



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

### THEME

**Etude in vitro et in silico de l'activité cytotoxique et antibactérienne des dérivés N-ferrocenylmethyl-3-fluoromethylaniline**

Présenté par :

- ✓ Ghania fatma
- ✓ Khouni kaouther
- ✓ Ouellabi soumaia

Devant le jury composé de :

	Membre de jury	Grade	Université
Président	Mr. MEDJOUR Abdelhak	M.A.A	Université d'El Oued
Examinatrice	Mme. GEMOUDA Messaouda	M.C.A	Université d'El Oued
Promotrice	Mme. ADAIKA Aicha	M.A.A	Université d'El Oued



## **Remerciement**

*Nous rendons grâce à Allah le Tout puissant de nos avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout. À notre encadreur de mémoire Mme. **Adaïka Aïcha** Docteur chercheur au laboratoire de valorisation et technologie des ressources saharienne, pour avoir accepté de nous encadrer et pour son dynamisme, nous a permis d'avancer plus loin dans nos recherches, votre rigueur scientifique, votre grande générosité et votre détermination pour la recherche et l'enseignement sont connus de tous et font de vous un exemple exceptionnel. Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de nos plus profonds respects et notre entière reconnaissance.*

*. Nos remerciements s'adressent aussi à tous les personnes du laboratoire VTRS surtout Dr. **ZeghebNadjiba**, Dr. **Lanez El-hafnaoui**. Et aussi nous adressons nos remerciements le directeur de laboratoire el medjed Zaoui Hamza. Nous n'oublions pas nos techniciens de laboratoire el medjed et surtout **Chenna djahd**, **Kedadra Abdellatif**, **Guezgouz Meriem** de ces qualités humaines et ces soutiens. Nous remercions nos collègue et amies pour leur soutien et plus précisément: **Tir Nassima**, **Nesba Safa**, nous tenons à exprimer notre grand respect à eux. A tout le personnel administratif et technique de la faculté de la nature et de la vie et science et technologie. Université d'El-Oued. A toute nos familles. Mercie pour votre soutien et vos encouragements, à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail. Trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.*

*Très cordialement*





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon père , pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé*

*A ma mère, pour son amour ,ses encouragements et ses sacrifiées*

*A mes chers frères et mes sœurs qui sont toujours à mes cotés*

*Aux fleurs de la maison oumaïma, bouchret el Rahman, chahd, moubarek*

*A ma tante et sa famille*

*A ma trinôme fatma et soumia*

*A tous ceux qui m'aime et ont donné tout pour encourager cette année*

*A tous les étudiants de notre promotion de biochimie appliquée*

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

*Merci*

*Kaouthier*





## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*À ma chère mère HemmadiDjabaria:*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager et prie pour moi durant toutes les années de mes études.*

*À mon cher père OuellabiMouhammed.*

*À mes chères amies Tír Nassima, Nesba Safa.*

*À mes chères frères Aïssa, Moussa, Djaafar, Rabie.*

*À tous ceux qui me sont chers et à tous ceux qui m'aiment.*

*Merci.*



*Soumaia*



*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma chère mère Ghendîr Moufîda, pour son amour, ses encouragements.*

*A mon père.*

*A mon mari Laïche et notre chères enfants Bouchra Ouïssal et Ahmed.*

*A mes sœurs Radjia, Haïfa, Bechîra, Nour elîslam, Nour elyakîn.*

*A mon frère Abdel moez.*

*A mes chères petits Dhîkra, Amor, Abdelmohaïmen, Doua,*

*Iyad.*

*Merci.*

*Fatma*



# *Résumé*

## Résumé

Le dérivé de ferrocène a une activité biologique élevée, ce qui lui permet d'être désigné comme antibiotique potentiel. Cependant, pour valider son utilisation, il est nécessaire de suivre ses effets secondaires et sa cytotoxicité

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de la N-Férocénylméthyl 3-fluorométhylaniline in silico et in vitro.

Les résultats ont montré in silico en évaluant les propriétés physico-chimiques et la pharmacocinétique du dérivé du ferrocène via le serveur web swiss ADMT qui montre une réponse à la base de Lipniski et Veber en raison de la solubilité et de la facilité d'absorption du dérivé. En revanche, le serveur Web protoxII confirme que le dérivé ferrocénique n'est pas toxique comparable avec la gentamycine. Cependant,

Le Docking moléculaire a montré une interaction entre le dérivé et de la protéine membranaire d'Escherichia coli pas des liaisons électrostatiques entre les acides aminés de la protéine et les ligands étudiés.

