



N° série:.....

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

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

**Évaluation in vitro et in silico, analyse ADMET et amarrage
moléculaire de l'activité anticancéreuse des dérivés N-
ferrocénylméthylméthylaniline**

Présentés Par :

- ✓ Boudershem Hadda
- ✓ Ismailia Rihab
- ✓ Makhoulouf Khaoula
- ✓ Oubbiche Marwa

Devant le jury composé de :

- | | |
|---|----------------------------------|
| ➤ Président B o u t e l i s e s a f i a | M.A.A, Université d'El Oued. |
| ➤ Examineur : mokhtari Majda | M.A.A, Université d'El Oued |
| ➤ Promoteur : Lanez Elhafnaoui | Professeur, Université d'El Oued |

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

*Nos respectueux remerciements et très vivement à notre encadreur Mr **LANEZ El hafnaoui** pour avoir acceptée d'encadrer ce travail et pour ses conseils et ses précieuses orientations, ses encouragements, sa patience qu'elle n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail merci Beaucoup.*

*Un grand merci aux le Professeur **Lanez Touhami** directeur de laboratoire de recherche **VIRES** à l'université d'El oued, pour l'ensemble des moyens et les différentes techniques et pour accepter travailler dans son laboratoire.*

*Nos remerciements vont aussi Melle **Adaiqa Aicha** pour son aide pratique et son soutien moral.*

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

Nous tenons aujourd'hui à remercier tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



إهداء

الحمد لله، والصلاة والسلام على أشرف المرسلين صلوات الله عليه وعلى آله وصحبه
ومن تبعهم بإحسان إلى يوم الدين أما بعد:

أهدي ثمرة جهدي المتواضع إلى من أوصانا فلما المولى عز وجل في كتابه: ﴿مربي أرحمهما كما
مرياني صغيراً﴾

إلى العزيزين المحترمين: إلى الغالي الذي تعب وسهر من أجل راحتي، إلى الذي كبرني ورعاني
إلى من أوصلي إلى هده اللحظة، إلى أبي حبيبي العايش بؤسهم حفظك الله وراعك وأطال
الله في عمرك

إلى شمس حياتي نور قلبي 'ضوء' عنمتي إلى نبع الحنان أمي حبيبتي عائشة بؤسهم الله يعطيك الصحة
والسعادة والعمل المديد....

إلى سندي بالحياة أخواني حفظكم الله لي: عثمان، رضا، محمد، المولدي

إلى المؤسسات إلى أعلى ما منحني الدنيا وأتقاسم معهم أفراحي وأحزاني أخواتي العزيزات: لوليزة
، آسيا، فريمان وإلى زوجات أخواني شكراً على دعمكم

إلى اسنادي المشرف العائز الحفاوي لك مني جزيل الشكر وإلى كل عائلتي الكريمة وكل من

حياة

أحبهم



إهداء

تعبيراً عن امتناني ، أهدي هذا العمل المتواضع لأولئك الذين مهما كانت الكلمات والقبولات ، لن أتمكن أبداً من التعبير عن حيي الصادق لهم .

للرجل عرضي الثمين من الله الذي أدين له بخيأتي وبنجاحي وكل احترامي : والدي
الراحل محمد الصغير .

❖ إلى المرأة التي عانت دون السماح لي بالمعاذاة ، والتي لم تقبل "لا" لمطالبي ولم تدخل جهداً في إسعادي مهما فعلت أو قلت ، لا أستطيع أن أشكر ك كما
تجيب والدتي المحبوبة، فينحة .

إلى أخواتي العزيزات حدة ، عواطف ، سهيلته ، هاجس وأبناء وهم الجميلين :
مرزان ، رؤيا ، عبد المؤمن ، لجين ، جواد ، أحمد سامي والأميرة الصغيرة براءة
، اللواتي لم تتوقفن أبداً عن نصحي وتشجيعي ودعوتي طوال دراستي .
حفظهم الله ومنحهم النوفيق والسعادة .



- ❖ إلى توأمي وصديقتي منذ ولادتي صفاء ، أتمنى لك النوفيق في ما تبقى لك من مشوارك الدراسي وطول السعادة في حياتك .
- ❖ إلى أخي العزيز محمد السعيد أبي الثاني ، سندي الدائم ، كل كلمات الشكر لا تسطيع أن تفيك حقك ، أشكرك على كل شيء .
- ❖ إخواني : مسعود وعلي وأولادهما : آدم وإسلام ومحمد الصغير مصدر الفرح والسعادة .
- ❖ لابنته خالي ، صديقتي ، الأخت التي لم تنجها والدتي ، مصدر الأمل . أسماء شكر الوجودك .
- ❖ إلى كل عائلتي وأصدقائي وخاصة عنيقة ومروة وخلود وعزيزتي بسمته .
- ❖ دون أن ننسى جميع المعلمين سواء أكانوا ابندا ئيا أو منوطا أو ثانويا أو عاليا .

مروة





إهداء

الحمد لله حمدك جدا يلبق بخلال وجهك وعظير سلطانك أن يسرت لي القيام بهذا العمل والصلاة والسلام على الحبيب المصطفى وأهله ومن وفى أما بعد الحمد لله الذي وفقنا لشمين هذه الخطوة في مسيرتنا الدراسية، بمدكرتنا هذه ثمرة الجهد والنجاح مهداة :

إلى من وضع المولى سبحانه وتعالى الجنة تحت قدميها وقرها في كتابه العزيز وعلمني الصمود مهما كانت الظروف أمي

الحبيبة..... * فريدة حملاي * أطال الله في عمرها

إلى صاحب السيرة العطرة والنفس المستشير فلقد كان له الفضل الأول في بلوغي هذا المستوى والذي الحبيب... * إسماعيلية لحسن * أطال الله في عمره

إلى إخوتي وأخواتي أحبي : مرزوي... طه... أشواق... إيناس... منتهى ولجين حفظهم الله ومرعاهم

إلى أصدقائي ومعلمي في الدين أحبهم واحترهم ولكل العائلة الكريمة التي ساندتني وإلى كل قس في كلية علوم الطبيعة والحياة خاصة من جعني معهم المشوار الدراسي من بدايته إلى نهايته وأساذنة تخصص البيوكيمياء وإلى كل من كان له أثر في حياتي ويذكرهم القلب

مرحبا





إهداء

بادئ ذي بدء، أود أن أشكر الله وأحمده لنوفيقه لإنجاز هذا العمل المتواضع

إلى من كانا عوناً لي في طفولتي وسنداً لي على من الأيام والسدي الكثر بين مخلوف الاخض، مخلوف مبروكت،

إلى من أقتاسهم معهم بكاء الحياة وضحكها أخواتي العزيزات وأخي الغالي عبد الله، نزيهة، صباح، وفاء، مرشيدة،

خديجة، أسهمان، عاليتة

إلى من كان صاحب الفضل علينا، ولم يدخل بدعمه وتوجيهاته في مرحلة نختنا هذه أسناذي المشرف العائز الحناوي

والى كل عائلتي، وأصدقائي منذ الطفولة ومن المدرسة والجامعة

إلى كل الذي يحبونني والذي أحبه

خولتة



Résumé

Résumé

L'approche thérapeutique du cancer repose sur trois axes, constitués de la chirurgie, de la radio-oncologie et de la chimiothérapie. Dans ce dernier domaine, l'interaction entre les médicaments anticancéreux et l'ADN, ainsi que les applications des techniques expérimentales a un potentiel d'intérêt pharmaceutique. L'ADN est la cible principale de certains agents cytotoxiques anticancéreux depuis plusieurs années.

Cependant, l'étude de l'interaction entre un anti-cancéreux et l'ADN ou le BSA est devenu un domaine de recherche très active à l'interface de la chimie, la biologie moléculaire et la médecine. En effet, cette interaction présente un rôle vital dans la détermination du mécanisme d'action et la conception de l'efficacité et la spécificité de ce médicament. L'objectif de cette étude est de déterminer le type d'interaction entre un médicament anti-tumeur le plus utilisé en chimiothérapie le dérivé N- ferrocénylméthylaniline et avec de l'ADN double brin et le sérum albumine de bovin (BSA), cette interaction a été étudiée par la technique spectroscopique UV-Visible et confirmé par le voltamètre cyclique. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une interaction spontanée entre ce médicament avec l'ADN ainsi que le BSA. En effet, N- ferrocénylméthylaniline se lie par intercalation ou par liaisons hydrogènes, traduite par les paramètres d'interaction, la constante de liaison K, l'énergie libre ΔG . Les coefficients de diffusion des formes libres et celles liées avec l'ADN ont été déduits à partir de l'équation de Randles-Sevcik. Ces résultats montrent une corrélation raisonnable entre ces paramètres expérimentaux. Les tailles des sites et la liaison de médicament avec l'ADN et avec le BSA ont été déterminées à partir de l'amarrage moléculaire, leurs ordres de grandeur confirment les types d'interaction mentionnés ci-dessus.

Mots clés : ADN, BSA, N- ferrocénylméthylaniline, Anti-cancer, chimiothérapie, Voltamètre cyclique, Spectroscopie UV-Visible, paramètres d'interaction K et ΔG , coefficient D

ملخص

يعتمد النهج العلاجي للسرطان على ثلاثة محاور، تتكون من الجراحة وعلاج الأورام بالإشعاع والعلاج الكيميائي. في المجال الأخير، قد يكون للتفاعل بين الأدوية المضادة للسرطان والحمض النووي، وكذلك تطبيقات التقنيات التجريبية، أهمية صيدلانية.

كان الحمض النووي هو الهدف الأساسي لبعض العوامل السامة للخلايا المضادة للسرطان لسنوات عديدة. ومع ذلك، أصبحت دراسة التفاعل بين عقار مضاد للسرطان و DNA و BSA مجالاً نشطاً للغاية للبحث في واجهة الكيمياء والبيولوجيا الجزيئية والطب.

في الواقع، يقدم هذا التفاعل دوراً حيوياً في تحديد آلية العمل وتصميم فعالية وخصوصية هذا الدواء. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد نوع التفاعل بين أكثر الأدوية المضادة للأورام استخداماً في العلاج الكيميائي، مشتق N-ferrocenylmethylaniline ومع الحمض النووي المزدوج الشريطة وألبومين المصل البقري (BSA)، تمت دراسة هذا التفاعل بواسطة الأشعة فوق البنفسجية - تقنية التحليل الطيفي المرئي ويؤكدها الفولتمتر الدوري. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن هناك تفاعلاً تلقائياً بين هذا الدواء مع DNA و BSA. في الواقع، يرتبط N-ferrocenylmethylaniline عن طريق الإقحام أو عن طريق الروابط الهيدروجينية، المترجمة بواسطة معاملات التفاعل، ثابت الربط K، الطاقة الحرة ΔG . تم استنتاج معاملات الانتشار للصيغ الحرة وتلك المرتبطة بالحمض النووي من معادلة راندليس-سيفجيك، وأظهرت هذه النتائج وجود علاقة ارتباط معقولة بين هذه المتغيرات التجريبية. تم تحديد أحجام مواقع ربط الأدوية بالحمض النووي من البيانات الكهروكيميائية، حيث تؤكد أوامرهما من حيث الحجم أنواع التفاعل المذكورة أعلاه.

الكلمات المفتاحية: DNA، BSA، N-ferrocenylmethylaniline، مضاد للسرطان، العلاج الكيميائي، الفولتامتر الدوري، التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية، معاملات تفاعل K و G، معامل D.

Abstract

The therapeutic approach to cancer is based on three axes, consisting of surgery, radiation oncology and chemotherapy. In the latter area, the interaction between anticancer drugs and DNA, as well as the applications of experimental techniques has potential pharmaceutical interest. DNA has been the primary target of certain anticancer cytotoxic agents for many years.

However, the study of the interaction between an anti-cancer drug and DNA and BSA has become a very active field of research at the interface of chemistry, molecular biology and medicine. Indeed, this interaction presents the vital role in determining the mechanism of action and designing the efficacy and specificity of this drug. The objective of this study is to determine the type of interaction between an anti-tumor drug most used in chemotherapy the derivative N-ferrocenylmethylaniline and with double-stranded DNA and bovine serum albumin (BSA), this interaction was studied by the UV-Visible spectroscopic technique and confirmed by the cyclic voltameter. The results obtained show that there is a spontaneous interaction between this drug with DNA and BSA. Indeed, N-ferrocenylmethylaniline binds by intercalation or by hydrogen bonds, translated by the interaction parameters, the binding constant K , the free energy ΔG . The diffusion coefficients of the free forms and those bound with DNA were deduced from the Randles-Sevcik equation. These results show a reasonable correlation between these experimental parameters. The sizes of drug binding sites with DNA were determined from electrochemical data, their orders of magnitude confirming the types of interaction mentioned above.

Keywords: DNA, BSA, N-ferrocenylmethylaniline, Anti-cancer, chemotherapy, Cyclic Voltameter, UV-Vis Spectroscopy, K and ΔG interaction parameters, D coefficient.

Liste des figures

Numéro	Titer	Page
Première Partie Synthèse Bibliographique		
Chapitre 01 : ADN (Acide Désoxyribose Nucléique)		
Figure 01	ADN dans le noyau cellulaire	06
Figure 02	Structure de l'ADN G les protéines	07
Figure03	Schéma général des premières étapes de la cancérisation	14
Chapitre 02 : BSA (Albumine de sérum bovin)		
Figure 01	<i>Albumine de sérum bovin</i>	17
Figure 02	Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les sites de liaison	18
Chapitre 03 : Ferrocène et dérivé Ferrocénique étudié		
Figure 01	Ferrocène sous forme de poudre orange	24
Figure 02	Structure électronique du ferrocène	24
Figure03	Mécanisme (I) : étape rapide où l'électrophile E détruit la liaison métal-carbone dans une réaction de SE2 avec la conservation de configuration.	26
Figure04	Mécanisme (II) : comporte une limitation de vitesse de l'attaque par l'électrophile à partir de l'extérieur dans un déplacement SE2 avec une inversion de la configuration.	26
Figure 05	Principales réactions électrophiles de ferrocène.	28
Figure 06	Structure de ferrocénylméthyltriméthylamonium.	28

Figure 07	Réactivités du sel ferrocénylméthyltriméthylamonium	29
Figure 08	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène	30
Figure 09	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	30
Figure 10	Structure cristalline de ferrocène.	32
Figure 11	N-ferrocénylméthylmethylaniline	35
Chapitre 04 : Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées		
Figure 01	Variation du potentiel en fonction du temps pour un cycle CV.	37
Figure 02	Voltammogramme cyclique pour un système réversible	38
Figure 03	Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible.	42
Figure 04	Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocénylméthylamino)benzotrile dans l'acétonitrile	43
Figure 05	Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques.	44
Figure 06	Structure de β-carotène	45
Figure 07	Schéma du protocole général de docking.	47
Figure 08	Les étapes clés du docking moléculaire.	49
Deuxième partie Etude expérimentale		
Chapitre 01 : Matériels et Méthode		
Figure 01	Structure d'ADN d'un dodécamère	63

Figure 02	Structure de la BSA téléchargé de la PDB (PDB ID : 3V03) Résolution 2.7Å°, Résidue count 1166	63
Figure 03	Procédures de docking avec AutoDock.	65
Chapitre 02 : Résultat et Discussions		
Figure 01	Spectre d'absorption de l'ADN	67
Figure 02	Voltammogrammes cycliques du dérivé ferrocénique étudié (1mM) en présence de différentes concentrations d'ADN et BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 10 ⁻¹ M à pH = 7.2 avec une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.1V/s.	69
Figure 03	Tracés de $\log \frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l'ADN et le BSA.	71
Figure 04	Chemins réactionnels des réactions électrochimiques du dérivé ferrocénique libre et celui lié à l'ADN ou au BSA.	73
Figure 05	Voltammogrammes cycliques de FcCH ₃ (1mM) en absence d'ADN et de BSA (ligne noire) et en présence de 6.67 μM d'ADN et de 10.13 μM de BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone	74
Figure 06	Succession des voltammogrammes cycliques du dérivé ferrocénique étudié (1mM), en absence d'ADN (a) et de BSA (b), et en présence de 6.67 μM d'ADN (a') et 10.13 μM de BSA (b'), enregistré sur une Hélectrode de carbone vitreux dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 10 ⁻¹ M à pH = 7.2.	76
Figure 07	Tracé de la densité du courant anodique i_p^a en fonction de la racine carrée de vitesse de balayage du potentiel V en présence de 6.67 μM d'ADN et 10.13 μM de BSA à pH = 7.2.	77
Figure 08	Spectre électronique des Fc (1mM) en présence de différentes concentrations d'ADN et de BSA dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄) 10 ⁻¹ M à pH = 7.2.	79

Figure 09	Tracés de $\frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A - A_0}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l'ADN et le BSA.	79
Figure 10	Représentation ORTEP de FcCH ₃ . Les ellipsoïdes de déplacement sont dessinés au niveau de probabilité de 30 % et les atomes H sont représentés sous forme de petites sphères de rayons arbitraires. Les codes de couleur sont : le carbone gris, l'hydrogène blanc, l'azote bleu, et le fer vert.	82
Figure 11	Structure tridimensionnelle de l'ADN (PDB ID : 1BNA) (a) et de BSA (b) (PDB ID : 4F5S) téléchargé depuis Protéine Data Bank	83
Figure 12	Poses d'amarrage de FcCH ₃ avec l'ADN (a) et avec le BSA (b) illustrant l'interaction de tous les adduits.	84
Figure 13	Liaisons électrostatiques entre le ligand étudié et les acides aminés et les bases nucléiques. (Les lignes en gris montrent les liaisons hydrophobiques, les lignes bleu indiquent les liaisons hydrogènes)	84

Liste des tableaux

Nombre	Titre	Page
Première Partie Synthèse Bibliographique		
Chapitre 02 : BSA (Albumine de sérum bovin)		
01	<i>Composition en acides aminés de la BSA.</i>	19
02	Composition atomique de la BSA (calculée à partir du Tableau)	20
Chapitre 03 : Ferrocène et dérivé Ferrocénique étudié		
01	Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène	30
Chapitre 04 : Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées		
01	Ordres de grandeurs de quelques chromophores.	45
02	les principaux programmes de docking moléculaire, le nom de leur éditeur et le site Internet.	54
Deuxième partie Etude expérimentale		
Chapitre 01 : Matériels et Méthode		
01	Rapport de la densité optique	60
Chapitre 02 : Résultat et Discussions		
01	Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.	68
02	Paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 02	70

03	Consentes et énergies libres de liaison calculées à partir du tracé $\log \frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$ à pH = 7.2.	72
04	Données électrochimiques de la forme libre de FcCH ₃ et celui de l'adduit FcCH ₃ _ADN et FcCH ₃ _BSA.	74
05	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	75
06	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel et à pH = 7.2.	76
07	Valeurs des coefficients de diffusion de dérivé ferrocénique non lié et celles des adduits à pH = 7.2.	77
08	Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre d'absorption UV-Vis du Figure08	79
09	Consentes et énergies de liaison calculée à partir du tracé $\frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A - A_0}$ à pH = 7.2.	81
10	Constantes de liaisons, les énergies libres de liaisons et les concentrations	83
11	Longueur des liaisons hydrogène formées entre le ligand étudié l'ADN et le BSA.	85
12	Comparaison des consentes (M ⁻¹) et énergies libres de liaison (KJ.mol ⁻¹) déterminées à pH = 7.2 avec celles obtenus par amarrage moléculaire	85

LISTE DES ABREVIATION

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ATP : Acide triphosphate

BSA : Sérum bovin albumine

°C : Degrés Celsius

DO : Densité Optique

EDTA : Acide éthylène Diamine Tétracétique

Fc : Ferrocène

FcTris:ferrocénylmethyltrishydroxymethylaminomethane

HSA : Albumine du sérum humain.

