément.

Nous exprimons aussi nos remerciements à **Ben Ali Abdelhi** qui nous avait fait l'honneur de présider ce Jury et à **Madjour Abdelhak** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.

Nous tenons à remercier profondément tout qui nous aide pour faire ce travail, et surtout **M^r.Tliba ali**, **D^r.Hemmami hadia**, **D^r.Hénni meriem**, **D^r.Mouada hanane**, **D^r. Zegheb Nadjiba** et **D^r. Lanez El-hafnaoui**.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire de département de la science de la nature et de la vie, **Université HAMMA LAKHDAR**, **El-oued**. Et à tous les

membres de laboratoire de l'urgence médicale d'El-oued, à tous les membres de laboratoire d'ELMEDJD.

Nous réservons une mention particulière à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et leur aide et tout particulièrement: Rehaïm Sana, Salem Nadjette, Degachí Widad, Boudebía Bechíra, Boutera Ríhab, Boutera Chaïma, Azzi Manaí, Touati Tlíba Ouarda, Attousí Asma et Gouassmía Soulef.

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tout ce qui ont participé à la réalisation de ce mémoire. Surtout, Boutera Abdallah, Boutera Ayoub, Boutera Ibrahím, Boudebía Aymen, Farhat Imad -Eddíne et Benaoun Abdelkerím.

Résumé

L'approche thérapeutique du cancer constitué trois axes principaux, la chirurgie, la radio-oncologie et la chimiothérapie, ce dernier repose sur l'utilisation de substances pharmacologiques pour tuer les cellules tumorales où la principale cible de ces substances est l'ADN. Parmi les composés organométalliques qui ont de capacité d'interagit avec l'ADN récemment étudiés sont les dérivés ferrocéniques. L'objectif de notre étude est l'évaluation *in silico*, *in vitro* et *in vivo* de l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes (FcTris). Les résultats *in silico* et *in vitro* montrent qu'il y a une interaction spontanée entre le FcTris et l'ADN qui se lie par intercalation ou par liaisons hydrogènes traduit par les paramètres d'interaction K et ΔG , les résultats montrent aussi que la forme réduite de dérivé ferrocénique réagit avec l'ADN plus que celle de la forme oxydée. En effet cette interaction est confirmée par la valeur de coefficient de diffusion D et la taille de site de liaison qui confirme davantage la formation du complexe FcTris-ADN. La liaison de dérive ferrocénique avec l'ADN peut provoquer leur altérations qui pourraient conduire à l'échec de la cellule cancéreuse de se répliquer. L'analyse *in vivo*, montre une augmentation du poids relatif du foie de groupe exposé au métribuzine. Des changements notables dans les paramètres hématologiques et biochimiques étudiés ont été observés. Cependant, Les résultats révèlent également la présence de stress oxydatif chez le lot exposé au métribuzine. En revanche, le traitement par le FcTris avec les deux doses et par le cisplatine donne les mêmes résultats en normalisant le poids relatif de foie et les paramètres hématologiques et biochimiques étudiés et en diminuant l'état de stress. L'étude histologique des foies montre que le FcTris et le cisplatine provoquent une protection contre la nécrose tumorale.

Mots clés : ADN, ferrocène, docking, paramètres d'interaction constante de liaison et énergie libre de liaison, paramètres biochimiques, stress oxydatif.

ملخص

الاسلوب العلاجي للسرطان يتكون من ثلاث محاور أساسية ، الجراحة، العلاج بالأشعة و العلاج الكيميائي، هذا الاخير يعتمد على استخدام مواد صيدلانية من اجل تثبيط الخلايا السرطانية حيث المستهدف الرئيسي لهذه المواد هو الحمض النووي (ADN). ومن بين المركبات العضومعدنية المدروسة حديثاً لها القدرة على التداخل مع الـADN هي مشتقات الفيروسين. الهدف من دراستنا هو تقييم النشاطية البيولوجية لمشتق N-فيروسينيل-ميثيل-تريس-هيدروكسيل-ميثيل أمينوميثان (FcTris) حاسوبيا (*in silico*)، في المختبر (*in vitro*) وفي الجسم الحي (*in vivo*). بينت النتائج حاسوبيا و في المختبر ان هناك تداخل تلقائي بين FcTris وADN الذي يرتبط بواسطة إقحام أو عن طريق روابط هيدروجينية تترجم من قبل معايير التداخل K و ΔG . تظهر النتائج أيضا أن الشكل المرجع لمشتق الفيروسين يتفاعل مع الـADN أكثر من الشكل المؤكسد. في الواقع هذا التداخل يؤكد من خلال قيمة معامل الانتشار، وطول موقع الرابطة دليل على تشكيل معقد FcTris-DNA. الربط بين مشتق الفيروسين و الحمض النووي يمكن أن يؤدي إلى تغييرات على الـADN مما يؤدي إلى فشل الخلايا السرطانية من التكاثر. ويظهر التحليل في الجسم الحي زيادة في الوزن النسبي لكبد المجموعة التي تعرضت للميتريبيوزين. وقد لوحظت تغييرات بارزة في المعايير الدموية والبيوكيميائية المدروسة. ومع ذلك، فإن النتائج تكشف أيضا عن وجود إجهاد تأكسدي في المجموعة التي تعرضت للميتريبيوزين. غير أن العلاج بواسطة مشتق الفيروسين مع الجرعتين وبواسطة سيسبلاتين تعطي نفس النتائج في تعديل الوزن النسبي للكبد والمعايير الدموية و البيوكيميائية المدروسة وخفض حالة الإجهاد. و أظهرت الدراسة النسيجية للكبد أن FcTris وسيسبلاتين يسببان حماية ضد نخر الورم.

كلمات مفتاحية : الحمض النووي، فيروسين، الإلتحام، معايير التداخل ثابت الرابطة و الطاقة الحرة للرابطة، معايير بيوكيميائية، إجهاد تأكسدي.

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine	Ep_a : potentiel de pic anodique
Å : Ångström	Ep_c : potentiel de pic cathodique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	ESM : Ecartype moyenne
ADT : AutoDockTools	Fc : Ferrocene
AFP : Alpha-FeotoProtéine	Fe : Fer
ALAT : alanine aminotransférase	FNS : formule de numération sanguine
ARN : Acide RiboNucléique	g : gramme
ASAT : aspartateaminotransférase	G : Guanine
BHT : Butylhydroxytoluène	GB : globule blanc
BSA : Sérum bovin albumine	GLDH : glutamate déshydrogénase
°C : Degrés Celsius	GSH : Glutathion réduite
C : Cytosine	GSTs : glutathion-S-transférase
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	H : Hydrogène
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène	H₂O : eau
Cispt : Cisplatine	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
cm : centimètre	Ip_a : courant de pic anodique
CO₂ : anhydride carbonique	Ip_c : courant de pic cathodique
CV : Voltamétrie Cyclique	K : constant de liaison
D_{0.1} : Dose 0.1 mg/kg	K₂HPO₄ : Phosphate de potassium dibasique
D_{0.2} : Dose 0.2 mg/kg	Kcal : Kilocalorie
DA : deoxyadénine	Kg : Kilogramme
FcTris : dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes	KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique
dlg : AutoDock docking log	KJ : Kilojoule
DMSO : Dimethyl sulfoxide	l : litre
DO : Densité Optique	M : molaire
DT : deoxythymidine	μA : micro-ampère
DTNB : 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque	MDA : malondialdéhyde
E₀ : Potentiel formel	MDH : Malate déshydrogénase
EDTA : Acide éthylène Diamine Tétracétique	mg : milligramme
	MgSO₄ : sulfate de magnésium anhydre

min : minute
ml : millilitre
mmol : millimole
Moy : moyenne
mV : milliVolte
mV/s : millivolt sur seconde
N : Azote
NaCl : Chlorure de sodium
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine
Dinucléotide
NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
NH₃ : ammoniac
NH₄Cl : Chlorure d'ammonium
nm : nanomètre
NS : différence Non Significative
PAL : phosphatase alcaline
Pdb : Protein Data Bank
Pdbqt : Protein Data Bank, Partial Charge
(Q), & Atom Type (T)
pH : potentiel Hydrogène
pNPP : p-nitrophénylphosphate
POD : peroxydase
ppm : Parties par million
prot : protéine

QSAR : Quantitative Structure Activity
Relationship
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
S : Taille de site de liaison
SDS : Sodium Dodecyl Sulfat
T : Thymine
TBA : Acide thiobarbiturique
TCA : Acide trichloroacétique
TGO : glutamate oxaloacétate-
transaminase
TGP : glutamate-pyruvate-transaminase
Tm : Température de fusion
TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha
TP : Témoin Pesticide
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
trs : Tours
U : Uridine
UV : Ultraviolet
Vis : Visible
 ΔE_p : Différence de potentiel
 μ l : microlitre
 ΔG : énergie libre de liaison
4-AF : 4-aminophénazone

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	ADN dans le noyau cellulaire	3
Figure 02	Structure de l'ADN	4
Figure 03	Différents formes de l'ADN	5
Figure 04	Le "dogme central de la biologie moléculaire", représentant les processus cellulaires clés de la réplication de l'ADN et la traduction	6
Figure 05	Représentation de l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentée en abscisse	7
Figure 06	Dénaturation de l'ADN peut être suivie par l'augmentation de densité optique : elle est caractérisée par la température de fusion	8
Figure 07	Formation d'adduits entre deux guanines adjacentes par le CISPLATINE	9
Figure 08	Différentes types des interactions réversibles	10
Figure 09	Étapes de l'oncogenèse	11
Figure 10	Structure de ferrocène proposée par Pauson et Kealy	13
Figure 11	Structure correcte de ferrocène	13
Figure 12	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène	18
Figure 13	Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10^{-3} M en présence de tétrabutylammoniumperchlorate 10^{-1} M à $V = 100$ mV/s	19
Figure 14	Chemin réactionnel de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthyl-aminométhanes	21
Figure 15	Structure chimique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthyl-aminométhanes	22
Figure 16	Quatre parties essentielles de spectrophotomètre	24
Figure 17	Allure générale de la courbe voltampérométrique et ses grandeurs caractéristiques.	25
Figure 18	Structure de l'ADN d'un dodécamère	31
Figure 19	Procédures de docking avec AutoDock.	33
Figure 20	Spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800).	37
Figure 21	Dispositif expérimental voltampérométrique	38

Figure 22	Interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, (B) : Vue en surface du FcTris amarré avec de l'ADN, Il montre que le FcTris est attaché dans le grand sillon par liaison H.	49
Figure 23	Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimées par Kcal.mol ⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le dérivé ferrocénique et de l'ADN.	50
Figure 24	Spectre d'absorption de l'ADN extrait	51
Figure 25	Spectre d'absorption UV-Vis de FcTris (4 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 0.1 M à pH = 7.2.	53
Figure 26	Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.	53
Figure 27	Voltammogrammes cycliques de dérivés ferrocénique (2mM) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 0.1 M à pH = 7.2 à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.	55
Figure 28	Voltammogramme cyclique de dérivé ferrocénique (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 0.1 M à pH = 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/S.	55
Figure 29	Droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	56
Figure 30	Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de dérivé ferrocénique libre et celui lié à l'ADN	57
Figure 31	Voltammogrammes cycliques de dérivés ferrocénique (2mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence de 2.49 µM d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 0.1 M à pH = 7.2.	58
Figure 32	Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN.	60
Figure 33	Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée	61

	de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.	
Figure 34	Tracé de $C1/Cn$ en fonction de [ADN]	62
Figure 35	Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.	64
Figure 36	Poids relatif des organes (cœur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.	65
Figure 37	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur certains paramètres hématologiques.	66
Figure 38	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP) et le taux de PAL chez les rattes exposées au métribuzine.	68
Figure 39	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique) chez les rattes exposées au métribuzine.	69
Figure 40	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium chez les rattes exposées au métribuzine.	70
Figure 41	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine “AFP”) chez les rattes exposées au métribuzine.	71
Figure 42	Concentrations hépatique et rénal de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.	72
Figure 43	Concentrations cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.	73
Figure 44	Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.	74
Figure 45	Concentrations tissulaires de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux	75
Figure 46	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, agrandissement x40). (T) foie de ratte témoin ; (P) foie de ratte exposé au métribuzine sans traitement; (D _{0.1}) foie de ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 0.1 mg/kg de FcTris ; (D _{0.2}) foie de ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 0.2 mg/kg de FcTris	76
Figure 47	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie de ratte exposé au métribuzine et traité par cisplatine, agrandissement x40.	77

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène	19
Tableau 02	Mode opératoire de dosage de glycémie	40
Tableau 03	Mode opératoire de dosage de l'activité enzymatique de GSTs	46
Tableau 04	Différentes conformations de l'interaction FcTris -ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison k .	48
Tableau 05	Distances et énergies des liaisons hydrogènes formées, et les atomes de dérivé ferrocénique et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.	50
Tableau 06	Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes	52
Tableau 07	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN- FcTris obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.	54
Tableau 08	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la fig.28.	56
Tableau 09	Constante et énergie libres de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	57
Tableau 10	Données électrochimiques de la forme libre de FcTris et celui de l'adduit FcTris-ADN	59
Tableau 11	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié	59
Tableau 12	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	60
Tableau 13	Coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN	61
Tableau 14	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique.	63
Tableau 15	Comparaison des constantes (mol^{-1}) et des énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique avec celles obtenus par amarrage moléculaire.	63
Tableau 16	Poids relatif des organes (foie, reins, cœur, poumon) chez les	64

	différents groupes expérimentaux.	
Tableau 17	Concentration plasmatique des paramètres hématologiques chez les différents groupes expérimentaux.	65
Tableau 18	Concentrations des marqueurs biochimiques chez les différents groupes expérimentaux.	67
Tableau 19	Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) et glutathion réduit (GSH) et l'activité de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux.	72

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : ADN (Acide DésoxyriboNucléique).....	3
I.1.1 Définition	3
I.1.2. Structure et propriétés de l'ADN.....	3
I.1.3. Rôles biologiques.....	5
I.1.3.1. Synthèse des protéines	5
I.1.3.2. Transmission de l'information génétique	6
I.1.3.3. Importance biologique des liaisons de faible énergie	6
I.1.4. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique	6
I.1.4.1. Instabilité chimique d'ADN	6
I.1.4.2. Spectres UV des bases nucléiques	7
I.1.4.3. Propriétés spectrales.....	8
I.1.4.4. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN).....	8
I.1.5. Interaction de l'ADN avec les adduits.....	9
I.1.5.1. Interaction irréversible avec l'ADN.....	9
I.1.5.2. Interactions réversibles avec l'ADN.....	9
I.1.6. Dommages de l'ADN et l'oncogenèse.....	11
I.1.6.1. Étapes de l'oncogenèse.....	11
I.1.6.2. Traitement du cancer.....	12
Chapitre 2 : Ferrocène et dérivé ferrocénique étudié.....	13
I 2.1. Généralité	13
I 2.2. Définition du ferrocène	14
I 2.3. Liaisons et structures électroniques du ferrocène	14

I.2 4. Synthèse du ferrocènes	14
I.2 4.1. Réaction du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux	15
I.2 4.2. Réaction du cyclopentadiénylthallium avec le chlorure ferreux	15
I.2 4.3. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux	15
I.2 4.4. Déprotonation du cyclopentadiène par oxydoréduction	15
I 2.5. Réactivité	16
I 2.5.1. Réaction de substitution.....	16
I 2.5.2. Acylation.....	16
I 2.6. Propriétés du ferrocène	16
I 2.6.1. Propriétés chimique	16
I 2.6.2. Propriétés physique.....	17
I 2.6.3. Propriétés spectrale	17
I 2.6.4. Structure Cristalline	18
I 2.6.5. Propriétés Électrochimiques	18
I 2.7. Quelques applications et utilisations du ferrocène et ses dérivés	19
I 2.8. Dérivé ferrocénique étudié.....	20
I 2.8.1. Synthèse	21
I 2.8.1. Structure.....	22
Chapitre 3 : Contexte théoriques des techniques expérimentales utilisées.....	23
I 3.1. Spectroscopie d'absorption dans UV-Visible	23
I 3.1.1. Principe du spectroscopie d'absorption dans l'UV visible	23
I 3.1.2. Loi de Beer-Lambert.....	23
I 3.1. Appareillage.....	24
I.3.2. Méthode d'analyse électrochimique	24
I.3.2.1. Voltampérométrie cyclique.....	25
I.3.3. Amarrage moléculaire.....	26
I.3.3.1. Amarrage avec AutoDock.....	27
I.3.3.2. Modélisation du potentiel énergétique.....	27
I.3.3. Etude <i>in vivo</i>	28
I.3.3.1. Définition	28
I.3.3.2. Etude chez l'animal.....	28

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériels	29
II.1.1. Produits chimiques	29

II.1.2. Matériels biologiques	29
II.1.3. Matériels de laboratoire	29
II.1.4. Animaux	30
II.2. Méthodes	31
II.2.1. Etude <i>in silico</i>	31
II.2.1.1. Préparation du dérivé ferrocénique (ligand)	31
II.2.1.2. Préparation de l'ADN (macromolécule)	31
II.2.1.3. Processus de docking	31
II.2.2. Etude <i>in vitro</i>	34
II.2.2. Extraction d'ADN	34
II.2.2. Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-FcTris	36
II.2.3. Etude <i>in vivo</i>	39
II.2.3.1. Traitement des animaux.....	39
II.2.3.2. Sacrifice et prélèvement du sang et des organes	39
II.2.3.3. Méthodes de l'analyse sanguine	40
II.2.3.4. Dosage des paramètres de stress oxydatif	43
II.2.3.5. Méthode d'analyse statistique	47

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Etude <i>in silico</i>	48
III.2. Etude <i>in vitro</i>	51
III.2.1. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN	51
III.2.1.1. Spectre d'absorption de l'ADN	51
III.2.1.2. Analyse quantitative : mesure de la concentration.....	51
III.2.1.3. Analyse de la pureté	52
III.2.2. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-FcTris.....	52
III.1.3. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique de l'interaction FcTris-ADN	54
III.1.3.1. Constante et énergie libre de l'interaction FcTris-ADN	54
III.1.3.2. Détermination du rapport des constants de liaison.....	57
III.1.3.3. Coefficient de diffusion.....	60
III.1.3.4. Taille de site de liaison.....	62
III.1.3.4. Comparaison des constantes (mol^{-1}) et énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) déterminées <i>in vitro</i> par méthode spectroscopique et électrochimique avec celles obtenus <i>in silico</i> par amarrage moléculaire	63
III.3. Etude <i>in vivo</i>	64

III.3.1. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine.....	64
III.3.2. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres hématologique chez les rattes exposées au métribuzine	65
III.3.3. Effet de traitement par le FcTris et le Cist sur les paramètres biochimique chez les rattes exposées au métribuzine.....	67
III.3.3.1. Effet sur les enzymes hépatique (TGO, TGP et PAL)	68
III.3.3.2. Effet sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique)	69
III.3.3.3. Effet sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium.....	70
III.3.3.4. Effet sur le marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine “AFP”).....	71
III.3.4. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine	71
III.3.4.1. Effet sur la concentration tissulaire de Malondialdéhyde (MDA)	72
III.3.4.2. Effet sur la concentration tissulaire de glutathion réduit (GSH).....	74
III.3.4.3. Effet sur la concentration tissulaire de Glutathion S Transférase (GST).....	75
Discussion	75
Conclusion générale	82
Références bibliographiques	84
Annexes	94

resumé et mots-clés

Introduction

générale

Introduction générale

La transmission fidèle du matériel génétique est essentielle pour qu'un organisme se développe normalement. Cependant, l'ADN est constamment soumis à des agents enzymatiques, chimiques ou physiques qui peuvent altérer son intégrité (**Hurley et Boyd, 1988**). Dans la cellule, il existe un ensemble complexe de voies de signalisation connu sous le nom de Réponse aux Dommages de l'ADN (DDR) qui assure la maintenance et la transmission du génome, coordonnant la réplication de l'ADN, la recombinaison, la réparation de l'ADN, ainsi que la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Un dysfonctionnement d'un de ces processus peut conduire à une prédisposition au cancer (**Lacave, R et al., 2005**).

Le cancer est une maladie de nos gènes. Il est généralement admis que le processus de transformation maligne nécessite plusieurs mutations indépendantes dans des gènes clés. Au cours de la vie, le génome accumule des mutations qui activent les proto-oncogènes et inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs, et provoquent de division anormale et incontrôlée de cellules appelées cellules cancéreuses, qui envahissent et détruisent les tissus avoisinants (**Baguley, B.C., 1991**). Le développement des cellules cancéreuses conduit généralement à la formation d'un nodule ou d'une tumeur. Un des plus grands problèmes liés au cancer est sa propagation dans différentes parties du corps, qu'on appelle la métastase (**Lacave, R et al., 2005 et Lacroix et al., 2009**). 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'ADN doit constituer la cible principale des agents anticancéreux (**Ricco, A.J., 1997**). L'interaction entre les médicaments anticancéreux et ADN, ainsi que les applications des techniques expérimentales a un potentiel d'intérêt pharmaceutique.

L'étude des espèces chimiques –synthétiques ou naturelles– ayant au moins une liaison covalente carbone-métal (C-M) ou carbone-métalloïde présentant des activités biologiques, a été définie comme chimie bio-organométallique. Les composés organométalliques –en tant qu'espèces à stabilité cinétique plus élevée que les complexes inorganiques de coordination et dotés d'une vaste diversité structurale– sont de fait attractifs pour le design des nouvelles classes de composés présentant des applications biologiques originales (**Marinero, C., 2014**).

L'utilisation de composés organométalliques pour le traitement des cancers est l'un des domaines de la chimie bio-organométallique qui connaît une expansion rapide. Parmi les composés les plus intéressants et très étudiés sont les dérivés ferrocéniques (**Görmen, M., 2010**).

L'objectif de notre étude est d'évaluer le type d'interaction entre le dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane et l'ADN. Cette interaction peut se faire par trois approches *in silico* par amarrage moléculaire, *in vitro* par la spectroscopie UV-Vis et l'électrochimie. Enfin pour confirmer l'effet biologique de ce dérivé ferrocénique nous avons testé son efficacité par approche *in vivo* par l'injection intra-péritonéale de ce dérivé ferrocénique chez les rattes albinos de type Wistar exposées au métribuzine et en comparer leur activité biologique avec le cisplatine (composé organométallique anticancéreux commercialisé et largement utilisé en chimiothérapie) (Nuhric, A. 2015).

Notre travail est répartie en trois parties, La première partie comprend une aperçu bibliographique qui contient trois chapitres : le premier chapitre comporte une étude sur l'acide désoxyribonucléique, le deuxième chapitre concerne le ferrocène et le dérivé ferrocénique étudié et le troisième chapitre présente un contexte théorique des techniques expérimentales utilisées. La deuxième partie concerne la partie expérimentale, qui présente les matériels et les méthodes utilisés. En fin, la troisième partie s'intitule résultats et discussion comprenant la présentation des différents résultats obtenus et ses interprétations.

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

ADN "AcideDésoxyriboNucléique"

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**Chapitre 1 : ADN (Acide DésoxyriboNucléique)****I.1.1. Définition**

L'ADN est un bio-polymère universel. Il est présent dans toutes les cellules. Il se trouve dans le cytoplasme des cellules procaryotes, alors qu'il est localisé dans le noyau, les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. L'ADN est le support de l'hérédité car il constitue le génome des êtres vivants et se transmet en totalité ou en partie lors des processus de la reproduction (Quinkal, I., 2003).

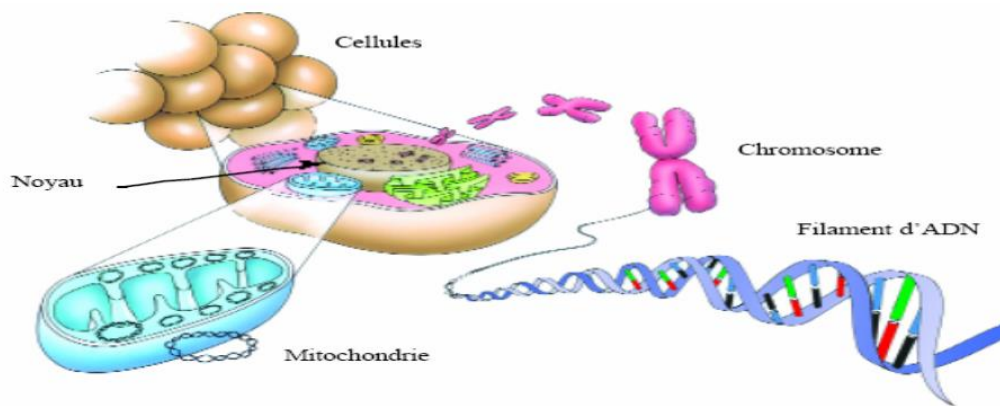


Figure 01 : ADN dans le noyau cellulaire (Chennouf, F., 2011).

I.1.2. Structure et propriétés de l'ADN

La molécule d'ADN est la plus grosse molécule de l'organisme. C'est une double hélice faite de deux monomères enroulés les uns sur les autres. Cette molécule est composée d'une succession répétitive de nucléotides composés eux-mêmes, dans l'ordre, d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre, le Désoxyribose, et d'un acide phosphorique. La séquence sucre-acide phosphorique est la séquence invariable de l'ADN. Les nucléotides ne se distinguent les uns des autres que par leur base. Il y en a, dans l'ADN, quatre types : l'Adénine, A, et la Guanine, G, qui sont des purines, la Cytosine, C, et la Thymine, T, qui sont des pyrimidines. La Thymine est la seule base spécifique de l'ADN, elle ne se retrouve pas dans l'Acide RiboNucléique, ARN, où elle est remplacée par l'Uridine, U (Swynghedauw, B., Silvestre J-S., 2008).

Ces bases ont une structure particulière qui confère à la molécule ses propriétés. Elles ont les unes pour les autres des affinités spécifiques et s'apparient d'une manière invariable T-A et C-G, c'est-à-dire que les bases puriques s'apparient aux bases pyrimidiques, mais ne peuvent contracter de liaisons entre elles, et vis-versa. Cette propriété donne à la molécule sa

stabilité et permet l'établissement de liaisons d'une hélice (ou monomère) à l'autre. Ces sont des liaisons hydrogène, mais leur nombre varie selon le couple de bases concerné (3 liaisons pour C-G; 2 pour T-A). Ces liaisons sont très spécifiques et puisque G ne peut se lier qu'à C et T qu'à A, les deux brins d'ADN ont une structure en image, et sont dits complémentaires, ce qui veut dire que la structure de l'un permet de prédire celle de l'autre (**Swynghedauw, B., Silvestre J-S., 2008**). Les 2 brins sont dits anti-parallèle, car leur polarité est inversée. Dans une double hélice d'ADN, un brin est dans le sens 5'-->3' alors que le brin complémentaire est en sens 3'-->5' (**Lunardi, J., 2012**).

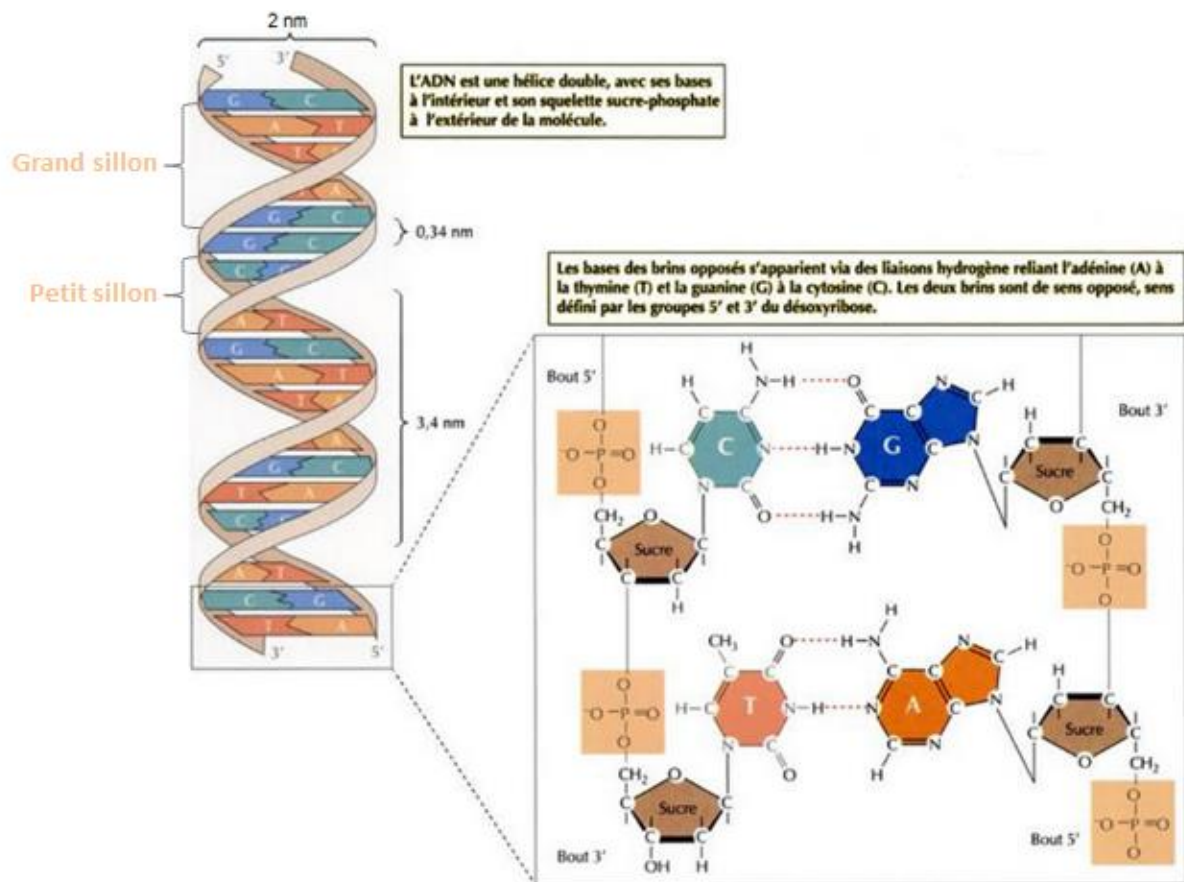


Figure 02 : Structure de l'ADN (Cooper, G-M., 1999).