En outre, les résultats de l'étude antibactérienne in vitro contre les souches bactériennes Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa et Klebsilla pneumonia ont montré que les zones d'inhibition ainsi que l'absorptivité moléculaire par spectroscopie UV-Vis augmentent chez Escherichia coli avec l'augmentation de la concentration du dérivé. En revanche, nous avons observé une résistance envers les autres souches cela est expliqué par l'absence des zones d'inhibition comparé avec la gentamycine, nous pouvons alors conclure que ce dérivé peut être un candidat antibiotique en complétant ce travail par la détermination de CMI et CMB et la synergie avec des autres antibiotiques

**Mot clés :** ferrocène, activité antibactérienne,docking, E.coli, spectroscopie UV-Vis, swiss ADMT, protoxII.

## ملخص

يملك مشتق الفيروسين نشاط بيولوجي عال، مما يسمح بتعيينه كمضاد حيوي محتمل، ومع ذلك للتحقق من صحة استخدامه، من الضروري مراقبة آثاره الجانبية وسميته الخلوية. الهدف من دراستنا هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لـ *N-Férocénylméthyl 3-fluorométhylaniline* حاسوبيا وفي المختبر

أظهرت النتائج حاسوبيا من خلال تقييم الخصائص الفيزيائية والكيميائية والحركية الدوائية لمشتق الفيروسين من خلال خادم الويب *swissadmt* والذي أظهر استجابة لقاعدة *Lipinski* و *veber* نظرا لقابلية الذوبان وسهولة امتصاص المشتق من ناحية أخرى، أكد خادم الويب *protoxII* إن مشتق الفيروسين ليس ساما عند مقارنته مع الجنتاميسين

ومع ذلك، أظهر الالتحام الجزيئي تفاعلا بين المشتق والبروتين الغشائي لـ *E.coli*، وليس الروابط الكهروستاتيكية بين الأحماض الأمينية للبروتين والرابط المدرسة. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت نتائج الدراسة المضادة للبكتيريا في المختبر ضد السلالات البكتيرية *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* مناطق التثبيط وكذلك الامتصاص الجزيئي بواسطة التحليل الطيفي *uv-vis* يزيد في *E.coli* مع زيادة تركيز المشتق.

من ناحية أخرى لاحظنا مقاومة السلالات الأخرى ويفسر ذلك بغياب مناطق التثبيط مقارنة بالجنتاميسين. ويمكننا بعد ذلك ان نستنتج ان هذا المشتق يمكن ان يكون مرشحا للمضادات الحيوية من خلال اكمال هذا العمل عن طريق تحديد *MIC* و *CMB* والتأزر مع مضادات حيوية اخرى

**الكلمات المفتاحية:** الفيروسين، النشاط المضاد للجراثيم، الالتحام، التحليل الطيفي للأشعة المرئية وال فوق بنفسجية، *protoxII*, *swissadmt*

## Summary

The ferrocene derivative has a high biological activity, which allows it to be designated as a potential antibiotic. However, to validate its use, it is necessary to monitor its side effects and its cytotoxicity.

The aim of our study is to evaluate the antibacterial activity of N-ferrocenylmethyl 3-fluoromethylaniline in silico and in vitro.

The results showed in silico by evaluating the physico-chemical properties and pharmacokinetics of the ferrocene derivative through the swissADMT web server which shows a response to the basis of Lipinski and Veber due to the solubility and the ease of absorbing the derivative. On the other hand, the web server protoxII confirms that the ferrocene derivative is not toxic comparable with gentamicin. However, Molecular docking showed an interaction between the derivative and the membrane protein of Escherichia coli not electrostatic bonds between the amino acids of the protein and the ligands studied.

In addition, the results of the in vitro antibacterial study against the bacterial strains Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Klebsilla pneumonia showed that the zones of inhibition as well as the molecular absorptivity by UV-Vis spectroscopy increase in Escherichia coli with increasing the concentration of the derivative. On the other hand, we observed a resistance towards the other stocks this is explained by the absence of the zones of inhibition compared with the gentamicin, we can then conclude that this derivative can be an antibiotic candidate by supplementing this work by the determination of CMI and CMB and synergy with other antibiotics.