Ipa : courant de pic anodique

Ipc : courant de pic cathodique

K : constant de liaison

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

M : molaire

NaCl : Chlorure de sodium

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

prot : protéine

S : Taille de site de liaison

SDS : Sodium Dodecyl Sulfat

UV : Ultraviolet

Vis : Visible

VTRS : Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes

ΔE_p : Différence de potentiel

ΔG : énergie libre de liaison

μl : microlitre

μM: micromolaire

Remerciement
Dédicaces
Résumé
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations
Sommaire
Première Partie Synthèse Bibliographique

Chapitre 01 : ADN (Acide Désoxyribose Nucléique)

1. Définition.....	6
2. Structure et propriétés de l'ADN	6
3. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique.	8
3.1. La solubilité	8
3.2. L'instabilité chimique de l'ADN	8
3.3. L'absorption de la lumière Ultra-Violette (UV).....	9
3.4. Spectres UV des bases nucléiques	9
4. Rôles biologiques	10
5. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)	10
5.1. Mutations.....	10
5.2. Mutagènes chimiques	10
6. Interaction de l'ADN avec les adduits	11
6.2. Interactions réversibles avec l'ADN	11
7. Définition du cancer	13

7.1. Facteurs activateurs de la cancérogenèse.....	13
7.2. Etapes de la carcinogenèse.....	13
7.3. Traitement du cancer.....	14

Chapitre 02 BSA (Albumine de sérum bovin)

1. Les protéines globulaires	17
2. Structure et propriétés de BSA	17
3. Composition et Propriétés Physico-chimiques	18
4_Nature de l'interaction :	20
4_1 Liaisons hydrogènes.....	20
4_2 Interaction ionique	20
5. le Rôle dans le corps	20
6 -MÉCANISME D'ACTION DE BSA:	21

Chapitre 03 Ferrocène et dérivé Ferrocénique étudié

1. Généralités sur les ferrocènes	23
1.1. Histoire.....	23
2. Définition	23
3. Processus chimique de synthèse de ferrocène	25
3.1. Réaction du cyclopentadiényllithium avec le chlorure ferreux.....	25
3.2. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux.....	25
4. Réactivité	25
4.1. Réaction de substitution.....	26
4.2. Réaction d'oxydation	27
4.2. Réaction avec les électrophiles	27
6. Propriétés de ferrocène	29
6.1. Propriétés électrochimiques	29
6.2. Propriétés chimiques	31
6.3. Propriétés physiques :	31
6.4. Structure Cristalline :	31
6.5. La Chimie médicamenteuse de ferrocène	32

7.Dérivé ferrocénique étudié : N-ferrocenylmethylethylaniline.....	34
--	----

Chapitre 04 Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées

1. Voltammétrie cyclique	37
1.2. Cas d'un système réversible (rapide).....	39
2. Spectroscopie électronique	41
2.1. Règles de sélection.....	41
2.2. Principe de la spectroscopie UV – Visible	42
2.3. Etude spectrophotométrique en UV-Visible.....	43
2.4. Analyse de l'absorption.....	44
3. Amarrage moléculaire	46
3.1. Introduction.....	46
3.2. Types du Docking moléculaire	46
3.3. Principes du docking moléculaire	47
3.4. Applications du docking moléculaire	49
3.5. Les étapes du docking moléculaire	50
3.6. Les outils du docking moléculaire	50

Deuxième partie Etude expérimentale

1. Matériels	58
1.2. Matériels biologiques.....	58
1.2.1. Matériels de laboratoire	58
2. Etude in vitro	59
2.1. Méthodes.....	59
2.1.1. Prélèvements sanguins	59
3. Extraction des acides nucléiques à partir du sang :	59
4. LES Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN ou BSA- FcTris	62
4. 1. Mesures voltammétriques	62
4. 1.1. Appareillage.....	62
5. Etude <i>in silico</i>	63

5.1. Amarrage moléculaire.....	63
5.1.1 Préparation de la Macromolécules (BSA/ ADN) 5.2.1.1. Préparation de l'ADN	63
5.2.1. 2. Préparation de ligand	64
1. Préparation de l'accepteur	65
6. Analyse de résultats	66
Résultats	68
1. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN	68
1.1. Spectre d'absorption UV-Vis de l'ADN	68
1.2. Analyse quantitative : Mesure de la concentration	68
2. Etude de l'activité anticancéreuse par voltamétrie cyclique	69
2.1. Constante et énergie libre de l'interaction FcCH ₃ _ADN et FcCH ₃ _BSA	69
2.2. Détermination du rapport des constants de liaison	خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
2.3. Coefficient de diffusion	76
3. Etude de l'activité anticancéreuse par spectroscopie électronique.....	79
4. Etude de l'activité anticancéreuse par amarrage moléculaire	82
4.1. Optimisation structurelle.....	83
4.2. Simulations d'amarrage.....	84
Conclusion générale	90
Références bibliographiques.....	

Introduction générale

Introduction générale

Le cancer, une croissance anormale de cellules est la seconde cause de mortalité globale, et est responsable d'environ 0.6 millions de mort en 2018. (**Shati *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2011**).

Les anticancéreux conventionnels ciblent les défauts de réparation des dommages à l'ADN et l'instabilité génétique des cellules cancéreuses. Toutefois, la plupart des anticancéreux ne sont pas des médicaments à effet spécifique sur les cellules néoplasiques étant donné qu'ils touchent également les cellules saines. De plus, certaines cellules de tumeurs malignes ont développé des mécanismes pour échapper à l'apoptose provoquée par les anticancéreux actuels, par le biais de différents mécanismes. D'où la nécessité de rechercher de nouvelles molécules et de développer de nouvelles démarches en utilisant les données de biologie moléculaire pour cibler d'autres molécules et mécanismes clés dans la survie des cellules cancéreuses, ou exploiter leur manque en certaines protéines (**Albert *et al.*, 2002**).

L'approche thérapeutique du cancer repose sur trois axes, constitués de la chirurgie, de la radio-oncologie et de la chimiothérapie. Dans ce dernier domaine, l'interaction entre les médicaments anticancéreux et ADN, ainsi que les applications des techniques expérimentales a un potentiel d'intérêt pharmaceutique. L'ADN est la cible principale de certains agents cytotoxiques anticancéreux depuis plusieurs années (**Ricco, A.J. (1997)**).

La chimie organométallique concerne les transformations des composés organiques par des métaux (**Hanzab, N. et Houas, M., 2013**). Les champs des composés organométalliques se développent rapidement en raison de la grande variété de structures possibles pour les ligands. Ils ont de nombreuses applications dans de nombreux aspects biologiques, cliniques et médicinales (**Gulam, F. M. et Manohar, V. L., 2014**). Le traitement du cancer à l'aide de médicaments à base de métal est l'une des stratégies les plus efficaces (**Shafqat, A., et al., 2015**). 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'étude de l'interaction entre un anti-cancereux et l'ADN est devenue un domaine de recherche très active à l'interface de la chimie, la biologie moléculaire et la médecine.

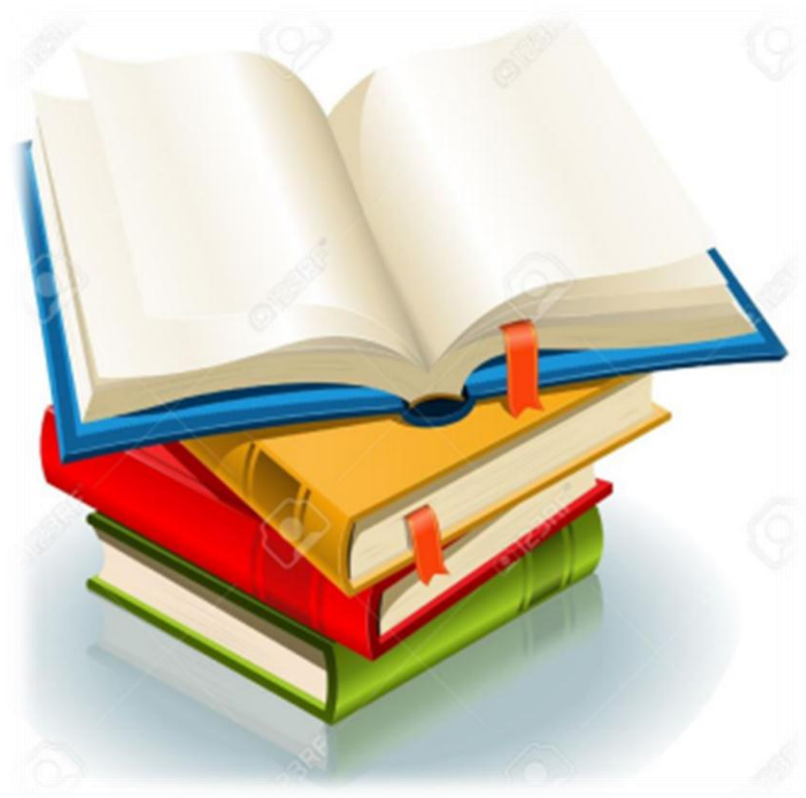
L'objectif de cette étude est de déterminer le type d'interaction entre un médicament anti-tumeur le plus utilisé en chimiothérapie le dérivé N-ferrocényl-méthylaniline. Les ligands ferrocéniques peuvent être liés à des protéines pour stopper la progression tumorale, pour ce fait nous avons choisi d'étudier les interactions entre une protéine modèle, la BSA, et le ligand. En effet, L'albumine de sérum bovin (BSA en anglais) est une protéine qui est souvent utilisée comme protéine modèle pour étudier les interactions protéine-ligand, du fait de son faible coût et d'une bonne connaissance de ses propriétés (similaires à l'albumine de sérum humain (HSA)) **Acevedo-Morantes, et al. (2012)**. L'étude de l'interaction entre des dérivés ferrocéniques synthétisés, l'ADN et les protéines présente le rôle vital dans la détermination du mécanisme d'action et la conception de l'efficacité et la spécificité de ces produits. Trois méthodes adoptées dans notre étude : la technique spectroscopique UV-Visible, la voltamétrie cyclique et confirmé par l'amarrage moléculaire.

Notre travail est réparti en trois parties, La première partie comprend un aperçu bibliographique qui contient quatre désoxyribonucléique, le deuxième chapitre concerne le BSA (Albumine de sérum bovin) et le troisième chapitre présente le ferrocène et le dérivé ferrocénique étudié et le quatrième chapitre un contexte théorique des techniques expérimentales utilisées.

La deuxième partie concerne la partie expérimentale, qui présente les matériels et les méthodes utilisés. La première étape de cette partie consiste à extraire l'ADN à partir des cellules sanguines. Ensuite nous poursuivons de faire une étude sur cette interaction en déterminant les paramètres d'interaction, le constante t de liaison K et la valeur de l'énergie libre ΔG . En fin, la deuxième partie s'intitule résultats et discussion comprenant la présentation des différents résultats obtenus et ses interprétations.

Les méthodes adoptées dans notre étude la technique spectroscopique UV-Visible et confirmé par l'étude de la voltamétrie cyclique, pour répondre à deux questions : cette interaction est-elle spontanée ? Quel est le type de liaison entre ces deux molécules ?

Première partie



Synthèse bibliographique

*Chapitre 01 :
ADN (Acide
Désoxyribose
Nucléique)*

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).

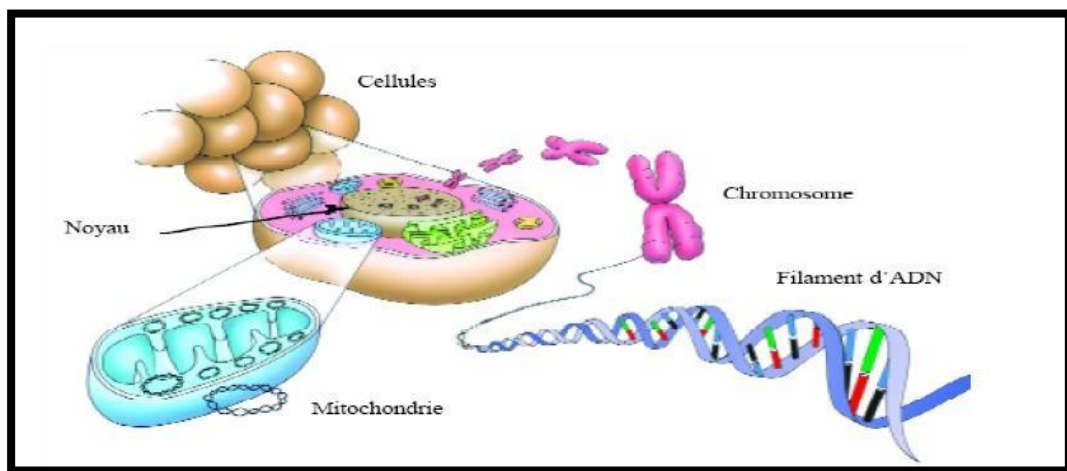


Figure 01 : ADN dans le noyau cellulaire. (Chennouf, 2011)

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 TA 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-parallèles, 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).

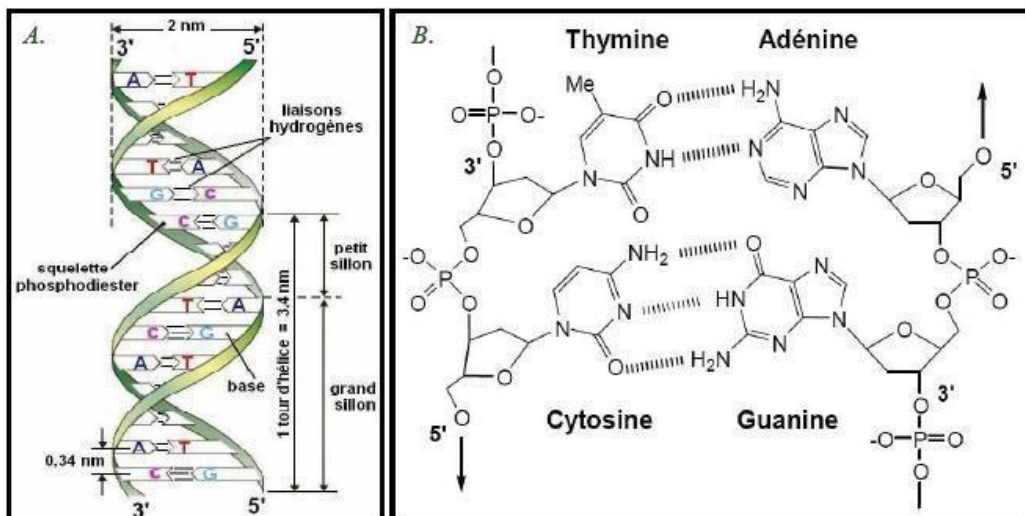


Figure 02 : Structure de l'ADN (G. Lenglet, 2010).

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**).

3. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique.

3.1. La solubilité

Les groupements phosphate donnent un caractère acide à ses acides nucléiques. De ce fait ils sont solubles dans l'eau en formant des solutions visqueuses. Une forte concentration saline (NaCl 0,15M) empêche la séparation des deux brins de l'ADN (Na⁺ neutralise les charges négatives des groupements phosphates). On obtient la formation de sel d'ADN qui peuvent être précipités par l'éthanol, l'isopropanol (diminution de l'hydratation des molécules et précipitation). Ils sont récupérés sous forme d'un long filament translucide (méduse) (**Amarani, 2017**).

3.2. L'instabilité chimique de l'ADN

Les acides nucléiques se décomposent spontanément en solution. De plus, la présence du 2 désoxyribose rend les liaisons N-glycosidiques particulièrement sensibles à l'hydrolyse, notamment celles des purines qui sont vingt fois plus instables que celles des pyrimidines. Par ailleurs, les fonctions amine exocycliques des bases peuvent être sujettes, à température et pH physiologiques, à des réactions d'hydrolyse. La cytosine est la base la plus

sensible à cette réaction de désamination, elle est alors convertie en uracile. La désamination des bases puriques existe également mais est beaucoup moins rapide que celle de la cytosine ; l'adénine et la guanine sont alors respectivement transformées en hypoxanthine et en xanthine. La structure en double hélice de l'ADN assure une bonne protection contre ces réactions et par conséquent la fréquence de celles-ci est relativement faible dans l'ADN double brin.

Cependant, la présence de ces lésions peut avoir des conséquences délétères pour la cellule car l'appariement des bases désaminées est différent de celui des bases normales et la réplication des bases induit des mutations (**Rapin, 2006**)

3.3. L'absorption de la lumière Ultra-Violette (UV)

Les acides nucléiques absorbent la lumière ultra-violette (UV) à une longueur d'onde comprise entre 254 et 260 nm. en raison de l'interaction entre la lumière ultraviolette et le cycle des molécules de purine et de pyrimidine N'importe quelle molécule contenant une base azotée (c'est-à-dire des nucléotides) peut donc être analysée par lumière ultraviolette. Cette technique est particulièrement important pour localiser, isoler et caractériser les acides nucléiques (**William et al., 2006**). D'onde représentée en abscisse (**Chennouf, 2011**).

3.4. 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**).

4. 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.

5. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

L'ADN est continuellement soumis à des agressions. Ces altérations sont soit dues à des facteurs internes (mutations, insertions ou délétions au niveau de la chimiques ou radioactifs, radiations électromagnétiques) (**Wood et al.,2000**).

5.1. Mutations

Les mutations sont des modifications permanentes de la séquence de l'ADN. Le gène est alors défectueux. La protéine produite est modifiée.

5.2. Mutagènes chimiques

- Substances qui réagissent chimiquement avec l'ADN.
- Les substances chimiques : Elle son très diverse on peut citer les agents alkylants (éthylméthane et sulfotane), les agents désaminant (acide nitreux et bisulfite) et les analogues des nucléotides.
- La majorité des mutagènes chimiques sont cancérigènes.
- Les **mutations par substitutions** : une paire de nucléotides est remplacée par une autre.

- Les **mutations par additions** ou **insertions** : une paire de nucléotides ajoutée dans la séquence d'ADN.
- Les **mutations par délétions** : disparition d'une paire de nucléotides dans la séquence d'ADN.

6. 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 :

6.1. 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 lier 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).

6.2. 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).

7. Définition du cancer

Le cancer est une maladie génétique, caractérisé par une prolifération cellulaire incontrôlée (Cattaly *et al.* ,2004).La création d'un cancer est appelée cancérogenèse ou tumorigenèse, un processus par lequel les cellules normales sont transformées par des cellules cancéreuses (Helena *et al.*,2020).

7.1. Facteurs activateurs de la cancérogenèse

Les facteurs carcinogènes qui augmentent le risque de cancer sont multiples :

7.1.1. **Les carcinogènes chimiques**, comme les produits chimiques environnementaux l'amiante et le Cadmium (Sultandyo, 2010).

7.1.2. **Les carcinogènes physiques**, comme les rayonnements UV solaires ou artificiels, les radiations ionisantes, les rayons X, la radioactivité (Royal *et al.* ,2008 ; Yakymenko *et al.* ,2010).

7.1.3. **Les carcinogènes biologiques**, comme les parasites (*Schistosoma haematobium*) (Khurana *et al.* ,2005) ; et les virus tels que le VHB, le VHC, le virus du papillome humain (VPH) (Tsai *et al.* ,1997), et le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Zur Hausen , 2006).

7.2. Etapes de la carcinogenèse

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 : correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non- contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique. (Teste, 2008).

3. La progression : indique le stade auquel les cellules malignes, sous l'influence de la nouvelle mutation du gène, envahiront de nouveaux tissus pour former des métastases (Pairol, 2015).

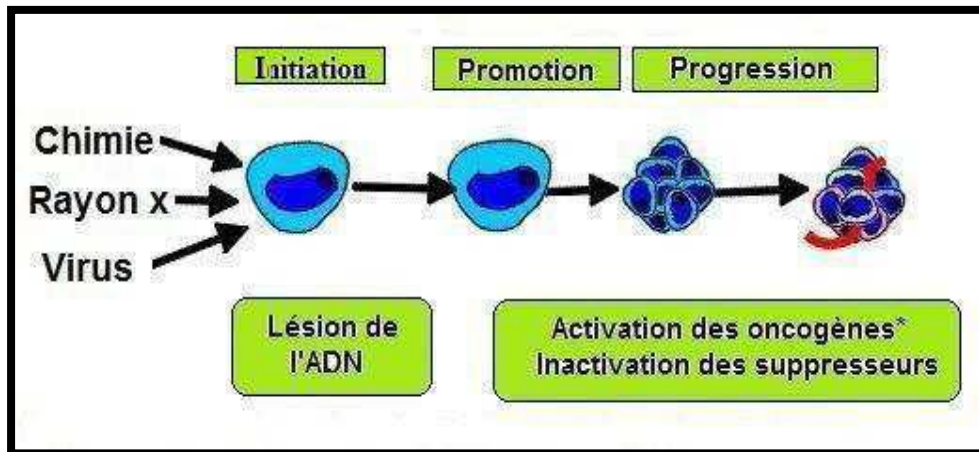


Figure 03 : Schéma général des premières étapes de la cancérisation (Teste, 2008).

7.3. 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).

7.3.1. La chirurgie : elle permet l'ablation d'une tumeur ou des tissus lésés. C'est le principal mode de traitement des tumeurs solides, localisées.

7.3.2. 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.

7.3.3. Les traitements biologiques : ils utilisent des substances endogènes. Par exemple, l'immunothérapie renforce les défenses immunitaires contre les cellules tumorales.

7.3.4. 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.

7.3.5. Les greffe 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.

7.3.6. 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 (**Görmen, M.,2010**)

*Chapitre 02 :
BSA (Albumine
de sérum bovin)*

1. Les protéines globulaires

L'albumine est une protéine de transport capable d'interagir avec une quantité métabolisation de ligands endogènes et exogènes. Elle peut modifier fortement les propriétés pharmacocinétiques d'une drogue, comme sa solubilité, sa et sa distribution corporelle . protéine du plasma la plus abondante chez l'homme (HSA) et d'autres *mammifères* (*BSA albumine de Bovine, albumine de cheval, albumine de rat, ...*)(**B.R. Bilirubin, (1979)**et **D.C. Carter, J.X. Ho, 1994** et **W. F. Harringtonetal,1956**).

L'albumine de sérum bovin (BSA en anglais) protéine globulaire avec un poids moléculaire de 66,43 kDa (66430 g mol^{-1}).Son point isoélectrique est compris, en solution aqueuse et à 25 °C, entre 4,7 et 4,9. Elle présente une structure primaire en forme de cœur. Sa structure secondaire contient entre 50 et 68% d'hélices α et entre 16 et 18% de feuillets β . (**D. C. Carter and J. X. Ho, (1994)** et **J. F. Foster et al (1977)** et **luis Iartundo-rojas(2007)**).



Figure 01 : *Albumine de sérum bovin* (www.sigmaaldrich.com).