Il existe plusieurs formes d'ADN dont la classification est fondée sur des critères physicochimiques. Ces types d'ADN diffèrent légèrement par le diamètre de leur hélice et par l'orientation de leur paire de bases. La structure de Watson et Crick également appelée forme B de l'ADN est la forme biologiquement la plus abondante. Elle se caractérise par un pas à droite de l'enroulement de la double hélice (**Gautheret P., 2012**). Lorsque l'humidité est faible et que la salinité est forte, l'ADN se présente sous la forme A. Dans ce cas la double hélice a un pas à droite et un intervalle entre les paires de bases plus faible que dans l'ADN B.

La molécule d'ADN dans la forme A est donc plus courte et de diamètre plus large que dans l'ADN B. Une troisième forme dite ADN Z se différencie par des hélices qui tournent vers la gauche. Le squelette sucre-phosphate prend une disposition en zigzag (d'où le nom qui lui a été donné) (Garrett, R.H et Grisham, C.M., 2000).

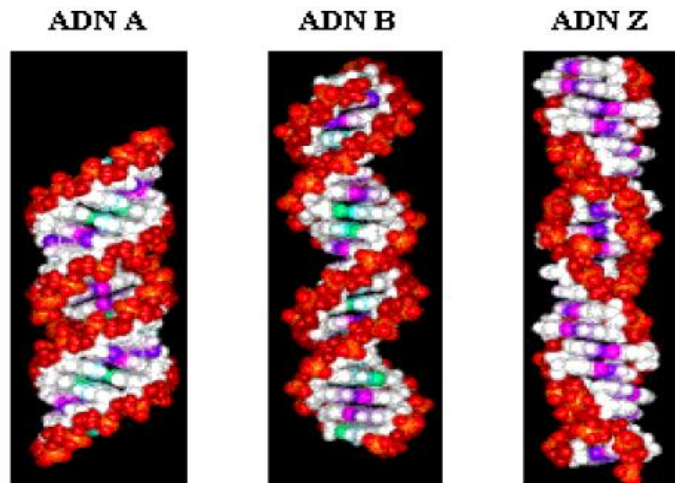


Figure 03 : Différents formes de l'ADN (Teste, K., 2008).

I.1.3. Rôles biologiques

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). Les études sur le mécanisme de liaison de certaines petites molécules avec de l'ADN ont été identifiées comme l'un des sujets clés au cours des dernières décennies. En outre, celle-ci ont pour comprendre les propriétés structurales de l'ADN, la mutation des gènes, l'origine de certaines maladies, le mécanisme d'action de certains médicaments antitumoraux et antivirus et, par conséquent, de concevoir de nouveaux médicaments plus efficaces ADN ciblées pour faire face à les maladies génétiques (Raufa S et al., 2005).

I.1.3.1. Synthèse des protéines

C'est le rôle fondamental car les protéines sont l'expression de l'information contenue dans le génotype. Ce mécanisme permet de différencier les protéines de structure et les protéines enzymatiques. A partir de l'ADN on aura formation d'un ARN correspondant (transcription) grâce à l'ARN polymérase, cet ARN ensuite forme une protéine spécifique (traduction) (Dahmani, O., 2014).

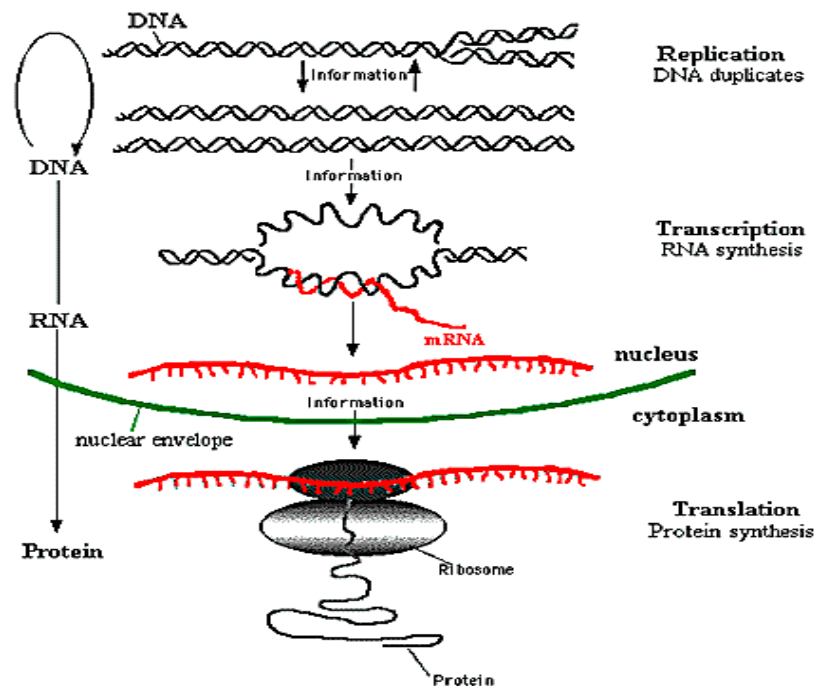


Figure 04 : Le "dogme central de la biologie moléculaire", représentant les processus cellulaires clés de la réplication de l'ADN et la traduction (Afzal S., 2010).

I.1.3.2. 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 (Adaika A., 2016).

I.1.3.3. 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 (Chennouf F., 2011).

I.1.4. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique

I.1.4.1. Instabilité chimique d'ADN

Les acides nucléiques se décomposent spontanément en solution. D'autre part, la présence du 2-désoxyribose rend la liaison N-glycosidique fragile à l'hydrolyse,

particulièrement celle des purines qui est 20 fois plus instable que celle des pyrimidines. Par ailleurs, les fonctions amine exocycliques des bases peuvent être sujettes à des réactions d'hydrolyse à température et à pH physiologiques. La cytosine, 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 uracile et thymine. Toutefois, la structure en double hélice de l'ADN assure une bonne protection contre ces réactions. D'autre part, la désamination des purines existe, mais est 50 fois moins rapide que celle de la cytosine. L'adénine et la guanine sont alors transformées en hypoxanthine et xanthine respectivement. Bien que la fréquence de ces réactions soit relativement faible dans l'ADN double brin, la présence de ces lésions peut avoir des conséquences délétères pour la cellule. En effet, l'appariement des bases désaminées est différent de celui des précurseurs et la réplication des bases induit des mutations (**Muller, E., 2002**).

I.1.4.2. Spectres 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
- ❖ 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) (**Amzazi, S. 2006**).

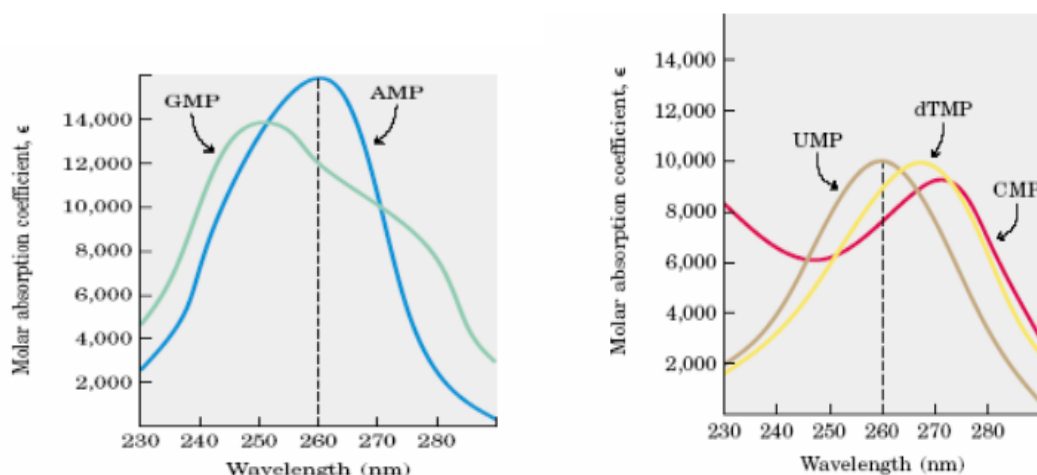


Figure 05 : Représentation de l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentée en abscisse (**Chennouf, F., 2011**).

I.1.4.3. 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. L'absorption UV dépend à l'appariement des bases et la température de fusion est caractéristique d'une séquence d'ADN spécifique. Comme trois liaisons hydrogène sont présentes entre la guanine et la cytosine, les paires d'adénosine et de thymine sont uniquement stabilisées par deux liaisons hydrogène (Kästner, A., 2011).

I.1.4.4. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

Les acides nucléique sous forme de double brin se déroulent ou se dénaturent lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures, des pH extrêmes et certains agents chimiques (ex. formamide, urée).

- ❖ La dénaturation provoque l'effet hyperchromique qui consiste en une augmentation de l'absorption ultraviolette (UV) (A_{260}).
- ❖ La dénaturation provoque une diminution de la viscosité.
- ❖ Un polynucléotide se dénature à une certaine température connue sous le nom de température de «fusion», melting en anglais (T_m). Les régions riches en GC forment des doubles hélices plus stables que les régions riches en AT; en conséquence, l'ADN riche en GC a une T_m plus élevée que l'ADN riche en AT (Robertis, E. D. P., Robertis, E. M. F. 1983).

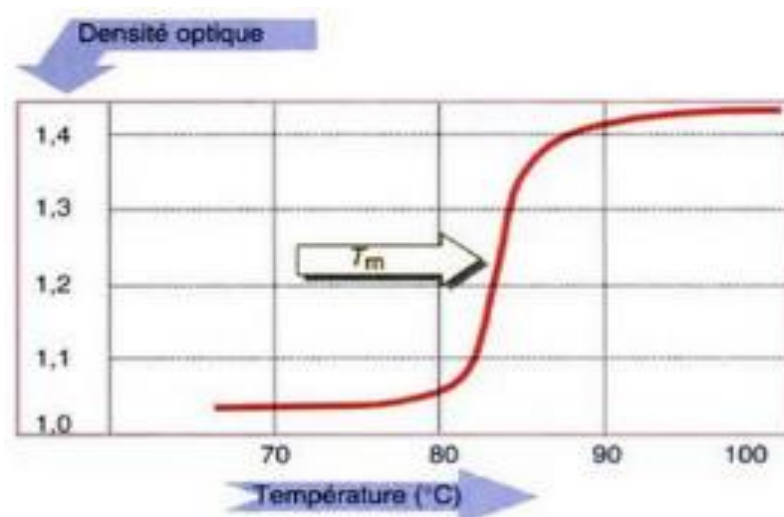


Figure 06 : Dénaturation de l'ADN peut être suivie par l'augmentation de densité optique : elle est caractérisée par la température de fusion (Lewin, B., 1998).

I.1.5. Interaction de l'ADN avec les adduits

L'ADN est une cible biologique potentielle importante pour de nombreuses molécules. En raison de leur structure complexe et sa taille, l'ADN offre de nombreux sites de liaison (**Kostrhunova, H et al., 2008**). Il est à noter que la structure de molécule joue un rôle primordial dans le mode d'interaction avec l'ADN (**Very, T., 2012**).

Nous allons, alors, distinguer deux grandes familles d'interactions :

I.1.5.1. Interaction irréversible avec l'ADN

Interaction irréversible avec les agents alkylants, sont des agents possèdent un groupement chimique pouvant former des liaisons covalentes avec les acides nucléiques. La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bifonctionnel (ils possèdent deux groupes alkyls) pouvant lié deux nucléotides adjacents (**Sirajuddin et al., 2013**). L'azote N7 de la guanine est probablement la cible moléculaire principale de l'alkylation, mais aussi N1 et N3 de l'adénine ou N3 de la cytosine peuvent être concernés (**Gossens, Ch et al., 2009**). L'exemple le plus connu est certainement celui du cisplatine qui servira de complexe modèle pour cette famille (**Sirajuddin et al., 2013**).

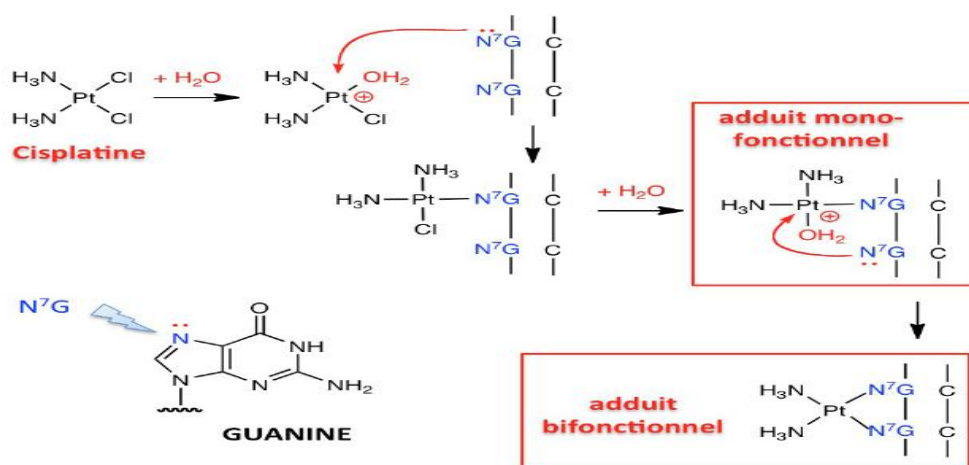


Figure 07 : Formation d'adduits entre deux guanines adjacentes par le CISPLATINE (**Nuhrich, A. 2015**).

I.1.5.2. Interactions réversibles avec l'ADN

Comprend plusieurs types d'interactions:

a. Interaction avec le petit ou le grand sillon

Cette interaction correspond à un placement du complexe dans l'un des deux sillons de l'ADN. Le complexe est alors nommé "groove binder". La nature des interactions est

principalement électrostatique. En effet, les complexes sont, généralement, des cations et cette charge positive va être capable d'interagir avec les groupements phosphates présents sur la double hélice. Ce mode n'implique que peu de déformations des paires de bases. La plupart des molécules de petites taille qui adoptent ce mode d'interaction le font via le petit sillon de la forme B de l'ADN (Very,T., 2012).

b. Interaction par intercalation

Un grand nombre de familles de molécules peuvent s'intercaler dans l'ADN, dans l'espace compris entre deux paires de bases. Ces molécules sont généralement polycycliques, aromatiques et planes. L'intercalation induit un changement de la structure locale du brin d'ADN, comme un "débobinage" de la double hélice ou un allongement du brin d'ADN. Ces changements structuraux induisent des modifications fonctionnelles, dont souvent une inhibition du procédé de réplication (Novakova, O et al., 2003).

c. Interaction par insertion

Correspond à une forte modification de la structure avec une rupture des liaisons hydrogène entre les bases, la molécule prend alors la place de la base éjectée dans la structure du double brin. Les coupures des brins d'ADN résultant d'une réaction radicalaire au niveau du désoxyribose des nucléotides GT ou GC (Lenglet., 2010).

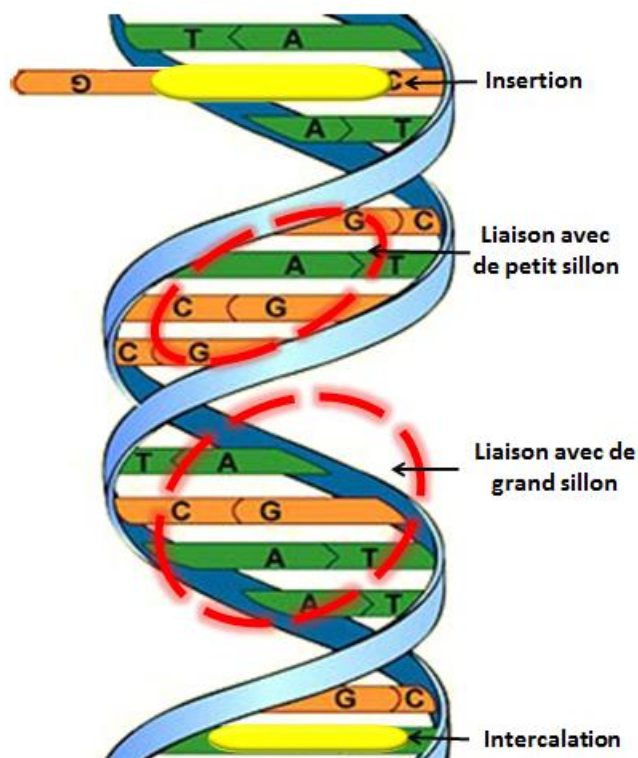


Figure 08 : Différentes types des interactions réversibles (Turro, N et al., 1991, Ariel, A et al., 2016 et Very,T., 2012).

I.1.6. Dommages de l'ADN et l'oncogenèse

La transmission fidèle du matériel génétique (et épigénétique) est essentielle pour qu'un organisme se développe normalement. Cependant, l'ADN est constamment soumis à des agents enzymatiques, chimiques ou physiques qui peuvent altérer son intégrité. Dans la cellule, il existe un ensemble complexe de voies de signalisation connu sous le nom de Réponse aux Dommages de l'ADN (DDR) qui assure la maintenance et la transmission du génome, coordonnant la réplication de l'ADN, la recombinaison, la réparation de l'ADN, ainsi que la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Un dysfonctionnement d'un de ces processus peut conduire à une prédisposition au cancer (**Lacave, R et al., 2005**).

Le cancer est une maladie de nos gènes. Il est généralement admis que le processus de transformation maligne nécessite plusieurs mutations indépendantes dans des gènes clés. Au cours de la vie, le génome accumule des mutations qui activent les proto-oncogènes et inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs, et provoquent de division anormale et incontrôlée de cellules appelées cellules cancéreuses, qui envahissent et détruisent les tissus avoisinants. Le développement des cellules cancéreuses conduit généralement à la formation d'un nodule ou d'une tumeur. Un des plus grands problèmes liés au cancer est sa propagation dans différentes parties du corps, qu'on appelle la métastase (**Lacave, R et al., 2005 et Lacroix et al., 2009**).

I.1.6.1. Étapes de l'oncogenèse

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, K., 2008 cité par Adaika A., 2016**).

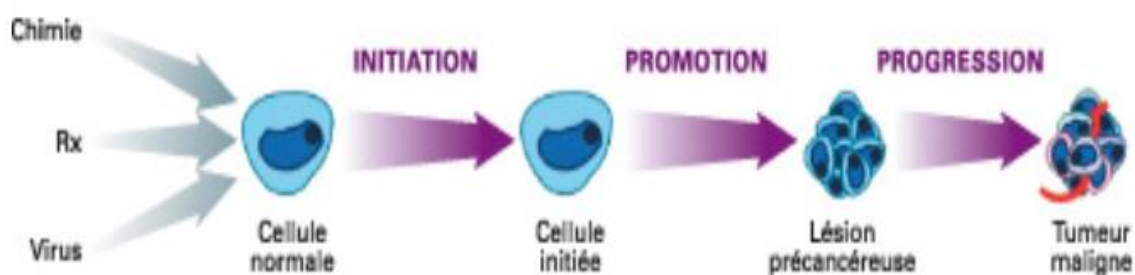


Figure 09 : Étapes de l'oncogenèse (Jacqueline L.Ch., 2000)

I.1.6.2. Traitement du cancer

Le but du traitement d'un cancer est, au mieux, d'obtenir la guérison ou, à défaut, de stopper l'évolution le plus longtemps possible tout en atténuant les symptômes de la maladie. Il existe deux grandes modalités de traitement du cancer : les traitements à visée locorégionale (chirurgie, radiothérapie) et les traitements médicaux systémiques tels que l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie (**Jegham, H., 2009**).

- **la chirurgie** : elle permet l'ablation d'une tumeur ou des tissus lésés. C'est le principale mode de traitement des tumeurs solides, localisées.
- **La radiothérapie** : la tumeur est irradiée par des rayons X ou γ afin de détruire les cellules tumorales. Elle est souvent utilisée en association avec d'autres thérapies.
- **Les traitements biologiques** : ils utilisent des substances endogènes. Par exemple, l'immunothérapie renforce les défenses immunitaires contre les cellules tumorales.
- **Les traitements hormonaux** : ils agissent sur la vitesse à laquelle les cellules tumorales grossissent, se multiplient ou meurent. C'est une forme particulière de chimiothérapie qui agit sur le système endocrinien et qui est utilisée pour le traitement de cancers hormono-dépendants.
- **Les greffes de la moelle osseuse** : il ne s'agit pas d'un traitement direct mais elles sont parfois utilisées pour renforcer le système de production des cellules sanguines.
- **La chimiothérapie** : il s'agit de l'utilisation de substances pharmacologiques pour tuer les cellules tumorales. L'utilisation de la chimiothérapie anticancéreuse dépend du type de cancer à traiter. Plusieurs agents anticancéreux avec des mécanismes d'action différents sont généralement combinés pour augmenter l'efficacité du traitement, et éviter des phénomènes de résistance (**Teniou, S., 2011**).

L'utilisation de composés organométalliques pour le traitement des cancers est l'un des domaines de la chimie bio-organométallique qui connaît une expansion rapide. Parmi les composés les plus intéressants et très étudiés sont les dérivés ferrocéniques (**Görmén, M., 2010**).

Chapitre 2 :

*Ferrocène et dérivé ferrocénique
étudié*

Chapitre 2 : Ferrocène et dérivé ferrocénique étudié

I.2.1. Généralité

Jusqu'à la deuxième guerre mondiale, la chimie organométallique de métaux de transition était dominée par les chimistes allemands. Les Anglais, puis les Américains se joignirent aux Allemands dans les années cinquante. Le premier grand choc de l'après-guerre eut lieu en 1951. Dans un article célèbre de Kealy et Pauson publié par la revue Nature, apparaissait pour la première fois le bis-(cyclopentadiényl) fer ou ferrocène (**Mathey, F., Sevin, A., 2000**). La structure proposée par Kealy et Pauson pour ce composé a une forme de résonance dans laquelle le fer est lié au cyclopentadiényle par une liaison sigma avec une formule ionique canonique Fig.10 (**Ahmed, S.A., 2016**).

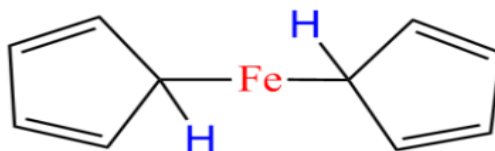


Figure 10: Structure de ferrocène proposée par Pauson et Kealy (**Ahmed, S.A., 2016**).

Le chimiste anglais Geoffrey Wilkinson et le physicien allemand Ernst Fischer, qui ont joué un rôle essentiel dans la correction de la structure de ferrocène proposée par Kealy et Pauson dont, le ferrocène a une structure dans laquelle l'atome de fer sont serrés entre deux anneaux organique C_5H_5 (**Jha, D.K., 2009**). Les plans des anneaux sont parallèles afin que tous les atomes de carbone sont à la même distance de l'atome de fer (**Madan, R.L., 2010**).

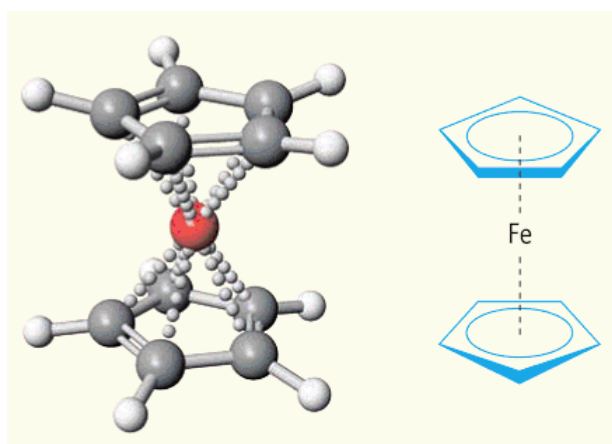


Figure 11 : Structure correcte de ferrocène (**Kotz, J et al., 2008**).

Des études de diffraction des rayons X révèle que le ferrocène a deux types d'arrangements du noyau cyclopentadiène connu sous le nom décalée ou éclipsé. Il a été observé que, en phase gazeuse, la structure du ferrocène est éclipsée à basse température tandis que la structure de ferrocène est décalée. La configuration décalée en phase solide existe en raison des forces d'empilement cristallin de sorte que le C-C et H-H répulsions entre les deux anneaux sont minimum. La différence d'énergie entre la configuration de ferrocène décalée et éclipsé est seulement 4 KJ mol^{-1} (Jha, D. K., 2009 et Madan, R L., 2010).

I.2.2. Définition du ferrocène

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il se présente sous forme d'un solide orange avec une odeur caractéristique (Cyril K., 2010). C'est le prototype des métallocènes. Il est composé de deux cycles pentadiényle entourant un centre métallique. Ils sont aussi appelés composés « sandwich » (Zerari, A., 2013).

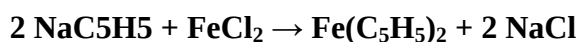
I.2.3. Liaisons et structures électroniques du ferrocène

La longueur moyenne de la liaison C-C dans les deux cycles pentadiényle du ferrocène est de $1.389\text{\AA}$, une valeur qui est très proche de celle du benzène ($1.395\text{\AA}$). En plus de la longueur de liaison C-C dans les cycles pentadiényle qui est différente pour chaque métallocène, une autre liaison caractéristique de chaque métallocène est celle de M-C. Pour le ferrocène, la longueur Fe-C est égale à $2.03\text{\AA}$ (Cyril K., 2010).

Le ferrocène est de loin le plus stable des métallocènes. Chaque ligand C_5H_5^- étant un donneur de six électrons, ainsi que les six électrons de Fe (II), on réalise alors une configuration de 18 électrons (Terki, B. 2007).

I.2.4. Synthèse du ferrocènes

Les ferrocènes sont facilement obtenus par réaction du cyclopentadiényle de sodium sur le chlorure de fer anhydre, en milieu étheré (Zerari, A., 2013) :



Ils sont constitués de deux anions cyclopentadiényles parallèles complexant un ion Fe^{2+} . Les deux cyclopentadiényles donnent chacun 6 stabilités au complexe. En plus, le fer fournit 6 électrons, ce qui donne lieu à un complexe à 18 électrons (Hanzab, N et Houas, M., 2013).

I.2.4.1. Réaction du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux :

La réaction directe du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux en présence R₃N, peut être adoptée pour synthétiser l'ion cyclopentadiényle.

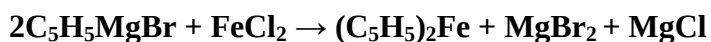
La réaction directe du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux en présence de diéthylamine, peut être adoptée pour synthétiser l'ion cyclopentadiényle à partir de cyclopentadiène, et même une diamine peut jouer le rôle d'un accepteur de HCl (**Bechki, M Kh., 2012**).

I.2.4.2. Réaction du cyclopentadiénnylthallium avec le chlorure ferreux

Le cyclopentadiénnylthallium peut être utilisé également comme un produit de départ pour la préparation du ferrocène (**Mahmoudi, N et Nems, A., 2009**).