2. Structure et propriétés de BSA

La molécule de la BSA est constituée de trois domaines pratiquement homologues (I, II, III) ; chaque domaine est consécutivement le produit de deux sous-domaines (IA, IB ...), divisé en neuf boucle (L1-L9) et liés par dix-sept liaisons disulfures ; les boucles de chaque

Domaine se compose d'un ordre de série formant un triplet (Figure 02) L'analyse de la structure cristalline de la BSA indique que l'attache spécifique des ligands par la protéine provient de la présence des accepteurs sélectifs de ligand nommés : Site I et II situé dans les sous-domaines IIA et IIIA. **R. Feng, et al (1991)**. La structure tertiaire de la BSA n'est toujours pas connue et, en raison de sa similitude avec l'Albumine de Sérum Humain (HSA en anglais) (le pourcentage d'homologie de séquences entre la BSA et la HSA est de 76%, un acide aminé hydrophobe étant remplacé par un autre acide aminé hydrophobe, un acide aminé hydrophile étant remplacé par un autre acide aminé hydrophile de même charge), les chercheurs supposent que les deux protéines possèdent une structure tridimensionnelle très proche. À ce sujet, des études récentes indiquent qu'il y a des différences parmi certains résidus lysine dans la structure tertiaire de la BSA et de la HSA. certains résidus lysine dans la structure tertiaire de la BSA et de la HSA (**B. X. Huang et al. S.,2004**).

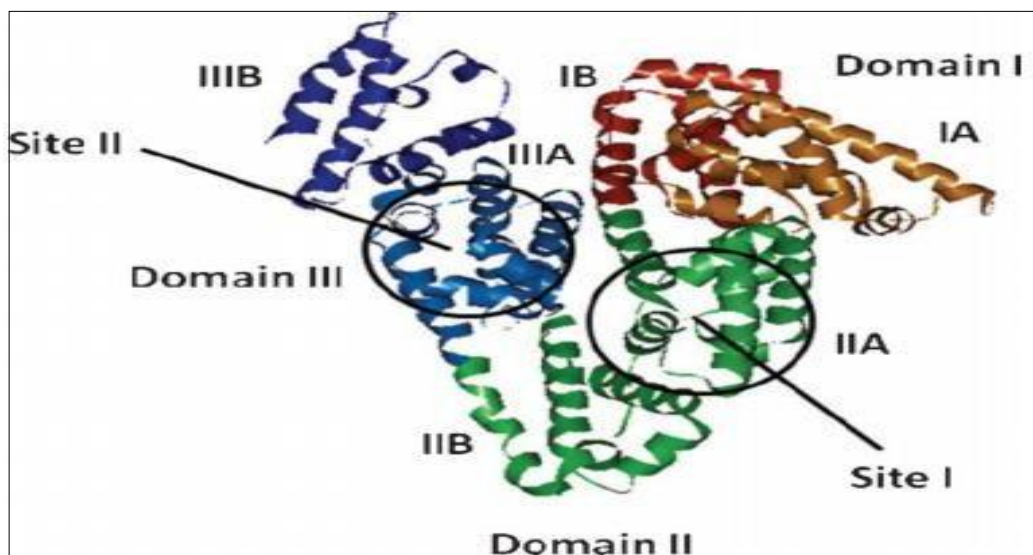


Figure 02 : Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les sites de liaison **Patra, et al(2012)**.

3. Composition et Propriétés Physico-chimiques

L'albumine est essentielle pour maintenir la pression colloïdale osmotique requise pour la distribution appropriée des fluides corporels entre les compartiments intravasculaires et les tissus. La BSA est généralement utilisée comme une protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche, (**J. F. Foster, (1960) et W. F. Harrington et al (1956)**).

La composition en acides aminés de la BSA a été publiée pour la première fois par J.R. Brown en 1975. (**JR. Brown, (1975)**). Ensuite une révision de la structure primaire de la BSA a été faite, en 1990, par Hirayama *et al.* (**K. Hirayama *al*, (1990)**). Les résultats obtenus par les deux groupes sont présentés dans le Tableau À partir de l'assemblage d'acides aminés, il est possible de déduire la composition élémentaire de la protéine, c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre que l'on peut trouver dans chaque molécule de BSA (Tableau 1)

Tableau01 : *Composition en acides aminés de la BSA.*

Acide aminée	Nombre de résidus	Acide Aminée
Acide Aspartique	41	41
Arginine	23	26
Asparagine	13	14
Acide Glutamique	59	58
Glutamine	20	21
Histidine	17	
Lysine	5	60
Sérine	28	32
Thréonine	34	34
Alanine	46	48
Isoleucine	14	
Leucine	61	65
Méthionine*	04	05
Phénylalanine	27	30
Tryptophane	02	03
Tyrosine	19	21
Valine	36	38
Cystéine*	35	35
Glycine	16	17
Proline	28	28
Total	582	607

Présence de S dans la molécule*

Tableau 02 : Composition atomique de la BSA (calculée à partir du Tableau)

NOMBRE D'ATOMES	C	N	O	S
Brown <i>et al.</i> (1975)	29	77	8	39
	26	9	9	
			7	
Hirayama <i>et al.</i> (1990)	30	84	9	40
	30	1	4	
			7	

4_Nature de l'interaction

Les protéines sont caractérisées par leur aptitude à former des associations réversibles par des liaisons non covalentes avec un nombre de molécules organiques de petite ou de grande taille. **J. Desaphy, 2013.**

4_1 Liaisons hydrogènes

La liaison hydrogène met en jeu un atome d'hydrogène, lié à un atome donneur de liaison hydrogène tel qu'un atome oxygène, un azote ou l'hydrogène, et un hétéroatome polarisable que l'on nommera accepteur H.

4_2 Interaction ionique

Les interactions ioniques résultent d'une force d'attractions électrostatiques entre deux atomes de charges opposées.

5. le Rôle dans le corps

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma et, en tant que protéine Porteuse, elle est responsable du transport d'une variété de composés, y compris les vitamines, les acides gras et les produits pharmaceutiques S. Howard *et al.* (1976) La fonction physiologique la plus importante de l'albumine sérique est de maintenir la pression osmotique

et le pH du sang artériel (DC, Ho J X. 1994), il a également la capacité d'interagir avec une variété de ligands, y compris la liaison. L'étude de l'amplitude de liaison et du mécanisme de l'interaction de petites molécules avec les albumines sériques est cruciale pour la compréhension de la pharmacodynamique et la pharmacocinétique des médicaments, car la nature et la force de l'interaction a une grande influence sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. (Liu H et al 2011 et Sathyadevi P, 2012).

L'albumine est une protéine de transport capable d'interagir avec une quantité de ligands endogènes et exogènes. Elle peut modifier fortement les propriétés pharmacocinétiques d'une drogue, comme sa solubilité, sa métabolisation et sa distribution corporelle. L'interaction des composés organométalliques avec l'albumine sérique bovine est à la base de la bio-activité des composés organométalliques. Ça joue un rôle important dans le transport d'une grande variété de produits endogènes et exogènes composés comprenant des acides gras, des métaux, des acides aminés, des stéroïdes et des médicaments. Il a la capacité d'interagir avec une variété de ligands.

6 - MÉCANISME D'ACTION DE BSA :

La fixation des médicaments aux HSA influence fortement leur comportement pharmacocinétique et contribue de manière significative à la découverte de nouveaux candidats-médicaments. (J. F. Foster).

En effet, l'interaction des petites molécules avec l'albumine bovine sérique est un aspect important du développement des médicaments. Les albumines sériques augmentent la solubilité des ligands hydrophobes dans le plasma, modulent leur libération en agissant comme réservoir de médicaments et affectent la biodisponibilité. (Nab-Pacitaxel (Abraxane®) (2012).

Chapitre 03 :
Ferrocène et
dérivé
Ferrocénique
étudié

1. Généralités sur les ferrocènes

1.1. Histoire

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

2. Définition

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il se présente sous forme d'un solide orange avec une odeur caractéristique, (**figure13**). (**Ghallab, 2014**). Il fait partie de la famille des métallocènes, un type de composé organométallique composé de deux cycles pentadiényles entourant un centre métallique. Ils sont aussi appelés composés sandwich. La croissance rapide de chimie organométallique est souvent attribuée à l'excitation résultant de la découverte du ferrocène et de ses nombreux analogues. (**Khelef, 2014**)



Figure 01: Ferrocène sous forme de poudre orange (Zayya et al., 2013).

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

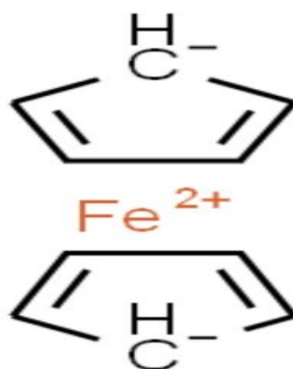


Figure 02 : Structure électronique du ferrocène (Chemspider, 2021).

3. Processus chimique de synthèse de ferrocène

L'acidité du cyclopentadiène est suffisante pour réagir avec l'hydroxyde de sodium dans le DMSO et produire l'anion cyclopentadiényle. Le DMSO est un solvant dipolaire aprotique exaltant la basicité de l'ion OH⁻ en solvatant très efficacement le contre-ion Na⁺. Une amine suffisamment basique comme le diéthylamine peut être utilisée pour former l'ion cyclopentadiényle à partir du cyclopentadiène (**Khalef, 2012**).

3.1. Réaction du cyclopentadiényllithium avec le chlorure ferreux

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

3.2. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux

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



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

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

4. Réactivité

Les ferrocènes substitués peuvent être préparés directement ou indirectement. Dans la préparation indirecte, la molécule de ferrocène est utilisée comme un point de départ pour la synthèse des autres dérivés ferrocéniques, tandis que dans la synthèse directe, le ferrocène substitué est préparé par la réaction d'un composé dérivé de cyclopentadiène convenablement

substitué avec le fer par des méthodes semblables à celles utilisées pour la préparation du ferrocène lui-même. Seulement, les bases fortes telles que le réactif de Grignard, les organothalliums, les réactifs de lithium ou de sodium, peuvent donner de bons rendements de dérivés ferrocéniques à partir de cyclopentadiènes substitués (Khelef, 2014).

4.1. Réaction de substitution

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

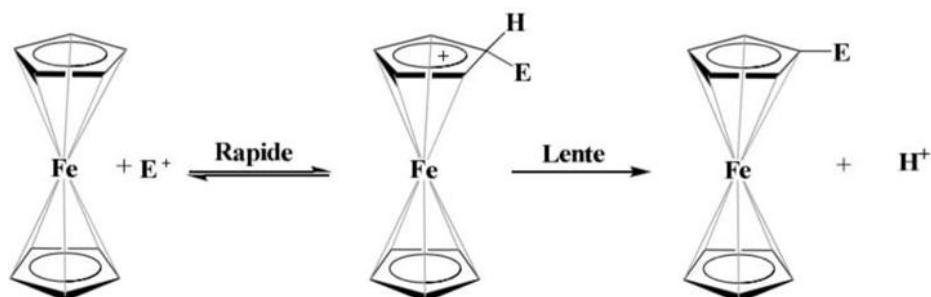


Figure03: La première est une étape rapide où l'électrophile E détruit la liaison métal-carbone dans une réaction de SE2 avec la conservation de configuration

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

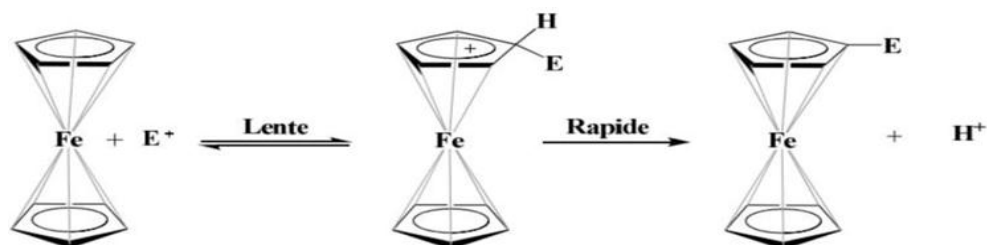


Figure04: mécanisme comporte une limitation de vitesse de l'attaque par l'électrophile à partir de l'extérieur dans un déplacement SE2 avec une inversion de la configuration

Mécanisme (II) : ce mécanisme comporte une limitation de vitesse de l'attaque par l'électrophile à partir de l'extérieur dans un déplacement SE2 avec une inversion de la

configuration, suivie du départ rapide d'un proton de l'intérieur, avec la conservation de la configuration

4.2. Réaction d'oxydation

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

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

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

4.2. Réaction avec les électrophiles

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

La (**figure0**) représente les Principales réactions du ferrocène avec les électrophil

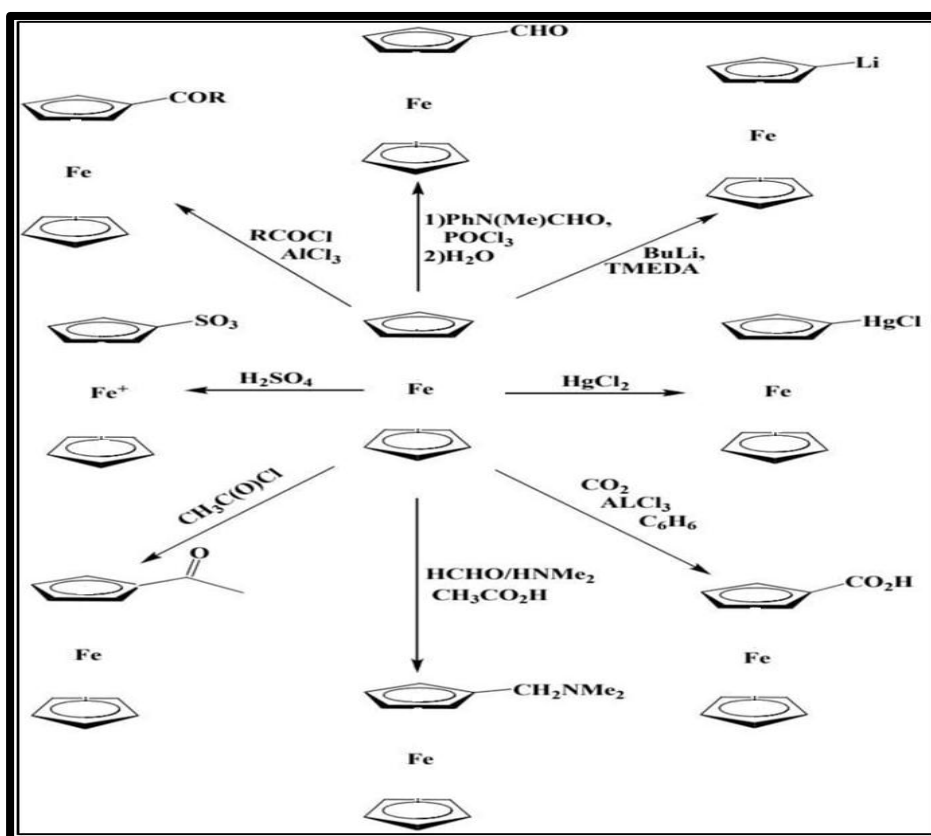


Figure 05 : Principales réactions électrophiles de ferrocène.

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

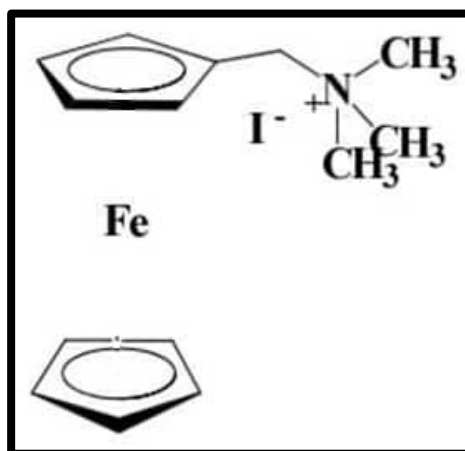


Figure 06 : Structure de ferrocénylméthyltriméthylamonium.

Le groupement triméthylamine dans le sel ferrocénylméthyltriméthylamonium (**figure06**) peut être facilement substitué par les nucléophiles, tels que des anions d'alcoxide et de cyanures, des réactifs de Grignard, des réactifs carbanioniques et des amines comme le montre le (**figure06**).

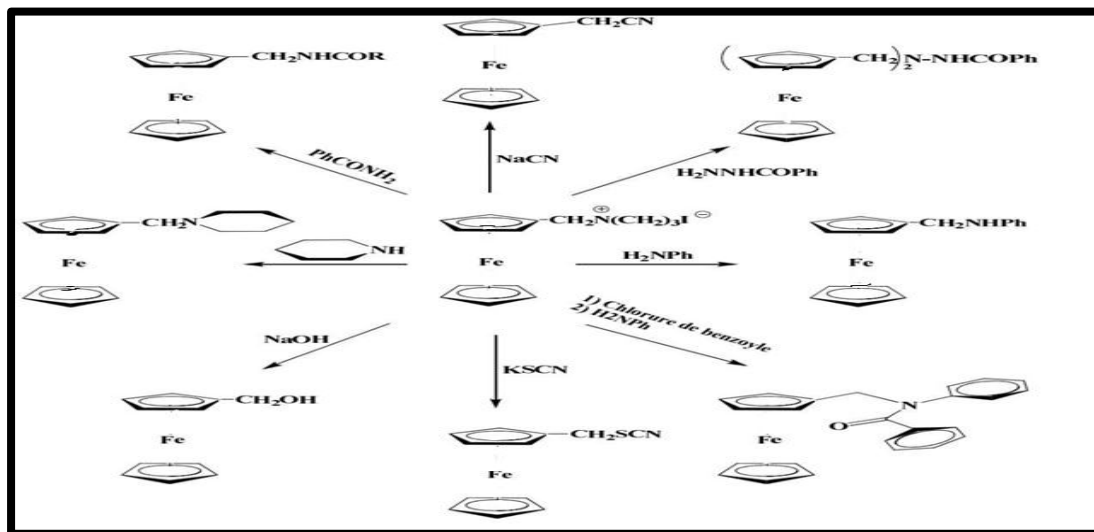


Figure 07 : réactivités du sel ferrocénylméthyltriméthylamonium (Khelef, 2014).

6. Propriétés de ferrocène

6.1. Propriétés électrochimiques

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

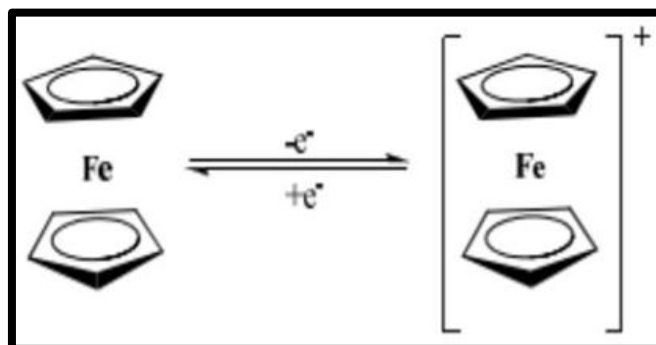


Figure 08 : Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène (Neghmouche, NS *et al.*, 2010).

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 monoélectronique (Khelef, 2014).

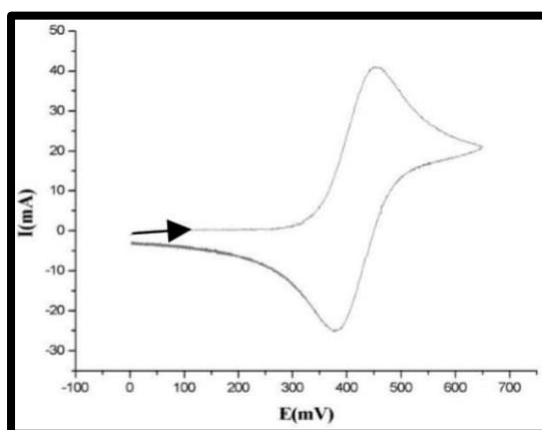


Figure 09 : Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10⁻³ M en présence de tétrabutylammonium perchlorate 10⁻¹ M à V = 100 mV/s (Bechki, 2012).

Les valeurs des paramètres électrochimiques tirées de voltammogramme de la (figure1) sont regroupées dans le tableau III. Ces valeurs renseignent sur les critères de rapidité et de réversibilité (Khelef, 2014).

Tableau 01 : Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène

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

6.2. Propriétés chimiques

Le ferrocène est insoluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques. Il est très stable thermiquement et peut être facilement fonctionnalisé de manière très variée. Dès lors, ces nouveaux dérivés organométalliques ont trouvé des applications pratiques en catalyse, science des matériaux et plus récemment en chile domaine d'électrochimie, ses propriétés d'oxydo-réduction font du ferrocène un bon électron, caractère qui s'amplifie avec l'alkylation du cycferrocèneperméthylé une espèce très sensible à l'oxydation (**Boudebria, 2017**).

6.3. Propriétés physiques :

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

6.4. Structure Cristalline :

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

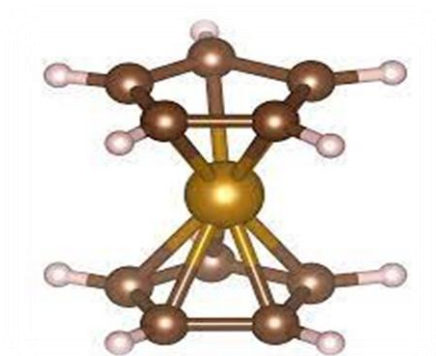


Figure 10 : structure cristalline de ferrocène.
(**Appel, 2015**).

6.5. La Chimie médicinale de ferrocène

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

6.5.1. Antibactériennes

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

6.5.2. Activité antifongique

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

6.5.3. Activité antioxydants

Les dérivés du ferrocène contenant des atomes d'azote sont connus pour avoir in vitro une capacité de piégeage des radicaux libres et une activité antioxydante. L'activité antioxydante des dérivés de ferrocène a d'abord été étudiée à la fin des années 1950, lorsque Acton et Silverstein ont rapporté la synthèse et l'évaluation antioxydante d'un certain nombre de ferrocénecarboxyamides N-substitués et de dérivés de ferrocénylamine. Zhang et Liu ont également étudié l'activité antioxydante des ferrocénylhydrazones et ont découvert qu'ils

présentaient une activité antioxydante intéressante. Depuis lors, un grand nombre de composés ferrocéniques ont été synthétisés et évalués en termes d'activités antioxydantes (Khelef et Lanez, 2015).

6.5.4. Anti-cancéreux

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

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

6.5.5. Anti-Toxoplasmose

L'atovaquone est une molécule utilisée dans le traitement de la toxoplasmose. En raison de problèmes d'intolérance, de concentrations et d'effets secondaires de l'atovaquone, des recherches sur de nouvelles molécules restent nécessaires. Des tests biologiques à partir des homologues ferrocéniques de l'atovaquone ont été réalisés. Trois de ces dérivés ferrocéniques, possédant une chaîne alkyle de 6 à 8 carbones en R₂, se sont révélés actifs sur des souches Toxoplasmas. De plus, ces nouveaux composés sont particulièrement efficaces sur des souches résistantes à l'Atovaquone (Barameea et al., 2006).

6.5.6. L'activité antivirale

L'activité des dérivés ferrocéniques antiviral basé sur l'étude de l'effet de ces composés sur virus VIH, responsable des symptômes du syndrome d'immunodéficience; Il a été montré que les dérivés ferrocéniques entravent la multiplication du virus de SIDA en inhibant

l'enzyme de transcriptase inverse, mais son effet inhibiteur sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte est plus important (**Hemmami, 2017**).

6.5.7. Anti- Alzheimer

L'agrégation et la formation de fibrilles de peptides β -amyloïdes (A β) est un phénomène clé dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. De nombreux efforts ont été déployés sur le développement d'inhibiteurs efficaces pour empêcher la formation de fibrilles d'A β ou démonter les fibrilles A β préformées. Des inhibiteurs peptidiques ayant des séquences homologues aux segments hydrophobes de A β peuvent modifier la voie d'agrégation de A β , avec diminution de la toxicité cellulaire. Le Fc-KLVFF; une combinaison de ferrocenyl (Fc) avec pentapeptide KLVFF montre l'effet inhibiteur de haute sélectivité de la formation de fibrilles de A β 1-42 (**Wei et al., 2011**).

6.5.8. Antipaludique

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

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

7. Dérivé ferrocénique étudié : N-ferrocenylméthylmethylaniline

La synthèse du N-ferrocenylméthylmethylaniline (FcCH₃), a été obtenue à partir du sel quaternaire triméthylferrocéyliodure de méthylammonium bien connu et d'un excès de methylaniline dans le rapport molaire 1/1,5 dans l'ébullition l'eau et la durée de la réaction a été de quatre heures. Le précipité jaune a été séparé par filtration, lavé avec de l'eau pour éliminer toute trace inchangée du sel d'ammonium quaternaire et finalement recristallisé dans 90% éthanol/eau pour produire 77% (**E. LANEZ, 2016**). La structure chimique de dérivé étudié est présentée dans la figure suivante :

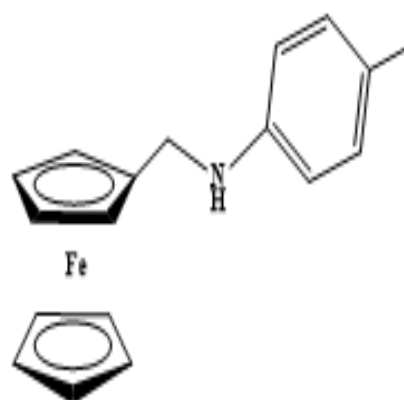


Figure11: N-ferrocenylmethylaniline

*Chapitre 04 :
Contexte
théorique des
techniques
expérimentales
utilisées*

1. Voltammétrie cyclique

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

Le montage généralement utilisé est un montage à trois électrodes. Le balayage des potentiel s'effectue de façon cyclique à vitesse constante, après avoir balayé vers les potentiels anodiques et réaliser une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel pour effectuer une exploitation vers les potentiels cathodiques. **A. S. Bernard et al. 2012.**

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

Le tracé du potentiel en fonction du courant est dit voltammogramme cyclique. Lors d'un cycle unique de potentiel, la réponse i - E attendue d'un couple redox réversible est illustrée par la Figure 01.

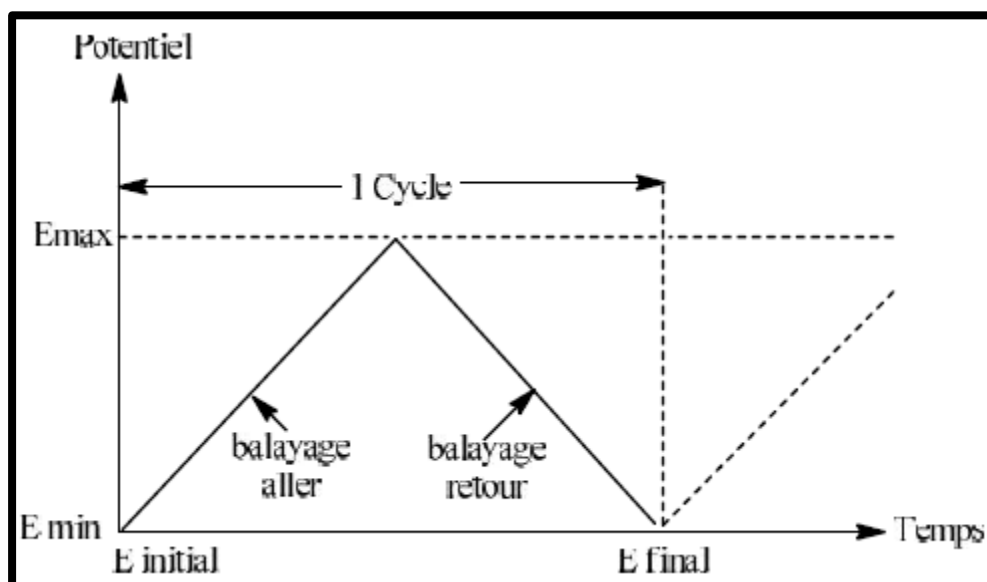


Figure 01: Variation du potentiel en fonction du temps pour un cycle CV.

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

Le tracé du courant en fonction du potentiel fait apparaître un pic maximum de courant i_{p_a}

(courant de pic anodique) à E_{pa} (potentiel de pic anodique) dans le scan anodique et un pic minimal de courant i_{pc} (courant de pic cathodique) à E_{pc} (potentiel de pic cathodique) lors du balayage cathodique (Figure 02).

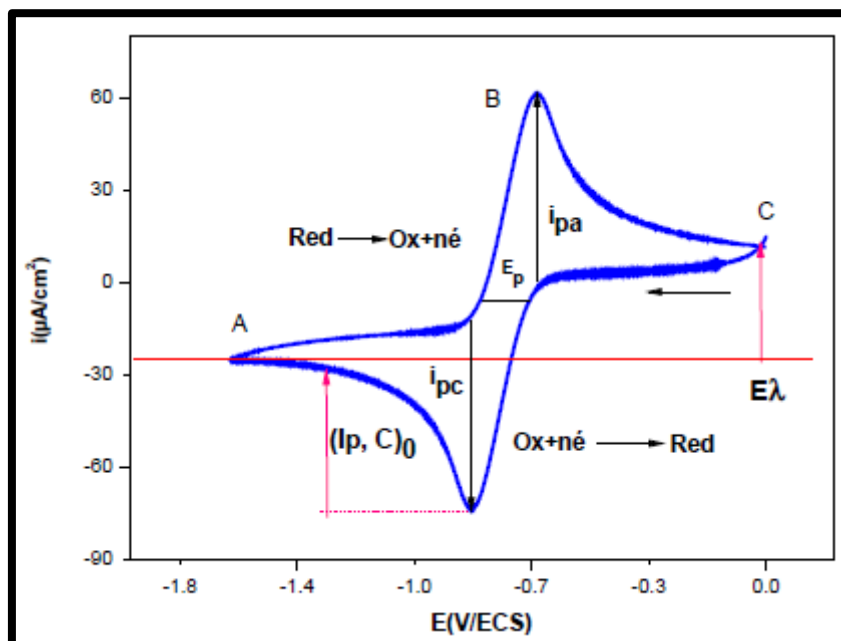


Figure 02 : Voltammogramme cyclique pour un système réversible.

Le voltammogramme cyclique peut fournir des informations importantes concernant la réversibilité du système. Dans un système entièrement réversible, les hauteurs des pics du courant obtenus dans le balayage aller et retour sont les mêmes, et sont séparées par 59 mV pour un processus monoélectronique. Ces caractéristiques devraient être indépendantes de la vitesse de balayage si le transfert d'électrons est un transfert rapide **A. S. Bernard et al 2012**.

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

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

Parfois, et c'est l'un des inconvénients des voltammogrammes cycliques, il n'est pas possible de mesurer la ligne de base avec précision suffisante afin de mesurer i_{pc} . Cependant, il est une bonne approximation d'appliquer l'expression suivante en termes de courant de pic mesuré à partir de l'axe de courant $(i_{pc})_0$ et le courant à l'inversion de potentiel $(I_\lambda)_0$ (voir Figure précédente).

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

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

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

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

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

Le rapport est égale à 0.1 pour une vitesse de balayage égale à $0.18 V \cdot s^{-1}$, si $[Red]_{sol}$ est d'ordre de grandeur plus élevé $10^{-3} M$ par exemple, le rapport est 0.01, Cela montre l'avantage d'utiliser des concentrations aussi élevées que possible, les concentrations millimolaires représentant la limite supérieure. (A. S. Bernard et al. 2012).

1.2. Cas d'un système réversible (rapide)

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

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

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

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

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

Cette équation peut se mettre à 25 °C sous la forme suivante : (C.M.ABrettet al., 1993)

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

Tel que :

A, surface de l'électrode en cm².

n, nombre total des électrons transférés.

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

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

v, vitesse de balayage en mV/s.

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

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

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

$$E_p - E_{\frac{1}{2}} = \frac{56.6}{n} \text{ mV}$$

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

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

L'allure des voltampérogrammes cycliques selon le système rapide est représenté par les suivantes ci-dessous. Nous pouvons résumer toutes les informations caractéristiques des voltampérogrammes de balayage cyclique pour des réactions réversibles : . (A. S. Bernard et al. 2012).

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

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

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

$$\checkmark \frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1$$

2. Spectroscopie électronique

La spectroscopie électronique, plus communément appelée la spectroscopie d'absorption dans ultraviolet et le visible (UV-Vis), est une des méthodes spectroscopiques les plus efficaces pour caractériser les interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. **W.B. Persons, 1969** La spectroscopie électronique présente beaucoup d'avantages, est non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en analyse quantitative (après construction d'une droite d'étalonnage et report d'une mesure expérimentale) ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. On peut citer par exemple le dosage des ions nitrates dans les eaux de piscine (après adjonction d'un additif formant un complexe colore) ou la détermination de la pureté de l'ADN et de certaines protéines après leur extraction. D'autres applications sont connues pour le contrôle qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires (**J.C.A. Boeyens et al., J. Phys 1967**)

2.1. Règles de sélection

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

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

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

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

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

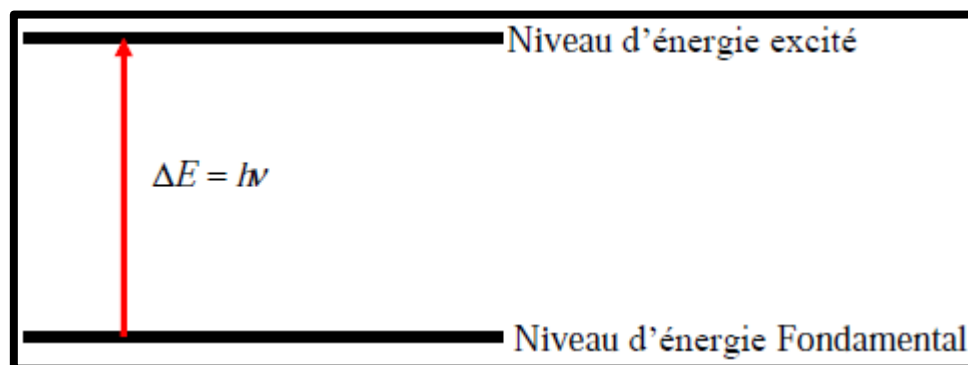


Figure 03 : Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible. Les règles de sélection déterminent si une transition est permise (active) ou interdite (inactive).

Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. De plus, une transition permise a lieu si les orbitales impliquées au cours de ce processus sont telles que $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta S = 0$. En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron (**J.C.A. Boeyens ,et J. Phy1967**)

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

2.2. Principe de la spectroscopie UV – Visible

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

2.3. Etude spectrophotométrique en UV-Visible

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

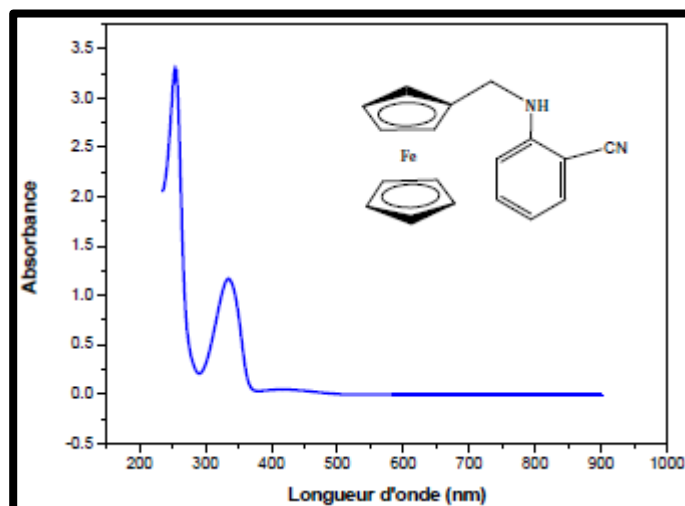


Figure 04 : Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile dans l'acétonitrile.

On remarque que le spectre de la figure 04 est constitué de bandes larges, et non de pics. De nombreuses transitions énergétiquement proches sont donc réalisées. Or si les transitions électroniques sont bien responsables de ces absorptions, les sous-structures vibrationnelles et rotationnelles, au sein d'un même niveau électronique, peuvent conduire à des transitions énergétiquement du même ordre de grandeur, partant et aboutissant aux mêmes niveaux électroniques mais mettant en jeu des niveaux vibrationnels et rotationnels différents. Différents rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes légèrement différentes conduisent alors à différentes transitions énergétiquement très proches et ainsi à des bandes d'absorption.

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

Avec l la largeur de la cuve contenant l'échantillon (donc la longueur du chemin optique), C la concentration molaire de l'échantillon et ϵ le coefficient d'extinction molaire (exprimé usuellement en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ si l est exprimée en cm). Cette loi est valable pour les solutions

transparentes, peu concentrées et dans ces conditions elle est également additive. Ainsi, la relation de linéarité est valide tant que l'absorbance garde des valeurs faibles.

La relation de Beer-Lambert donne donc accès au coefficient d'extinction molaire ϵ qui caractérise l'absorption de l'édifice dans les conditions de l'expérience. Ainsi, il dépend de la température, de l'édifice et du solvant dans lequel est enregistré le spectre. En se plaçant à la longueur d'onde du maximum d'absorption, les coefficients ϵ_{\max} peut être calculé. La donnée de ces deux grandeurs (λ_{\max} , ϵ_{\max}) est caractéristique de l'absorption d'un édifice dans des conditions expérimentales données, mais ne dépend pas de l'appareil utilisé. **R.S. Mulliken**, *J. Phys* 1952

2.4. Analyse de l'absorption

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

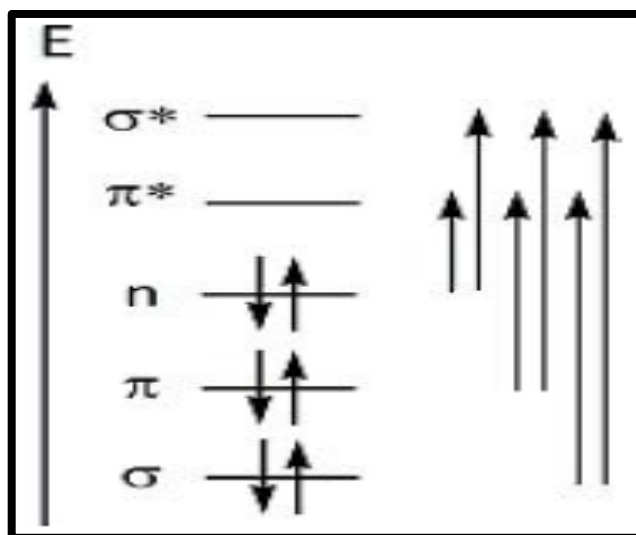


Figure 05 : Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques.

De nombreuses transitions sont donc possibles mais seules celles de plus faibles énergies conduisent à une absorption dans l'UV-Visible. La nature σ ou π des niveaux implique reflètent la nature du groupe fonctionnel présent dans l'édifice. Certaines fonctions organiques provoqueront donc une absorption, ce sont des chromophores. L'enregistrement

d'un spectre UV-Visible peut donc, à l'instar de la spectroscopie Infrarouge, conduire à l'identification des fonctions présentes dans une molécule organique. Les ordres de grandeurs de nombreux chromophores caractéristiques sont tabulés :

Tableau 01 : Ordres de grandeurs de quelques chromophores.

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

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

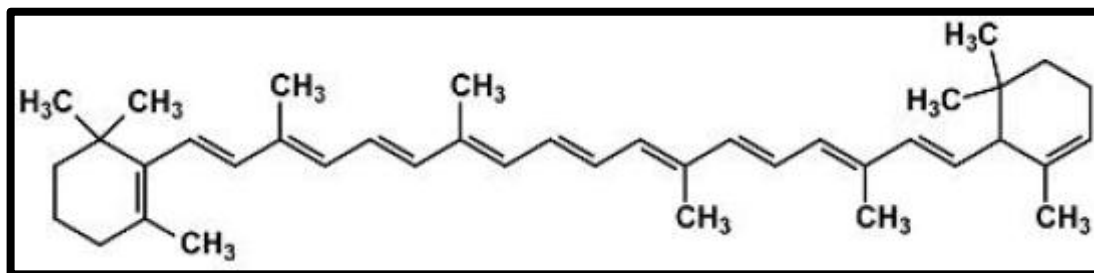


Figure 06 : Structure de β -carotène.

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

Dans le cas des complexes des métaux de transitions, les transitions électroniques sont réalisées entre orbitales d, dont la dégénérescence a été levée par les ligands. Il s'agit alors de

transitions d-d, en général peu intenses et qui conduisent souvent à des absorptions dans le visible.

3. Amarrage moléculaire

3.1. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques Mezhoud K Elle permet la régulation de certains processus, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques (**Chabbi A., Nabti K. 2017**). Etudier les détails de ces interactions, à l'échelle moléculaire grâce au Docking moléculaire, s'avère donc d'un très grand intérêt (**Bouchagra S . 2018**).

Initié au début années 1980, (**Souyel B ., 2015**). le Docking moléculaire ou amarrage moléculaire *in silico*, vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées. Il consiste à trouver les modes de liaison les plus favorables d'un ligand à la cible d'intérêt, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales *in vitro*. Le Docking a émergé au cours des trois dernières décennies, poussé par les besoins de la biologie moléculaire structurale et la découverte de médicaments structurels. Il a été grandement facilité par la croissance spectaculaire et la disponibilité des outils informatiques, et la facilité d'accès aux bases de données biomoléculaires (**Morris G. M., Lim-Wilby M. 2008**).

3.2. Types du Docking moléculaire

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

Le deuxième type est le docking semi-flexible qui est souvent utilisé pour l'amarrage protéine-ligand. Le ligand étant considéré comme flexible et la protéine gardée rigide.

Cependant, certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité, subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand. Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats du docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier.

En revanche, la troisième classe qui est le docking flexible traite la flexibilité des deux molécules, mais la flexibilité permise reste limitée (El Hadj Said K., 2016 et Lebbad F., 2016 et Doss C. G. P., 2014).