I.2.4.3. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux

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



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

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

I.2.4.4. Déprotonation du cyclopentadiène par oxydoréduction

Une méthode de préparation du ferrocène et des composés analogues a été développée par Wilkinson suite à une synthèse de travaux de plusieurs équipes de recherche. Cette méthode est basée essentiellement sur la déprotonation du cyclopentadiène par, oxydoréduction avec le sodium dans le xylène, suivie par une réaction du sel de cyclopentadiényle avec le chlorure ferreux dans le THF (**Khelef, A. 2014**).

I.2.5. Réactivité :

Le ferrocène se comporte comme la plupart des composés aromatiques, permettant la synthèse de dérivés substitués. Les propriétés semblables entre le ferrocène et le benzène ont contribué au développement de la chimie de cette molécule, et ont facilité la réalisation d'une grande variété de réactions de substitution sur le ferrocène (**Bechki, M.Kh., 2012**).

I.2.5.1. Réaction de substitution

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

Ce mécanisme explique pourquoi dans le cas des substitutions électrophiles les réactivités relatives des différents dérivés du ferrocène vont de pair avec la facilité d'oxydation de l'atome de fer (**Hanzab, N et Houas, M., 2013**).

I.2.5.2. Acylation :

L'acylation du ferrocène, selon **Fridel et Crafts** peut être effectuée dans des conditions très douces avec, par exemple l'anhydride acétique contenant de l'acide phosphorique comme catalyseur conduit au mono-acétylferrocène. Avec le chlorure d'aluminium comme catalyseur on peut obtenir un bon rendement soit de mono soit du 1,1-diacétylferrocène selon les proportions de réactif employé (**Bechki, M.Kh., 2012**).

I.2.6. Propriétés du ferrocène

I.2.6.1. Propriétés chimique :

Le ferrocène est insoluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques. Il est très stable thermiquement et peut être facilement fonctionnalisé de manière très variée. Dès lors, ces nouveaux dérivés organométalliques ont trouvé des applications pratiques en catalyse, science des matériaux et plus récemment en chimie domaine d'électrochimie, ses propriétés d'oxydo-réduction font du ferrocène un bon électron, caractère qui s'amplifie avec l'alkylation du cycloferrocèneperméthylé une espèce très sensible à l'oxydation (**Jean-Philippe., 2011**).

I.2.6.2. Propriétés physique

Le ferrocène est un solide cristallin orange, de masse molaire 186,04 g.mole⁻¹, stable à l'air son point d'ébullition 249°C et son point de fusion 173-174 °C. le ferrocène est soluble dans la plupart des solvants organiques, sa solubilité dans l'eau est d'environ 0,1 mg/ml à 21°C, 100 mg/ml dans le DMSO à 19.5°C. Il est stable à haute température, jusqu'à 400°C.

A température ambiante, le ferrocène est le plus stable des métallocènes, d'une odeur de camphre. Les études ont montré qu'il est sensible à l'exposition prolongée à l'air et à la lumière. Le ferrocène forme avec l'acide nitrique dilué et l'acide sulfurique concentré des solutions rouges foncées avec une fluorescence bleue (Terki, B., 2007).

I.2.6.3. Propriétés spectrale

1. Infrarouge

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

2. Résonance Magnétique Nucléaire RMN

RMN ¹H

Le spectre RMN ¹H de la molécule de ferrocène est très simple, il présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4.15 ppm (Mahmoudi, N. et Nemsy, A., 2009)

RMN ^{13}C

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

I.2.6.4. Structure Cristalline

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

I.2.6.5. Propriétés Electrochimiques

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

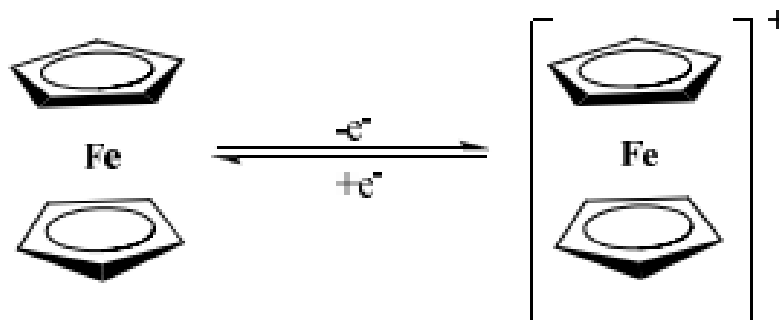


Figure 12 : Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène (**Neghmouche,NS et al., 2010**).

La réversibilité de la réaction d'oxydoréduction a été démontrée par voltamétrie cyclique, les paramètres électrochimiques tirés de voltammogramme de ferrocène montrent que le processus d'oxydoréduction se fait d'une façon rapide, réversible et mono électronique (**Khelef, A. 2014**).

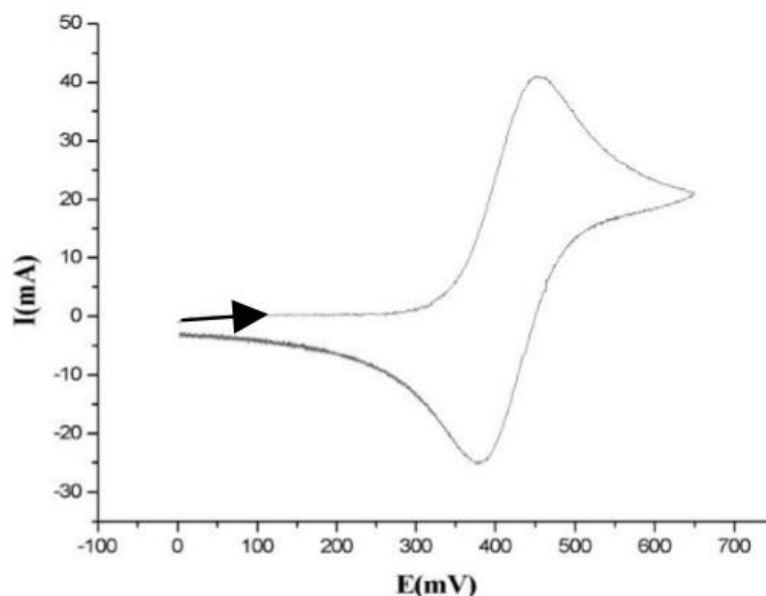


Figure 13 : Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10^{-3} M en présence de tétrabutylammonium perchlorate 10^{-1} M à $V = 100$ mV/s (Bechki, M.Kh., 2012).

Les valeurs des paramètres électrochimiques tirées de voltammogramme de la figure 13 sont regroupées dans le tableau 01. Ces valeurs renseignent sur les critères de rapidité et de réversibilité (Khelef, A., 2014).

Tableaux 01 : Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène (Khelef, A., 2014).

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

I.2.7. Quelques applications et utilisations du ferrocène et ses dérivés

Le ferrocène est utilisé, comme matière à ajouter au carburant, des puissants réacteurs puisque elle permet au propriétés d'oxydation, d'augmenter, l'énergie de la réaction, thermique, ce qui donne au réacteurs, une énergie supplémentaire de propulsion équivaut à 40% ,Comme, il peut être (le ferrocène) associer dans différents types de combustion, étant

donné qu'il joue un rôle important dans la réduction de la fumée, le contrôle de la pollution et l'allongement de la durée de vie des réacteurs de propulsion (**Hanzab N et Houas M., 2013**). Il peut être utilisé comme un facteur de protection dans le polyéthylène.

✓ **La protection :**

Quelques dérivés du ferrocène peuvent être utilisés dans la protection des fines couches des pôles photo électrochimiques.

✓ **La polymérisation :**

L'ajout du ferrocène fixe la polymérisation de la matière cellulosique et lui donne une certaine rigidité, contre la chaleur et l'air.

✓ **Insecticides :**

Certaines dérivés du ferrocène, sont utilisés comme insecticides.

✓ **L'amélioration de la stabilité thermique :**

Le ferrocène est utilisé dans l'amélioration de la stabilité thermique, du plastique et du caoutchouc.

✓ **La catalyse**

✓ **L'application biologique et pharmaceutique :**

(Fabrication des médicaments telle que : La pénicilline, céphalosporine, et rifamycines)

✓ **Lutte contre certaines bactéries (Bechki M K., 2012).**

✓ **Effet anti-tumoral :**

Le ferrocène a un effet anti-tumoral chez des souris portant des métastases pulmonaires établies de mélanome B-16, l'effet anti-tumoral maximal a été atteint à des doses de 0,05 à 0,2 mg / kg et ils ont constaté que des doses inférieures ou supérieures ne sont pas efficaces (**Görmen, M., 2010**).

I.2.8. Dérivé ferrocénique étudié

Le chemin réactionnel consiste à utiliser le sel quaternaire de l'iodure de ferrocénylméthyltriméthylamonium comme produit de départ. Le N-ferrocénylméthyltrishydroxyméthylaminométhane est synthétisé par la réaction du sel quaternaire par un excès de Tris comme le montre le schéma (fig.14) (**Nouveau produit., 2017**).

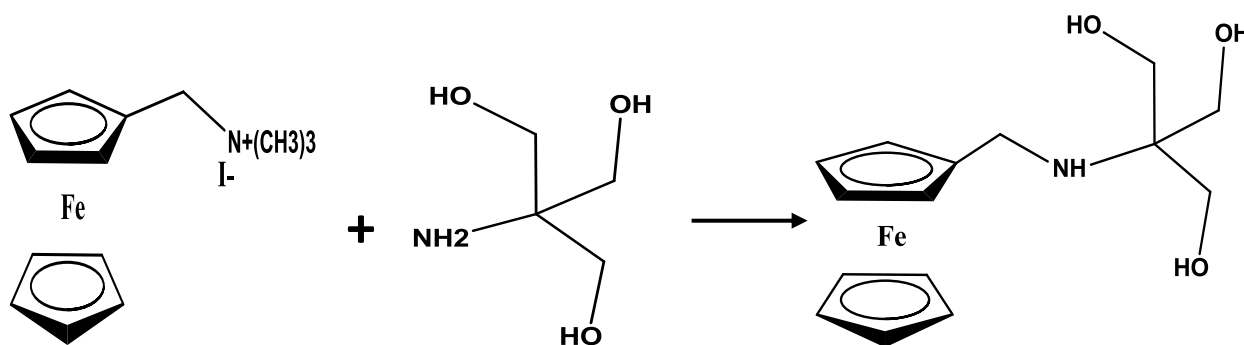


Figure 14 : Chemin réactionnel de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhanes.

I.2.8.1. Synthèse

Préparer un montage réactionnel composé d'un réacteur (ballon tricol) de 100 mL équipé d'une ampoule de coulée, d'un thermomètre et d'un réfrigérant à reflux, d'un agitateur magnétique et adapté à un courant d'azote continu. La température de réaction est choisie 100°C. On introduit une quantité de (0,1 g, 0.00025 mol) d'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium et de Tris (0,062 g, 0.00051 mol) dans le ballon tricol, ensuite on ajoute 25 ml d'eau distillée. On agite le mélange jusqu'à la dissolution complète de la suspension solide. Puis, on chauffe le mélange dans un bain d'huile de silicone à 100 °C sous flux d'azote pendant 4h,

Une fois la réaction arrêtée :

- Refroidir le ballon tricol contenant le produit de synthèse obtenu, introduire un volume de dichlorométhane et agiter vigoureusement le mélange biphasique dans une ampoule à décanté.
- Séparer la phase organique (inférieure) et la phase aqueuse (supérieure).
- Procéder à deux extractions du contenu de la phase aqueuse avec deux volumes de dichlorométhane au moins 3 lavages.
- Les phases organiques sont réunies puis lavées plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne neutre (à chaque fois récupérer la phase organique et la remettre dans l'ampoule et ajouter de l'eau pour le lavage suivant et ainsi de suite jusqu'à ce que l'eau devienne clair).

- Sécher la phase organique à l'aide de sulfate de magnésium anhydre MgSO_4 . Puis filtré pour éliminer le précipité de MgSO_4 .
- Faire une colonne de chromatographie sur colonne silicagel pour séparer l'échantillon.
- Faire une CCM pour confirmer la présence de notre produit, si le CCM montre une seule tache c'est bon (**Nouveau produit., 2017**).

I.2.8.2. Structure

La réaction entre le sel quaternaire de l'iodure de ferrocénylméthyltriméthylamonium et le Tris qui est l'abréviation courante de trishydroxyméthylaminométhane forme le dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane leur structure représentée dans le fig.15.

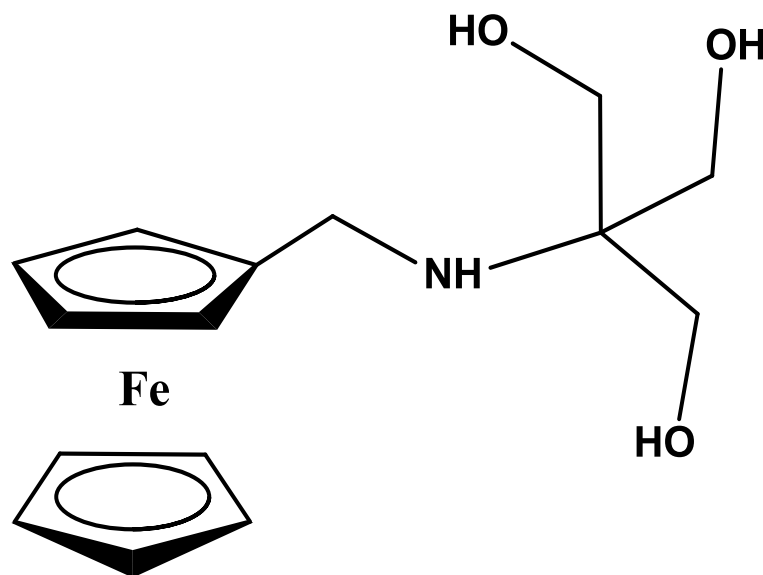


Figure 15 : Structure chimique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane (**Nouveau produit., 2017**).

Chapitre 3 :

*Contexte théoriques des techniques
expérimentales utilisés*

Chapitre 3 : Contexte théoriques des techniques expérimentales utilisées

Notre étude vise à déterminer le type d'interaction entre le dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes et l'ADN *in vitro*, 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, A., 2010**). Ainsi, l'étude *in silico* de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN viennent confirmer théoriquement nos résultats expérimentales celle-ci se fait par amarrage moléculaire (**Boucherit et al., 2013**). En fin pour confirmer l'effet biologique de ce dérivé ferrocénique nous avons testé son efficacité *in vivo* par l'injection intra péritonéal sur des rattes albinos de type Wistar, ensuite des analyses hémo-biochimiques ont été procédées pour discuter les résultats.

I.3.1. Spectroscopie d'absorption dans UV-Visible

Les domaines de longueurs d'onde considérés ici sont, pour la radiation ultraviolette (UV), compris entre 190 et 400 nm et entre 400 et 800 nm pour la radiation du domaine visible (**Biemont, É., 2008 et Gratien, E., 2008**).

I.3.1.1. Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules (**Baudouin, A., 2012**).

I.3.1.2. Loi de Beer-Lambert

L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est proportionnelle à la longueur du trajet d'absorption (ℓ) et à la concentration de l'espèce dans le milieu (C). On exprime généralement la concentration en mol L^{-1} et la longueur en cm on a donc la relation :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C$$

Avec ϵ_{λ} : coefficient d'absorption (ou d'extinction) molaire du composé à la longueur d'onde λ . L'unité du coefficient d'adsorption molaire est : $\text{Lmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, C'est une grandeur qui dépend de l'espèce chimique considérée, de la longueur d'onde d'analyse, du solvant et de la température (**Mesplede, J., Randon J. 2004 et Boutiti A., 2010**).

I.3.1.3. Appareillage

Un spectrophotomètre se compose de quatre parties essentielles :

- Source lumineuse :
 - Lampe au deutérium, utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm;
 - Lampe à filament de tungstène, utilisée dans le domaine de 350 à 800 nm.
- Monochromateur : composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie, il a pour objet de sélectionner la longueur d'onde de travail.
- Cuve : contiennent la solution de référence et la solution à analyser. Ces cuves doivent être parallélépipédiques et transparentes aux radiations. Pour travailler dans l'UV et le visible, les cuves sont en quartz. Leur épaisseur caractérise la longueur du trajet optique (ℓ).
- Détecteur : se compose de deux éléments, les photodiodes (semiconducteurs) et le photomultiplicateur qui amplifie l'intensité du faisceau émergent (**Degallaix, S., Ilchner B., 2007**).

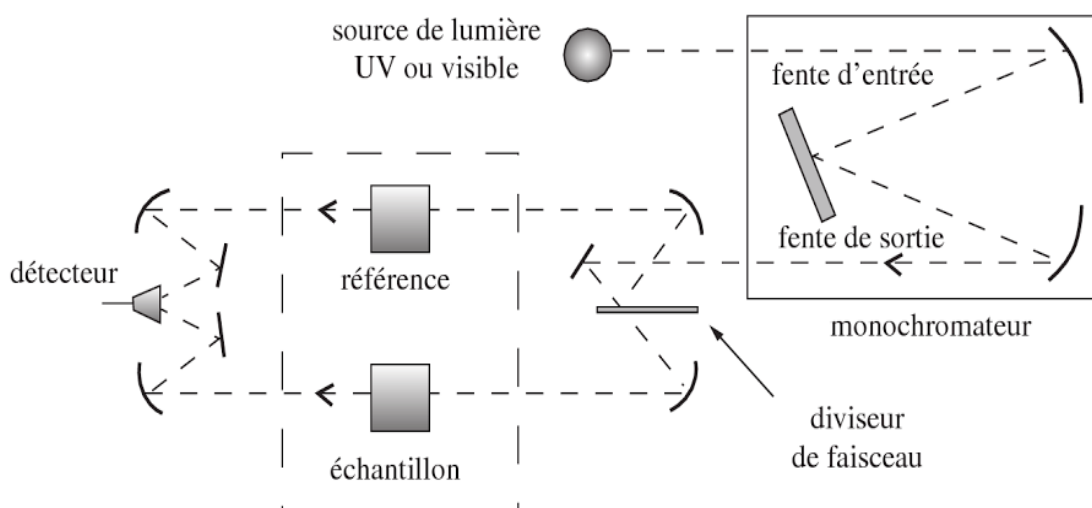


Figure 16 : Quatre parties essentielles de spectrophotomètre (Burgot, G., Burgot, J-L., 2011)

I.3.2. Méthode d'analyse électrochimique

L'électrochimie est la science qui étudie tous les phénomènes engendrés lorsqu'un milieu chimique électrolytique est en interaction avec un circuit électrique (**Olivier. M.-G., 2009**). L'électrochimie est un outil remarquable pour les études de réactivité parce qu'elle permet de déclencher et de suivre les réactions chimiques rédox avec une grande précision et résolution temporelle. Cette technique s'est imposée pour l'étude des réactions chimiques

provoquées par les transferts d'électrons, mais aussi, dans le domaine de la biologie, pour l'étude de certains phénomènes cellulaires (**Baffert. C.2014 et Audigie. Cl., Dupont.G., ZonszainF., 1992**). 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 cité par Adaika A., 2016**).

1.3.2.1. Voltampérométrie cyclique

a. Principe

La voltamétrie est une technique d'électro analyse basée sur la mesure du flux de courant résultant des phénomènes électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. La voltamétrie cyclique repose sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant la mesure des courbes $i = f(E)$ pour l'oxydation et la réduction du composé (**Bernard A.S. et al., 2012**).

Cette méthode consiste à appliquer à l'électrode un potentiel variant linéairement en fonction du temps par rapport à une électrode de référence (**Adaika, A., 2016**).

$$\text{Où : } E = E_i + vt$$

E : potentiel de l'électrode indicatrice (volt), E_i : potentiel initial appliqué à l'électrode, v : vitesse de balayage, $v = dE/dt$ (v/s), t : temps(s) (**Come, J., 2012**).

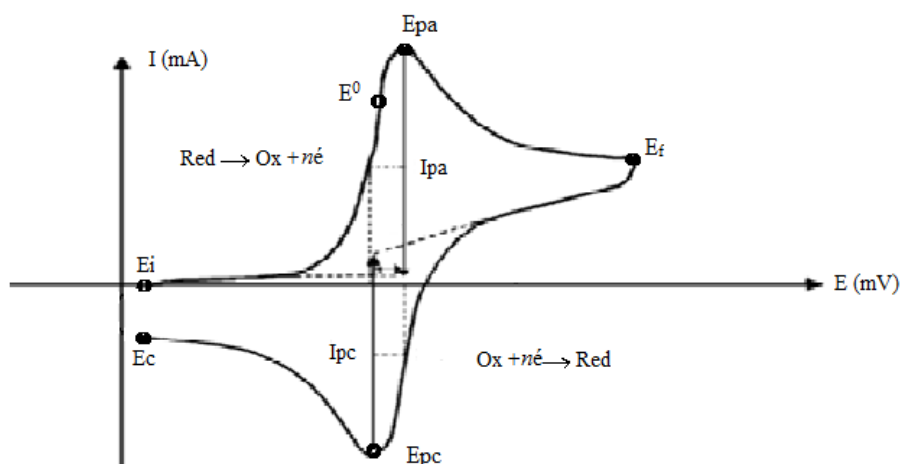


Figure 17 : Allure générale de la courbe voltampérométrique et ses grandeurs caractéristiques. Avec : I_{pa} , I_{pc} : Courants de pic anodique et cathodique, E_{pa} , E_{pc} : Potentiels de pic anodique et cathodique, $E_{pa}/2$, $E_{pc}/2$: Les potentiels à mi-hauteur des pics anodiques et cathodiques, ΔE_p : Différence de potentiel entre E_{pa} et E_{pc} (**Derbal, S., 2014**).

b. Explication de la courbe de voltampérométrie cyclique

- **En E_i** : la concentration de réactif égal à C_0 dans la solution et sur l'électrode, et la concentration de produit P égal à zéro.
- **En E^0** : la matière électroactive R sur l'électrode en diminution, et le produit P augment.
- **En E_{pa}** : la concentration de la matière réactive R dirigé vers le zéro alentour d'électrode au moment où la concentration de matière produite P dirigé vers C_0 . Ce dernier explique par phénomène de consommation de la matière électroactive R à côté d'électrode résultat de haute vitesse de balayage.
- **En E_f** : l'augmentation de l'épaisseur de diffusion parce que la matière produite diffuse dans la solution et la diminution de la concentration jusqu'à la constante. Puis l'inversion de la direction de balayage du potentiel.
- **En E_{pc}** : dans cet état la matière produite électroactive est trouvée au niveau d'électrode et poser par consommation puis la diminution de sa concentration au niveau d'électrode dirigée vers le zéro. Quand la concentration de la matière R approche autrefois du C_0 et dû de nouveau au potentiel initial

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 associent 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, A., 2010**) :

$$Ox + n e^- \leftrightarrow Red$$

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox}{Red} \quad (\text{Olivier, M.-G., 2009}).$$

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

I.3.3. Amarrage moléculaire

L'amarrage moléculaire « molecular docking » consiste à prédire comment des ligands, comme des substrats ou des médicaments potentiels, se fixent sur un récepteur de structure tridimensionnelle connue (**Louacheni F., 2013 et Sousa, S F., 2006**). Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel ce molécule est impliqué (**Boucherit et al., 2013**).

I.3.3.1. Amarrage avec AutoDock

AutoDock fait partie de la simulation de trajectoire. Est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation. L'énergie d'interaction est calculée par une fonction énergétique. Les mouvements du cycle à venir sont guidés par les variations d'énergie induites par les mouvements des cycles précédents. L'algorithme s'arrête lorsqu'il a trouvé la position idéale du ligand dans le récepteur. Ces techniques sont plus lentes et prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes. Il combine une méthode d'évaluation de l'énergie à partir de grilles de potentiels et différentes méthodes d'exploration allant de la dynamique moléculaire (méthode Métropolis : recuit simulé Monte Carlo - RSMC) aux algorithmes génétiques (**Fortune, A., 2006**).

I.3.3.2. Modélisation du potentiel énergétique

Pour calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, AUTODOCK utilise les termes d'un champ de force traditionnel auxquels sont ajoutés deux termes liés à l'entropie. L'énergie est donnée par l'Équation suivante :

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol} \text{ (Garrett, M. M et al., 1998)}$$

ΔG_{vdw} : énergie de dispersion / répulsion des atomes,

ΔG_{hbond} : énergie des liaisons d'hydrogène,

ΔG_{elec} : énergie des interactions électrostatiques,

$\Delta G_{conform}$: énergie de déviations à partir de géométrie covalente

ΔG_{tor} : est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction des rotors libres du ligand et à la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation au récepteur,

ΔG_{sol} : est un autre terme lié à l'entropie qui décrit les variations d'énergie du système lors de la désolvatation du ligand au moment de la complexation au récepteur (**Lanez E., 2016**).

Le passage par une relation empirique de type QSAR est nécessaire pour relier la structure des complexes et l'énergie libre de liaison. Le modèle empirique utilisé dans AUTODOCK est une régression linéaire multiple des différents termes de l'équation d'énergie libre. Chaque terme est ainsi pondéré par un coefficient dérivé d'un jeu étendu de complexes récepteur-inhibiteur pour lesquels la constante d'inhibition K_i est connue. La

relation entre la constante d'inhibition et l'énergie libre de liaison est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G = RT \ln K_i$$

Où R: constante des gaz parfaits ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : température absolue (298.15 K) (Garrett, M. Met *al.*, 1998).

I.3.4. Etude *in vivo*

I.3.4.1. Définition

In vivo (en latin : « au sein du vivant ») est une expression latine qualifiant des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant, par opposition à in vitro ou ex vivo. Les tests sur les animaux et les essais cliniques sont des formes de recherche in vivo (Legler J *et al.*, 2002).

I.3.4.2. Etude chez l'animal

Les études chez l'animal, le plus souvent le rongeur (souris, rats, etc.), présentent une grande diversité dans le choix des espèces et des lignées, les modes d'administration des substances chimiques et les périodes d'exposition (Fini JB *et al.*, 2007).

a. Choix des espèces et lignées

Dans l'optique de la transposition des données à l'espèce humaine, le choix de l'espèce animale dans laquelle les études in vivo sont conduites est important. La plupart des travaux in vivo sont menés chez les rongeurs en particulier les rats des lignées Wistar à cause de leur similarité physiologique avec l'homme (Howdeshell *et al.*, 2008).

b. Modes d'administration

Il existe plusieurs voies d'administration des substances à testés (voie alimentaire, administration par gavage, par injection...etc.) et quel que soit le mode d'administration, il est intéressant de connaître le taux circulant du composé administré et de ses principaux dérivés (métabolites actifs). Ce dosage est un paramètre qui prime sur le mode d'administration pour comparer avec les taux retrouvés chez l'homme ou pour corrélérer les effets aux modes d'actions in vitro (Drake *et al.*, 2009).

c. Période d'exposition

La période d'exposition dépend à la nature de substances à testées et leur mode d'administration, et fréquemment dépend aux espèces et lignées choisis (Vandenberg *et al.*, 2007).

Partie II :

Matériels et Méthodes

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

Les paramètres d'étude ont été réalisés au niveau du laboratoire de la Valorisation et Technologie des Ressources Saharienne (VTRS), et laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar-El-Oued, les analyses sanguines ont été effectuées au niveau du laboratoire d'établissement hospitalier spécialisé Ben Omor Djilani, d'El oued et laboratoire d'analyses médicales EL-MEDJED.

II.1. Matériels

II.1.1. Produits chimiques

- | | |
|---|---|
| ✓ N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhanes | ✓ Acide éthylène Diamine Tétra-acétique (EDTA) |
| ✓ Métribuzine | ✓ NH_4Cl |
| ✓ Cisplatine | ✓ 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) |
| ✓ Sodium DodecylSulfat (SDS) | ✓ Glutathion réduite (GSH) |
| ✓ Trishydroxyméthylaminométhane (Tris) | ✓ 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) |
| ✓ Ethanol | ✓ Bleu de Coomassie |
| ✓ Méthanol | ✓ Acide salicylique |
| ✓ NaHCO_3 | ✓ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) |
| ✓ Chlorure de sodium (NaCl) | ✓ Butylhydroxytoluène (BHT) |
| ✓ Isopropanol | ✓ Acide thiobarbiturique (TBA) |
| ✓ Phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4) | ✓ Acide trichloroacétique (TCA) |
| ✓ Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) | ✓ Sérum bovin albumine (BSA) |
| ✓ Eau Ultra pure et eau bi-distillé. | |

II.1.2. Matériels biologiques

- ✓ Le sang du poulet conservé directement dans la glace pour l'extraction de l'ADN.
- ✓ Le sang et les organes des rattes pour l'analyse Histo-hémobiochimique.