3.3. Principes du docking moléculaire

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

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

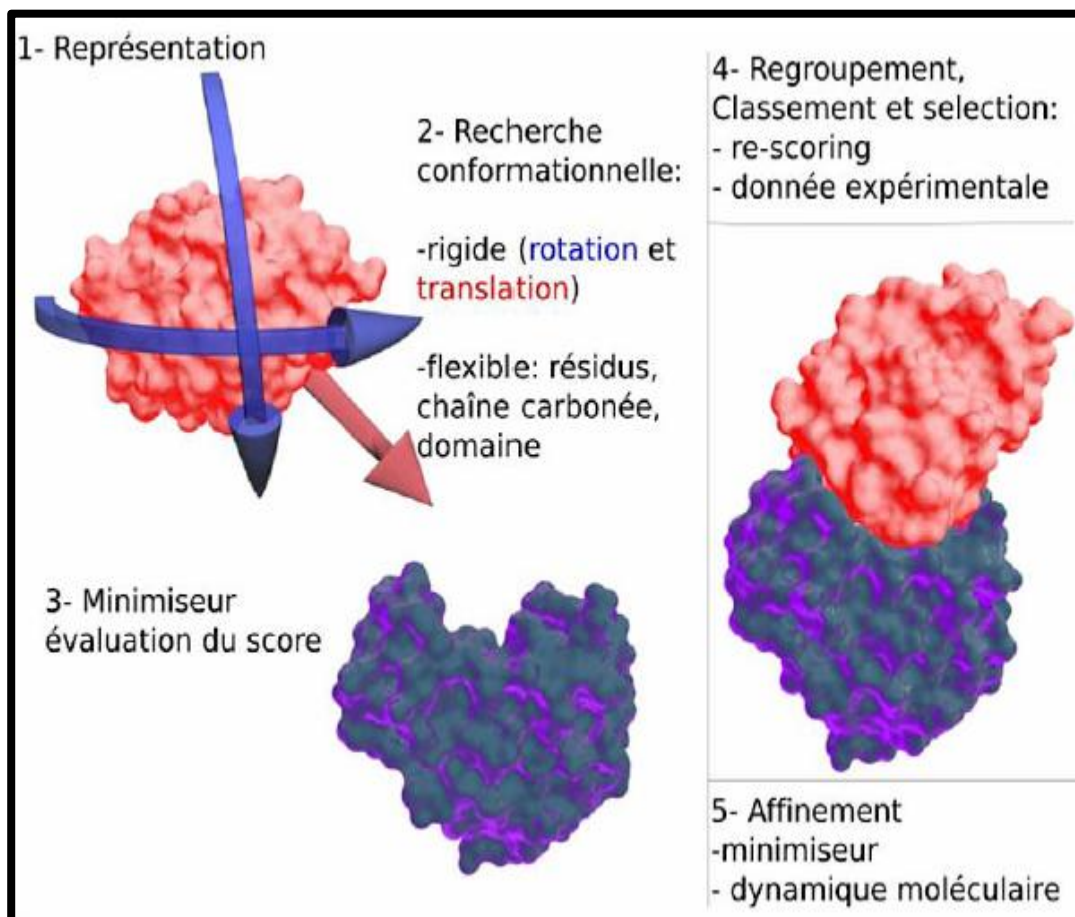


Figure 07 : Schéma du protocole général de docking.

Les fonctions de notation (scoring) prédisent des facteurs tels que : la force de van der Waals, l'énergie de liaison, les effets de solvatation, les effets d'entropie, le nombre des liaisons hydrogènes formées entre la protéine cible et le ligand, et d'autres types d'interactions intermoléculaires (interactions hydrophobes et électrostatiques) . (Doss C. G. P., 2014 et El Hadj Said K., 2016)

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

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

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de

complexation est négative (ΔG complexation < 0) (**El Hadj Said K., 2016**)

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

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

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

La dernière classe est la plus récente, elle regroupe les fonctions de notation basées sur le consensus. Ces fonctions combinent les scores de tous les programmes de scoring et donnent un score final afin de minimiser les erreurs et trouver le ligand parfait pour une macromolécule cible donnée.(**Guedes I. A., 2014 Doss C. G. ,P 2014**)

3.4. Applications du docking moléculaire

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

En combinaison avec le scoring et grâce au criblage virtuel des différentes bases de données, le docking permet l'identification des molécules potentielles (hits) qui peuvent cibler la molécule d'intérêt, afin de découvrir des candidats médicaments. Il permet aussi l'optimisation des molécules identifiées pour développer des médicaments plus puissants, sélectifs et efficaces (**Dar A. M., Mir S.,2017**)Il est aussi appliqué pour fournir des hypothèses des différentes interactions afin de faciliter les prédictions des études de mutagenèse, et aider la cristallographie aux rayons X dans l'adaptation des substrats et des inhibiteurs à la densité électronique. Le docking peut également être utilisé dans les études des mécanismes chimiques et la conception de la bibliothèque combinatoire **Morris G. M., Lim-Wilby M. 2008 .**

3.5. Les étapes du docking moléculaire

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

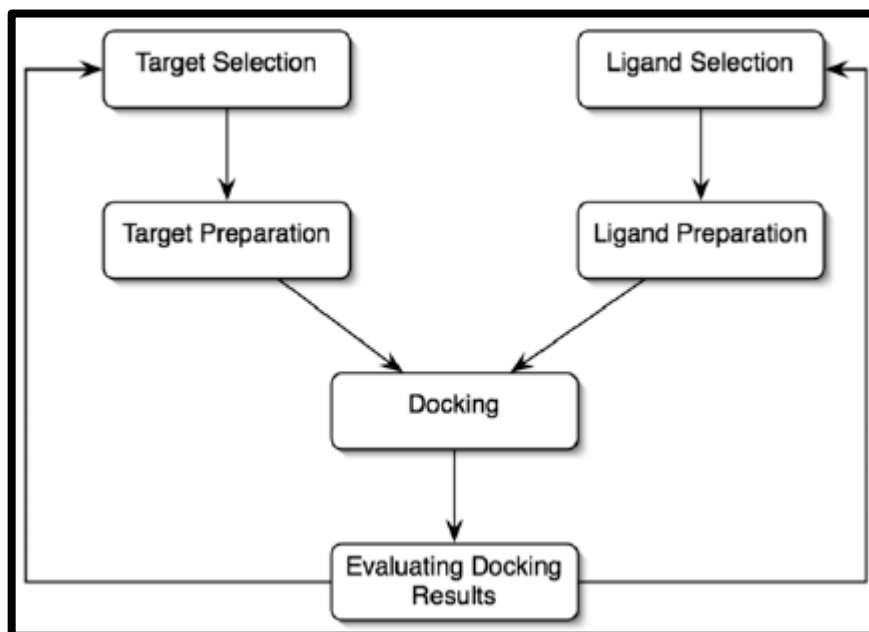


Figure 08: Les étapes clés du docking moléculaire.

3.6. Les outils du docking moléculaire

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

a) *Protéine* :

L'application pratique du docking moléculaire nécessite avant tout la disponibilité de la structure tridimensionnelle (3D) de la cible d'intérêt (Enzyme dans notre cas),[59] qui peut être facilement acquise depuis les bases de données protéiques notamment la PDB « Protein Data Bank ».

La PDB est une collection mondiale de données sur la structure 3D de macromolécules biologiques : protéines essentiellement et acides nucléiques. Ces structures sont principalement déterminées par cristallographie aux rayons X, microscopie électronique ou par la résonance magnétique nucléaire (RMN). En plus des structures 3D, on y retrouve

également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée(**Ghouti M., Halbigue H. 2019**) .

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

b) Ligand :

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

❖ *Modélisation moléculaire :*

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

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

Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Si ceux de mécanique classique, économiques en termes de temps de calcul, permettent de traiter des systèmes moléculaires de grande taille, les méthodes quantiques (semi-empiriques ou théorie de la fonctionnelle de la densité) sont, quant à elles, capables de

calculer les propriétés électroniques des systèmes. C'est pour cette raison que ces approches ont été employées dans le cadre de cette étude.

❖ *La mécanique moléculaire (MM) :*

La mécanique moléculaire est apparue en 1930 mais **(D.H. Andrews 1930)**, mais s'est développée à partir des années 1960, avec les progrès d'accessibilité et de performance des ordinateurs. Elle permet de déterminer l'énergie d'une molécule en fonction de ses coordonnées atomiques et de chercher des minima de l'énergie correspondant à des conformères stables **.(C. Hetényi et al.,2003. G.M. Keseru.D.K. Menyhárd., 1999)**.

Les techniques de modélisation basées sur la mécanique quantique souffrent d'un inconvénient majeur : elles sont très coûteuses en termes de temps de calcul et ne sont dès lors applicables qu'à des systèmes moléculaires de taille restreinte. Au final, le temps nécessaire au traitement d'un système par les méthodes *ab initio* est environ proportionnel à la quatrième puissance du nombre d'électrons qu'il contient. L'utilisation de ces techniques peut s'avérer problématique pour l'étude d'objets macromoléculaires tel qu'une enzyme en interaction avec un inhibiteur ou encore pour la caractérisation de complexes métallo-organiques de grande taille, comme ceux qui font l'objet de cette recherche.

Par contre, la mécanique moléculaire **(R.H. Holmet al., 1996)**, considère l'énergie d'un système uniquement en fonction de ses positions atomiques. Cette approximation repose elle aussi sur les travaux de Born et Oppenheimer. En effet, l'approximation de Born Oppenheimer, en découplant les mouvements des noyaux et des électrons d'une molécule, postule que ces derniers peuvent s'adapter de manière quasi instantanée à la position des noyaux. Le fait d'ignorer les mouvements des électrons épargne ainsi un temps de calcul considérable.

En particulier, la mécanique moléculaire permet l'étude d'une gamme étendue de propriétés en décrivant l'énergie d'un système par la somme d'une série de contributions rendant compte des interactions intra et intermoléculaire. Pour chacune des contributions, des pénalités énergétiques sont appliquées lorsqu'une variable (par exemple une longueur de liaison ou un angle de valence) s'écarte de sa valeur de référence. L'ensemble de ces termes et des paramètres destinés à décrire chaque type d'atome rencontré constitue un champ de forces qui comporte généralement cinq contributions principales **(I. Bremner., 1998)**.

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

Chacun de ces termes possédant une position d'équilibre préférentielle (longueur de liaison, angle de liaison...). La recherche de l'énergie minimale par optimisation de la géométrie joue un rôle primordial. L'énergie de la molécule est exprimée sous la forme d'une

somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence. A cet égard, la mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type "tiges et boules", mais elle est beaucoup plus quantitative.

L'idée directrice de cette méthode est d'établir, par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique, le "champ de force", qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, il n'existe pas encore de modèle unique permettant de simuler tous les aspects du comportement moléculaire, mais un ensemble de modèles (**T. Magali 2004**). Alors pour atteindre un minimum local sur la surface de potentiel dans un temps minimum, il faut représenter toutes les variations possibles de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'obtention de la plus basse énergie : c'est-à-dire le minimum global ou absolu. Presque toutes les méthodes de minimisation ont un point en commun ; on commence à un endroit donné de l'hypersurface énergie-coordonnées et on accède au minimum local le plus proche.

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

Dans le formalisme de la théorie de la fonctionnelle de la densité on exprime l'énergie en fonction de la densité électronique. Les premiers à avoir exprimé l'énergie en fonction de la densité furent L.H. Thomas (1927), E. Fermi (1927, 1928) et P.A. Dirac (1930) sur le modèle du gaz d'électrons non interagissant. Le but des méthodes DFT est de déterminer des fonctionnelles qui permettent de donner une relation entre la densité électronique et l'énergie. La (a) (**Parr. R. G. and Yang. W., 1989**). DFT a véritablement débuté avec les théorèmes fondamentaux de Hohenberg et Kohn en 1964 ;(**P. Hohenberg and W. Kohn ,1964**), qui établissent une relation fonctionnelle entre l'énergie de l'état fondamental et sa densité électronique. Les deux théorèmes montrent l'existence d'une fonctionnelle de la densité qui permet de calculer l'énergie de l'état fondamental d'un système.

d) Les méthodes semi-empiriques :

Elles sont utilisées pour modéliser les systèmes moléculaires de grande dimension. Elles sont basées sur deux approximations, la première consiste à ne considérer que la couche de valence (les électrons de valence qui interviennent dans les liaisons chimiques et définissent donc les propriétés du système). La seconde annule les intégrales de répulsion électroniques multicentres. Utilisant des paramètres ajustés aux résultats expérimentaux, elles peuvent conduire parfois à d'importantes erreurs dans l'évaluation des énergies totales.

c) Les programmes du docking :

Les logiciels de docking moléculaire sont des outils très utiles en biologie, pharmacie et K médecineMezhoud

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (Commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont : Surflex, GOLD, FlexX, DOCK et AutoDock.

Ils permettent un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques tel que : l'Algorithme génétique (GA), l'algorithme de Monte Carlo (MC) et l'Algorithme de construction incrémentale (IC)...etc,(**Dias R. 2008et Forli S., 2016**)

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

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

Dans ce travail, nous avons utilisé le programme AutoDock qui est une suite de logiciels libres et gratuits utilisés pour le docking moléculaire **Forli S 2016** . Dans ce logiciel l'amarrage se base sur la simulation de trajectoire, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation. L'énergie d'interaction est calculée par une fonction énergétique. Les mouvements du cycle à venir sont guidés par les variations d'énergie induites par les mouvements des cycles précédents. L'algorithme s'arrête lorsqu'il a trouvé la position idéale

du ligand dans le récepteur. Ces techniques prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes.

Deuxième partie



Etude expérimentale

Chapitre 01 : Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Produits chimiques

- ✓ N-ferrocénylméthylméthylaniline
- ✓ Isopropanol
- ✓ Sodium DodecylSulfat (SDS).
- ✓ Ethanol.
- ✓ NaHCO₃.
- ✓ Chlorure de sodium (Na Cl).
- ✓ Eau Ultra pure et eau bi-distillé.
- ✓ Acide éthylène Diamine Tétracétique (EDTA).
- ✓ NH₄Cl.
- ✓ Phosphate de potassium dibasique (K₂HPO₄) .
- ✓ Phosphate de potassium monobasique.
- ✓ Tris.
- ✓ Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- ✓ Acétone.
- ✓ Sérum bovin albumine (BSA).

1.2. Matériels biologiques

Le sang du poulet conservé directement dans la glace pour l'extraction de l'ADN.

1.2.1. 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.
- ✓ Verreries (bucher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).

2. Etude in vitro

2.1. Méthodes

2.1.1. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube à EDTA un tube en présence d'EDTA, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes nucléases, une quantité d'environ 10 ml est prélevé a la poulet et conservés directement dans la glace. Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ADN est extrait des échantillons de sang de manière sécuritaire et constante, tout en éliminant les risques 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).

3. Extraction des acides nucléiques à partir du sang :

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 (Adaika. A., 2016). Il existe I 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).

✓ Séparation des leucocytes par hémolyse

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges. Le sang prélevé est traité selon les étapes suivantes

- Ajouter 1 volume de solution de lyse des globules rouges par 1 volume de sang (1:1) - incuber de 20 à 30 min à 4°C.
- Centrifuger à 1500 g 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 incuber 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 .

✓ Extraction d'ADN

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

*Lyse des leucocytes

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

* Précipitation des protéines

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

*Précipitation de l'ADN

Après agitation le mélange est dilué par l'ajout de 20 ml d'eau distillée et en fin a été filtré. Une portion du filtrat a été transférée dans un tube à essai et refroidi dans un mélange glace/eau pendant 5 minutes, Un volume égal d'isopropanol à haute force ionique (99%) a été ajouté au surnageant récupéré précédemment. On laisse l'ADN se précipiter par agitation douce en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une méduse ; on récupère l'ADN dans un tube en verre (5 ml) la méduse d'ADN ainsi condensée est lavée 3 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels : 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 température ambiante pour que l'éthanol s'évapore et la pelote séchée.

✓ **Dissolution de l'ADN**

Quand l'ADN est en pelote sèche, il ne peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire. On doit donc réhydrater l'ADN dans un volume d'eau distillée stérile qui sera choisi en fonction de la taille de la méduse. Cette solubilisation nécessite une agitation continue pendant une nuit à 42 °C ; L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. Après dissolution complète, la DO de la solution d'ADN obtenu est mesurée à 260 nm et à 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait. L'ADN dissout peut être conservé à +4°C pendant quelques jours ou à - 20°C pour une conservation à plus long terme. D'ailleurs, l'ADN pure se conserve à - 20 °C, plus de 10 ans.

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

L'estimation de la quantité et la qualité d'ADN étaient indispensables après son extraction. Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN. La mesure 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 la pureté de l'ADN et sa contamination éventuelle par des protéines. Un rapport compris entre 1.8 et 2 indique que l'ADN est propre. La concentration d'ADN a été estimée à 260 nm Selon La loi de Beer Lambert (réf 6)

Tableau 01 : Rapport de la densité optique

DO260/DO280	DO 280	DO 260
1.52	0.673	1.023

-Préparation de l'ADN dénaturé (monobrin)

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

4. LES Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN ou BSA- FcTris

Il existe de nombreux types de méthodes décrivant l'étude in vitro de l'interaction ADN-ligand et BSA-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.

4. 1. Mesures voltammétriques

4. 1.1. Appareillage

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

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

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

4. 1. 2. Réactifs

Solution tampon de phosphate de potassium

Electrolyte

support (Tetra-n-butylammonium tetrafluoroborate, 99%)

éthanol

Azote (Gaz)

Eau ultra pure

4.1.3. Procédure

La réaction entre les dérivés ferrocéniques étudiés et l'ADN ou BSA se fait dans la cellule électrochimique. Le milieu réactionnel est une solution tampon constitué d'un mélange de phosphate mono- et bipotassique (KH₂PO₄+K₂HPO₄) à 0.1 M et de pH égal à 6, 7.2 et 9.

Avant chaque mesure on effectue un polissage de l'électrode de travail en utilisant le papier abrasif p4000. Après polissage, on lave l'électrode avec de l'eau ultra-pure et on la sèche à l'air. La surface de l'électrode présente ainsi l'aspect d'un miroir. Ensuite on équipe la cellule électrochimique avec l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire, et aussi l'électrode de travail. On remplit la cellule avec 25 ml d'une solution constituée de 90% éthanol/ solution tampon contenant le dérivé ferrocénique à étudié, en suite on fait un barbotage d'azote pendant 10 à 15 minutes pour chasser l'oxygène de la cellule. On impose un potentiel variable à une vitesse de balayage fixe et à une température ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), le voltammogramme obtenu est exploité pour accéder aux paramètres d'interaction entre le dérivé ferrocénique étudié et l'ADN ou BSA.

4. .2. Mesures spectroscopiques

4. 2. 1. Appareillage

Les mesures UV-Vis ont été effectuées en utilisant un spectromètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et une cellule de quartz ayant une capacité volumétrique de 5 ml. L'acquisition de données a été accompli avec un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel UV probe version 2.34 (Shimadzu). Les données sont traitées en utilisant le logiciel OriginLab 2.0.

4.2.2. Réactifs

- Solution tampon de phosphate de potassium.
- éthanol.
- Eau ultra pure.

4.2. 3. Procédure

Les spectres électroniques de dérivé ferrocénique dans la solution 90% éthanol/solution tampon de phosphate de potassium ont été obtenu en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN ou BSA.

5. Etude *in silico*

5.1. Amarrage moléculaire

5.1.1 Préparation de la Macromolécules (BSA/ ADN)

5.2.1.1. Préparation de l'ADN

Dans notre étude nous avons utilisé l'ADN disponible dans la PDB (code : 1 BNA), la molécule d'ADN a été téléchargé au format pdb.

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

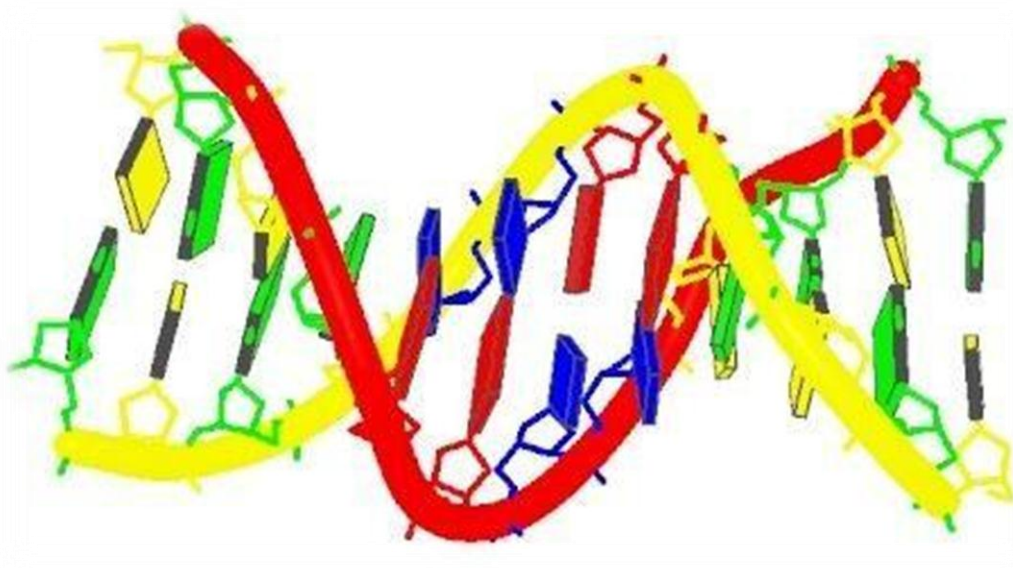


Figure 01 : Structure d'ADN d'un dodécamère

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

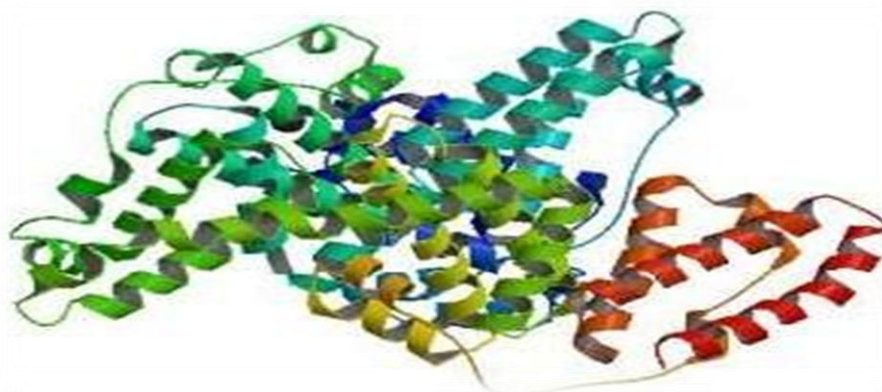


Figure 02 : Structure de la BSA téléchargé de la PDB (PDB ID : 3V03) Résolution 2.7Å°, Résidue count 1166

5.2.1. 2. Préparation de ligand

Les structures des dérivés ferrocéniques retenues pour l'amarrage ont été optimisé avec le logiciel Gaussian 09, elles sont enregistrées sous format pdb. Le logiciel Autodock exige le

format pdbqt, les ligands sont donc convertis en format pdbqt par le logiciel OpenBabel 2.3.0.

- Amarrage

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

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

1. Préparation de l'accepteur

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

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

2. Chargement de récepteur et du ligand

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

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

3. Configuration des paramètres de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

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

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

4. Exécution de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes

- Run-AutoGrid

5. Exécution de l'AutoDock

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

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

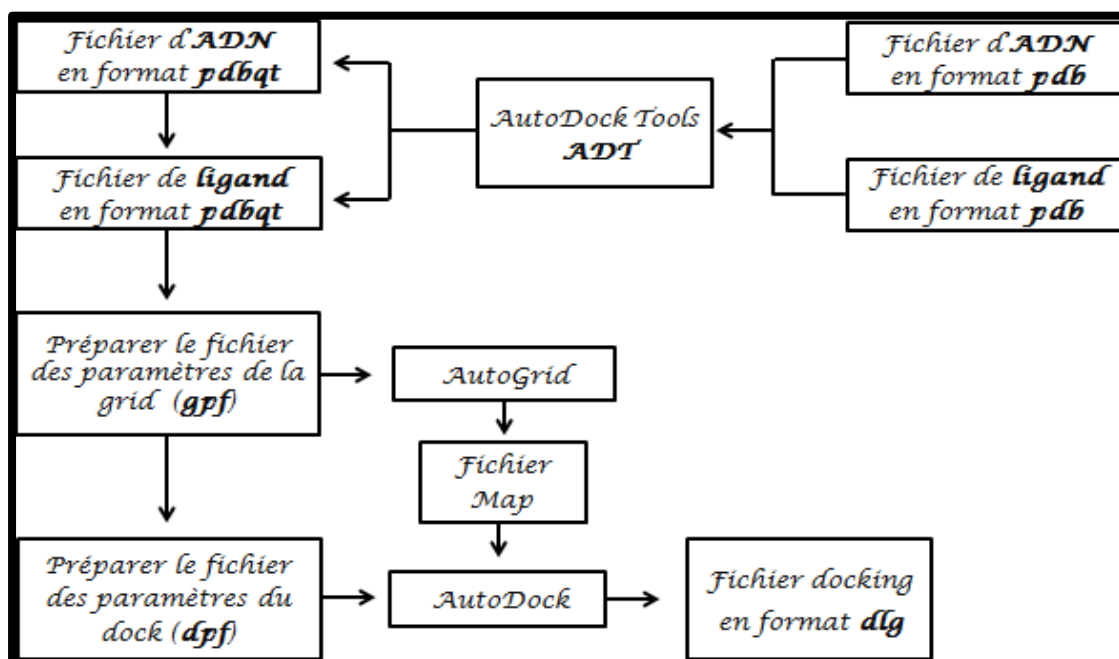


Figure 03 : Procédures de docking avec AutoDock.

6. Analyse de résultats

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

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

Chapitre 02 :
Résultats et
discussion

Résultats

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

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.

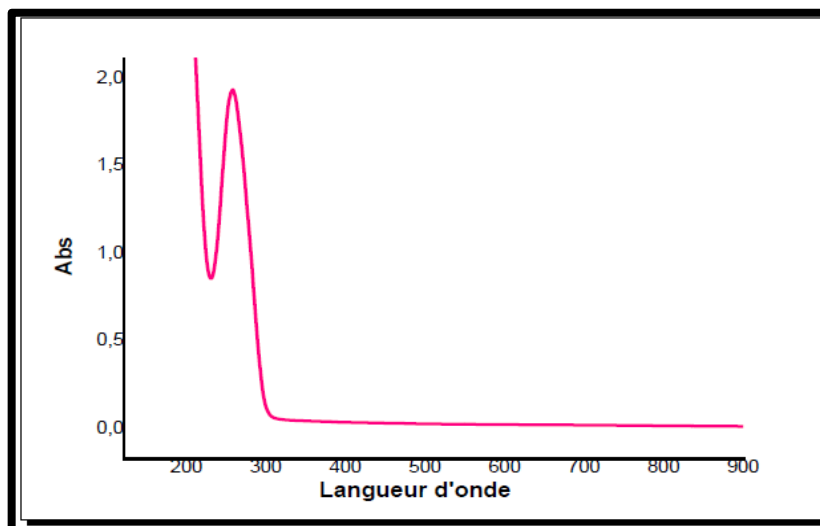


Figure 01: Spectre d'absorption de l'ADN.

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

$$\varepsilon = 6600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}.$$

$$A = \varepsilon.l.c \quad (1)$$

Avec : « C » concentration d'acide nucléique en mol.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 213×10^{-6} mol/l.

Analyse de la pureté

Le rapport des densités optiques 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 01 : Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.

Longueur d'onde	DO d'ADN	
260	1.404	1.915
280	0.793	1.064
DO260/DO280	1.77	1.79

2. Etude de l'activité anticancéreuse par voltamétrie cyclique

2.1. Constante et énergie libre de l'interaction $FcCH_3_ADN$ et $FcCH_3_BSA$

L'énergie libre de liaison ΔG de l'ADN et du BSA avec le dérivé ferrocénique N-ferrocénylméthylméthylaniline a été déterminé par l'étude du comportement anodique de ce dérivé en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN et du BSA, cette étude du comportement électrochimique a été réalisée par la technique de la voltammétrie cyclique dans une solution 90% éthanol/tampon de phosphate 0.1 M à $pH = 7.2$, la fenêtre du potentiel était de 0.0 à 1 Volt dans la direction de balayage positif avec une vitesse de balayage égale à 0.1 V/s. Les voltammogrammes cycliques étaient initialement débuté à 0.0 V et inversé à 1.0 V.

Les voltammogrammes cycliques à $pH = 7.2$ en absence d'ADN ou BSA sont caractérisé, dans le domaine de potentiel étudié, par un couple redox stable et bien défini. Les pics de potentiel anodique pour le dérivé $FcCH_3$ a été apparu à 0.506 V, dans le balayage retour les pics de potentiel cathodiques a été observé à 0.326 V.

En présence d'ADN et du BSA le potentiel des pics anodiques et cathodiques ont été déplacé vers les valeurs de potentiel le plus faibles, tableau 1. En outre le couple ferrocérium/ferrocène dans le dérivé ferrocénique étudié garde sa réversibilité électrochimique en présence ou en absence d'ADN ou du BSA.

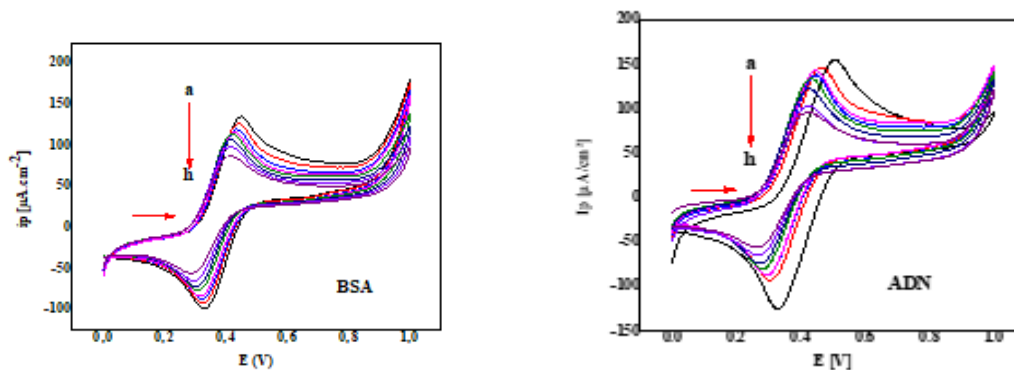


Figure 02 : Voltammogrammes cycliques du dérivé ferrocénique étudié (1mM) en présence de différentes concentrations d'ADN et BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 10^{-1} M à pH = 7.2 avec une vitesse de balayage du potentiel égale à 0.1V/s.

Les voltammogrammes cycliques représentés dans la figure 02 révèlent quel que soit la portion d'ADN ou du BSA ajoutée, il y a toujours une diminution de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques accompagné d'un déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques vers les valeurs les plus faibles.

Les paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 02 sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Paramètres électrochimiques calculés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 0 2

Adduit	Concentration (μM)	E_{pa} (V)	i_{pa} ($\mu A/cm^2$)	E_{pc} (V)	i_{pc} ($\mu A/cm^2$)
<i>FcCH₃_ADN</i>	0	0.503	155.4	0.327	153.3
	1.24	0.465	147.2	0.303	146.6
	1.65	0.444	143.4	0.291	144.3
	2.08	0.444	139	0.281	139.1
	2.72	0.431	134.6	0.277	134.6
	3.96	0.424	122.7	0.270	121.9
	5.81	0.420	103.8	0.270	101.9
	6.67	0.417	95.61	0.266	96.3
<i>FcCH₃_BSA</i>	0	0.446	134.3	0.328	133.6
	1.21	0.439	126.2	0.325	127.8
	2.04	0.432	119.4	0.321	118.5
	3.57	0.432	115.7	0.318	116.7
	4.72	0.418	110.1	0.311	109.1
	5.62	0.411	106.3	0.304	106.9
	8.02	0.411	97.62	0.297	96.92
	10.13	0.411	86.43	0.294	87.63

La décroissance du courant de pic anodique des dérivés ferrocéniques par l'addition de diverses concentrations d'ADN et u BSA a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant les équations suivantes (**Q. Feng1997**):

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

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de la valeur de K en utilisant la relation thermodynamique suivante :

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

R, constante des gaz parfait

T la température en kelvin

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

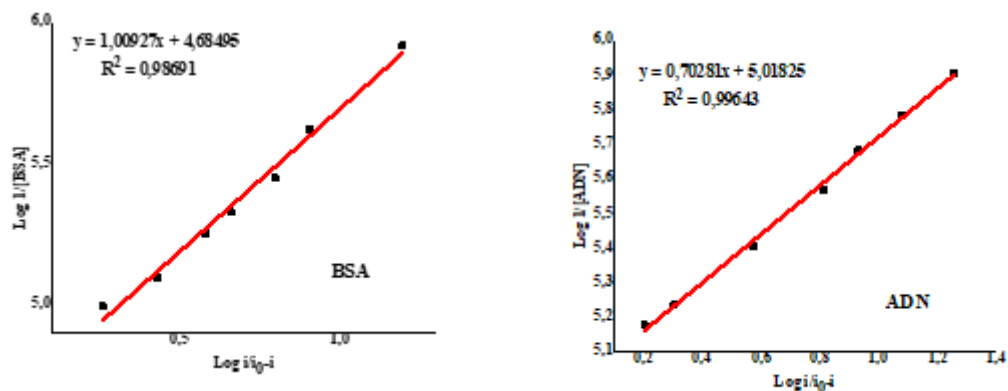


Figure 03 : Tracés de $\log \frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0}} - i_p$ utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l'ADN et le BSA.

Les valeurs obtenues des constantes liaisons et des énergies libres de liaison des adduits FcCH₃_ADN et FcCH₃_BSA sont regroupées dans le tableau 03:

Tableau 03 : Constantes et énergies libres de liaison calculées à partir du tracé

$\log \frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$ à pH = 7.2.

Adduit	$\log \frac{1}{[Mac]}$	$\log \frac{i_p}{i_{p0} - i_p}$	Equation	R^2	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
<i>FcCH₃_ADN</i>	5.91	1.25	$y = 0.70x + 5.01$	0.996	1.04×10^5	28.65
	5.78	1.08				
	5.68	0.93				
	5.57	0.81				
	5.40	0.57				
	5.24	0.30				
	5.18	0.20				
<i>FcCH₃_BSA</i>	5.92	1.19	$y = 1.00x + 4.68$	0.987	4.84×10^4	26.75
	5.62	0.90				
	5.45	0.79				
	5.33	0.66				
	5.25	0.58				
	5.10	0.43				
	4.99	0.26				

Les valeurs de l'énergie libre de liaison varient dans le même ordre que celle de la constante de liaison, leur insigne indique la spontanéité de la réaction d'interaction de l'ADN et du BSA avec le dérivé ferrocénique étudié.

2.2. Détermination du rapport des constants de liaison

Les valeurs de l'énergie libre de liaison varient dans le même ordre que celle de la constante de liaison, leur insigne indique la spontanéité de la réaction d'interaction de l'ADN et du BA avec le dérivé ferrocénique étudié.

Le mode d'interaction *FcCH₃_ADN* et *FcCH₃_BSA* 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 macromolécule (M. Aslanoglu, Anal., 2006). bien que le décalage cathodique (déplacement vers les valeurs les plus négatives) ait été causé par l'interaction électrostatique du composé cationique étudié avec le phosphate anionique du squelette de l'ADN. (N. Liet et al., 2005).

Ainsi, le déplacement négatif du potentiel de pic (décalage cathodique) dans le comportement de CV de dérivé ferrocénique (FcCH_3) par l'ajout de l'ADN ou du BSA peut être attribué à la liaison électrostatique du cation ferrocénium des dérivés étudiés chargés positivement avec l'ADN ou BSA polyanionique. Le déplacement de potentiel de pic vers les valeurs les plus négatives indique en outre que l'anion Fe (II) du dérivé FcCH_3 est plus facile de s'oxyder en présence des macromolécules parce que sa forme oxydée est plus fortement liée à l'ADN et au BSA que sa forme réduite (forme neutre). Pour un tel système, où les deux formes de dérivé ferrocénique réagissent avec l'ADN et avec le BSA, le schéma 1 ci-dessous peut être appliqué. (X. Chu., 1998).

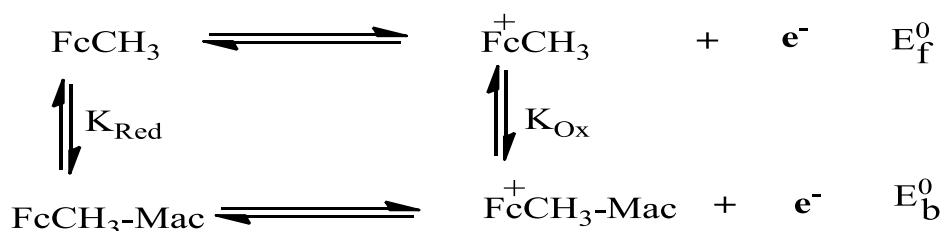


Figure 04 : Chemins réactionnels des réactions électrochimiques du dérivé ferrocénique libre et celui lié à l'ADN ou au BSA.

Avec E_f^0 et E_b^0 est le potentiel redox de la forme FcCH_3 non liée et liée respectivement à l'ADN et au BSA, 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 ou BSA donne la relation suivante :

$$E_f = E_f^0 + 0.059 \log \frac{[\text{FcCH}_3(\text{III})]}{[\text{FcCH}_3(\text{II})]}$$

Pour la forme liée on obtient la relation suivante :

$$E_b = E_b^0 + 0.059 \log \frac{[\text{FcCH}_3(\text{III})\text{-Mac}]}{[\text{FcCH}_3(\text{II})\text{-Mac}]}$$

A l'équilibre on a $E_f = E_b$ et on obtient la relation :

$$E_f - E_b = 0.059 \log \frac{K_{ox}}{K_{red}}$$

Pour déterminer le rapport K_{ox}/K_{red} , des voltammogrammes cycliques du dérivé ferrocénique en absence et en présence de $6.67 \mu\text{M}$ d'ADN et de $10.13 \mu\text{M}$ de BSA ont été obtenus figure 05.



Figure 05 : Voltammogrammes cycliques de FcCH_3 (1mM) en absence d'ADN et de BSA (ligne noire) et en présence de $6.67 \mu\text{M}$ d'ADN et de $10.13 \mu\text{M}$ de BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone

Une électrode de carbone vitreux dans une solution 90%éthanol/ tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 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 tableau 04.

Tableau 04 : Données électrochimiques de la forme libre de FcCH_3 et celui de l'adduit FcCH_3_ADN et FcCH_3_BSA .

Composé	i_{p_a} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	E_{pa} (V)	i_{p_c} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	E_{pc} (V)	E_0 (V)	$\left \frac{i_{p_a}}{i_{p_c}} \right $
FcCH_3	155.4	0.503	153.3	0.327	0.415	1.01
FcCH_3_ADN	95.61	0.417	96.3	0.266	0.3415	0.99
FcCH_3	134.3	0.446	133.6	0.328	0.387	1.01
FcCH_3_BSA	86.43	0.411	87.63	0.294	0.3675	0.99

E_0 est calculé à partir de la relation suivante :

$$E_0 = \left| \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \right|$$

Le tableau 1 montre que le potentiel des pics anodiques et cathodiques des adduits est supérieur de celui de la forme non liée du dérivé ferrocénique, les constatations sont observées pour le potentiel formel E_0 . Les valeurs du rapport i_{pa}/i_{pc} traduit 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 $\% \Delta i_p$ est calculé à partir de relation 10 sont représenté dans le tableau 1 :

$$\Delta E_0 = E_f^0 - E_b^0 \quad (9)$$

$$\% \Delta i_p = 100 - \frac{i_{pa}}{i_{pa0}} \times 100 \quad (10)$$

Tableau 05 : 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)	$\% \Delta i_p$	K_{ox} / K_{red}
<i>FcCH₃_ADN</i>	0.0735	1	15.66
<i>FcCH₃_BSA</i>	0.0195	1	4.075

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 *FcCH₃_ADN* ou *FcCH₃_BSA* qui se diffuse plus lentement. La diminution de la densité du courant des pics anodiques en présence de macromolécules 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 tableau 05 que la forme oxydée Fc(III) réagit plus quantitativement que celle de la forme réduite Fc(II).

2.3. Coefficient de diffusion

L'interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN et le BSA a été aussi étudiée en mesurant les coefficients de diffusions du dérivé non lié et celui de l'adduit. Afin de calculer les coefficients de diffusion du composé *FcCH₃* non lié et celui de l'adduit *FcCH₃_ADN* et *FcCH₃_BSA*, plusieurs voltammogrammes cycliques sont enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400, 500 mV/s en présence et en absence d'ADN et BSA, les voltammogrammes obtenus sont représentés dans la figure 06.

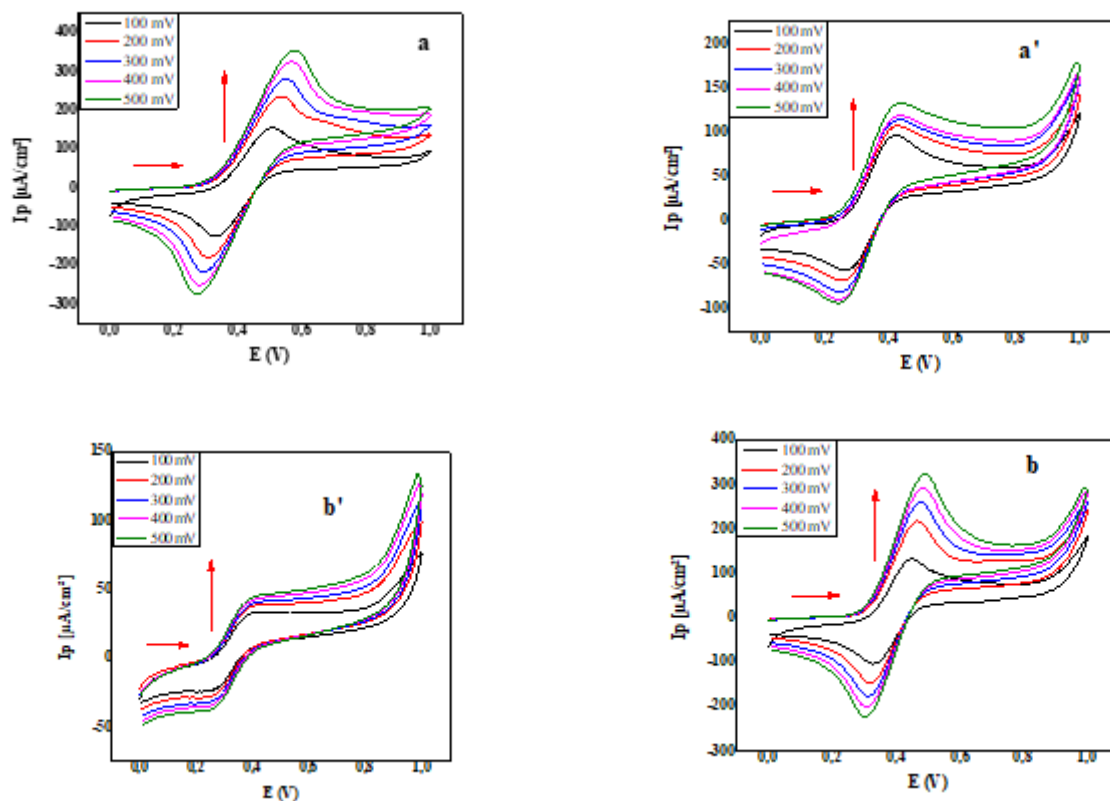


Figure 06 : Succession des voltammogrammes cycliques du dérivé ferrocénique étudié (1mM), en absence d'ADN (a) et de BSA (b), et en présence de 6.67 μM d'ADN (a') et 10.13 μM de BSA (b'), enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 10^{-1} M à pH = 7.2.

Les courants des pics anodiques à différentes vitesses de balayage du potentiel sont tabulés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel et à pH = 7.2.