II.1.3. Matériels de laboratoire

- ✓ Agitateur thermo-programmable.
- ✓ Micropipettes ajustables avec des embouts stériles.

- ✓ Bain de glace.
- ✓ portoir pour tubes spéciaux de centrifugation.
- ✓ Vortex.
- ✓ Centrifugeuse Sigma.
- ✓ Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0. 1mg).
- ✓ Balance électrique de type KERN EMB 2200-O.
- ✓ 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.
- ✓ pHmètre 210 MeterLAB.
- ✓ Bain marie de type MEMMERT.
- ✓ Agitateurs magnétiques à plaque chauffante.
- ✓ Analyseur clinique automatisé de type BIOLIS 24I.
- ✓ Analyseurs d'hématologie de type Medonic.
- ✓ Hown.
- ✓ Verreries (bucher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).

II.1.4. Animaux

Notre étude *in vivo* a été réalisé sur vingt-cinq (25) rats femelles de type Wistar Albinos, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, Les animaux sont élevés à l'animalerie au niveau de la faculté de sciences de la nature et de la vie, à l'université Echahid Hamma Lakhdar. Les rattes sont logées dans des cages en plastique à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité, et ont reçu un régime alimentaire standard avec de l'eau potable. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie pendant 25 jours.

II.2. Méthodes

II.2.1. Etude *in silico*

II.2.1.1. Préparation du dérivé ferrocénique (ligand)

La structure de dérivé ferrocénique a été préparée et optimisée avec le logiciel Gaussian 09, puis elle est enregistrée sous format pdb. Le logiciel AutoDock exige le format pdbqt, le ligand est donc converti en format pdbqt par le logiciel OpenBabel 2.3.0.

II.2.1.2. Préparation de l'ADN (macromolécule)

Dans notre étude nous avons utilisé l'ADN disponible dans la PDB (code : 1BNA), la molécule d'ADN a été téléchargée au format pdb. La longueur de structure de l'ADN téléchargée est 12 nucléotides. Dont, la succession nucléotidique pour les chaînes A et B comme suivant :

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

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

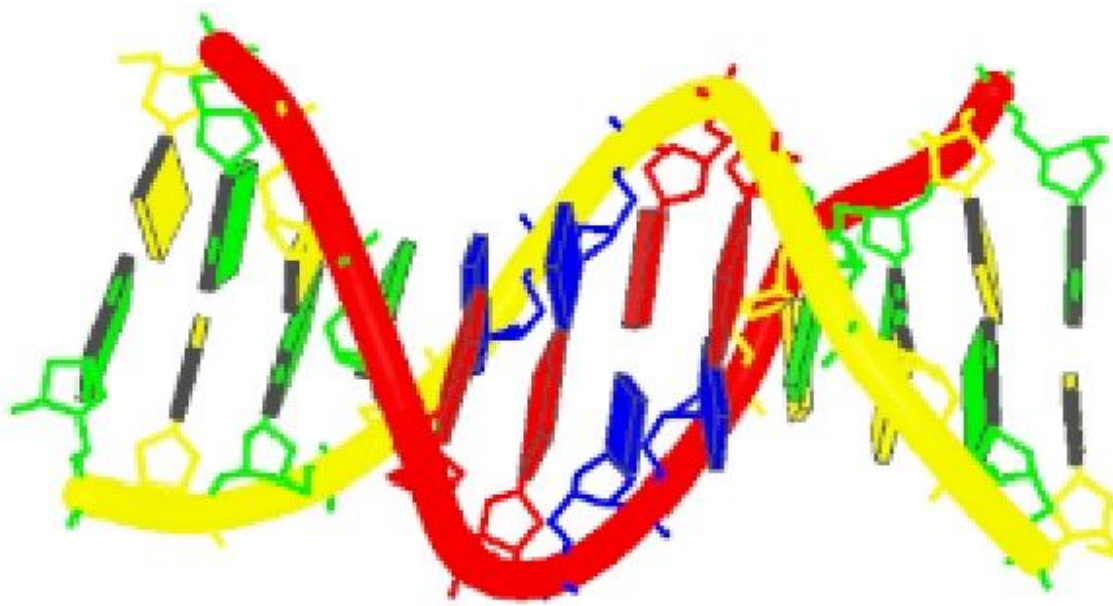


Figure 18 : Structure de l'ADN d'un dodécamère (Drew, H.R et *al.*,1981).

II.2.1.3. Processus de docking

Le processus de docking consiste à faire interagir un dérivé ferrocénique avec l'ADN en utilisant le logiciel AutoDock 4.2.6. La procédure d'amarrage avec AutoDock se décompose en deux étapes principales :

A. Génération des cartes d'interactions du récepteur avec le programme AutoGrid

B. Amarrage proprement dit du ligand au récepteur avec le programme AutoDock

Nous utiliserons également une interface graphique appelée AutoDockTools (ADT) pour faciliter la préparation du docking et la visualisation des résultats. Cette interface est réalisée grâce aux commandes suivantes : **File** > **Préférences** > **Set** puis taper "ADT" dans le "Startup Directory" et cliquer sur "Make Default" en suite cliquer sur "Set"

La technique de docking comprend 6 étapes principales :

- a. Préparation de l'accepteur
- b. Chargement de récepteur et du ligand
- c. Configuration des paramètres de l'AutoGrid
- d. Exécution de l'AutoGrid
- e. Exécution de l'AutoDock
- f. Analyse de résultats

a. Préparation de l'accepteur

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **File** > **Read Molecule** > **select 1BNA.pdb**
- ✓ **Edit** > **Delete Water**
- ✓ **Edit** > **Hydrogens** > **Add**
- ✓ **Edit** > **Hydrogens** > **Merge Non-Polar**
- ✓ **Edit** > **Charges** > **Compute Gasteiger Charge**

b. Chargement de récepteur et du ligand

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **Ligand** > **Input** > **Open** > **ligand.pdbqt**
- ✓ **Ligand** > **Torsion Tree** > **Detect Root**

c. Configuration des paramètres de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **Grid** > **Macromolecule** > **Choose**
- ✓ **Grid** > **Select Map Types** > **Choose Ligand** > **select Ligand**
- ✓ **Grid** > **Select Map Types** > **Set Up Covalent Map** > set Energy Barrier Height to 1000 and set Half & width (angstrom) to 5.00

- ✓ **Grid** > **Grid Box** > Set number of points in x, y and z-dimension to 100 & set Spacing (angstrom) to 0.200

d. Exécution de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **Run** > **AutoGrid**

e. Exécution de l'AutoDock

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **Docking** > **Macromolecule** > **Rigid Filename** > select 1BNA.pdbqt
- ✓ **Docking** > **ligand** > **Choose** > select ligand
- ✓ **Docking** > **Search Parametres** > **Genetic Algorithm** > set Number of GA Runs to 25
- ✓ **Docking** > **output** > **Lamarckian GA (4.2)** > save output as dock.dpf
- ✓ **Run** > **Autodock**

f. Analyse de résultats

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ **Analyse** > **Docking** > **Open** > fichierdock.dlg
- ✓ **Analyse** > **Macromolecule** > **Open**
- ✓ **Analyse** > **Confirmation** > **Play, Ranked by energy** & analyze interactions.

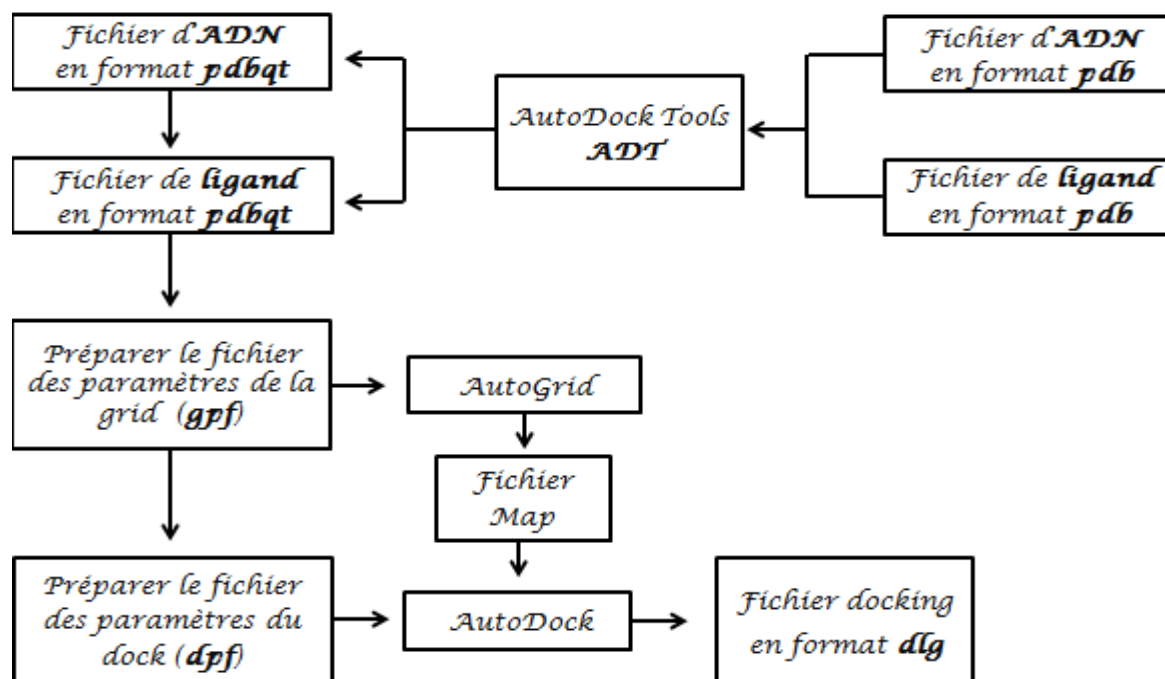


Figure 19 : Procédures de docking avec AutoDock.

II.2.2. Etude *in vitro*

II.2.2.1. Extraction d'ADN

a. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement à partir des poulets au cours de l'abattage dans des pots à prélèvement de 40ml en présence un volume d'EDTA pour 9 volume du sang, l'échantillon en suit est conservé directement dans la glace. Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ADN est extrait d'une manière sécurisé, 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).

b. 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 (Adaika. A., 2016).

✓ 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 1volume 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 trs pendant 15 min à 4°C;
- Enlever le surnageant;
- Ajouter 1ml 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;
- Eliminer 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 (**Adaika. A., 2016**).

✓ **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 2 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 3ml de Na Cl à 6M a été ajouté à l'extrait après le refroidissement; La suspension obtenue est vortexée pendant 6 min. Cette dernière est par la suite centrifugée 10 min à 1300 trs/min 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 2 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels : à 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 à 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 bidistillée qui sera choisi en fonction de la taille de la méduse. L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. Après dissolution complète, la DO de la solution d'ADN obtenu est mesurée à 260nm

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 (**Adaika. A., 2016**).

✓ **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 DO260 /DO280, 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. Les concentrations d'ADN a été estimées à 260 nm Selon La loi de Beer Lambert (**Sirajuddin et al., 2013**).

II.2.2.2. Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-FcTris

Il existe de nombreux types de méthodes décrivant l'étude in vitro de l'interaction ADN-ligand, certains permettent de déterminer les paramètres de liaison (mesure de la constante et l'énergie libre de liaison). Nous avons deux méthodes les plus sensibles, les méthodes spectrophotométriques dans l'UV et visible sont un premier mode de détection, mais les mesures les plus délicates requièrent le plus souvent les méthodes électrochimiques qui sont très utiles dans ce cas.

A. Analyse spectroscopique UV-Visible

-Appareillage

Les mesures UV-Vis ont été effectuées grâce au spectromètre UV-Vis (SHIMADZU 1800) lié à un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel de visualisation et acquisition des données (Logiciel UV probe Spectrum). L'interaction 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 (le dérivé ferrocénique seul ou avec l'adduit d'ADN), puis les données sont traitées en utilisant le logiciel d'analyses Origin9.



Figure 20 : Spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800).

-Procédure

Le spectre électronique de dérivé ferrocénique « FcTris » (4 mmol/l) solubilisé dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 a été réalisé, après l'ajout des différentes concentrations de l'ADN, les spectres sont enregistrés afin de déterminer λ_{max} et calculer les paramètres d'interactions.

B. Méthode électrochimique

-Appareillage

La voltamétrie cyclique est réalisée à partir d'un potentiostat Galvanostat Model PGZ301 (Radiometer Analytical SAS) relié à une cellule électrochimique à trois électrodes,

- Une électrode en carbone vitreux surface 3 mm^2 .
- Une électrode de référence $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ saturée.
- Une électrode auxiliaire en platine. Diamètre 3 mm^2 .

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



Figure 21 : Dispositif expérimental voltampérométrique.

-Procédure

La réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN se fait dans une cellule électrochimique. Le milieu réactionnel est un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) à 0.1 M à $\text{pH} = 7.2$.

Un polissage de l'électrode de travail en utilisant le papier abrasif p4000 est effectué avant chaque manipulation, les électrodes sont ensuite rincées avec de l'eau ultra-pure et essuyé avec du papier absorbant. La cellule électrochimique est rempli avec 25 ml d'une solution constituée le tampon contenant le dérivé ferrocénique (2mmol/l) ensuite elle est équipé avec l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire, et aussi l'électrode de travail. Le voltammogramme et tracé en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN après un barbotage d'azote pendant 10 à 15 minutes pour chasser l'oxygène de la cellule.

On impose un potentiel variable à une vitesse de balayage fixe, le voltammogramme obtenu est exploité pour accéder aux paramètres d'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN.

II.2.3. Etude *in vivo*

II.2.3.1. Traitement des animaux

Après 25 jours d'adaptation, les rattes ont été divisées en cinq lots chacun contient cinq rattes, les rattes ont été traitées comme suit :

Lot 1 (T) : rattes saines (groupe témoin)

Lot 2 (TP) : rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours.

Lot 3 (D_{0.1}) : rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par dose 0.1 mg/kg (Görmen, M., 2010) de dérivé ferrocénique pendant 7 jours.

Lot 4 (D_{0.2}) : rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par dose 0.2 mg/kg (Görmen, M., 2010) de dérivé ferrocénique pendant 7 jours.

Lot 5 (Cispt) : rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par le Cisplatine par dose 1 mg/ml pendant 7 jours.

Le métribuzine a été solubilisé dans l'eau potable à raison de 30mg/Kg de poids corporel durant 50 jours. Le dérivé ferrocénique a été solubilisé dans l'eau physiologique, 0.1 ml est injecté par voie intra-péritonéal aux rattes des lots 3 et 4. Le Cisplatine est injecté de volume 0.1 ml par voie intra-péritonéal au lot 5.

II.2.3.2. Sacrifice des rattes et prélèvement du sang et des organes

Les rattes sont anesthésiées par chloroforme (94%) après 16h de jeûne et sont sacrifiées. Le prélèvement sanguin s'effectue au moment de sacrifice dans des tubes EDTA pour les analyses hématologiques, des tubes secs pour les analyses biochimiques et des tubes héparinés pour l'analyse d'alphafoetoprotéine (AFP).

Après la dissection, les foies, les reins, les cœurs et les poumons sont attentivement prélevés, rincés avec l'eau distillé ensuite avec du NaCl 0,9% puis pesés. Une partie des organes est utilisé pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé pour faire des coupes histologique. Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, glutathion réduit, glutathion-s-transférase et MDA).

II.2.3.3. Méthodes de l'analyse sanguine

A. Dosage des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques (hémoglobine, globules rouges, globules blancs, plaquettes,) sont déterminés par la méthode de Coulter en utilisant l'auto analyseur d'hématologies de type Medonic spécifique de l'FNS (formule de numération sanguine).

B. Analyse de l'alpha feotoprotéine (AFP)

Le dosage de AFP est réalisé par l'analyseur cobas e411 est un analyseur d'immunologie entièrement automatisé, qui est utilisé la technique d'électrochimiluminescence (ECL).

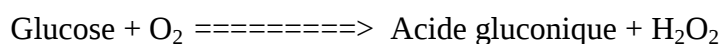
C. Dosage des paramètres biochimiques

a) Dosage de la glycémie

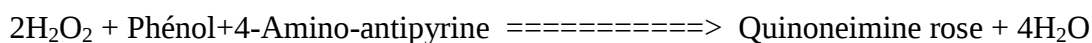
➤ Principe:

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

Glucose oxydase



Peroxydase



➤ Mode opératoire :

-Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif

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

Tableau 02 : Mode opératoire de dosage de glycémie

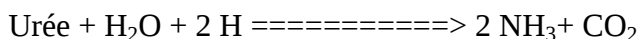
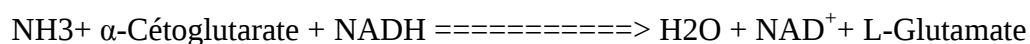
	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

b) Dosage de fer sérique

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

c) Dosage d'urée

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

Uréase**GLDH**

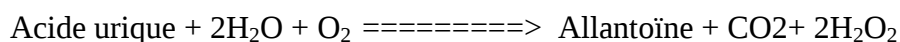
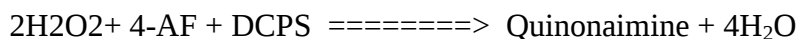
La diminution de la concentration de NAD^+ dans la méthode est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon testé. L'absorption est mesurée à 340 nm (**Mac Key et Rackeyll., 1927**).

d) Dosage de la créatinine

Le dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium. Créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps choisi pour les mesures évite les interférences provenant d'autres constituants du sérum. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (**Murray et al., 1984**).

e) Dosage de l'acide urique

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

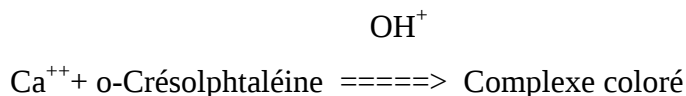
Uricase**POD**

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

f) Dosage de la calcémie

-Principe

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

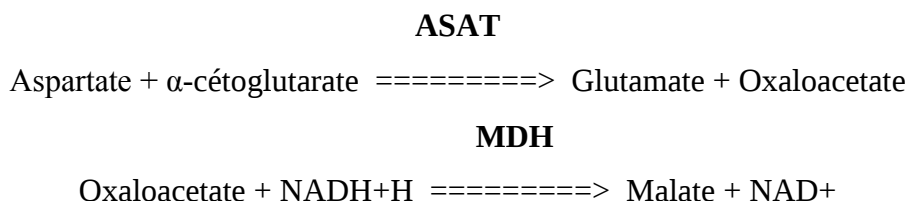


L'intensité de la couleur formée est directement proportionnelle à la concentration de calcium présente dans l'échantillon testé, l'absorption est mesurée à 570 nm (**Farell, E C., 1984**).

g) Dosage de l'activité des transaminases

➤ Dosage de l'aspartateaminotransférase (ASAT)

L'Aspartate aminotransférase (ASAT) initialement appelée glutamate oxaloacétate-transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un groupe aminé d'aspartate vers l' α -cétooglutarate pour donne du glutamate et l'oxaloacetate. L'oxaloacetateest réduit au Malate par Malate déshydrogénase (MDH):



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartateaminotransferase dans l'échantillon. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=340$ nm (**Henry et al., 1960**).

➤ Dosage d'Alanine aminotransférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) est une transaminase connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase (GPT). L'ALAT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l' α -cétooglutarate pour donne du L-glutamate et pyruvate. Pyruvate est réduit au lactate par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH.

ALAT

Alanine + α -Cétoglutarate =====> Glutamate + Pyruvate

LDH

Pyruvate + NADH + H^+ =====> Lactate + NAD^+

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine transférase dans l'échantillon. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=340$ nm (**Bergmeyer et al., 1978**).

h) Dosage de l'activité des phosphatases alcalines

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1-propanol libérant du p-nitrophénol et du phosphate.

PAL

p-Nitrophénylphosphate + AMP =====> p-Nitrophénol + Phosphate

La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=405$ nm (**Rosalki S et al., 1993**).

II.2.3.4. Dosage des paramètres de stress oxydatif**A. Préparation de l'homogénats des organes**

Un gramme de tissu (foie, reins, cœur et poumon) de chaque ratte des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après le broyage et l'homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), la suspension cellulaire est centrifugée à 3000 trs/min pendant 15 minutes. Puis le surnageant obtenu est conservés dans la glace les dosages des paramètres du stress oxydatif.

B. Dosage des protéines tissulaire

Il est nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des protéines contenues dans les tissus. Le dosage des protéines se fait par la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines et en particulier sur les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines. L'absorption est mesurée à 595 nm.

C. Méthode de dosage des malondialdéhyde (MDA) tissulaires

-Principe

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

-Réactif

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% P/V ; Chlorure d'hydrogène (HCl) 1 N. 375 mg de TBA, 20g de TCA, 0,01g de BHT, 25 ml de HCl 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 ml et le volume complété à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

-Mode opératoire

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

-Expression des résultats

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

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon} / 1,53 \times 10^5) / \text{mg de prot}$$

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

-Principe

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

-Mode opératoire

- Prendre 0.8 ml de la solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) solution 2.

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

-Calcule

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

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

DO: la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525ml: volume total de mélange.

0.5ml: volume de surnagent.

1: volume de mélange de protéine.

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

(GSH): concentration de glutathion.

d : facteur de dilution.

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

-Principe

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

-Mode opératoire

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

Tableau 03 : Mode opératoire de dosage de l'activité enzymatique de GSTs.

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

-Expression des résultats

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

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

GSTs : glutathion S-transférase.

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

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

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

II.2.3.5. Méthode d'analyse statistique

L'évaluation statistique des résultats est effectuée par le test T student; qui est basé sur la comparaison entre deux moyennes. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes de cinq répétitions pour chaque groupe ($\pm$ écart-types moyenne). Pour cela, on a utilisé les logiciels de *MINITAB* (version 13) et *EXCEL* (version 2010), la signification est déterminée par la valeur $\alpha=0.05$, Si $P < \alpha$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité.

Partie III :

Résultats et discussion

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Etude *in silico*

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

Tableau 04 : Différentes conformations de l'interaction FcTris-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
1	-21,59	6.026×10^3
2	-17,3218	1.081×10^3
3	-16,987	0.942×10^3
4	-16,736	0.852×10^3
5	-16,0247	0.639×10^3
6	-15,8574	0.597×10^3
7	-15,8155	0.587×10^3
8	-15,7737	0.578×10^3
9	-15,4808	0.514×10^3
10	-14,9787	0.418×10^3
11	-14,6022	0.360×10^3
12	-14,6022	0.360×10^3
13	-14,6022	0.360×10^3
14	-14,3511	0.326×10^3
15	-14,1419	0.299×10^3
16	-14,1001	0.294×10^3
17	-14,0582	0.289×10^3
18	-13,9327	0.275×10^3
19	-13,849	0.265×10^3
20	-13,6817	0.249×10^3
21	-13,6398	0.244×10^3
22	-13,347	0.217×10^3
23	-13,347	0.217×10^3
24	-13,1378	0.21×10^3
25	-11,7152	0.112×10^3

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative -21,59, et dans laquelle 5 liaisons hydrogènes sont formées entre le FcTris et l'ADN.

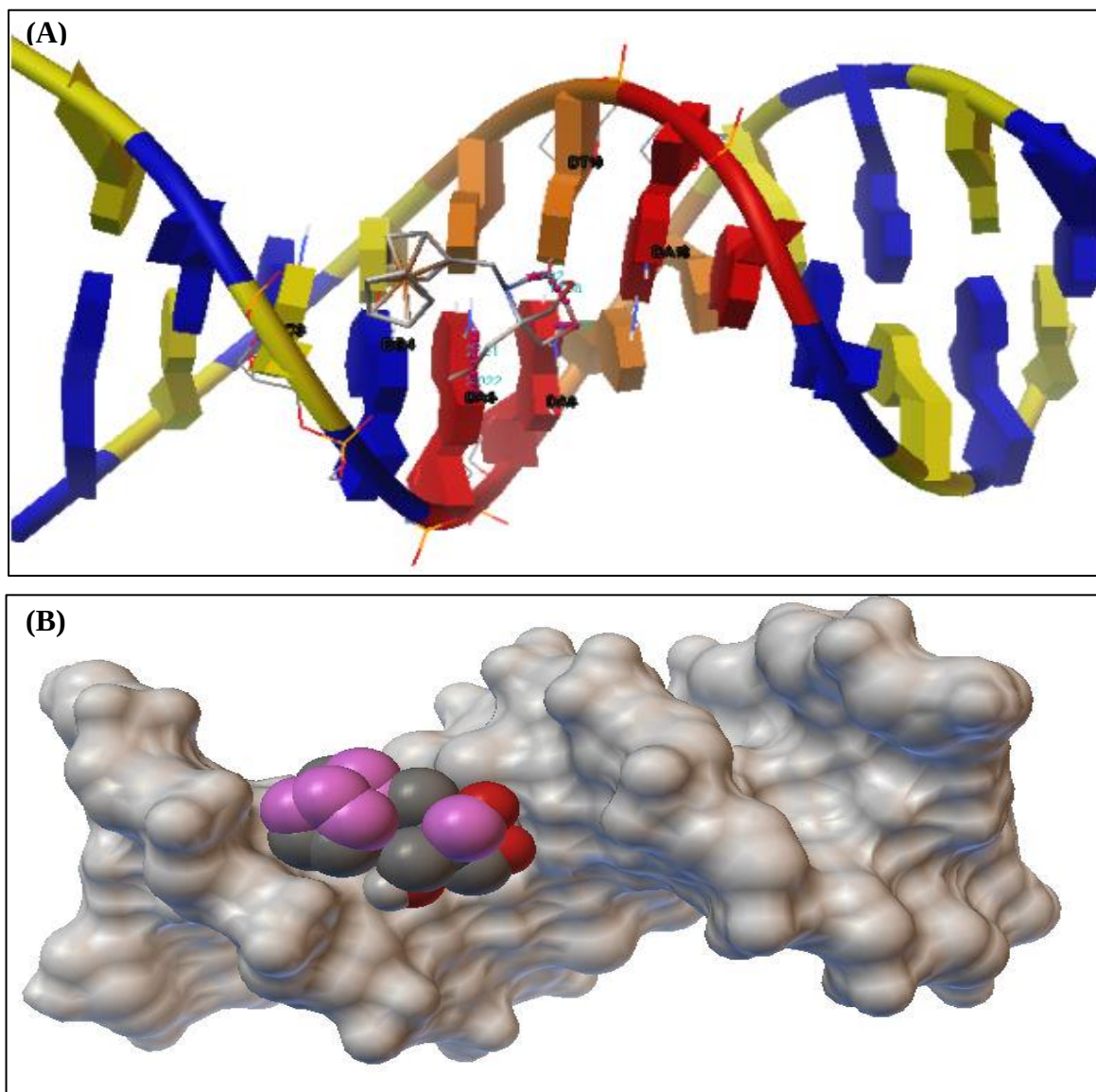


Figure 22 : Interaction de FcTris avec l'ADN, **(A) :** Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, **(B) :** Vue en surface de FcTris amarré avec de l'ADN, Il montre que le FcTris est attaché dans le grand sillon par liaison H.

Le FcTris se lie avec l'ADN en formant 5 liaisons hydrogènes (fig.22, tab.05), la première entre l'hydrogène n°62 de deoxyadénine (DA) n°5 de la chaîne A d'ADN et l'oxygène de FcTris, la deuxième entre l'oxygène n°4 de deoxythymidine (DT) n°19 de la chaîne B de l'ADN et l'hydrogène de l'azote de FcTris, la troisième entre l'hydrogène n°62

de DA n°6 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de FcTris, la quatrième entre l'hydrogène n°7 de DA n°5 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de FcTris et la cinquième entre l'oxygène n°4 de DT n°19 de la chaîne B de l'ADN et l'hydrogène de l'oxygène de FcTris.

Tableau 05 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de FcTris et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.

Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ.mol ⁻¹)
ADN : chaîne A : DA5 : H62 <=> Ligand : O	2.161	-17,464
ADN : chaîne B : DT19 : O4 <=> Ligand : H(N)	1.792	-4,13379
ADN : chaîne A : DA6 : H62 <=> Ligand : O	2.156	-0,76567
ADN : chaîne A : DA5 : H7 <=> Ligand : O	2.022	-18,2799
ADN : chaîne B : DT19 : O4 <=> Ligand : H(O)	1.708	-3,3221

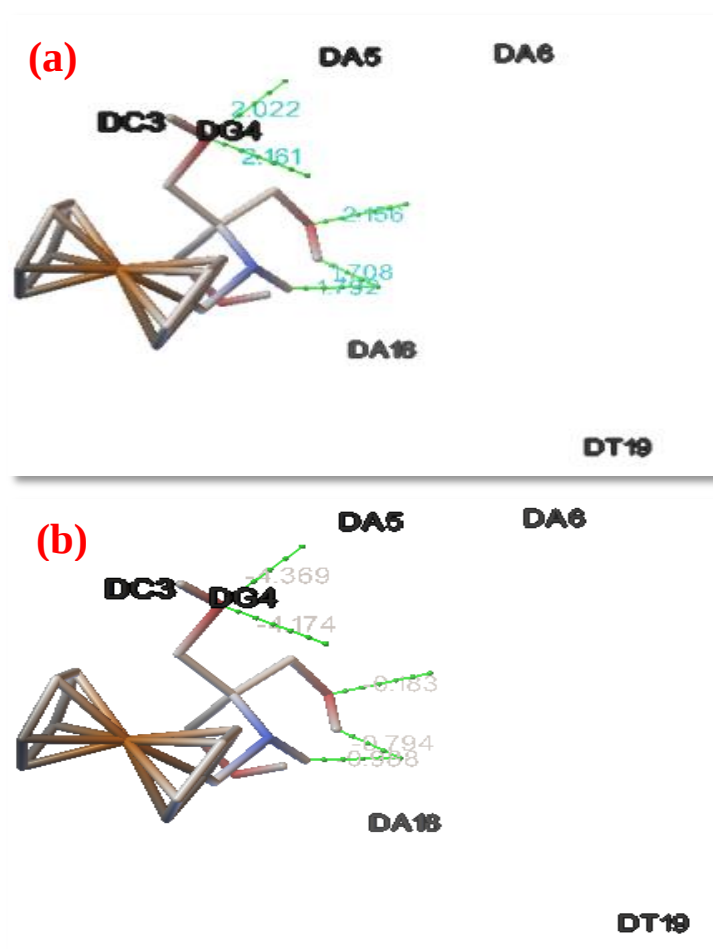


Figure 23 : Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimer par Kcal.mol⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre le FcTris et de l'ADN.

III.2. Etude *in vitro*

III.2.1. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN

III.2.1.1. Spectre d'absorption UV-Vis de l'ADN

Le spectre d'absorption de l'échantillon d'ADN met en évidence une large bande d'absorption dans l'UV-Vis, avec un maximum pour $\lambda = 260$ nm.

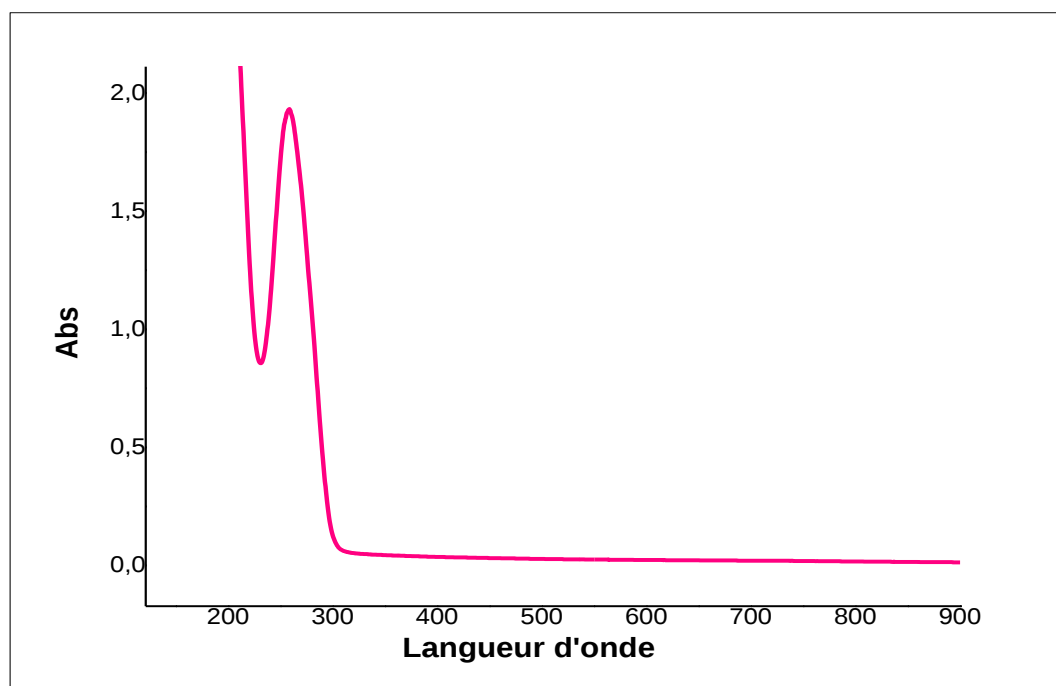


Figure 24 : Spectre d'absorption de l'ADN.

III.2.1.2. Analyse quantitative : Mesure de la concentration

La concentration de l'ADN a été calculé par l'équation (1) de la loi Beer-Lambert selon la relation ci-dessous en mesurant l'absorbance à 260 nm avec le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

Avec : « C » concentration d'acide nucléique en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, « ϵ » coefficient d'extinction, et « l » trajet optique en cm.

Le dosage de nos échantillons d'ADN à 260 nm donne des concentrations 56×10^{-6} et $213 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$.

III.2.1.3. Analyse de la pureté

Le ratio DO_{260}/DO_{280} est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. La pureté d'une solution d'ADN est considérée comme acceptable lorsque ce ratio est compris entre 1,6 – 2,0.

Tableau 06 : Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.

Longueur d'onde	DO ADN	
260	1.404	1.915
280	0.793	1.064
Ratio = DO_{260}/DO_{280}	1.77	1.79

III.2.2. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-FcTris

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. Ces variations peuvent être utilisées 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 dérivés ferrocéniques avec l'ADN en raison de leur couleur intense, ce qui permet les mesures spectroscopiques dans le domaine visible.

En effet, La constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation (2) de Benesi-Hildebrand suivante (Li et al., 2005; Aslanoglu., 2006) :

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon_0}{\epsilon-\epsilon_0} + \frac{\epsilon_0}{\epsilon-\epsilon_0} \frac{1}{K[ADN]} \quad (2)$$

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 est calculée par le rapport pente/interception, du tracé du $A_0/(A - A_0)$ en fonction de $1/[DNA]$.

Les résultats des constantes de liaison K et des énergies libres de liaison ΔG de l'adduit FcTris-ADN ont été déterminés par l'étude de la variation d'absorbance de dérivé ferrocénique 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 phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1M à $\text{pH} = 7.2$, la gamme des longueurs d'ondes balayée était de 350 à 600 nm.

Le spectre électronique de dérivé ferrocénique révèle que quel que soit la portion d'ADN ajoutée, il y a toujours une diminution de l'absorbance fig.25.

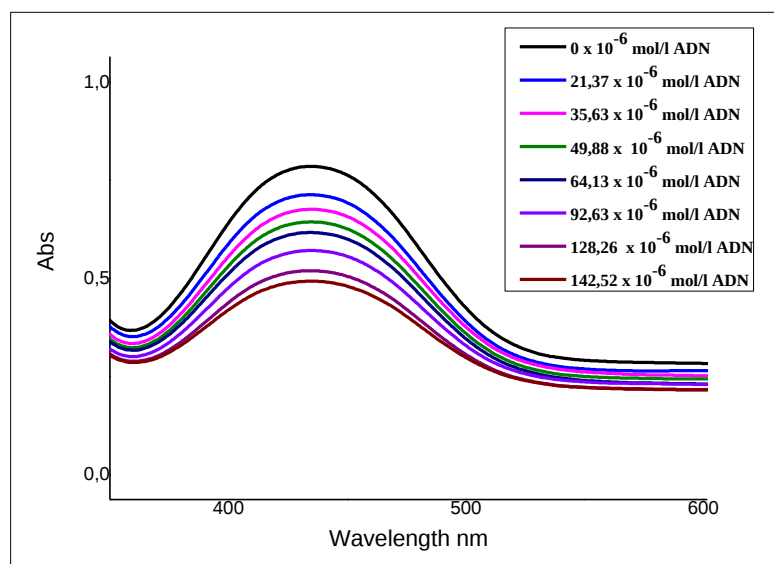


Figure 25 : Spectre d'absorption UV-Vis de FcTris (4 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à $\text{pH} = 7.2$.

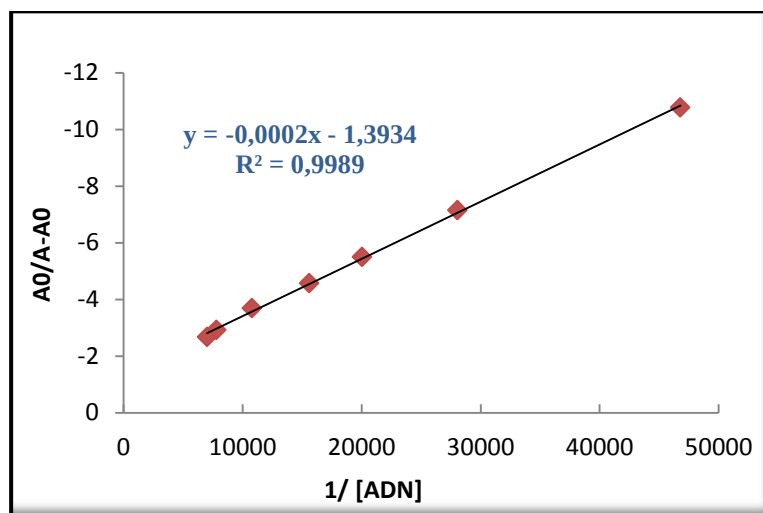


Figure 26 : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation (3) suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

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

Différents concentrations d'ADN ajoutées ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir de spectre d'absorption UV-Vis, Les valeurs obtenues de constant de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FcTris sont regroupés dans le tableau ci-dessous avec, $A_0 = 0,786$.

Tableau 07 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-FcTris obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.

[ADN] mol/l $\times 10^{-6}$	A	1/ [ADN]	$A_0/A - A_0$	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
21,37	0,713	46794,571	-10,767	6.97 x 10 ³	-21.90
35,63	0,676	28066,236	-7,145		
49,88	0,643	20048,115	-5,496		
64,13	0,614	15593,326	-4,569		
92,63	0,573	10795,638	-3,690		
128,26	0,516	7796,663	-2,911		
142,52	0,491	7016,559	-2,664		

III.2.3. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique de l'interaction FcTris-ADN

III.2.3.1. Constante et énergie libre de l'interaction FcTris-ADN

L'énergie libre de liaison ΔG de l'ADN avec le dérivé ferrocénique a été déterminé par l'étude du comportement anodique de ce dérivé en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN, cette étude du comportement électrochimique a été réalisé par la technique de la voltammétrie cyclique dans une solution tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2, la fenêtre du potentiel était de -200 à 600 mV avec une vitesse de balayage égale à 100 mV/s.

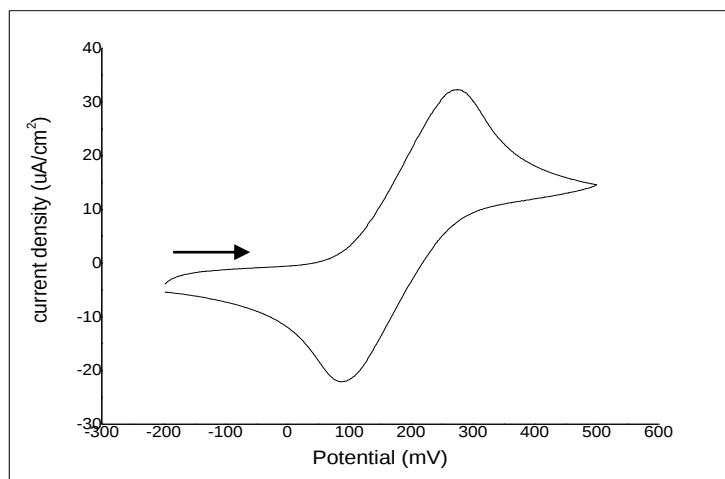


Figure 27 : Voltammogrammes cycliques de FcTris (2mM) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.

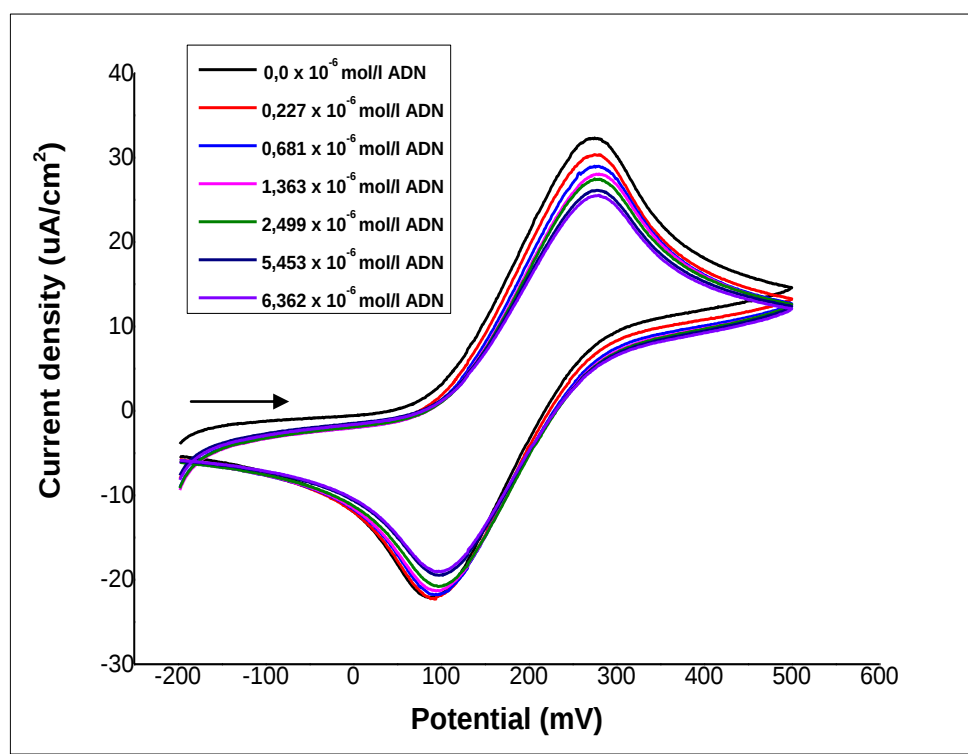


Figure 28 : Voltammogramme cyclique de FcTris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

Les voltammogrammes cycliques représentés dans la fig.28 montrent que l'addition de l'ADN provoque toujours une diminution de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques ip_a et ip_c accompagné d'un déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques vers les valeurs les plus positives. Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la fig.28 sont regroupés dans le tableau 08 suivant :

Tableau 08 : Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la fig.28.

[ADN] mol/l	E_{p_a} (mV)	ip_a ($\mu A/cm^2$)	E_{p_c} (mV)	ip_c ($\mu A/cm^2$)
0.0×10^{-6}	275.56	32.21	88.29	-31.78
0.22×10^{-6}	277.16	30.34	90.73	-30.14
0.68×10^{-6}	277.85	28.95	93.18	-28.64
1.36×10^{-6}	279.05	27.93	94.78	-27.84
2.49×10^{-6}	279.30	27.39	95.63	-26.92
5.45×10^{-6}	279.80	26.06	98.07	-25.87
6.36×10^{-6}	281.50	25.41	98.82	-25.16

La diminution du courant de pic anodique de FcTris par l'addition de différentes concentrations d'ADN a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation (4) (Feng et al., 1997) suivante :

$$\log \frac{1}{[ADN]} = \log K + \log \frac{ip}{ip_0 - ip} \quad (4)$$

Avec, [ADN] : concentration d'ADN, K : constante de liaison, ip_0 et ip sont les densités de courant anodiques en absence et en présence d'ADN respectivement.

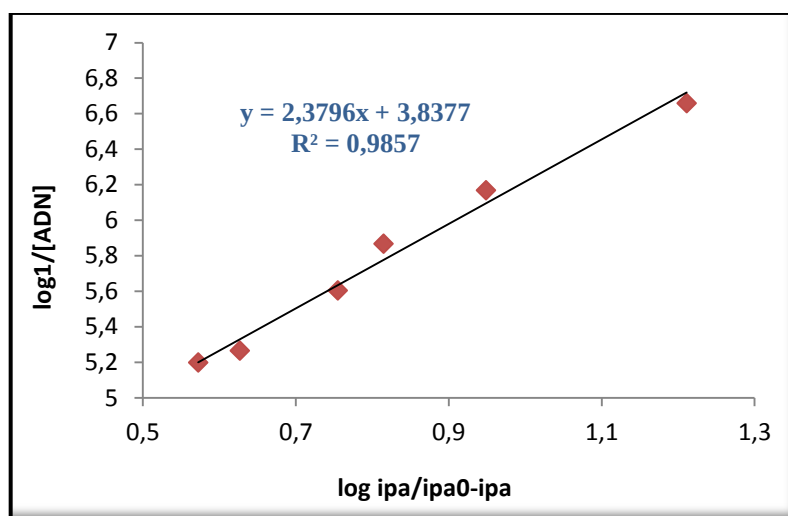


Figure 29 : Droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation (3).

Les valeurs obtenues de constante liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FcTris sont regroupées dans le tab.09.

Tableau 09 : Constante et énergie libres de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

$\log 1/[ADN]$	$\log ip/(ip_0 - ip)$	Equation	R^2	$K (mol^{-1})$	$\Delta G (KJ.mol^{-1})$
6,657	1,211	$y = 2,3796x + 3,8377$	0,9857	6.881×10^3	-21.90
6,167	0,948				
5,866	0,814				
5,603	0,755				
5,263	0,626				
5,196	0,572				

III.2.3.2. Détermination du rapport des constants de liaison

Le mode d'interaction FcTris-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'intercalation du composé étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN (**Aslanoglu, M., 2006**), bien que le décalage cathodique (déplacement vers les valeurs les plus négatives) est causé par l'interaction électrostatique du composé cationique étudié avec le phosphate anionique du squelette de l'ADN (**Li et al., 2005**).

Ainsi, le déplacement positive du potentiel de pic (décalage anodique) dans le comportement de CV de dérivés FcTris par l'ajout de l'ADN peut être attribué à la l'intercalation de dérivé étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN. Le déplacement de potentiel de pic vers les valeurs les plus positive indique en outre que l'anion Fe (III) du dérivé FcTris est plus facile de s'oxydée en présence d'ADN parce que sa forme réduite est plus fortement lié à l'ADN que sa forme oxydée. Pour un tel système, où les deux formes de dérivé ferrocénique réagissent avec l'ADN, le schéma 30 ci-dessous peut être appliqué.

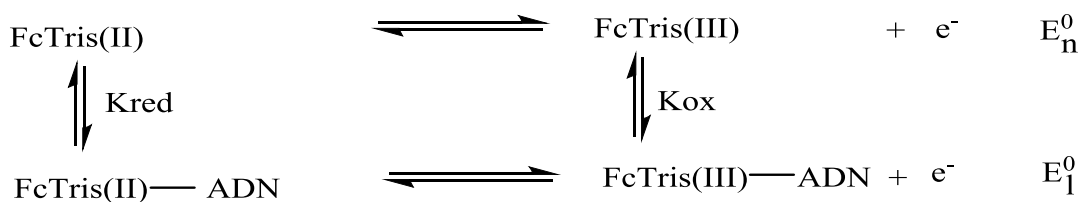


Figure 30 : Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de FcTris libre et celui lié à l'ADN

Avec E_n est le potentiel redox de la forme $FcTris$ non liée à l'ADN, E_n^0 est son potentiel redox standard, $[FcTris(III)]$ et $[FcTris(II)]$ sont respectivement les concentrations de la forme oxydée et réduite du dérivé $FcTris$ non lié à l'ADN, 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 (5) suivante,

$$E_n = E_n^0 + 0.059 \log \frac{[FcTris(III)]}{[FcTris(II)]} \quad (5)$$

Pour la forme liée on obtient la relation (6) suivante,

$$E_l = E_l^0 + 0.059 \log \frac{[FcTris(III) - ADN]}{[FcTris(II) - ADN]} \quad (6)$$

A l'équilibre on a $E_n = E_l$ et on obtient la relation (7),

$$E_n^0 - E_l^0 = 0.059 \log \frac{K_{ox}}{K_{red}} \quad (7)$$

Pour déterminer le rapport K_{ox}/K_{red} , des voltammogrammes cycliques de dérivé ferrocénique en absence et en présence de 2.49 μM d'ADN ont été obtenus fig.31.

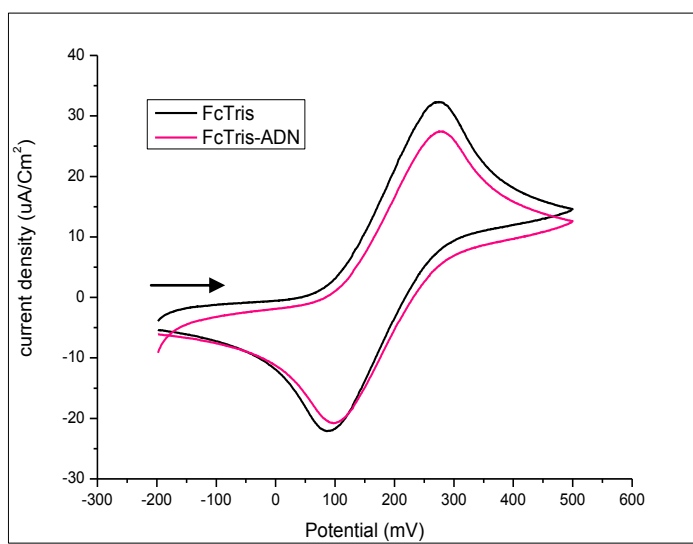


Figure 31 : Voltammogrammes cycliques de $FcTris$ (2mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence de 2.49 μM d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 0.1 M à pH = 7.2.

Les valeurs de déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques et la baisse de leurs courants, ainsi que le rapport des constantes de liaison sont tabulées dans le tab.10.

Tableau 10 : Données électrochimiques de la forme libre de FcTris et celui de l'adduit

FcTris-ADN.

Composé	i_{p_a} (μA)	E_{p_a} (V)	i_{p_c} (μA)	E_{p_c} (V)	E_0 (V)	$\left \frac{i_{p_a}}{i_{p_c}} \right $
FcTris	32.31	0.275	-31.78	0.088	0.1815	1.016
FcTris-ADN	27.39	0.279	-26.92	0.095	0.187	1.017

E^0 est calculé à partir de la relation (8) suivante,

$$E^0 = \left| \frac{E_{p_c} + E_{p_a}}{2} \right| \quad (8)$$

Le tableau 10 montre que le potentiel des pics anodiques et cathodiques des adduits est supérieur de celui de la forme non liée de dérivé ferrocénique, les constatations sont observées pour le potentiel formel E_0 . Les valeurs du rapport i_{p_a}/i_{p_c} traduisent parfaitement la réversibilité du système ferrocénium/ferrocène.

La variation de valeur du potentiel formel ΔE^0 calculé à partir de la relation 9 ainsi que le pourcentage de la baisse de la densité du courant anodique $\% \Delta i_{p_a}$ est calculé à partir de la relation 10 sont représentés dans le tab.11.

$$\Delta E^0 = E_n^0 - E_l^0 = E^0(\text{FcTris}) - E^0(\text{FcTris-ADN}) \quad (9)$$

$$\% \Delta i_{p_a} = 100 - \frac{i_{p_a}}{i_{p_{a_0}}} \times 100 \quad (10)$$

Tableau 11 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.

Adduit	ΔE^0 (V)	$\% \Delta i_{p_a}$	K_{ox} / K_{red}
FcTris-AND	-0.0055	15.22	0.806

La baisse de la densité du courant de pics anodiques est attribuée à la diminution de concentration en dérivé ferrocénique suite à la formation de l'adduit FcTris-ADN qui se diffuse plus lentement. La diminution de la densité 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.

On remarque, d'après la valeur du rapport K_{ox} / K_{red} dans le tab.11, que la forme réduite $Fc(II)$ réagit plus quantitativement que celle de la forme oxydée $Fc(III)$.

III.2.3.3. Coefficient de diffusion

Afin de calculer les coefficients de diffusion de FcTris et celui de l'adduit FcTris-ADN, plusieurs voltammogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400, 500 mV/s en absence et en présence (2.49×10^{-6} mol/l) d'ADN.

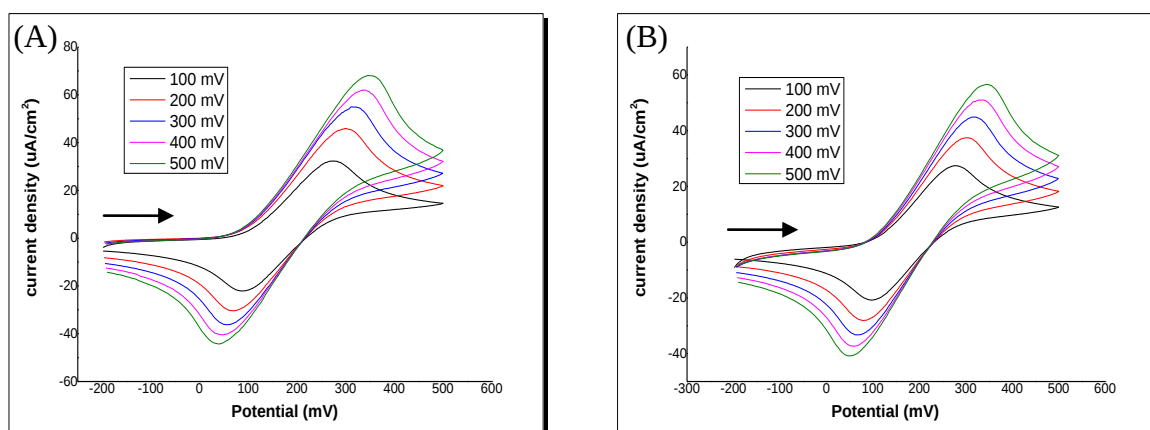


Figure 32 : Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la fig.32, ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le tab.12.

Tableau 12 : Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel

Vitesse (mV/s)	$V^{1/2}$	0.0 mol/l ADN	2.49×10^{-6} mol/l ADN
		IPa ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)	IPa ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
100	10	32,311	27,398
200	14,142	45,686	37,359
300	17,32	54,464	44,691
400	20	61,814	51,07
500	22,36	67,96	56,516

Les coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN ont été déterminés en utilisant l'équation (11) de Randles–Sevcik (**Brett et al., 1993**)

$$ip_a = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

Avec, ip_a : la densité du courant de pic anodique, n : nombre des électrons mise en jeu, A : surface de l'électrode du travail, C : la concentration de dérivé ferrocénique, D : coefficient de diffusion, et v : la vitesse de balayage du potentiel.

Le courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence et en présence de $2.49 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ de l'ADN selon l'équation (11).

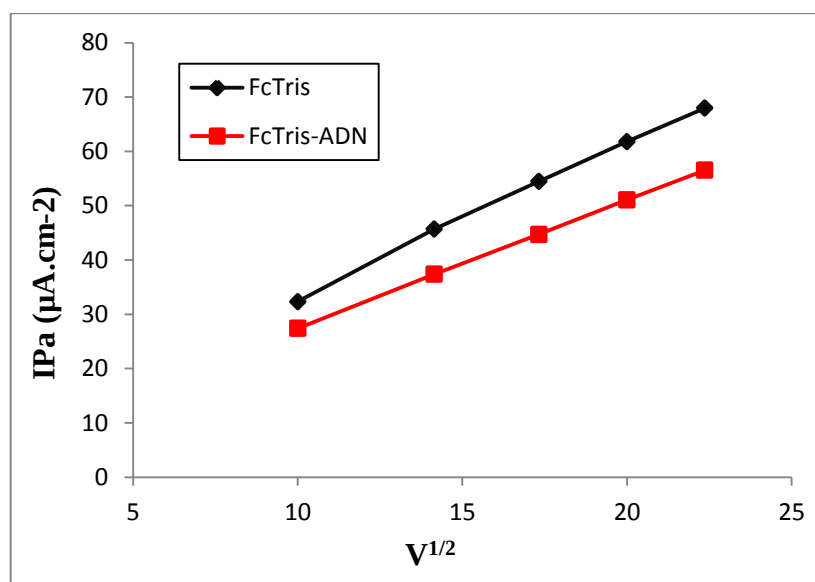


Figure 33 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.

Les coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN sont tabulés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN

Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
FcTris	y = 2,8733x + 4,277	0,998	1.17206 x 10 ⁻³
FcTris-ADN	y = 2,3544x + 3,9372	0,999	0.78695 x 10 ⁻³

Les résultats montrent que le coefficient de diffusion de l'adduit de dérivé ferrocénique en présence de l'ADN (FcTris-ADN) est plus petit que celle de dérivé ferrocénique seul (FcTris) cela confirme l'interaction entre ce dernier et l'ADN.

III.2.3.4. Taille de site de liaison

La taille des sites de liaison S de dérivé ferrocénique avec l'ADN peut être déterminée à partir des données électrochimiques en utilisant de l'équation (12) (Aslanoglu et al., 2005) suivant :

$$\frac{C_1}{C_n} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{S} \quad (12)$$

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_1 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 $[\text{ADN}]/2$, l'équation précédente peut être écrite comme suit :

$$\frac{C_1}{C_n} = \frac{K[\text{ADN}]}{2S} \quad (13)$$

Le rapport des concentrations C_1/C_n est déterminé à partir de l'équation (14) (Aslanoglu et al., 2004) ci-dessous :

$$\frac{C_1}{C_n} = \frac{i_0 - i}{i} \quad (14)$$

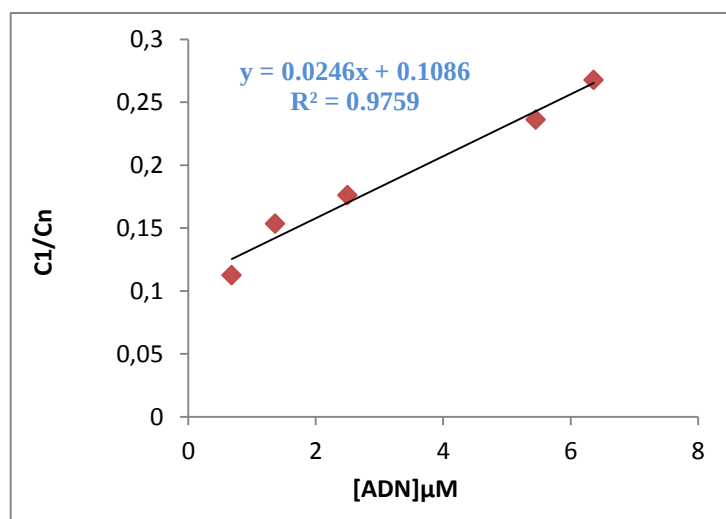


Figure 34 : Tracé de C_1/C_n en fonction de $[\text{ADN}]$

La taille de site de liaison déterminée à partir de la pente de Tracé de $C1/Cn$ en fonction de $[ADN]$ en mettant : $\frac{K}{2S} = \text{pente}$

Tableau 14 : Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique.

Pente	K	S (bp)
0,0246	6881,76	0.139

La faible valeur de S indique la dominance de l'interaction via le mode d'intercalation ou électrostatique entre le dérivé ferrocénique et l'ADN. Une telle interaction peut induire une perturbation dans le fonctionnement normal de l'ADN qui probablement abouti à la prévention de la réplication et la mort de la cellule.

III.2.3.5. Comparaison des constantes de liaison (mol^{-1}) et énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) déterminées *in vitro* par méthode spectroscopique et électrochimique avec celles obtenus *in silico* par amarrage moléculaire

Les constantes (mol^{-1}) et les énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique et celles obtenus par amarrage moléculaire sont tabulées dans tab.15.

Tableau 15 : Comparaison des constantes (mol^{-1}) et des énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique avec celles obtenus par amarrage moléculaire.

	$\Delta G (\text{KJ.mol}^{-1})$	K (mol^{-1})
Amarrage moléculaire	-21,59	6.03×10^3
UV-Vis	-21.90	6.97×10^3
CV	-21.90	6.89×10^3

III.3. Etude *in vivo*

III.3.1. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine

Les foies, les reins, les cœurs et les poumons sont attentivement prélevés, les poids relatifs de ces organes sont calculés comme suit :

$$\frac{\text{poids d'organe}}{\text{poids totale de ratte}} \times 100$$

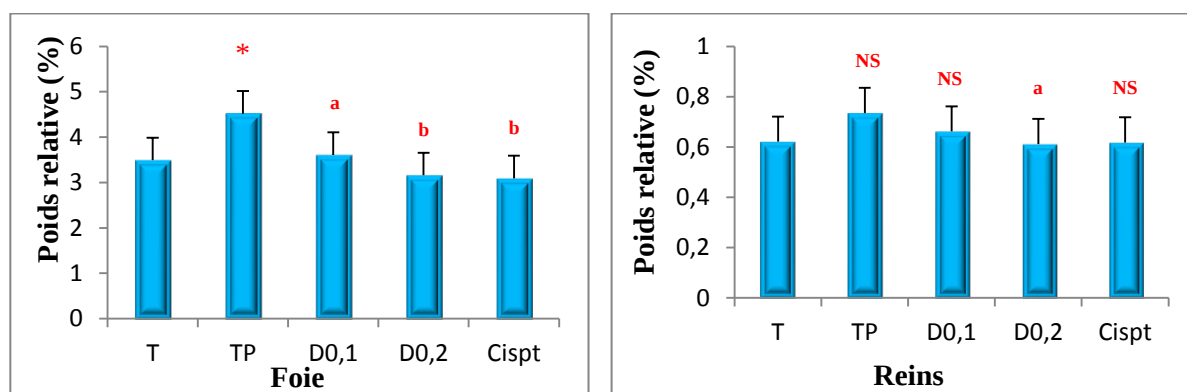


Figure 35 : Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.

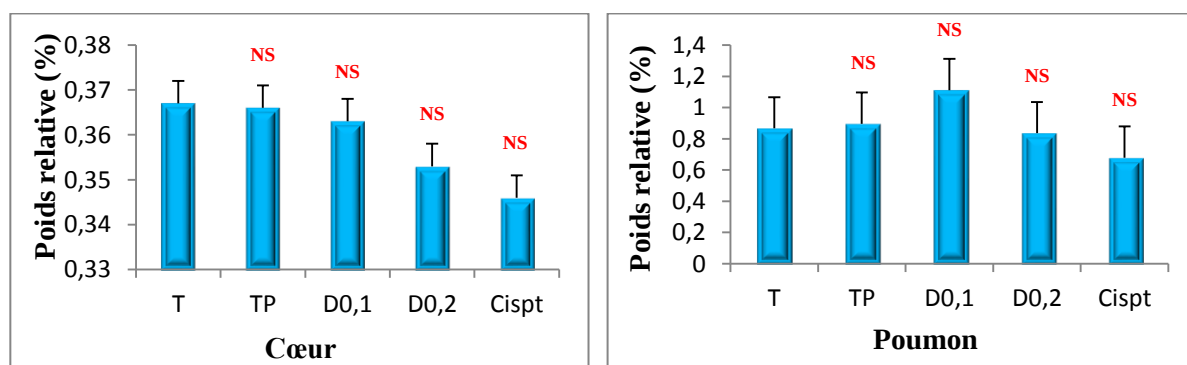


Figure 36 : Poids relatif des organes (cœur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

D'après nos résultats, une augmentation significative ($p < 0.05$) de poids relatif de foie chez le groupe exposé au métribuzine (TP) a été observé et aucune variation concernant les autres organes par rapport au témoin. En revanche, une diminution significative ($p < 0.05$) de poids relatif de foie chez le groupe traité par D_{0,1} de FcTris et de poids relatif de reins chez le groupe traité par D_{0,2} de FcTris, aussi une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de

poids relatif de foie chez le groupe traité par D_{0,2} de FcTris et par le Cispt par rapport à groupe TP.

III.3.2. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres hématologique chez les rattes exposées au métribuzine

Après 50 jours d'exposition au métribuzine, les rattes sont traitées ensuite par le FcTris (0.1 et 0.2 mg/kg) et le cisplatine pendant 7 jours, les analyses des paramètres hématologiques sont ensuite réalisées.

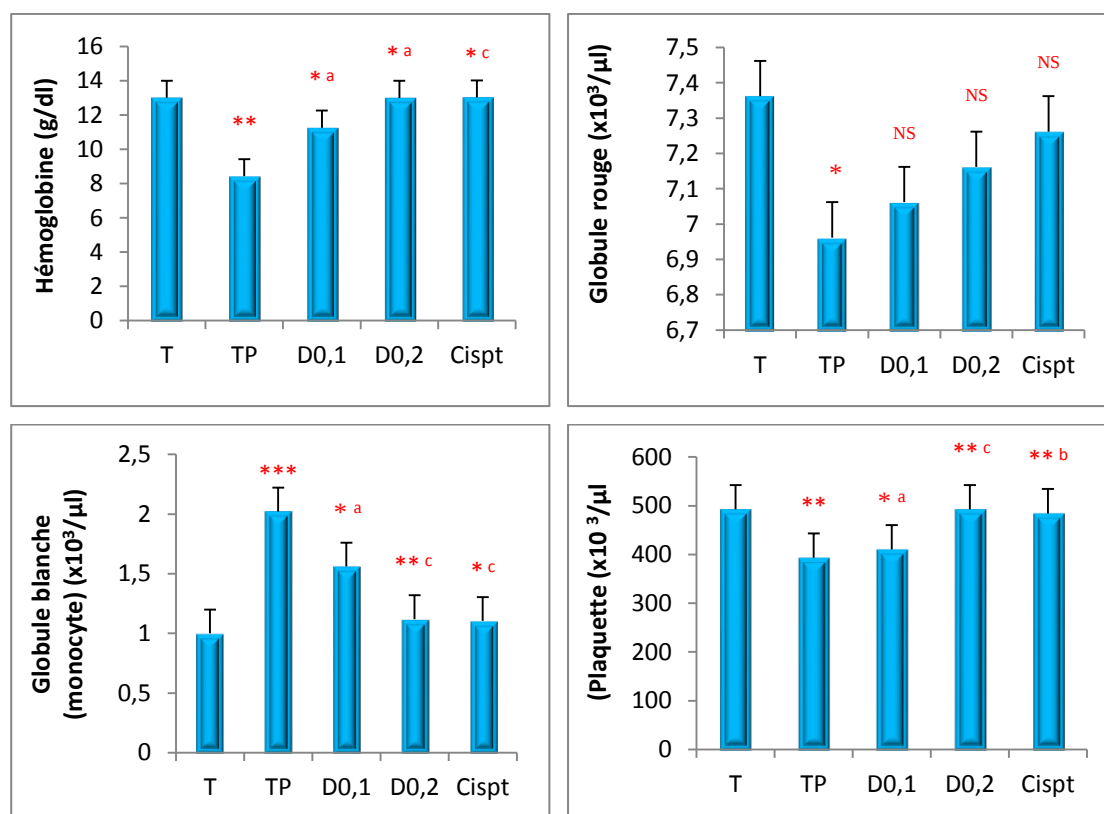


Figure 37 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur certains paramètres hématologiques.

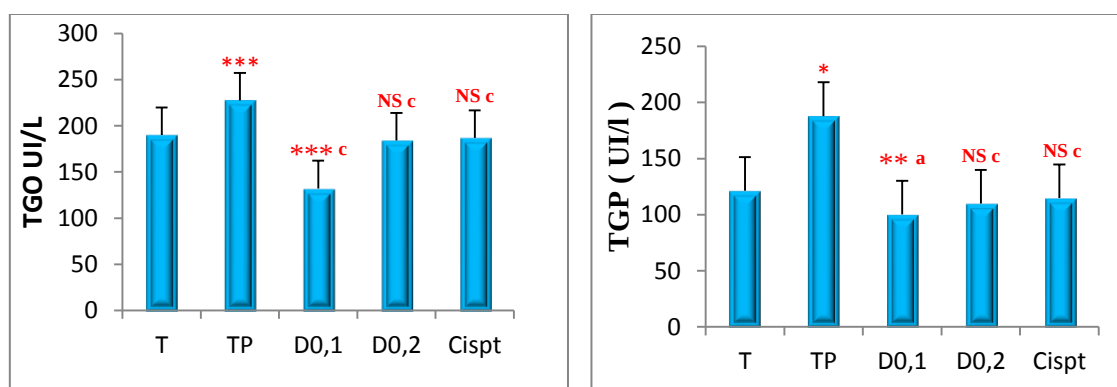
Les résultats obtenus (fig.37) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une diminution hautement significative de concentration plasmatique d'hémoglobine et de plaquette ($p < 0.01$), une diminution significative de concentration plasmatique de globule rouge ($p < 0.05$) et une augmentation très hautement significatif de concentration plasmatique de globule blanc ($p < 0.001$) par rapport aux rattes saines. En revanche, le traitement des rattes par de dose 0.1 mg/kg de FcTris provoque une augmentation significative de concentration plasmatique d'hémoglobine ($p < 0.05$), une augmentation non significative de concentration

plasmatique de globule rouge ($p>0.05$), une augmentation significative de concentration plasmatique de plaquette ($p<0.05$) et une diminution significatif de concentration plasmatique de globule blanc ($p<0.05$). En parallèle, la dose 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation significative de concentration plasmatique d'hémoglobine ($p<0.05$), une augmentation non significative de concentration plasmatique de globule rouge ($p>0.05$), une augmentation très hautement significative de concentration plasmatique de plaquette ($p<0.001$) et une diminution très hautement significatif de concentration plasmatique de globule blanc ($p<0.001$). Ainsi, le traitement par le cisplatine provoque une augmentation très hautement significative de concentration plasmatique d'hémoglobine ($p<0.001$), une augmentation non significative de concentration plasmatique de globule rouge ($p>0.05$), une augmentation hautement significative de concentration plasmatique de plaquette ($p<0.01$) et une diminution très hautement significatif de concentration plasmatique de globule blanc ($p<0.001$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.3. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les ratte exposées au métribuzine

Les analyses biochimiques ont été réalisées au laboratoire ALMAJD. et laboratoire Ben amor djilani à El oued

III.3.3.1. Effet sur les enzymes hépatique (TGO, TGP et PAL)



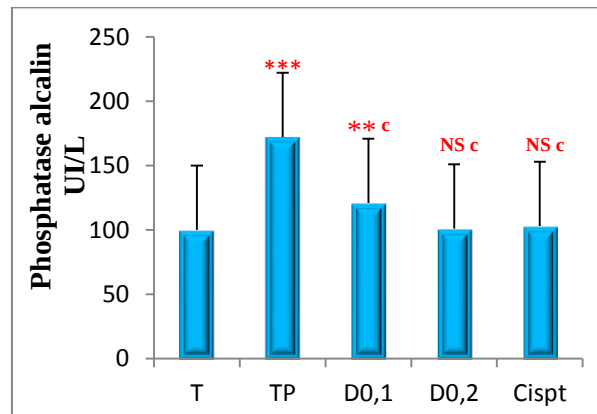
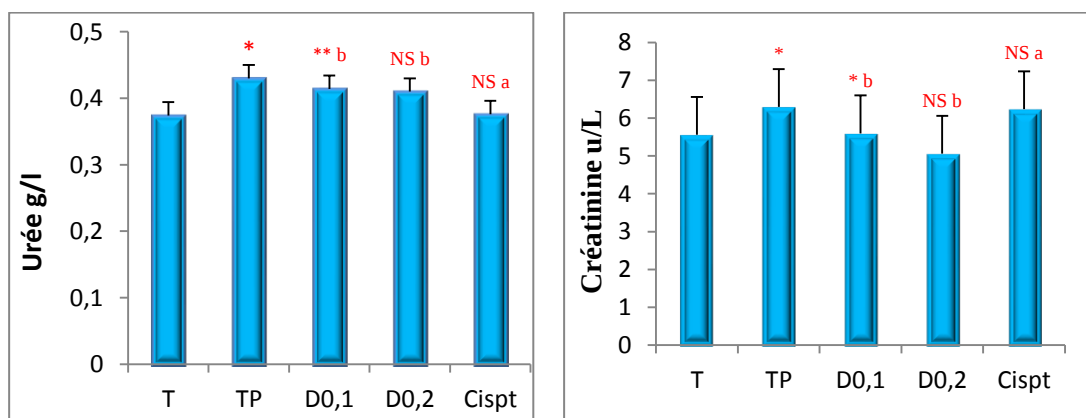


Figure 38 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP) et le taux de PAL chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats (fig.38) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation très hautement significatif de taux du PAL (phosphatase alcalin), TGO ($p < 0.001$) et une augmentation significative l'activité de TGP ($p < 0.05$) par rapport aux rattes sains témoins. En revanche, le traitement des rattes par une dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une diminution très hautement significative de taux du TGO et PAL ($p < 0.001$) et une diminution significatif de taux de TGP, ainsi le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris et par le cisplatine provoque une diminution très hautement significative de taux du TGO, TGP et PAL ($p < 0.001$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.3.2. Effet sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique)



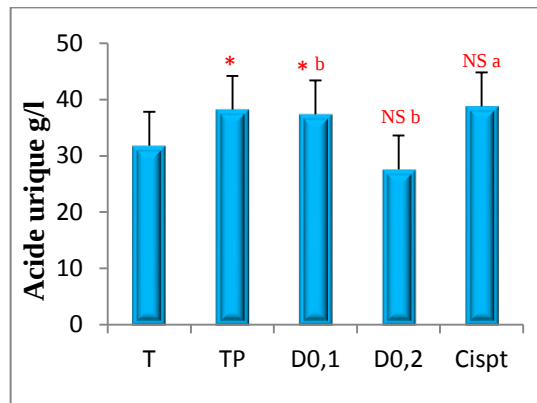
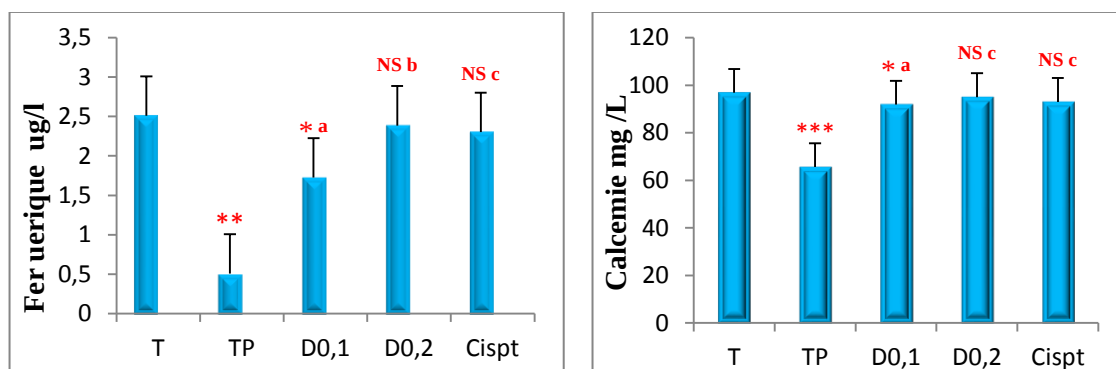


Figure 39 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique) chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig.39) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation significative des concentrations de l'urée, créatinine et de l'acide urique ($p < 0.05$) par rapport aux rattes saines. Cependant, le traitement des rattes par des doses de 0.1 et 0.2 mg/kg de FcTris provoque une diminution hautement significative des concentrations de l'urée, créatinine et de l'acide urique ($p < 0.01$). En revanche, le traitement par le cisplatine provoque une diminution significative des concentrations de l'urée, créatinine et de l'acide urique ($p < 0.05$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.3.3. Effet sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium



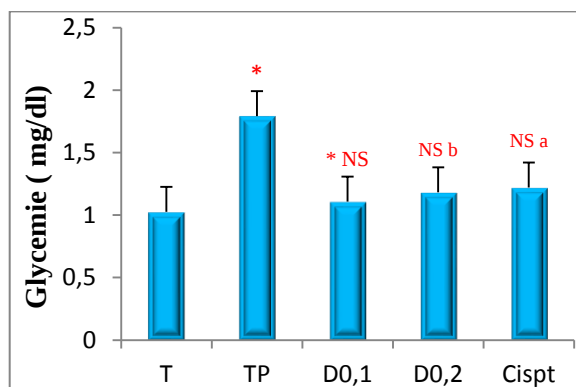


Figure 40 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig.40) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une diminution très hautement significatif de calcium ($p < 0.001$), une diminution hautement significative fer sérique ($p < 0.01$) et une augmentation significative de glycémie ($p < 0.05$) par rapport aux rattes saines. En revanche, le traitement des rattes par une dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une augmentation significative de calcium et de fer sérique ($p < 0.05$) et une diminution non significative de la glycémie ($p > 0.05$); Ainsi, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation significative calcium ($p < 0.05$), une augmentation hautement significative de fer sérique ($p < 0.01$) et une diminution significative de glycémie ($p < 0.05$); d'un autre côté, le traitement par le cisplatine provoque une augmentation très hautement significative de calcium et de fer sérique ($p < 0.001$) et une diminution significative de glycémie ($p < 0.05$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.3.4. Effet sur le marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine "AFP")

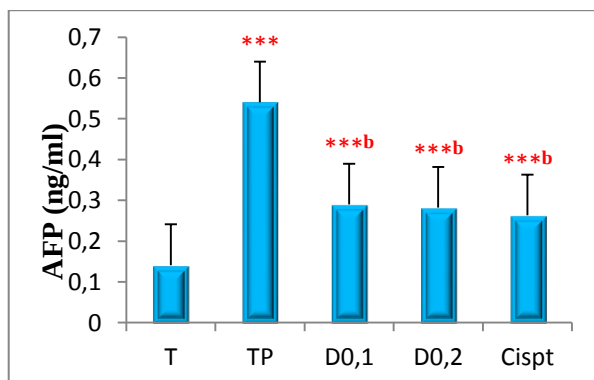


Figure 41 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine "AFP") chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig.41) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une augmentation très hautement significative de concentration de AFP ($p<0.001$) par rapport aux ratte saine. Ainsi le traitement des ratte par des dose de 0.1 et 0.2 mg/kg de FcTris et par le cisplatine provoque une diminution hautement significative des concentration de AFP ($p<0.01$) par rapport aux ratte exposée au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.4. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les ratte exposée au métribuzine

Après 50 jour d'exposition des ratte au métribuzine sont traitée par le FcTris (des dose 0.1 et 0.2 mg/kg) et le cisplatine pendant 7 jour, dans les organe prélevé ont été effectués les test de stress oxydatif (Malondialdéhyde « MDA », glutathion réduit « GSH » et l'activité de Glutathion S Transférase « GST »)

III.3.4.1. Effet sur la concentration tissulaire de Malondialdéhyde (MDA)

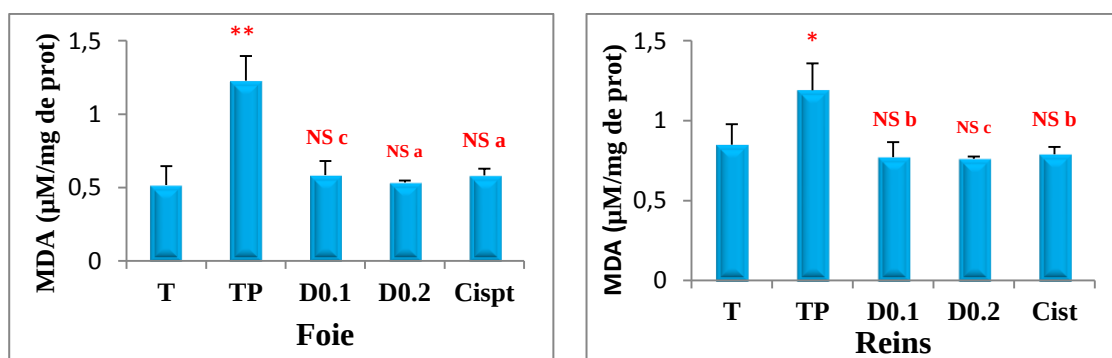


Figure 42 : Concentrations hépatique et rénal de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupe expérimentaux.

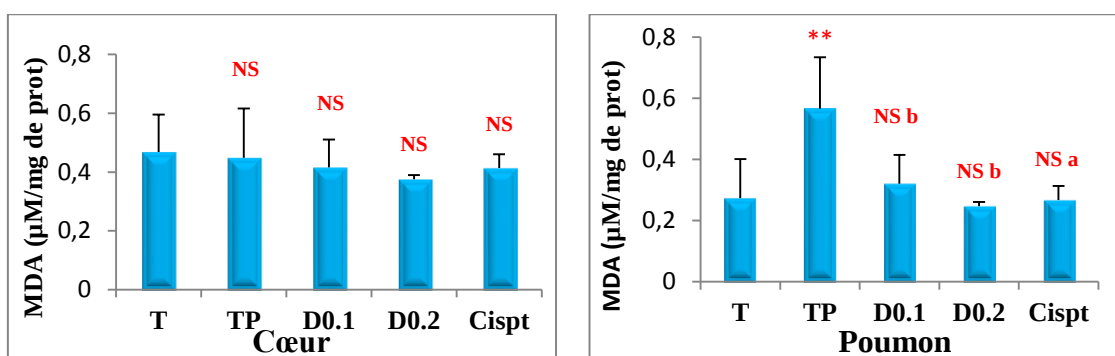
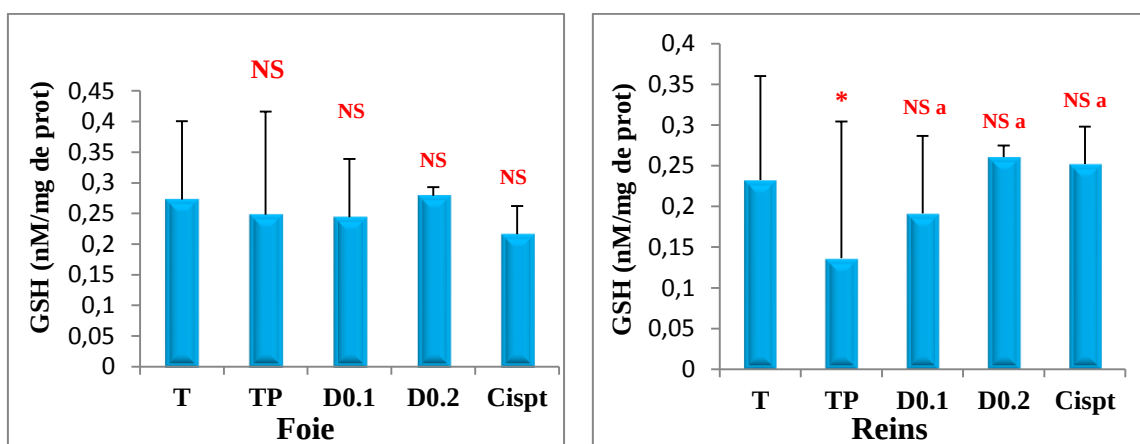


Figure 43 : Concentrations cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupe expérimentaux.

Les résultats obtenus (fig.42, 43) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une augmentation hautement significatif de la concentration hépatique et pulmonaire de MDA ($p < 0.01$), une augmentation significatif de la concentration rénal de MDA ($p < 0.05$) et une diminution non significative de la concentration cardiaque de MDA ($p > 0.05$), par rapport aux ratte saines. Les résultats montrent aussi que le traitement par une dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une diminution très hautement significative de la concentration hépatique de MDA ($p < 0.001$), une diminution hautement significative de la concentration rénal et pulmonaire de MDA ($p > 0.01$) et une diminution non significative de concentration cardiaque de MDA ($p > 0.05$). Cependant, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une diminution significative de la concentration hépatique de MDA ($p < 0.05$), une diminution très hautement significative de la concentration rénal de MDA ($p < 0.001$), une diminution hautement significative de la concentration pulmonaire de MDA ($p < 0.01$) et une diminution non significative de concentration cardiaque de MDA ($p > 0.05$). En revanche, le traitement par le cisplatine provoque une diminution significative de la concentration hépatique et pulmonaire de MDA ($p < 0.05$), une diminution hautement significative de la concentration rénal de MDA ($p < 0.01$) et une diminution non significative de la concentration cardiaque de MDA ($p > 0.05$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.4.2. Effet sur la concentration tissulaire de glutathion réduit (GSH)



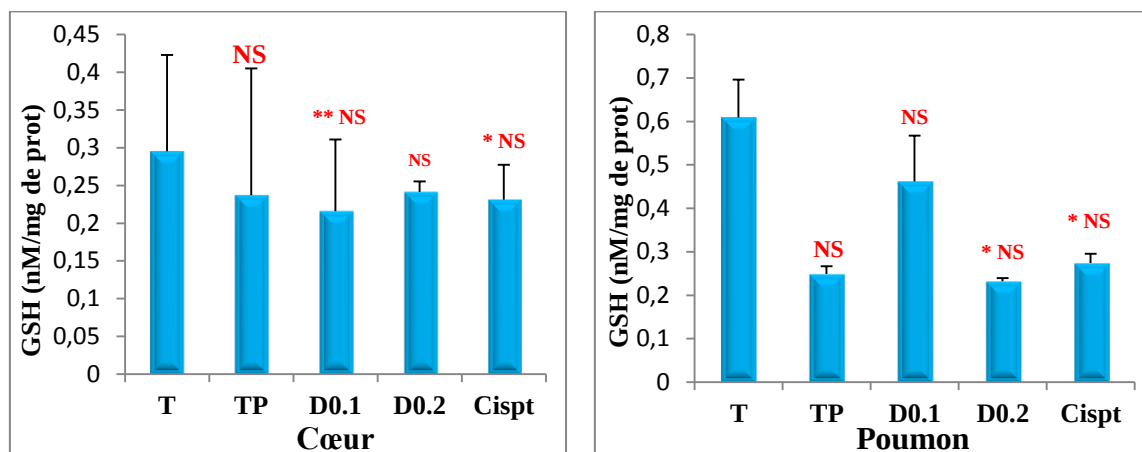


Figure 44 : Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.