C (μM) \ / \ \sqrt{v}	FcCH ₃ _ADN		FcCH ₃ _BSA	
	0	6.67	0	10.13
10.00	155.4	95.61	134.3	31.82
14.14	234.8	106.6	220.08	36.61
17.32	280.2	112.9	261.38	39.01
20.00	325.7	120.3	296.18	41.4
22.36	354.1	132.7	324.47	44.59

Pour confirmer davantage l'interaction de composé FcCH₃ avec l'ADN et le BSA, les densités du courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel avant et après l'addition de l'ADN et le BSA, en utilisant

l'équation de Randles–Sevcik (C.M.A. Brett, A.M.O. Brett1993) , figure 06.

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

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.

La figure 07 montre que les coefficients de diffusion des adduits FcCH₃_ADN et FcCH₃_BSA sont toujours inférieur à celui de dérivé ferrocénique non lié.

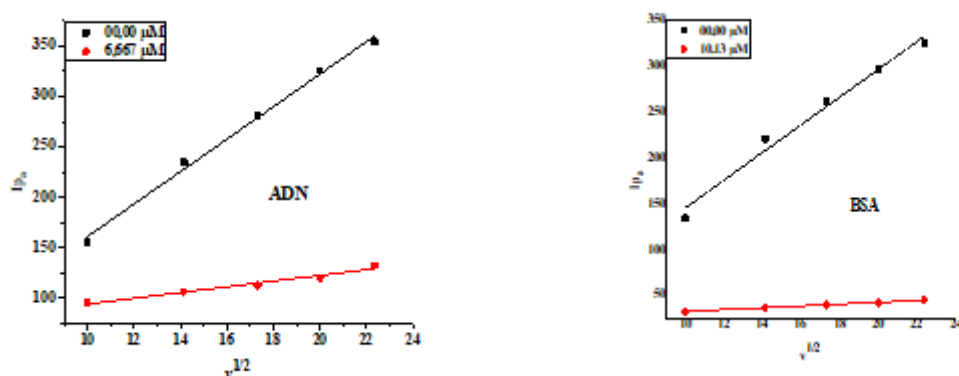


Figure 07: à. Tracé de la densité du courant anodique ip_a en fonction de la racine carrée de vitesse de balayage du potentiel V en présence de 6.67 μM d'ADN et 10.13 μM de BSA à $\text{pH} = 7.2$.

Les coefficients de diffusion sont calculés par la régression linéaire des tracés de la relation $ipa = f(v)$, les coefficients de diffusion sont obtenus à partir de la pente des équations obtenues de régression. Le tableau 1 regroupe les coefficients de diffusion obtenus à $\text{pH} = 7.2$.

Tableau 07 : Valeurs des coefficients de diffusion de dérivé ferrocénique non lié et celles des adduits à $\text{pH} = 7.2$.

Composé	Equation	R^2	D (cm^2 / s)
FcCH ₃	$y = 16.09x + 0.325$	0.992	2.117×10^{-5}
FcCH ₃ _ADN	$y = 2.831x + 66.15$	0.960	6.556×10^{-7}
FcCH ₃	$y = 15.13x - 6.428$	0.978	4.682×10^{-6}
FcCH ₃ _BSA	$y = 0.991x + 22.07$	0.989	2.008×10^{-8}

3. Etude de l'activité anticancéreuse par spectroscopie électronique

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec une macromolécule, l'absorbance et la longueur d'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition de cette dernière. La variation d'absorbance et de longueur d'onde peut être utilisée pour la détermination des paramètres de liaison. Il est bien connu dans la littérature scientifique que les techniques spectroscopiques UV-visible sont particulièrement utilisées pour l'étude de l'interaction des dérivés ferrocéniques avec l'ADN et le BSA en raison de leur couleur intense, ce qui permet les mesures spectroscopiques dans le domaine visible. Pour les dérivés ferrocéniques qui interagissent avec l'ADN ou BSA la constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation de Benesi-Hildebrand suivante (**H. A. Benesi, J H. Hildebrand. 1949**)

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

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

La constante de liaison, K est évaluée à partir du rapport pente/interception du tracé du terme $\frac{A_0}{A - A_0}$ de l'équation précédent en fonction de $\frac{1}{[\text{Mac}]}$.

Dans ce qui suit, les résultats de mesure des constantes de liaison K et des énergies libres de liaison ΔG des adduits $\text{FcCH}_3\text{-ADN}$ et $\text{FcCH}_3\text{-BSA}$ obtenus par la voltammétrie cyclique ont été validés par la spectroscopie électronique.

Ces deux paramètres 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 et BSA.

Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisée par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans une solution 90% éthanol/tampon de phosphate 0.1 M à pH = 7.2, la gamme des longueurs d'ondes balayée était de 350 à 900 nm.

Les spectres électroniques à pH = 7.2 en absence d'ADN et de BSA sont caractérisés, dans la gamme des longueurs d'onde étudiée, par une bande d'adsorption stable et bien définie. La bande d'absorption pour le dérivé FcCH_3 a été apparue à 436.8 nm, la bande d'absorption associée à cette longueur d'onde est égale à 0.52.

La figure 08ci-dessous présente la variation de l'absorbance de dérivé ferrocénique FcCH_3 en fonction de la concentration d'ADN ou le BSA ajoutée. Les spectres électroscopiques représentés dans la figure 3.4 révèlent que quel que soit la portion d'ADN ou de BSA ajoutée, il y a toujours une diminution de l'absorbance moléculaire accompagnée d'un déplacement de

longueur d'onde vers les valeurs les plus faibles.

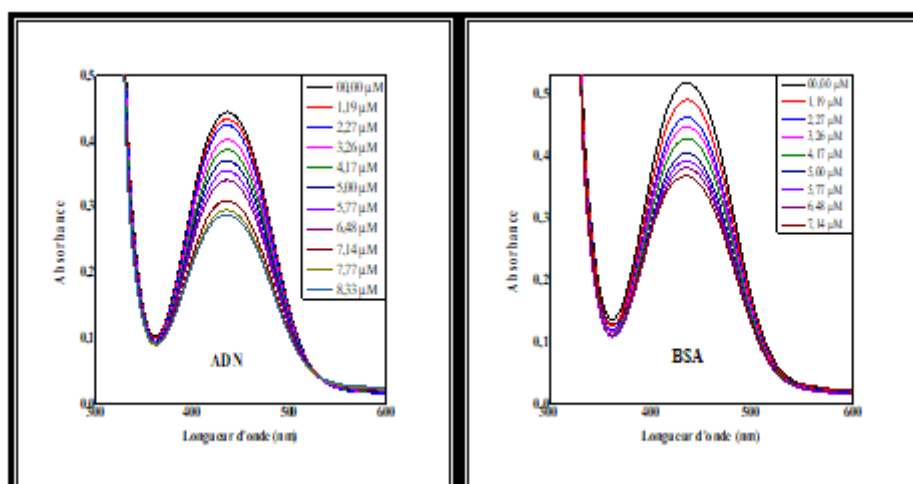


Figure 08 : Spectre électronique des Fc (1mM) en présence de différentes concentrations d'ADN et de BSA dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 10^{-1} M à pH = 7.2.

Les concentrations d'ADN et du BSA ajoutées ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir des spectres électroniques de la figure sont regroupées dans le tableau 1 suivant :

Tableau 08 : Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre d'absorption UV-Vis du Figure08

$[ADN] \mu M$	Abs	$[BSA] \mu M$	Abs
0.00	0.446	0.00	0.521
1.19	0.435	0.43	0.494
2.27	0.425	0.82	0.465
3.26	0.403	1.17	0.452
4.17	0.387	1.50	0.431
5.00	0.373	1.80	0.409
5.77	0.357	2.08	0.396
6.48	0.343	2.33	0.384
7.14	0.311	2.57	0.371
7.76	0.297	--	--
8.33	0.289	--	--

En se basant sur la diminution d'absorbance du dérivé ferrocénique suite à l'addition de différentes concentrations d'ADN ou de BSA (figure 34), la constante de liaison a été évaluée à partir du tracé de $\frac{A_0}{A-A_0}$ en fonction de $\frac{1}{[Mac]}$ selon l'équation citée auparavant. La constante de liaison est calculée du rapport pente/interception.

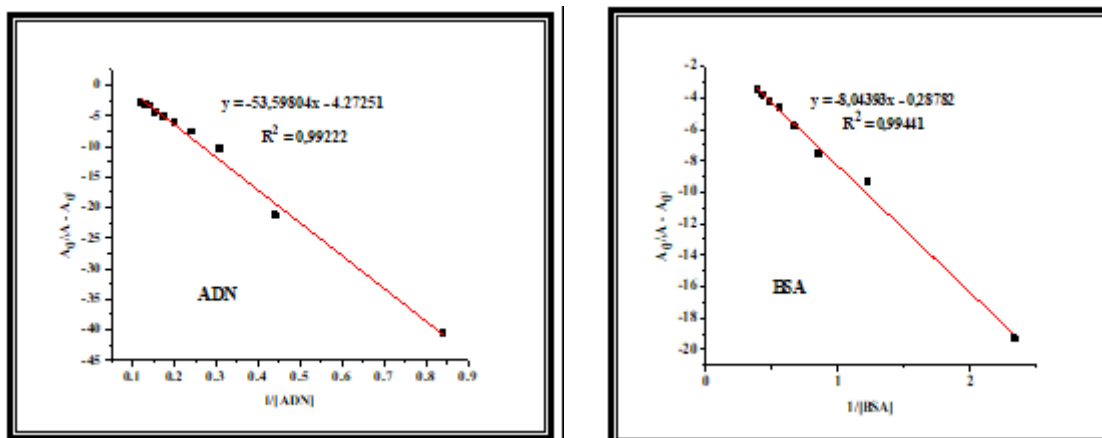


Figure 09 : Tracés de $\frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A-A_0}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l'ADN et le BSA.

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN et le BSA sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Constantes et énergies de liaison calculée à partir du tracé $\frac{1}{[Mac]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A-A_0}$ à pH = 7.2.

Adduit	$\frac{1}{[Mac]}$	$\frac{A_0}{A-A_0}$	Equation	R^2	K (M^{-1})	$-\Delta G$ ($KJ.mol^{-1}$)
<i>FcCH₃_ADN</i>	0.84	-40.55	$y = -53.59x - 4.27$	0.992	7.97×10^4	27.98
	0.44	-21.24				
	0.31	-10.37				
	0.24	-7.56				
	0.20	-6.11				
	0.17	-5.01				
	0.15	-4.33				
	0.14	-3.30				
	0.13	-2.99				
	0.12	-2.84				
<i>FcCH₃_BSA</i>	2.33	-19.30	$y = -8.04x - 0.29$	0.994	3.58×10^4	25.99
	1.22	-9.30				
	0.85	-7.55				
	0.67	-5.79				
	0.56	-4.65				
	0.48	-4.17				
	0.43	-3.80				
	0.39	-3.47				

4. Etude de l'activité anticancéreuse par amarrage moléculaire

L'étude de l'amarrage moléculaire de complexe synthétisé $FcCH_3$ a été ancrée dans la structure 3D de l'ADN et ainsi dans la structure de la protéine de BSA afin de prédire le mode de liaison possible du complexe avec les macromolécules et de mieux visualiser les interactions.

Les études de simulation moléculaire prédisent également le site de liaison sélectionné ainsi que la meilleure configuration de ligand étudié à l'intérieur du récepteur cible.

4.1. Optimisation structurelle

La structure de conformation 3D entièrement optimisée de FcCH_3 est présentée à la Figure10:

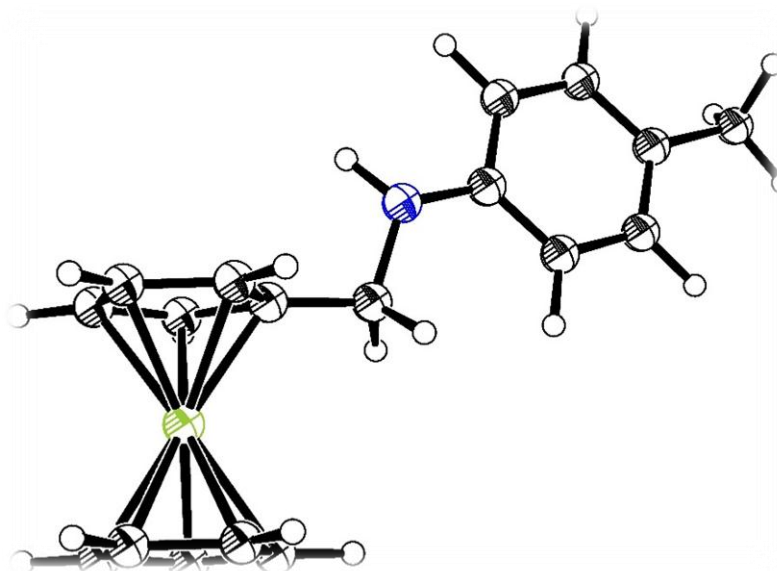


Figure 10 : Représentation ORTEP de FcCH_3 . Les ellipsoïdes de déplacement sont dessinés au niveau de probabilité de 30 % et les atomes H sont représentés sous forme de petites sphères de rayons arbitraires. Les codes de couleur sont : le carbone gris, l'hydrogène blanc, l'azote bleu, et le fer vert.

Les études d'amarrage moléculaire de ligand FcCH_3 a été réalisée sur une structure cristalline tridimensionnelle d'ADN dodécamère (PDB ID : 1BNA) et une structure cristalline tridimensionnelle d'albumine de sérum bovin (PDB ID : 4F5S) ; extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) (Gilles, C et al., 1996).

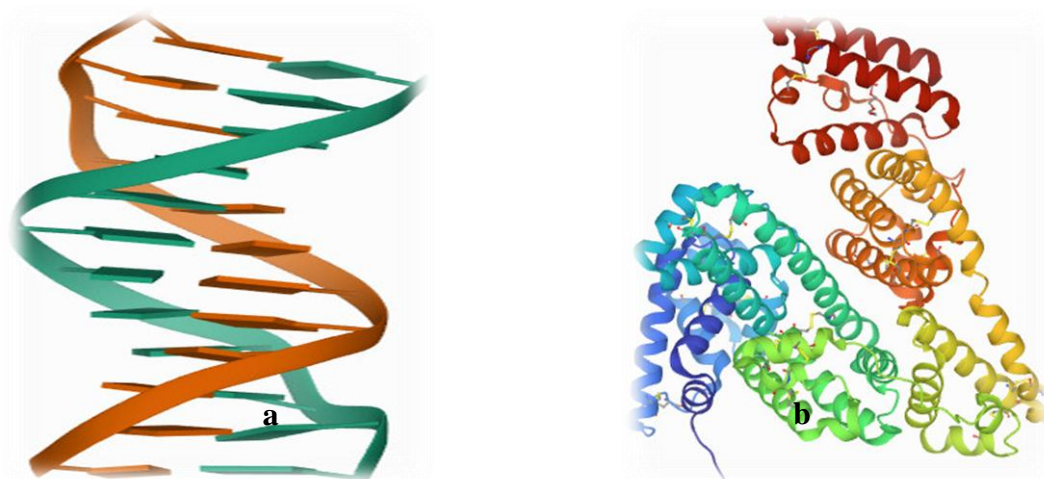


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de l'ADN (PDB ID : 1BNA) (a) et de BSA (b) (PDB ID : 4F5S) téléchargé depuis Protéine Data Bank (<http://www.pdb.org>).

4.2. Simulations d'amarrage

L'amarrage moléculaire a été réalisé afin de prédire le mode de liaison possible de dérivé de ferrocène préparé à l'ADN et BSA et de visualiser davantage les interactions. Avant d'effectuer les calculs d'amarrage, toutes les molécules d'eau cristallographiques ont été retirées de la structure cristalline du récepteur, des atomes d'hydrogène ont été ajoutés et des charges partielles ont été attribuées au fichier de structure de la macromolécule. Les énergies libres de liaison, les constantes de liaisons résultantes des adduits ancrés FcCH₃_ADN et FcCH₃_BSA est résumée dans le Tableau 10.

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

Adduits	K (M^{-1})	$-\Delta G$ ($KJ.mol^{-1}$)
FcCH ₃ _ADN	8.06×10^4	28.01
FcCH ₃ _BSA	4.13×10^4	26.35

La vue de l'interaction présentée dans la Figure 12 indique le positionnement des complexes étudiés dans le site actif de la protéine.

De plus, les résultats d'amarrage de FcCH₃ avec l'ADN et le BSA ont clairement montré la formation des liaisons électrostatique (Figure 12) entre le ligand étudié et les récepteur cibles.

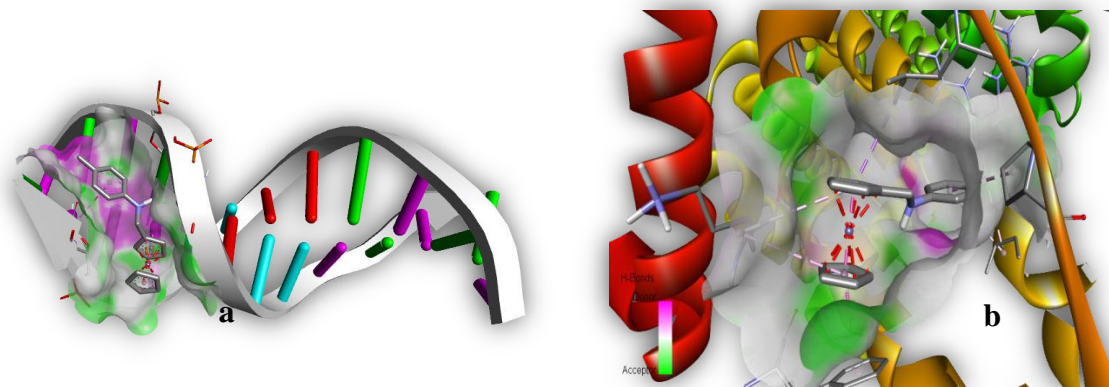


Figure 12: Poses d'amarrage de FcCH₃ avec l'ADN (a) et avec le BSA (b) illustrant l'interaction de tous les adduits.

Dans le cas de l'ADN le ligand FcCH₃ forme deux liaisons hydrogène, un est entre l'atome d'oxygène du DA17 et l'hydrogène de la fonction méthyl de FcCH₃, l'autre est entre l'atome d'azote du ligand et le DG23, (Figure12).

Dans le cas du BSA le ligand FcCH₃ forme une seule liaison hydrogène, entre l'atome d'azote de FcCH₃ et l'acide Tyrosine numéro 160 (TYR160) (chaîne A), (Figure 12b).

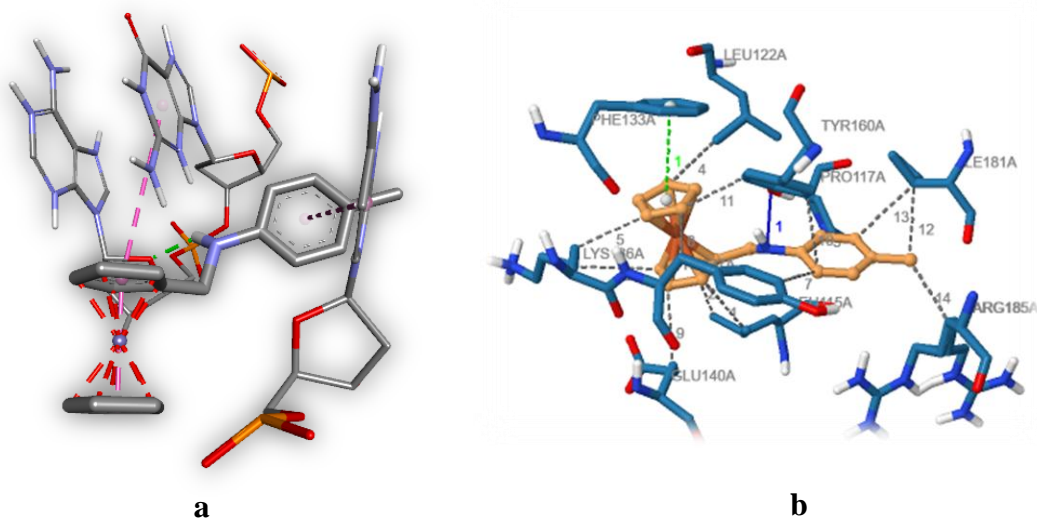


Figure 13: Liaisons électrostatiques entre le ligand étudié et les acides aminés et les bases nucléiques. (Les lignes en gris montrent les liaisons hydrophobiques, les lignes bleu indiquent les liaisons hydrogènes).

La distance entre des liaisons hydrogène sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Longueur des liaisons hydrogène formées entre le ligand étudié l'ADN et le BSA.

<i>ADN</i>			
<i>Résidu</i>	<i>BN</i>	<i>Distance H-A</i>	<i>Distance D-A</i>
17A	DA	2.13	3.02
23A	DG	2.15	2.99
<i>BSA</i>			
<i>Résidu</i>	<i>AA</i>	<i>Distance H-A</i>	<i>Distance D-A</i>
160A	TYR	2.12	3.09

Les valeurs des énergies libres et des constantes des liaisons obtenues expérimentalement par CV et UV-Vis sont comparées avec celles obtenues par amarrage moléculaire, tableau 1.

Tableau 12 : Comparaison des constantes (M^{-1}) et énergies libres de liaison ($KJ.mol^{-1}$) déterminées à pH = 7.2 avec celles obtenus par amarrage moléculaire

Méthodes Adduits	CV		UV		Amarrage moléculaire	
	K	$-\Delta G$	K	$-\Delta G$	K	$-\Delta G$
FcCH ₃ _ADN	1.04×10^5	28.65	7.97×10^4	27.98	8.06×10^4	28.01
FcCH ₃ _BSA	4.84×10^4	26.75	3.58×10^4	25.99	4.13×10^4	26.35

Discussion

Notre étude a pour but d'évaluer l'activité biologique du dérivé N ferrocénylméthylméthylaniline (FcCH₃), qui est un dérivé ferrocénique synthétisé à partir de la réaction du sel quaternaire et le méthyl aniline. D'après littérature les dérivés ferrocéniques ont une capacité d'interagit avec l'acide désoxyribonucléique (**Gasser, G, et al., 2011 et Muhammad Khawar, R, et al., 2015**) comme avec l'albumine de sérum bovin (**Adaika, A et al., 2021 et Lanez, E., 2019**). L'interaction entre le FcCH₃ avec l'ADN et le BSA 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.

In silico, l'étude de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et la macromolécule ciblée révèle que le dérivé ferrocénique interagit avec l'ADN et le BSA d'une façon spontanée traduit par la valeur de l'énergie libre ($\Delta G = -28.63$ et -27.09) (**Friedli, C., 2002 et Infelta, P., Graetzel, M., 2006**). En effet, le dérivé ferrocénique se lie à l'ADN en formant 2 liaisons hydrogènes et avec le BSA par la formation d'une seule liaison hydrogène 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-ferrocénylméthylméthylaniline considéré théoriquement comme un anticancéreux potentiel. Nos résultats sont 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 comme avec le BSA.

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 ou de BSA donne une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -27.9$) cela indique la spontanéité de la réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN et BSA par une interaction physique (**Friedli, C., 2002 et Infelta, P., Graetzel, M. 2006**). Le spectre électronique du dérivé ferrocénique révèle que quel que soit la portion d'ADN ou de BSA 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 ou à la BSA par intercalation (**Can, et al., 2014**).

L'étude par méthode électrochimique de l'interaction de FcCH₃ et l'ADN ou bien le BSA montre que la valeur de l'énergie libre est négative ($\Delta G = -28.9$) et moins de 30 KJ/mol, ce qui confirme que l'interaction de dérivé ferrocénique avec ces macromolécules se fait spontanément par interaction physique.

D'ailleurs, Lorsque l'ADN est ajouté à une solution de FcCH₃, une diminution de courant de pic anodique est remarquée 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 FcCH₃ à la masse de macromolécules (**Altaf, A.A, et al., 2016**).

Nos résultats montrent que la forme réduite du 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 FcCH₃ avec l'ADN et le BSA, la représentation linéaire du pic des courants de FcCH₃ 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 ou de BSA est inférieur à celle du FcCH₃ libre cela peut être due à la formation d'adduits FcCH₃_ADN et FcCH₃_BSA 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 antérieures. En effet, le coefficient de diffusion de FcCH₃ libre est plus que le FcCH₃ lié.

Conclusión general

Conclusion générale

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

L'objectif de notre thèse est l'évaluation *in vitro*, *in silico* de l'activité anticancéreuse des dérivés N-ferrocénylméthylméthylaniline,

Les résultats suggèrent que les techniques électrochimiques peuvent Dans cette étude nous avons étudié l'interaction de dérivés Ferrocénique avec de l'ADN et la BSA par deux méthodes de mesures spectroscopique UV-Visible et électrochimique. Ces deux méthodes, montrent une variation dans les valeurs de la constante de liaison ainsi les valeurs de l'énergie libre de Gibbs et la taille de site d'interaction. Cependant, les valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs indiquent la spontanéité de l'interaction de ces dérivés avec l'ADN et la BSA. En outre, les résultats de l'interaction entre la BSA et les dérivés synthétisés indiquent que ces derniers pourraient être distribués et transportés *in vivo*, nous pourrions dire que ces composés peuvent être des bons candidats des produits antitumoraux.

L'étude *in silico* confirme les résultats obtenus *in vitro* et que montrent que ces dérivés possèdent une activité antimutagène en se lient à l'ADN et la BSA par intercalation ou par liaison électrostatique (généralement non spécifique) avec la structure chargée négativement d'acide nucléique sucre-phosphate et l'interaction de liaison avec le petit ou le grand sillon d'ADN.

Être utilisés avec succès pour la détermination du mécanisme des réactions d'oxydo-réductions. Le mécanisme d'action proposé pour les composés biologiquement importants devrait fournir des idées profondes dans la compréhension des voies mécanistiques inexplorées par laquelle ces médicaments exercent leur action biochimique.

*Références
bibliographiques*

- ✚ **Acevedo-Morantes, C. Y. Meléndez, E. Singh, S. P & E Ramírez-Vick, J. (2012).** Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines, *J Cancer Sci Ther*, 4.9.
- ✚ **Adaïka A. (2016).** Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxorubicine avec de l'ADN, Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED., Algérie, 90p.
- ✚ **Adaïka A. (2016).** Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxorubicine avec de l'ADN., Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED., Algérie, 90p.
- ✚ **Afzal S. (2010).** Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electroactive Compounds., Quaid-i-Azam University Islamabad., these du doctorat., p 60-61.
- ✚ **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002).** Cancer treatment: present and future. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* Garland Science.
- ✚ **Altaf, A.A., Lal, B., Khan, N. Badshah, A., Ullah, Sh., Akbar, K. (2016).** Spectroscopic, Electrochemical, and In Silico Characterization of Complex Formed between 2-Ferrocenylbenzoic Acid and DNA, *Journal of Chemistry*, Vol 2016 (2016), Article ID 7468951, 8 p. doi.org/10.1155/2016/7468951.
- ✚ **Amarani, F. (2017).** Cours de Génétique moléculaire. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. p11.
- ✚ **Amzazi, S. (2006).** Les Acides Nucléiques., Élément : Biochimie structurale semestre 3, Université Mohammed V-Agdal, p10.
- ✚ **Appel, M. A. (2015).** Ring Rotation in Ferrocene and Ferrocene-containing Polymers.
- ✚ **Arrault A.** Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données : Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat en Modélisation Moléculaire Et Chimie Informatique. Université d'Orléans. France. 2007. 190 p.
- ✚ **Arter DC, Ho J X.** Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994,45:153–203. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60640-3)
- ✚ **Audigie Cl., Dupont G., Zonszain F. (1992).** Principes des méthodes d'analyse biochimique Tome 2. Doin éditeurs-Paris. 173p.
- ✚ **Baguley B. C. (1982).** Non intercalative DNA-binding antitumor compounds. *Mol. Cell Biochem.* 43, 167-181.

Références bibliographiques

- ✚ **Bao-xian, ye., Cui-hong Wang., Ai-hua, Jiang. (2003).** interaction of the anticancer Drug 8-Azaguanine with DNA *Journal of the Chinese chemical Society* 50, 457-464.
- ✚ Barama, A. Coppinc, A. Mortuairec, M. Pelinskia, L. Tomavoc, S. & Brocarda, J. (2006). Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 1294-1302.
- ✚ Beagley, P. Blackie, M.A. L. Chibale, K. Clarkson, C. Meijboom, R. Moss, J.R. Smith P. J. & Su, H. (2003). Synthesis and antiplasmodial activity in vitro of new ferrocene chloroquine analogues. *the royal society of chemistry*, 3046-3051.
- ✚ Bechki, M. K. (2012). Etude de comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanole et nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- ✚ Benabdesselam, S. (2017). Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par l'arylation de ferrocène. *Doctorat ès sciences, Université Kasdi Merbah, Ouargla, p61.*
- ✚ Bioud, M et Lassoued, N. (2015). Schéma D'élaboration d'une Molécule à Visée Thérapeutique et Application Biologique .Mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine. P10
- ✚ Bouchagra S. Modélisation des interactions protéine-petites molécules : Etude de la relation structure-fonction dans le cas des lipases. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Bioorganique : Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie. 2018. 145 p.
- ✚ Boudebja, O., & Boutera, S. (2017). Evaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane.
- ✚ Bremner, *The American journal of clinical nutrition*. 1998, 67, 1069S.
- ✚ C.M.A. Brett, A.M.O. Brett. *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications, Oxford, 1993.
- ✚ C.M.A. Brett, A.M.O. Brett. *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford Science University Publications, Oxford, 1993.
- ✚ C.N.R. Rao, *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*, 1967, Butterworths, London.
- ✚ Can, Ozluer., Hayriye, Eda., Satana, Kara. (2014). Approche Electrochimical 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.

Références bibliographiques

- ✚ Cattle R. C., & Radinsky B. R. (2004). Cancer Therapeutics: Understanding the Mechanism of Action. *Toxicologic Pathology*, 32(1_suppl), 116–121.
- ✚ Cavarelli J. Biocristallographie : De la détermination des phases à la structure cristallographique. *Technique de l'ingénieur*. [En ligne] <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/chimie-pharmaceutique-42609210/biocristallographie-p1111/base-de-donnees-pdb-p1111v2niv10008.html>. Consulté le : [12/05/2020].
- ✚ Chabbi A., Nabti K. Etude in silico de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la chitinase fongique. Mémoire de Master en Phytopathologie et phytopharmacie : Université 8 Mai 1945 Guelma. Algérie. 2017. 49 p.
- ✚ Chavain, N. (2008). Conception, synthèse, analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de ferroquine. Thèse de doctorat. Université de Lille I. P11-12.
- ✚ chemspider (2021). Ferrocene | C10H10Fe | ChemSpider . Retrieved 4 May 2022, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7329.html>
- ✚ Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Tang Y. 2012. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012, 52, 3099–3105.
- ✚ Chennouf, F. (2011). thèse de magister, L'influence de la chaleur sur l'ADN, niversité mentouri Constantine, faculté des sciences exactes, département de physique, 103p.
- ✚ D.H. Andrews, *Physical Review*. 1930, 36, 544.
- ✚ Daina A., Michielin O., Zoete V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7, 42717.
- ✚ Dar A. M., Mir S. Molecular Docking : Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2017 ; 8 (2) : 356. doi : 10.4172/2155-9872.1000356.
- ✚ Dias R., Filgueira de Azevedo Jr W. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, 2008, 9 (12): 1040-1047. doi: 10.2174/138945008786949432.
- ✚ Doss C. G. P., Chakraborty C., Narayan V., Kumar D. T. Computational Approaches and Resources in single Amino Acid Substitutions Analysis Toward Clinical Research. *Avances in Protein Chemistry and Structural biology*. 2014 ; 94 : 1876-1623. doi : 10.1016/B978-0-12-800168-4.00010-X.
- ✚ Dubar, F. Khalife, J. Brocard, J. Dive, D. & Biot , C. (2008). Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug Thoughts on the Mechanism of Action, *Molecules*, 13:2900-2907.

Références bibliographiques

- ✚ El Hadj Said K. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de Master en Chimie Organique : Université de Tlemcen. Algérie. 2016. 50 p.
- ✚ Figge J, Rossing TH, Fencel V. The Role of Serum-Proteins in Acid-Base Equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* 1991, 117: 453–467.
- ✚ Forli S., Huey R., Pique M. E., Sanner M. F., Goodsell D. S., Olson A. J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols.* 2016 ; **11** (5) : 905-919 · doi : 10.1038/nprot.2016.051.
- ✚ Fouda, M. F. R., Abd-ElZaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007) . On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*, 21: 613–625.
- ✚ Friedli, C. (2002). Chimie générale pour ingénieur, PPUR presses polytechniques, 747p.
- ✚ G.M. Keseru.D.K. Menyhárd, *Biochemistry.* 1999, 38, 6614.
- ✚ Gaelle Lenglet. (2010). Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. Human health and pathology. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010.French. <NNT : 2010LIL2S048>. <tel-00703474>.
- ✚ 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.
- ✚ Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011). “Organometallic anticancer compounds,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 3–25.
- ✚ Gassier, J., Morel-Haziza, C. (2003). Biologie-Microbiologie-Nutrition-Alimentation BEP Carrières sanitaires et sociales/CAP Petite enfance, Elsevier Masson, 310p.
- ✚ Ghallab, R. (2014). Synthèse et étude structurale par diffraction des rayons X de nouveaux ligands ferrocéniques et leur complexation avec le palladium.
- ✚ Ghouti M., Halbigue H. Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites. Mémoire de Master en Génie Pharmaceutique : Université de Djilali Bounaama. Khemis Miliana. Algérie. 2019. 46 p.
- ✚ Gilles, C., Polette, M., Piette, J. et al. (1996). High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cell. *Int J cancer* 65: 209-213.
- ✚ **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 Paris Tech*, 2010. Français, 244p.

Références bibliographiques

- ✚ 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.
- ✚ Guedes I. A., de Magalhães C. S., Dardenne L. E. Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical reviews*. 2014 ; **6** (1) : 75–87. doi : 10.1007/s12551-013-0130-2.
- ✚ **Gulam, F. M., Manohar, V. L. (2014)**. Synthesis of ferrocene based organometallic compounds and antimicrobial activity. *Journal of applied chemistry*. 7: 27-32
- ✚ H. A. Benesi, J H. Hildebrand. *Journal of the American Chemical Society*, 1949, (71), 2703-2707. doi: 10.1021/ja01176a030.
- ✚ **Hanzab, N., Houas, M. (2013)**. Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocenyl-2- nitrobenzène mono et bis-substitué., mémoire du master académique, Université Kasdi Marbah Ouargla., Algérie, 24p.
- ✚ Hanzab, N., Houas, M. (2013). Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocenyl-2- nitrobenzène mono et bis-substitué. mémoire M. UNIVERSITE KASDI MARBAH OUARGLA. P01.
- ✚ Hausen H. (2006). *Infections causing human cancer* Weinheim: Wiley-VCH; Chichester: John Wiley).
- ✚ Hemmami, H.(2017). Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl)nitroaniline. Thèse de doctorat en chimie, Université Echahid Hamma Lakhdar, ELOUED, p13.
- ✚ Hennings H., Glick AB., Greenhalgh DA, et al. (1993). Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1993;202(1):1-8.
- ✚ Hetényi; U. Maran.M. Karelson, *Journal of chemical information and computer sciences*. 2003, 43, 1576.
- ✚ Infelta, P et Graetzel, M. (2006). *Thermodynamique : principes et applications*, Universal-Publishers, 488p.
- ✚ J.C. Boeyens, The conformation of six-membered rings, *Journal of Crystal and Molecular Structure*. 8 (1978) 317–320.
- ✚ J.C.A. Boeyens. *J. Phy. Chem. Hhaca*. 1967, 71, 2969.
- ✚ Jade D. D., Gupta D. Introduction to methods for molecular docking and HT virtual screening. 2016. doi : 10.13140/RG.2.2.12322.84167.
- ✚ Jegham, H.(2009) .étude de l'activité biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux., université lavalquébec, p16-17.

Références bibliographiques

- ✚ Khelef, A.; Lanez, T. et Terki, B. (2012). Etude structurale d'amide N-phényl-N-éthanoyl ferrocénylméthylamine. 1st International Days of Organometallic Chemistry and Catalysis JICOC. (24-31).
- ✚ Khurana S., Dubey ML., Malla N. (2005). Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol.* 23(2):749.
- ✚ Kotz, J., Treichel, P., Townsend, J. (2008). *Chemistry and Chemical Reactivity*, seventh edition, vol 2, 800p.
- ✚ LANEZ, E. (2016). Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de master. Université Mohamed Khider – Biskra.
- ✚ LANEZ, E. (2016). Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de master. Université Mohamed Khider – Biskra.
- ✚ Lebbad F. Etude par modélisation moléculaire des mécanismes de complexation. Thèse de doctorat en Chimie Théorique et Modélisation moléculaire. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 2016. 96 p.
- ✚ Liu C.Y., Chang H.S., Chen I.S., Chen C.J., Hsu M.L., Fu S.L., Chen Y.J. (2011). Radiat. Oncol. 6, 56–63. In Lin X., Peng Z., & Su C. (2015). Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. *International journal of molecular sciences*, 16(5) : 10888-10906.
- ✚ Masoom Y. (2015). Antileishmanial, DNA Interaction, and Docking Studies of Some Ferrocene-Based Heteroleptic Pentavalent Antimonials. *Chem. Med.* 349, 50–62. DOI: 10.1002/ardp.201500312.
- ✚ Medellel, S., & Tedjani, A. (2017). Synthèse et étude in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline.
- ✚ Mezhoud K. Doking Principes et Méthode. – Ubuntu wiki [En ligne] <https://wiki.ubuntu.com/kmezhoud/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=docking.pdf>. Consulté le [10/05/2020].
- ✚ Monserrat, J. P. (2012). Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocéniques des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). P
- ✚ Morris G. M., Lim-Wilby M. Molecular Docking. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2008 ; 443 : 365–382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- ✚ Neghmouche, NS., Khelef, A. et Lanez, T. (2010). Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 01(76-82)

Références bibliographiques

- ✚ Olivier. M.-G. (2009). Electrochimie et applications. EDITION 2009. p11.
- ✚ P. Hohenberg and W. Kohn. Phys. Rev., 1964, 136, B846.
- ✚ Pairon, J-C.(2015) Génotoxicité et Cancérogenèse. Université Paris Est Créteil. Décembre 2015.
- ✚ Parr. R. G. and Yang. W. « Density Functional Theory », Oxford University Press, (1989).
- ✚ Priyanka Banerjee, Andreas O Eckert, Anna K Schrey and Robert Preissner. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2; 46 (Web Server issue): W257–W263. (Doi: 10.1093/nar/gky318).
- ✚ R.H. Holm; P. Kennepohl.E.I. Solomon, Chemical Reviews. 1996, 96, 2239.
- ✚ R.S. Mulliken, J. Phys. Chem. 1952, 56 (801), 53.
- ✚ Rapin, D. (2006). Utilisation d'une puce OLISA pour la caractérisation d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN dans des lysats cellulaires : mise au point de la technique de révélation par colorimétrie. . Thèse de doctorat. Université de JOSEPH FOURIER. P09.
- ✚ **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.
- ✚ Royal et al. (2008); Yakymenko et al (2010). Effects of low level radiation-what's new? Semin Nucl Med. • 38(5):392-402.
- ✚ S Top, J Tang, A Vessières, D Carrez, C Provote, G Jaouen (1996). Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. Chem Commun 1996, 955–956.
- ✚ S. Bernard et al. Techniques expérimentales en Chimie, Dunod, 2012.
- ✚ Sansook, S. (2017). Biological Evaluation of Ferrocene Derivatives. Doctorat thesis. University of Sussex. P06-09.
- ✚ **Shafqat, A., Ghulam, Y., Zareen, Z., Zhanpeng, W., Ian, S. B., Badshah, A.,Imtiaz, U. D. (2015)**. Ferrocene-Based Bioactive Bimetallic Thiourea Complexes: Synthesis and Spectroscopic Studies. Bioinorganic Chemistry and Applications. Doi: org/10.1155/2015/386587
- ✚ **Shati A. A., Alkahtani M. A., Alfaifi M. Y., Elbehairi S. E. I., Elsaid F. G., Prasanna R., & Mir M. A. (2020)**. Secondary Metabolites of *Saussurea costus* Leaf Extract Induce Apoptosis in Breast, Liver, and Colon Cancer Cells by Caspase-3-Dependent Intrinsic Pathway. BioMed Research International, 2020.

Références bibliographiques

- ✚ Skoog, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (2003). Principes d'analyse instrumentale, De Boeck Supérieur, 956p.
- ✚ 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.
- ✚ Souyel B. Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Mémoire de Master en Chimie Organique Analytique : Université d'EL-Oued. Algérie. 2015. 94 p.
- ✚ Sultandyo N. (2010). Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones*, 42(1):36-42.
- ✚ Swynghedauw, B., Silvestre, J-S. (2008). Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires, 3ème édition, Paris : DUnod, p21-22.
- ✚ T. Magali, thèse de doctorat, Université de Montpellier I, U.F.R.DE Medecine, France 2004.
- ✚ 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.
- ✚ Terki, B. (2007). Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl-N'alkylferrocenyl méthyle hydrazide. Thèse de doctorat. Université de Hadj Lakhdar-Batna. P06.
- ✚ 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.
- ✚ Tsai J., Jeng J., Ho M., et al. (1997). Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 1997; 76 : 968–74.
- ✚ Tubiana M. Généralités sur la cancérogenèse, Volume 752, Issue 2, 02/2007, Pages 101-178, ISSN 1631-0691.
- ✚ W.B. Persons, R.S. Mulliken. *Molecular CT complexes; a lecture and reprint volume*, 1969, Wiley, New York.
- ✚ Walker, N., & Stuart, D. (1983). *Actu Crystallogr. Sect. A*, 39, 158.
- ✚ Wei, C-W., Peng, Y., Zhang, L., Huang, Q., Cheng, M., Liu, Y-N. & Li ,J.(2011).Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as aninhibitor of Alzheimer's A β -fibril formation in vitro, *inorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 5818–5821

Références bibliographiques

- ✚ William, S., Klug, W. S., Michael, R., Cummings, M. R. et Spencer, C. A. (2006). Génétique 8^{ème} édition. Nouveaux horizons. P255.
- ✚ X. Fu, D. Liu, Y.Lin, W. Hu, Z. Mao and X. Le, (2014). Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA **interactions** *Dalton Trans.*, DOI: 10.1039/C3DT53577K.
- ✚ Zayya, I. A.; Jonathan Singh, J. and Spencer, J. L. (2013). Synthesis and Reactions of Ferrocene. Chemical and Physical Sciences.
- ✚ Zerari, A. (2013). Synthèse, séparation et identification de M-Nitrophenylferrocène mono et bis-substitué. Mémoire master. Université Kasdi Marbah Ouargla. P02