Les résultats obtenus (fig.44) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une diminution non significatif de la concentration hépatique, pulmonaire et cardiaque de GSH ($p > 0.05$), une diminution significatif de la concentration rénal de GSH ($p < 0.05$), par rapport aux ratte saines. Les résultats montrent aussi que le traitement des ratte par une dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une diminution non significative de la concentration hépatique et cardiaque de GSH ($p > 0.05$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire de GSH ($p > 0.05$) et une augmentation significative de la concentration rénal de GSH ($p < 0.05$). En parallèle, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation non significative de la concentration hépatique et cardiaque de GSH ($p > 0.05$), une diminution non significative de la concentration pulmonaire de GSH ($p > 0.05$), et une augmentation significative de la concentration rénale de GSH ($p < 0.05$). Cependant, le traitement par le cisplatine provoque une diminution non significative de la concentration hépatique et cardiaque de GSH ($p > 0.05$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire de GSH ($p > 0.05$) et une augmentation significative de la concentration rénal de GSH ($p < 0.05$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

III.3.4.3. Effet sur la concentration tissulaire de Glutathion S Transférase (GST)

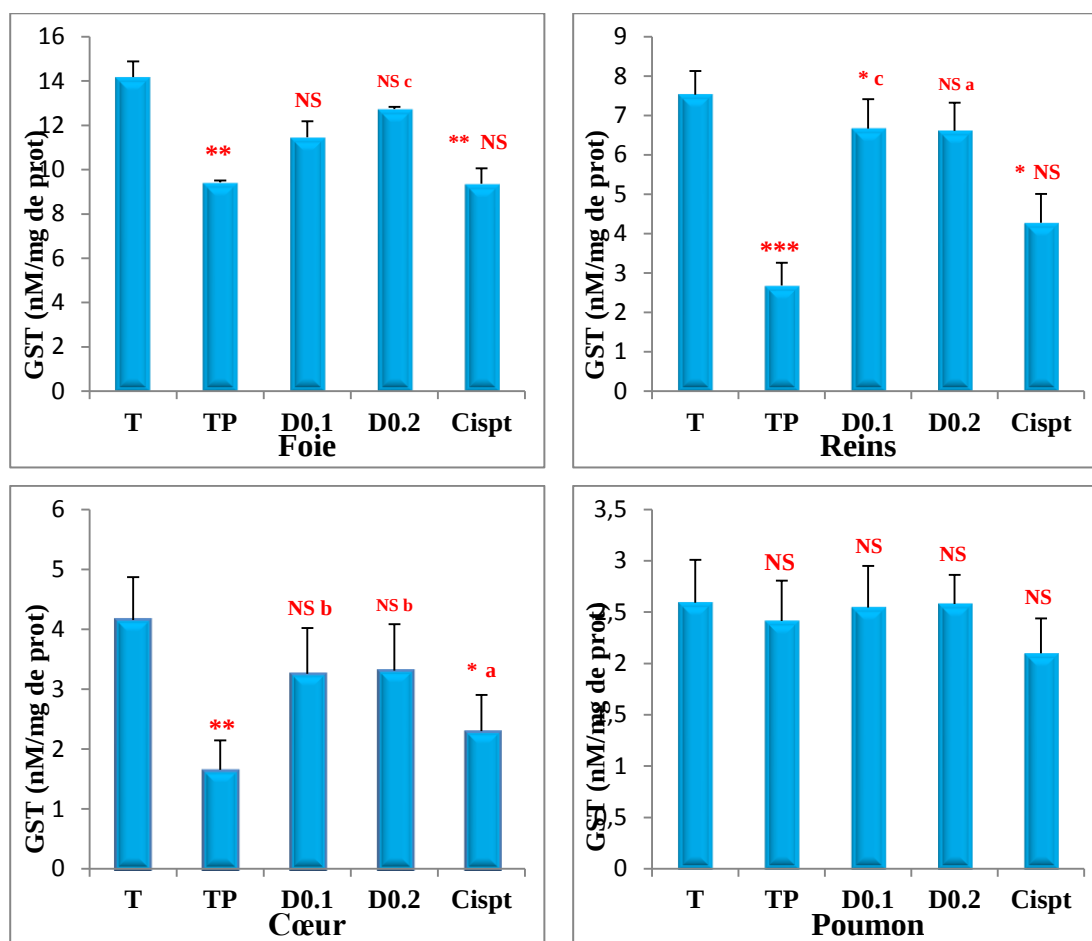


Figure 45 : Concentrations tissulaires de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats obtenus (fig.45) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une diminution hautement significatif de la concentration hépatique et cardiaque de GST ($p < 0.01$), une diminution très hautement significative de la concentration rénal de GST ($p < 0.001$) et une diminution non significative de concentration pulmonaire de GST ($p > 0.05$) par rapport aux ratte saines. Les résultats montrent aussi que le traitement des ratte par une dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une augmentation non significative de la concentration hépatique et pulmonaire de GST ($p > 0.05$), une augmentation très hautement significative de la concentration rénal de GST ($p < 0.001$) et une augmentation hautement significative de la concentration cardiaque de GST ($p > 0.01$). En parallèle, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation très hautement significative de la concentration hépatique de GST ($p < 0.001$), une augmentation significative de la concentration rénal de GST ($p < 0.05$), une augmentation hautement significative de la concentration cardiaque de GST

($p < 0.01$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire de GST ($p > 0.05$). En revanche, le traitement par le cisplatine provoque une diminution non significative de la concentration hépatique de GST ($p > 0.05$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire et rénal de GST ($p > 0.05$) et une augmentation significative de la concentration cardiaque de GST ($p < 0.05$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide)

Discussion

Notre étude a pour but d'évaluer l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes (FcTris), qui est un dérivé ferrocénique synthétisé à partir de la réaction du sel quaternaire et le Tris. Sachant que les dérivés ferrocéniques ont une capacité d'interagir avec l'acide désoxyribonucléique (**Gasser, G, et al., 2011 et Muhammad Khawar, R, et al., 2015**). L'interaction entre le FcTris et l'ADN a été déterminé par différents méthodes d'études, *in silico* pour confirmer cette interaction théoriquement, *in vitro*, par la spectroscopie UV-Visible et l'électrochimie. En fin, l'étude *in vivo* pour tester l'efficacité biologique de ce dérivé ferrocénique par injection intra péritonéal chez des rattes albinos de type Wistar exposé au métribuzine. Cette étude a été comparée avec l'activité biologique de cisplatine qui est un composé organométallique anticancéreux et qui interagit avec l'ADN (**Nuhrich, A. 2015**).

In silico, l'étude de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN révèle que le dérivé ferrocénique interagit avec l'ADN d'une façon spontané traduit par la valeur de l'énergie libre ($\Delta G = -21.58$) (**Friedli, C., 2002 et Infelta, P., Graetzel, M., 2006**). En effet, le dérivé ferrocénique se lie à l'ADN en formant 5 liaisons hydrogènes ce qui empêche la réplication de l'acide nucléique et donc, l'arrêt de la division cellulaire. Cela peut être expliqué par le fait que les cellules cancéreuses caractérisées par une prolifération anormale et anarchique dans l'organisme (**Gassier, J., Morel-Haziza, C., 2003**), l'attaque de ces cellules par le dérivé ferrocénique qui interagit avec l'ADN en empêchant leurs multiplications, de ce fait, le dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes considéré théoriquement comme un anticancéreux potentiel. Nos résultats est en accord avec les études de **Altaf, A.A, et al., 2016 et Lanez, E., 2016** qui ont montré par docking l'interaction d'autres dérivés ferrocéniques avec l'ADN.

In vitro, en spectroscopie UV-Visible l'étude de la variation d'absorbance de dérivé ferrocénique en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN donne une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -21.9$) cela indique la spontanéité de la réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN par interaction physique (**Friedli, C., 2002 et Infelta, P., Graetzel, M. 2006**).

Le spectre électronique de dérivé ferrocénique révèle que quel que soit la portion d'ADN ajoutée, il y a toujours une diminution de l'absorbance, les changements d'absorbance

se produisent généralement, lorsque les molécules se lient à l'ADN par intercalation (**Can, et al., 2014**).

L'étude par méthode électrochimique de l'interaction de FcTris et l'ADN montre que la valeur de l'énergie libre est négative ($\Delta G = -21.9$) et moins de 30 KJ/mol, ce qui confirme que l'interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN se fait spontanément par interaction physique.

D'ailleurs, Lors que l'ADN est ajouté à une solution de FcTris, une diminution de courant de pic anodique est marqué et les changements de potentiels de pic à de valeurs positives sont observés. Il semble que cette diminution du courant de pic est provoquée par l'intercalation de FcTris à la masse d'ADN (**Altaf, A.A, et al., 2016**).

Nos résultats montrent que la forme réduite de dérivé ferrocénique réagit plus quantitativement que celle de la forme oxydée traduit par la valeur du rapport K_{ox} / K_{red} (**Molina, Á et González, J. 2015**).

Pour connaître davantage l'interaction de FcTris avec l'ADN, la représentation linéaire du pic des courants de FcTris 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. Dans les travaux antérieurs le coefficient de diffusion en présence d'ADN est inférieur à celle du FcTris libre cela peut être due à la formation d'adduits FcTris- ADN qui deviennent lourd. Généralement les molécules à grande masse moléculaires ont un faible coefficient de diffusion c'est-à-dire se diffusent lentement à la surface de l'électrode (**Shah, A., 2010**). Nos résultats est comparable avec les études antérieure. En effet, le coefficient de diffusion de FcTris libre est plus que le FcTris lié.

La faible valeur de S indique la dominance de l'interaction d'intercalation ou l'interaction électrostatique entre le dérivé ferrocénique et l'ADN. Une telle interaction peut induire une perturbation dans le fonctionnement normal de l'ADN qui probablement abouti à la prévention de la réplication et la mort de la cellule.

In vivo, les résultats montrent une augmentation significative ($P < 0,05$) de la masse relative du foie après l'exposition au pesticide par rapport au groupe témoin. En effet, le foie est l'organe cible du pesticide. Cette augmentation du poids du foie peut être due à l'augmentation des demandes accrues de détoxification des composés toxiques (**Kadota et**

al., 1976). En outre, il désigne l'augmentation de la masse cellulaire ou de la densité cellulaire (Abston, P.A et *al.*, 1976). Une autre étude chez les souris mâles est comparable avec nos résultats, car celles-ci montrent que l'augmentation du poids du foie aboutit à l'apparition d'une tumeur du foie (Quest, J.A. et *al.*, 1990 ; Chang, J.C. et *al.*, 1991). En revanche, le traitement par le FcTris et le cisplatine au groupe exposé aux métribuzine a entraîné une amélioration de poids relatif des organes notamment le foie. Cette amélioration est due probablement à l'effet inhibiteur de ces composés contre l'accumulation de ce pesticide ainsi que l'augmentation du volume qui l'accompagne avec l'apparition d'une tumeur. En effet, le dérivé ferrocénique diminue l'effet néfaste de pesticide sur ces organes et donc diminue leur poids relatifs. Nous pourrions dire que l'effet protecteur de ces molécules pourrait être dû à leurs propriétés antiproliférative et antioxydante (Keerthi., 2014 et Miguel., 2010).

Les résultats hématologiques obtenus montrent d'une part qu'il y a une augmentation de nombre des globules blancs chez les groupes exposés au métribuzine par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Medjdoub, A., et *al.*, 2011 qui ont montré que la métribuzine conduit à l'activation et la stimulation de la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines dans les cellules spléniques humaines et de rat. Cette augmentation peut être due à l'effet cancérogène de pesticide (Rossant-Lumbroso, J et Rossant, L., 2016).

D'autre part, une diminution de nombre des globules rouges et des plaquettes chez les groupes exposés au métribuzine par rapport au groupe témoin est observée, cette diminution due à l'hématotoxicité de métribuzine (Sudhir, et *al.*, 2007). En effet, une diminution de la concentration d'hémoglobine sous l'effet de la métribuzine par rapport au lot témoin est observée. Sachant que, l'hémoglobine est une protéine ayant la propriété de fixer, transporter et délivrer l'oxygène. Une diminution du taux d'hémoglobine oriente le diagnostic vers une anémie (Descroix et *al.*, 2014). La diminution de nombre de globules rouges et d'hémoglobine peut être attribuée à la cancérogénicité de métribuzine (Rossant-Lumbroso, J et Rossant, L., 2016).

Le traitement par le FcTris et le cisplatine aux ratte intoxicées par le métribuzine a induit une augmentation du taux de l'hémoglobine, de nombre globules rouges et des plaquettes, et une diminution de nombre globules blancs. En effet, On a révélé un effet protecteur de ces molécules contre l'hématotoxicité, et indique que ces molécules peuvent protéger contre l'anémie saturnine. Ceci corrélée avec leur capacité anticancéreuse, et la

grande activité antioxydant, qui peut expliquer la diminution de la peroxydation lipidique et de l'hémolyse érythrocytaire.

L'augmentation des teneurs sériques en glucose chez les groupes traités par la métribuzine. Ceci peut être expliquée par le grand catabolisme du glycogène hépatique **(Kumar et Rajini., 2009)**. D'ailleurs, plusieurs études ont montré, quand un organisme est exposé à des substances toxiques, et les réactions émotionnelles dans le système limbique actif l'hypothalamus pour produire la corticolibérine (CRH). Ce dernier stimule l'hypophyse pour libérer l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui est un activateur de glandes surrénales pour la production et la sécrétion de cortisol dans le sang **(Pourramzanidesaraei, Met al., 2013)**. Le cortisol a de nombreuses actions dont certaines conduisent à l'élévation de la glycémie **(Jacotot., et Campillo., 2003)**. Ce qui expliquer le plus probable les résultats de glycémie. Ces résultats sont en accord avec d'autres auteurs utilisant d'autres pesticides **(Kumar et Rajini, 2009; Ksheerasagar et Kaliwal, 2006)**. L'augmentation de glycémie peut être dû la présence de tumeur hépatique qui empêche l'absorbance de glucose par les cellules hépatique **(Rossant-Lumbroso, J et Rossant, L., 2016)**.

En effet, le traitement des rattes avec le FcTris et le cisplatine a restauré la fonction hépatique. Ces molécules ont pu diminuer les concentrations sériques de glycémie chez les rattes exposées au métribuzine qui montrent la capacité de ces molécules à protéger contre les dommages et la tumeur hépatique induite par le pesticide.

Concernant les marqueurs de la fonction rénale, notre étude montre qu'il y a une augmentation de la concentration sérique d'urée, d'acide urique et de la créatinine chez le groupe exposé à la métribuzine. Ces résultats sont en d'accord avec l'étude **d'El-Damaty et al., 2012**, qui présentent une augmentation significative de l'urée, d'acide urique et la créatinine dans le sérum de rattes, sous traitement au dose en pesticides. La créatinine est un métabolite de la créatine, qui dans le muscle squelettique est phosphorylée en créatine-phosphate, un composé riche en énergie libre **(Bossuyt., et Boeynaems., 2001)**. Elle est un déchet métabolique azoté, produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire. L'urée est un catabolite des acides aminés produit par les hépatocytes. Sa production est donc dépendante du fonctionnement hépatique et du catabolisme des protéines. On considère que la filtration glomérulaire est le mécanisme essentiel de l'élimination de la créatinine et de l'urée **(Maurey, 2005)**. Les teneurs sériques en urée et en créatinine chez les différents lots de rattes expérimentaux présentent une augmentation significative comparés à leurs témoins. Des

résultats semblables ont été également retrouvés par des auteurs sur d'autres pesticides (**Garoui et al., 2011; Salem, 2011; Renugadevi et Milton., 2009**), ceux-ci ont montré une augmentation de la créatinine et l'urée par différents types de pesticides avec une altération de la fonction rénale.

En revanche, le traitement des ratte avec le FcTris et le cisplatine a restauré la fonction rénale. L'effet protecteur de ces molécules a été reflété par la diminution des concentrations sériques de l'urée, créatinine et d'acide urique chez les ratte traitées par ces molécules par rapport aux ratte exposées au métribuzine. Cela explique la capacité de ces molécules à protéger contre les dommages rénaux induits par les pesticides.

Par ailleurs, nos résultats montrent aussi qu'il y a une augmentation de l'activité des transaminases (TGO, TGP) chez les lots exposés au métribuzine par rapport au lot témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Merzouk et al., 2013**, qui a montré une augmentation de l'activité des transaminases plasmatiques (TGO et TGP) chez des rats exposés à la métribuzine. On peut expliquer ces résultats probablement par l'effet cytotoxique de la métribuzine sur les cellules hépatiques et myocardique. En effet, les transaminases sont des enzymes essentielles de la cytolys (Karaa., et Labayle., 2008), ils sont actives dans le foie, le cœur et les muscles. Elles passent dans le sérum en cas de cytolys hépatique ou musculaire, une augmentation importante s'observe dans les cytolyses des hépatites toxiques (**Descroix et al., 2014**). L'augmentation significative des activités sériques de l'AST et ALT chez les ratte traitées peut être expliquée par les changements destructifs des cellules hépatiques induites par la métribuzine, entraînant par la suite des changements de perméabilité, et la fuite des enzymes (**Djeffal A., 2014**). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres travaux utilisant différents pesticides (**Saoudi, M. et al., 2011; Chattopadhyay, S. et al., 2003**).

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate en plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le plasma des ratte recevant le métribuzine et une diminution des activités de la PAL dans différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ou à la nécrose cellulaire, montrant l'état d'un stress dans l'animal. L'augmentation de l'activité de PAL chez les ratte provoqué par le métribuzine est en accord avec les conclusions rapportées par **El Missiry et**

Othman (1993), Patil et *al.* (2008), Garg et *al.* (2009a), El-Fakharany et *al.* (2011) et El-Demerdash et *al.* (2012). D'autres études ont aussi montré l'augmentation de l'activité de PAL suite à l'exposition aux insecticides carbamates, comme le carbofuran (Pach et *al.*, 1998 ; Brkia et *al.*, 2008) et le carbaryl (Sharma, 1999 ; Eraslan et *al.*, 2009).

En revanche, nos résultats montrent que le traitement des ratte par le FcTris et par le Cisplatine a restaurée significativement l'activité enzymatique des transaminases et PAL par rapport aux ratte exposées au pesticide, ce qui signifie que ces molécules inhibent les dommages hépatiques causés par le métribuzine. Ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydant.

Comparant au témoin, les résultats concernant le taux sérique du calcium et de fer montrent une diminution remarquable chez les ratte exposés au pesticide. Cette diminution du a l'effet oxydante de métribuzine dans les cellules intestinales qui induit l'inhibition de l'absorption gastro-intestinale du Ca^{+2} et de Fe (Kathryn et Mahaffey, 1974). En effet, Le traitement des ratte par le FcTris et le Cisplatine a restauré la fonction intestinale en augmentent le taux sérique du calcium et de fer.

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de taux de l'Alpha-foetoprotéine (AFP) chez les lots exposé au métribuzine par rapport au lot témoin, AFP est une protéine naturellement fabriquée par le foie et le sac vitellin d'un bébé en développement. Le taux d'AFP diminue peu après l'accouchement. On ne l'observe normalement pas chez les adultes en bonne santé (Malaguarnera, G et *al.*, 2011). AFP est utilisé comme marqueur tumoral pour aider à détecter et à diagnostiquer les cancers du foie, son augmentation chez le groupe exposé au métribuzine indique la présence de carcinome hépato-cellulaire (CHC) (Pincus MR, et *al.*, 2011).

Le traitement des ratte par le FcTris et le Cisplatine a induit une diminution hautement significative de taux d'AFP. Ceci explique le même effet anticancéreux de Cisplatine et de FcTris.

L'effet de la métribuzine sur les paramètres de stress oxydatif présente une augmentation de la concentration de MDA tissulaire dans tous les organes étudiés à l'exception de cœur. Ces résultats sont comparables avec l'étude de Chialif.Z., 2014 qui montre une augmentation de la concentration de MDA tissulaire chez des ratte exposées au métribuzine. La métribuzine est capable d'induire un stress oxydatif intracellulaire

(Medjdoub et al., 2011). En outre, le stress oxydant au niveau cellulaire (des structures membranaires riches en phospholipides contenant des acides gras insaturés) traduit par une augmentation de la malondialdéhyde (MDA), produit de la peroxydation lipidiques des membranes (Pelletier et al., 2004), qui sont susceptibles d'être altérées par les formes radicalaires. En présence de radicaux libres et d'oxygène, les acides gras insaturés subissent une dégradation oxydative (Lauwerys et al., 2007).

Cependant, une diminution de concentration rénale et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) et une diminution l'activité de glutathion-S-transférase (GST) au niveau du foie, reins et de cœur chez les rattes exposées au métribuzine. Le glutathion réduit (GSH) est le principal agent antioxydant non enzymatique intracellulaire (Jacob., 2007). Le GST est l'enzyme qui catalyse la conjugaison du glutathion (GSH), celui-ci possède la capacité de désintoxication où semble leur rôle dans la protection cellulaire du stress oxydatif (Schwab., 2011). Dans une étude, la diminution du taux de GSH rénal chez les rates allaitantes traités par du cobalt et leur progéniture peut-être la conséquence de son utilisation accrue par les cellules pour piéger les radicaux (Aouacheri., 2009).

Nos résultats montrent que le traitement avec le FcTris et avec Cisplatine pourrait empêcher l'altération induite par le pesticide, et jouent ainsi un rôle important dans la prévention des maladies résultant de la peroxydation lipidique. Cela peut être dû à l'effet antioxydants de ces molécules. Les enzymes antioxydants limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus et jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs de radicaux libres (Ghosh et al., 2012). D'autre part, une restauration des activités des enzymes antioxydants chez les rattes intoxiquées par le pesticide après l'administration du FcTris et Cisplatine q été observé ce qui suggère l'effet protecteur de ces molécules contre les dommages oxydatifs induits par le métribuzine. En revanche, l'augmentation de l'activité de ces enzymes antioxydants peut servir de mécanisme de compensation supplémentaire pour maintenir l'intégrité de la cellule et la protection contre les dommages des radicaux libres (Hussain, R.A et al., 2013).

Conclusion

générale

Conclusion générale

Les résultats obtenus par l'étude *in silico* et *in vitro* montre qu'il y a une interaction spontanée entre le dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes et l'ADN qui se lie par intercalation ou par liaison électrostatique traduite par l'ordre de grandeur de la constante de liaison K et l'énergie libre de liaison ΔG .

L'étude *in silico* a montré que le FcTris a formé cinq liaisons hydrogène avec les différentes nucléotides de l'ADN. Ce résultat indique que le dérivé étudié est un médicament candidat pour lutter contre le cancer.

Les études d'interaction avec l'ADN révèlent que le FcTris peut provoquer des changements conformationnels de l'ADN se qui peuvent ralentir le processus de la réplication cellulaire et finalement la mort cellulaire.

L'étude *in vivo* a montré que le traitement par le FcTris améliore le poids relatif de foie et ne présente aucun effet secondaire toxique sur cet organe. Cependant, le traitement par le FcTris induit une importante restauration de certains paramètres hématologiques et biochimiques ce qui justifie l'effet protecteur de ce dérivé ferrocénique contre la dysrégulation physiologique de plusieurs systèmes biologiques.

En effet, le traitement par le FcTris diminue l'état de stress oxydant induit par l'exposition au métribuzine par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes en diminuant la peroxydation lipidique au niveau hépatique, rénale et pulmonaire et en améliorant la mobilité de la défense antioxydant au niveau hépatique, rénale et cardiaque.

Enfin, les analyses histopathologiques viennent confirmer nos résultats, c'est bien que l'analyse tissulaire réalisée au niveau des foies des rattes traités et non traités par le FcTris a permis de montrer que le dérivé ferrocénique possède une activité anticancéreuse et provoque une protection contre la nécrose tumorale en empêche la progression tumorale.

Perspective

- D'après les résultats obtenus nous pouvons dire qu'en perspective, nous devons faire une étude de la toxicité de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhanes et l'identification de dose létale DL50.
- Des analyses des autres marqueurs tumoraux normalement confirment l'effet antimutagène de cette dérivée ferrocénique
- Ainsi trouvés des autres moyens pour les rats cancéreux afin de bien précisé le type de tumeur.
- Une étude *ex vivo* sur une culture des cellules tumorales vient compléter nos résultats

Références bibliographique

Références bibliographiques

1. **Abadjian, G. (2004).** diagnostic morphologique d'une tumeur des tissus mous. EPU tumeur des tissus mous, cours d'université ST, Joseph, 30p.
2. **Abston, P.A., Yarbrough, J.D. (1976).** The in vivo effects of Mirex on soluble hepatic enzymes in the rat. *Pesti. Biochem. Physiol.*, 6: 192-199.
3. **Adaika A. (2016).** Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN., UniiversitéEchahidHamma Lakhdar -El OUED., Algérie, 90p.
4. **Afzal S. (2010).** Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electroactive Compounds., Quaid-i-Azam University Islamabad., these du doctorat., p 60-61.
5. **Altaf, A.A., Lal, B., Khan,NBadshah, A., Ullah, Sh., Akbar, K .(2016).** Spectroscopic, Electrochemical, and In Silico Characterization of ComplexFormedbetween 2-Ferrocenylbenzoic Acid and DNA, Journal of Chemistry, Vol 2016 (2016), Article ID 7468951, 8 p.doi.org/10.1155/2016/7468951
6. **Amzazi, S. (2006).** Les Acides Nucléiques., Elément : Biochimie structurale semestre3, Université Mohammed V-Agdal, p10.
7. **Aouacheri, W., Aouacheri, S., Saka, R.D. (2009).** The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system, *Ann. Toxicol. Anal.* 21, 125–129
8. **Aslanoglu, M. (2006).** Electrochemical and SpectroscopicStudies of the Interaction of Proflavinewith DNA. *Anal. Sciences*, 22, 439.
9. **Aslanoglu, M., Oge, N. (2005).** Voltammetric, UV Absorption and ViscometricStudies of the Interaction of Norepinephrinewith DNA, *Turk. J. Chem.* 29, 477-485.
10. **Audigie Cl., Dupont.G., Zonszain F. (1992).** Principes des méthodes d'analyse biochimique Tome 2. Doin éditeurs-Paris. 173p.
11. **Baffert. C., Dementin. S., Fourmond. V., Léger. Ch. (2014).** L'électrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques. Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, CNRS et Aix Marseille Université. Marseille. http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06_christophe.leger@imm.cnrs.fr

12. **Baguley, B.C. (1991).** DNA intercalating anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Design* 6, 1-35.
13. **Baudouin, A. (2012).** La spectroscopie., l'université Lyon1 .,rapport de Formation pour professeurs du 2nd degré, CEPEC, Craponne.
14. **Bechki, M Kh., (2012).** Etude du comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanol et nitrophenyleferrocenes, Mémoire Du Magister UniversiteKasdiMerbah – Ouargla, Algérie, p83 .
15. **Benzidane CH. (2012).**Effettoxique des résidus des pesticides utilisés sur la flore de la région de Sétif, Université Du Farhat Abbas Sétif, mémoirede Magister, 87p.
16. **Biemont, É. (2008).** **Spectroscopie moléculaire:** Structures moléculaires et analyse spectrale, EditionDe Boeck Supérieur, Pais, 428p.
17. **Boucherit, H., Chikhi, A., Bensegueni, A., Merzoug1, Hioual, K. S. Mokrani El H. (2013).** l'amarrage moleculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le developpement de la tuberculose, *rev. microbiol. ind. san et environn.* vol 7, n°2, p : 133-149.
18. **Boutiti, A. (2010).** étude phytochimique de l'espèce *globulariaaalpuml.*, grade de magister., Université Mentouri Constantine., p41.
19. **Brett, C.M.A., Brett. A.M.O. (1993).**Electrochemistry : Principles, Methods and Applications, Oxford Science University Publications, Oxford.
20. **Burgot, G., Burgot, J-L. (2011).** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications (3e ed.), Lavoisier 75008 Paris, 369p.
21. **Can, Ozluer., Hayriye, Eda., Satana, Kara. (2014).** Approche Electrochemical 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, Elseiver* 138 (2014) 36–42.
22. **Chattopadhyay, S., Sampa, P.G., Ghosh D., Debnath, J. (2003).** Effect of dietary coadministration of sodiumselenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterinedisorders in mature albino rats. *Toxicological Science* 75: 412–422.
23. **Chennouf, F. (2011).** thèse de magister, L'influence de la chaleur sur l'ADN, universitementouriconstantine,faculte des sciences exactes,departement de physique, 103p.

24. **Chiali, F.Z. (2014).** Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat Wistar, université aboubekr belkaid tlemcen.
25. **Come, J. (2012).** Caractérisation électrochimique de matériaux à insertion de Li pour supercondensateurs hybrides à haute densité d'énergie. Thèse de Doctorat De L'université De Toulouse. 185p.
26. **Cooper, G-M. (1999).** La cellule: Une approche moléculaire, 1^{re} édition américaine De Boeck Université, 706p.
27. **Cyril, K. (2010).** Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électroactifs basés sur le couple ferrocène/ferrocenium. Thèse pour l'obtention du titre de docteur ès Science. Université de Neuchâtel. France
28. **Degallaix, S., Ilschner, B. (2007).** Caractérisation expérimentale des matériaux: Propriétés physiques, thermiques et mécaniques, Volume 1, PPUR presses polytechniques Amazon France, 402p.
29. **Derbal, S. (2014).** Electrodeposition et caractérisation de couches minces métalliques ternaires CuZnSn. Mémoire de Magister. 80p.
30. **Descroix, V., Fortin, T., Fricain, J.C. (2014).** Analyses biologiques d'intérêt en odontologie: Prescrire et interpréter pour les pathologies générales et lésions de la muqueuse buccale. Ed. Editions CdP, Paris. 104p.
31. **Djeffal, A. (2014).** Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C., Université Badji Mokhtar-Annaba., thèse du doctorat, 148 p.
32. **Drake AJ, Van Den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, Sharpe RM. (2009).** Glucocorticoids amplify dibutylphthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology*, 150 : 5055-5064
33. **Drew, H.R., Wing, R.M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura. (1981).** structure of a b-dodecamer. conformation and dynamics, DOI: [10.2210/pdb1bna/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1bna/pdb)
34. **Dubard, J., Voyer, J., Hameury J., Buteau, F. (2015).** qualification métrologique de spectrophotomètre : un guide pour les industriels, revue *française de métrologie* no 41, Volume 2016 -1, p10. DOI: 10.1051/rfm/2016001
35. **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.

36. **Fini JB, Le Mevel S, Turque N, Palmier K, Zalko D.(2007).** An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol*, 41 : 5908-5914.
37. **Fortune, A. (2006).** Techniques de Modelisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance, thèse de doctorat, Université Joseph-Fourier, 166p.
38. **Friedli, C. (2002).** Chimie générale pour ingénieur, PPUR presses polytechniques, 747p.
39. **Garoui, J.S., Bhatti, I.P.S., Garoui, K. (2011).** Améliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes, *Mol.Cell.Biochem.* 353 (2011) 139–149.
40. **Garrett, M. M., David, S.G, Robert, S. H., Ruth, H., William, E. H., Richard, K. B., Arthur, J. O. (1998).** Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 19, No. 14, 1639-1662
41. **Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011).** “Organometallic anticancer compounds,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 3–25.
42. **Gassier, J., Morel-Haziza, C. (2003).** Biologie-Microbiologie-Nutrition-Alimentation BEP Carrières sanitaires et sociales/CAP Petite enfance, Elsevier Masson, 310p.
43. **Gérard, A. (2012).** Histologie en Pratique, Faculté de Médecine .p :14.
44. **Görmen, M. (2010).** Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocénophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate, Cancer. Chimie ParisTech, 2010. Français, 244p.
45. **Gratien, E. (2008).** Spectroscopie ultraviolet-visible et infrarouge des molécules clés atmosphériques., Thèse du doctorat., université du Paris 12_Val de Marne, 27p.
46. **Hamaï, A., Muret, J., Cavalcanti, A., Bonvalot, S., Chouaïb, S. (2009).** Le facteur de nécrose tumorale : de la biologie à la thérapie oncologique, *Hématologie* ; vol 15 (4) : pp291-304.
47. **Hanzab, N., Houas, M. (2013).** Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocényl-2- nitrobenzène mono et bis-substitué., mémoire du master académique, Université Kasdi Marbah Ouargla., Algérie, 24p.

48. **Howdeshell KL, Rider CV, Wilson VS, Gray LE JR. (2008).** Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res*, 108 : 168-76
49. **Hurley, L. H., Boyd, F. L. (1988).** DNA as target for drug action. *Trends Pharmacol. Sei.* 9, 402-407.
50. **Hussain, R.A., Badshash, A., Sohail, M., Lal, B., Altaf, A.A. (2013).** Synthesis, chemical characterization, DNA interaction and antioxidant studies of ortho, meta and para fluorosubstituted ferrocene incorporated selenoureas, *Inorganica Chimica Acta* S0020-1693(13)00184-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2013.04.003>
51. **Infelta, P et Graetzel, M. (2006).** Thermodynamique : principes et applications, Universal-Publishers, 488p.
52. **Jacob, L. (2007).** L'insuffisance rénale aiguë. Ed. Springer Science & Business Media, France. 344p.
53. **Jacotot, B., Campillo, B. (2003).** Nutrition humaine. Ed. Elsevier Masson, Paris. 311p.
54. **Jacqueline L.Ch. (2000).** UE2 Cancérologie ; Le cancer par le gène.
55. **Jegham, H.(2009).** étude de l'activité biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux., université laval québec, p16-17.
56. **Jha, D. K. (2009).** Physical Chemistry: Statistical Mathematics, Discovery Publishing House. 276p.
57. **Kadota, T., Okuna, Kohdo, H., Mtyamoto, J. (1976).** Mammalian toxicological study of permethin, 3 phenoxy benzyl ($\pm$) atrans -2, 2- dimethyl-3-(2, 2 dichlorovinyl) - cyclopropane -1- carboxylate. *Botyukgoku*, 41: 143-151.
58. **Karaa, A., Labayle, D., (2008).** Pathologies digestives et soins infirmiers. Ed: 5. Wolters Kluwer France, Paris. 223p.
59. **Kathryn, R. (1974).** Nutritional factors and susceptibility to lead toxicity. *Environmental health perspectives. Environ Health Perspect*, 7: 107-112. En ligne: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475135/pdf/envhper00497-0105.pdf>.
60. **Khelef, A. (2014).** Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N-phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N' phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines, Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider – Biskra .Algerie, 156p.

61. **Kotz, J., Treichel, P., Townsend, J. (2008).** Chemistry and Chemical Reactivity, seventh edition, vol 2, 800p.
62. **Ksheerasagar, R.L., Hiremath, M.B., Kaliwal B.B. (2011).** Impairment of hepatic biochemical contents and enzymes activities during carbosulfan intoxication in albino mice, *Int. Multidisc. Res. J.* 3 (2011) 6–15.
63. **Kumar, J.A.R., Rajini, P.S. (2009).** Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis, *Toxicology* 257 (2009) 40–45
64. **Lacave, R., Larsen, Ch-J., Robert, J. (2005).** Cancérologie fondamentale, John Libbey Eurotext, Paris, 437p.
65. **Lacroix, R., Sabatier, F., Digna, T., George, F., Sampol, J. (2009).** La leucémie myéloïde chronique, 14 p.
66. **Lanez, E. (2016).** Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN., diplôme de Master., Université Mohamed Khider – Biskra, 98p.
67. **Lauwerys, R.R., Lauwerys, R. (2007).** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Ed: 5. Elsevier Masson, Stuttgart. 1252p.
68. **Legler, J., Zeinstra, LM., Schuitemaker, F., Lanser, PH., Bogerd, J. (2002).** Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol*, 36 : 4410-4415
69. **Lewin, B. (1998).** Gènes VI, 6^e édition De Boeck Université, 1288p.
70. **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.
71. **Lodish, H., Darnell, J., Baltimore, D. (1989).** « La cellule, biologie moléculaire » 3^{ème} édition, Paris,
72. **Louacheni, F. (2013).** Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul, mémoire de master, 63p.
73. **Madan, R L. (2010).** Chemistry for degree students, S. Chand, 920p.

74. **Mahmoudi, N., Nems, A. (2009).** Etude du comportement anodique de Nphényl- N-benzoylferrocénylméthylamine., Mémoire De Licence Académique Centre Universitaire D'el-Oued, Algérie, p48.
75. **Malaguarnera, G., Giordano, M., Paladina, I Rando, A., Uccello, M., Basile, F., ... Alessandria, I et Mazzarino C. (2011).** Markers of bile ducttumors, *World J GastrointestOncol*, 3(4): 49-59. doi:10.4251/wjgo.v3.i4.49
76. **Marinero, C. (2014).** synthese, caracterisation et evaluation des effetsbiologiques des hybrides "FcTAM-SAHA" et composes derives, these de doctorat, ÉcoleNationaleSupérieure de Chimie de Paris, 236p.
77. **Mathey, F., Sevin, A. (2000).** Chimie moléculaire des éléments de transition: un dialogue entre théorie et expérience Editions Ecole Polytechnique, 305p.
78. **Medjdoub, A., Merzouk, S.A., Merzouk, H., Chiali, F.Z., Narce M. (2011).** Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (101): 27-33.
79. **Merzouk, H., Chiali, F.Z., Merzouk, S.A., Medjdoub, A., Narce, M. (2013).** Chronic low level Metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (106): 38-44.
80. **Mesplede, J., Randon, J. (2004).** 100 manipulations de chimie générale et analytique Editions Bréal p249.
81. **Miguel, M.G. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287. doi:10.3390/molecules15129252
82. **Molina, Á., González, J. (2015).** Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis: Theory and Applications, Springer, 671p.
83. **Muhammad Khawar R, Ummara Sh., Faiza A., Amin B., Akhtar N., Sikander A., ... Masoom Y. (2015).**Antileishmanial, DNA Interaction, and DockingStudies of SomeFerrocene-BasedHeteroleptic Pentavalent Antimonials.*Chem. Med.* 349, 50–62. DOI: 10.1002/ardp.201500312

84. **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, p217.
85. **Neghmouche, Ns., Khelef, A., Lanez T. (2010).** Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques, vol 1, 76p.
86. **Olivier. M.-G. (2009).** ELECTROCHIMIE ET APPLICATIONS. EDITION 2009. p11.
87. **Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (2004).** Écotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement. Ed. PUQ, Canada. 502p.
88. **Pincus, MR., Bluth, MH., Pherson, RA. (2011).** Diagnosis and management of cancer using serologic tumor markers. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; chap 73.
89. **Pourramzanidesaraei, M., Mohammadlikhani, M., Saheli, M., Farokhrouz, M., Zamani, A., Abbasian F. (2013).** Determination of the Acute Toxicity of Pretilachlor on Liver and Gill Issues as well as Glucose and Cortisol Levels in Fingerling Grass Carps (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. (8): 721-726.
90. **Quest, J.A., Copley, M.P., Hamernik, K.L., Rinde, E., Fisher, B., Engler, R., Burnam, W.L. and Fenner-Crisp, P.A. (1990).** Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. *Reg. Toxicol.* 12: 117-126.
91. **Raufa, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A. Khalid, A.M. (2005).** Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 205–217.
92. **Ricco, A.J. (1997).** Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods : Proceedings of the Symposium on Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods, The Electrochemical Society, 1100p.
93. **Robertis, E. D. P., Robertis, E. M. F. (1983).** Biologie cellulaire et moléculaire,, Presses Université Laval, Paris, p758.
94. **Rossant-Lumbroso, J., Rossant, L. (2016).** Cancer primitif du foie, Encyclopédie médicale.

95. **Salem, M.M. (2011).** Toxic effects of mancozeb containing formulations and neemixpesticides on kidney function and ultrastructure of albino rats, *Egypt. Acad. J.Biol. Sci.* 3 (2011) 17–30
96. **Saoudi, M., Messarah, M., Boumendjel, A., Jamoussi, K., ElFeki, A. (2011).** Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1765–1769
97. **Schwab, M. (2011).** Encyclopedia of Cancer .Ed: 3. Springer Science & Business Media, New York. 3934p.
98. **Shah, A. (2010).** Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electro active Compounds Quaid-i-Azam University, Islamabad.
99. **Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Nag, T.C., Dogra, T.D. (2005).** Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure, *Toxicology*, 215 (2005) 173–181.
100. **Sinhaseni, P., Foongvidya, S., Tayaputch, N. (1995).** Exposure evaluation is a crucial step for quantitative risk assessment of methomyl. *Arhiv za Higijenu Radai Toksikologiju*, 46: 301–306.
101. **Sirajuddin, M., Saqib, Ali., Amin, Badshah. (2013).** Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence, spectroscopies and cyclic voltammetry, Elsevier, *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology science direct*, 124(1-19).
102. **Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2003).** Principles d'analyse instrumentale, De Boeck Supérieur, 956p.
103. **Sousa, S F., Fernandes, P A., Ramos, M J. (2006).** Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 65:15–26.
104. **Sudhir, V. S., Radhakrishna, B., Mohan, R., Vivian, A. F. (2007).** Oxidants in Chronic Kidney Disease. *Am Soc Nephrol*. Vol. (18): 16-28.
105. **Swynghedauw, B., Silvestre, J-S. (2008).** Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires, 3^{ème} édition, Paris : DUNOD, p21-22.
106. **Teniou, S. (2011).** Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses, Université Mentouri Constantine., diplôme de magistère, Algérie .p11-13.
107. **Terki, B. (2007).** Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl-N'alkylferrocenyl méthyle hydrazide, 144p.

108. **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.
109. **Vandenberg, LN., Maffini, MV., Wadia, PR., Sonnenschein, C., Rubin, BS., Soto, AM. (2007).** Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology*, 148 : 116-127
110. **Zerari, A. (2013).** synthèse, séparation et identification de m nitrophenylferrocene mono et bis-substitué., Mémoire Du Master Académique Université Kasdi Marbah Ouargla, Algérie, 22p.

Annexes

Annexes 01

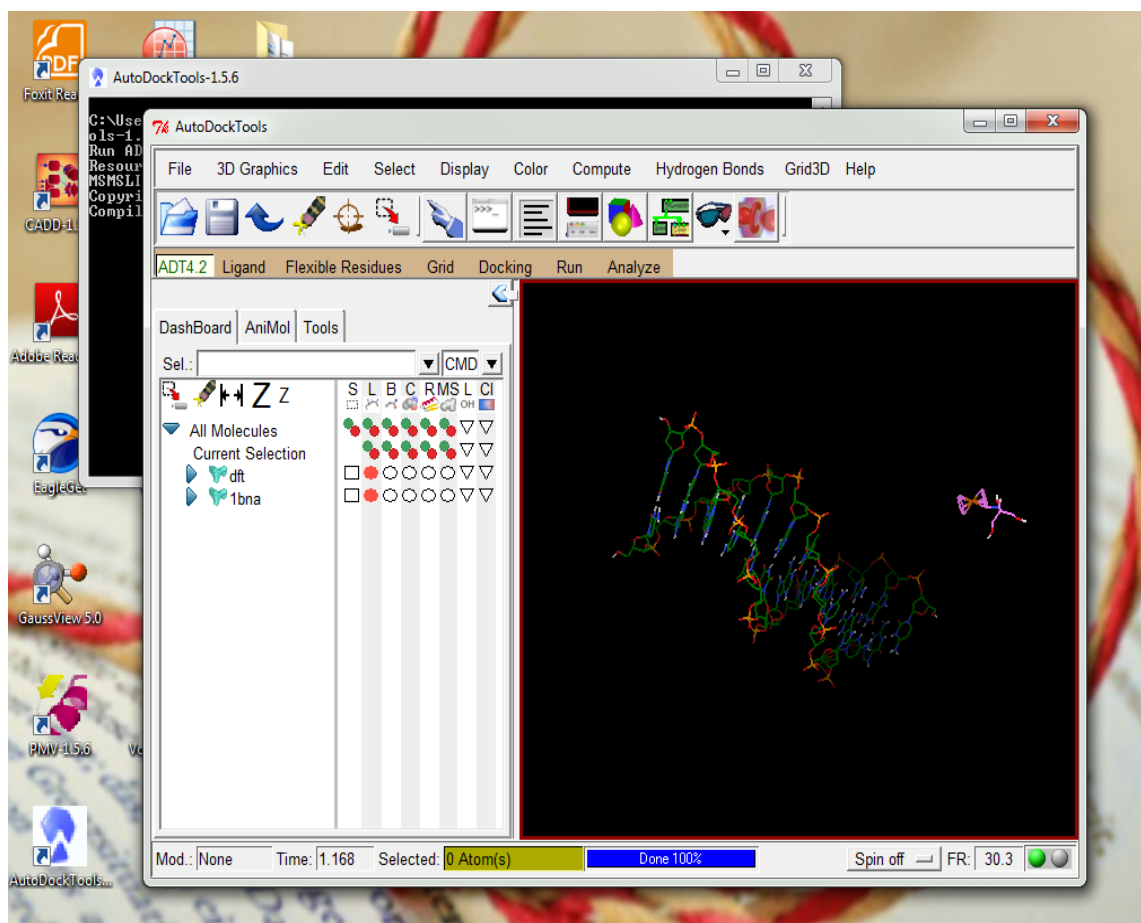


Figure 01 : Logiciel AutodockTools.

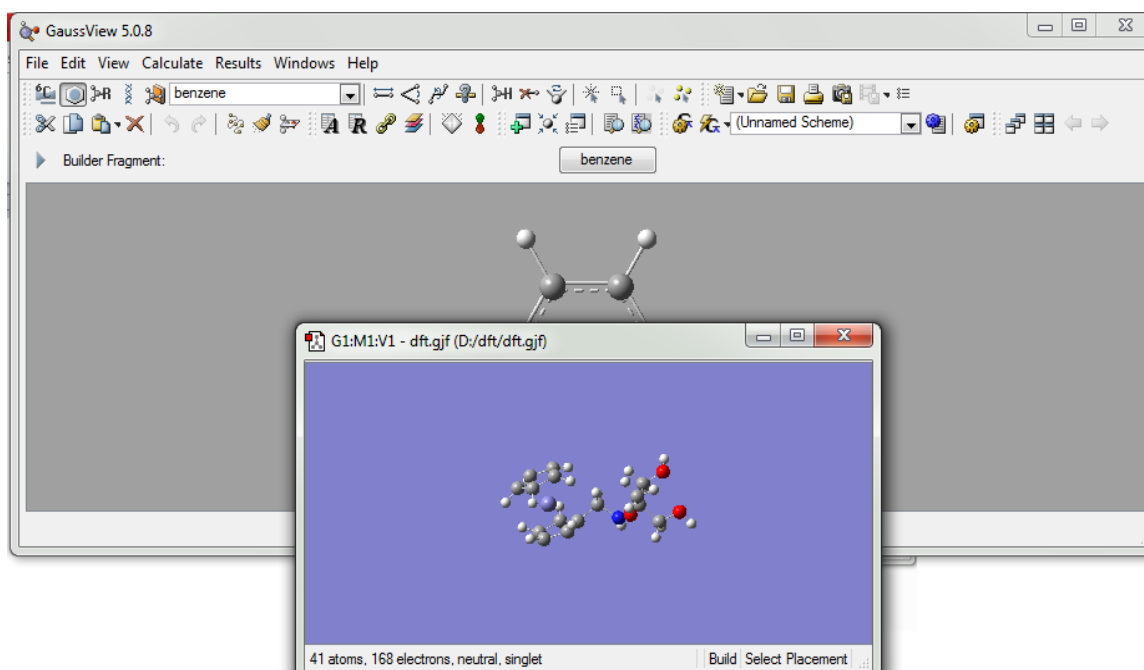


Figure 02 : Logiciel Gaussian 09.

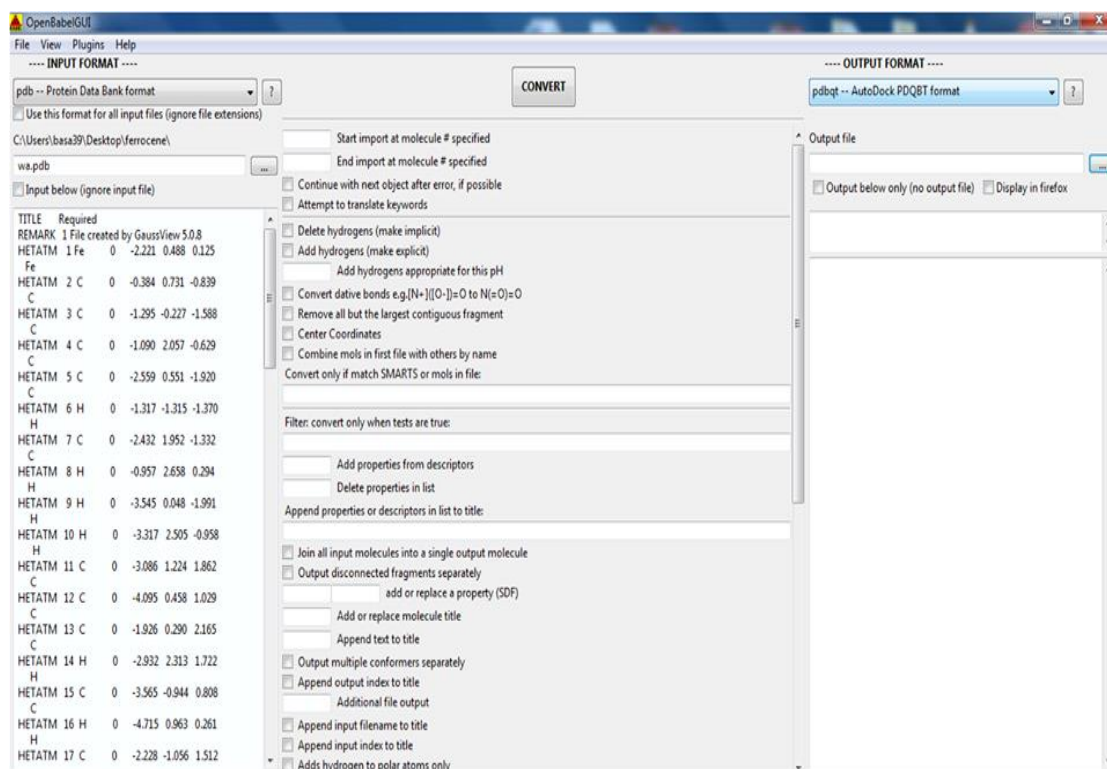


Figure 03 : Logiciel OpenBabel 2.3.0.

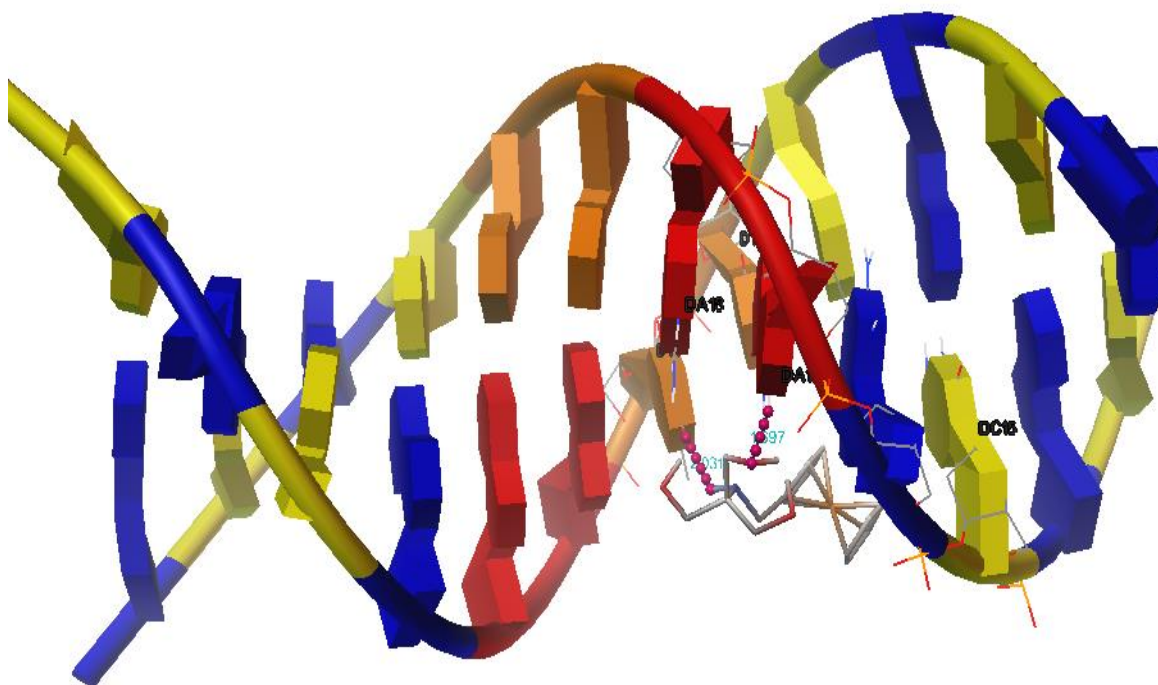


Figure 04 : Formation deux liaisons hydrogènes avec $\Delta G = -17,32 \text{ KJ.mol}^{-1}$ dans la conformation 2 de l'amarrage moléculaire de FcTris et l'ADN.

Annexe 02



Figure 05 : Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (Photo originale, 2017).



Figure 06 : Vortex (Photo originale, 2017).



Figure 07 : Agitateur thermo-programmable (Photo originale, 2017).

Annexe 03



Figure 08 : Cages de rattes (Photo originale, 2017).



Figure 09 : Pesticide de métribuzine (Photo originale, 2017).



Figure 10 : Dérivé ferrocénique (FcTris) solubilisé dans l'eau physiologie et médicament de Cisplatine **(Photo originale, 2017).**



Figure 12 : Injection intrapéritonéal **(Photo originale, 2017).**



Figure 13 : Sacrifice, prélèvement du sang **(Photo originale, 2017).**



Figure 14 : Dissection et prélèvement des organes (Photo originale, 2017).



Figure 15 : Analyseur cobas e411 (Photo originale, 2017).



Figure 16 : Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800 (Photo originale, 2017).



Figure 17 : Bain-marie de type MEMMERT (Photo originale, 2017).

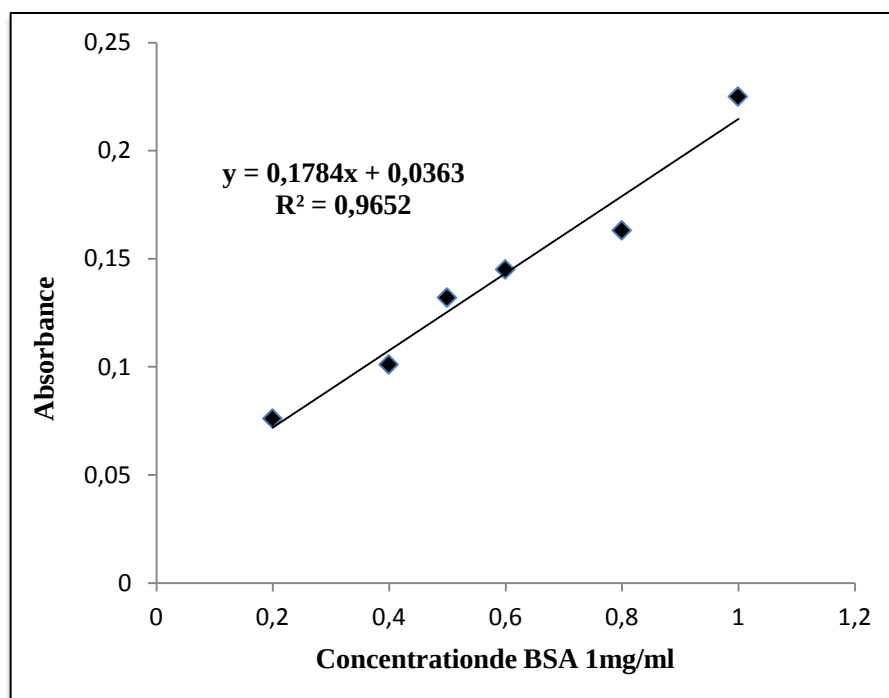


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de dosage protéique.