**Keywords:** ferrocene, antibacterial activity, docking, E. coli, UV-Vis spectroscopy, swissADMT, protoxII,

## Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	La structure de résonance proposée par Kealy et Pauson	06
Figure 2	La structure du ferrocène proposée par Wilkinson et ses collaborateurs	06
Figure 3	Ferrocène sous forme de poudre orange	07
Figure 4	Structure cristalline de ferrocène	07
Figure 5	Structure correcte de ferrocène	08
Figure 6	Spectre IR de ferrocène	10
Figure 7	Spectre RMN $^1\text{H}$ de ferrocène	10
Figure 8	Spectre RMN $^{13}\text{C}$ de ferrocène	10
Figure 9	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène	11
Figure 10	Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonurie $10^{-3}$ M en présence de tétrabutylammoniumpairchlorate $10^{-1}$ M à $v = 100$ mv/s.	11
Figure 11	Structure chimique de N-Ferrocenylmethyl N-3-trifluorométhylaniline	19
Figure 12	Chemin réactionnel de synthèse de dérivé N-Ferrocenylmethyl -3-trifluoromthylaniline	19
Figure 13	Spectroscopie électronique UV-Vis de dérivé N-Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline	21
Figure 14	Voltamogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques FM3FManiline $10^{-3}$ M enregistré en milieu organique (acétonitrile) en présence de Bu4NBF4 $10^{-3}$ M à différentes vitesses de balayage sur une électrode de CV	22

Figure 15	Spectroscopie FT-IR de dérivé FM3FMA	24
Figure 16	Structure générale d'une cellule bactérienne	27
Figure 17	Les morphologies bactériennes	28
Figure 18	Comparaison de la structure pariétale entre les bactéries à Gram+ et à Gram-	28
Figure 19	Mécanismes d'action des antibiotiques, d'après « Les médicaments antibiotiques en urologie »	30
Figure 20	Les étapes de docking moléculaire	38
Figure 21	Page d'accueil du serveur swissadme	39
Figure 22	Page d'accueil du serveur admetsar	40
Figure 23	Page d'accueil du serveur Prottox	41
Figure 24	Quatre parties essentielles de spectrophotomètre	43
Figure 25	Représentation ORTEP de Fc3F.	60
Figure 26	Structure tridimensionnelle de la Gentamicine téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès Drug Bank : DB00284.	60
Figure 27	Structure tridimensionnelle de l'enzyme Transglycosylase d'Escherichia Coli (PDB ID : 3VMA) téléchargé depuis Protein Data Bank ( <a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a> ).	61
Figure 28	Pose d'amarrage Fc3F et avec l'Escherichia coli (PDB ID : 3VMA) illustrant l'interaction le ligand.	63
Figure 29	Interaction de liaisons hydrophobique et atomes de Fc3F et protéine E.COLI : VAL 314 TYR 315 ALA357	63

Figure30	Activité antibactérienne de dériver ferrocénique sur <i>Escherichia coli</i> .	66
Figure 31	Pourcentage d'inhibition de la dérivé ferrocénique par chaque concentration a partir des diamètres d'inhibition.	67
Figure 32	pourcentage d'inhibition de la dérivé ferrocénique par chaque concentration a partir de donn"s spectroscopique.	69
Figure 33	Tracés de $\frac{1}{[Fc]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A - A_0}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l' <i>Escherichia coli</i> .	71

## Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
Tableau 01	Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène	11
Tableau 02	Synthèse du ferrocène à partir du cyclopentadiène	14
Tableau 03	Caractéristiques physicochimiques des dérivés ferrocéniques synthétisés	20
Tableau 04	Tableau de correspondance Couleur – Longueur d'onde	21
Tableau 05	Valeurs caractéristiques des données électrochimiques tirées des voltamogrammes des produits synthétisés à une vitesse de balayage 100mV/s	23
Tableau 06	Données spectroscopiques et électrochimiques de dérivé	23
Tableau 07	Information sur le récepteur cible choisie pour l'étude d'amarrage	49
Tableau 08	Paramètre d'amarrage sélectionnés pour l' <i>Escherichia coli</i>	50
Tableau 09	Propriétés physicochimiques des composés N-Férocénylméthyl 3-fluorométhylaniline et gentamicine	55
Tableau 10	Propriétés pharmacocinétiques des composés N-Férocénylméthyl 3-fluorométhylaniline et gentamicine	57
Tableau 11	Prédiction de la toxicité des composés étudiés Fc3FManiline et de la gentamicine	58
Tableau 12	Constante de liaison, l'énergie libre de la liaison et les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour le complexe étudié par approche d'amarrage moléculaire	62
Tableau 13	Distance des liaisons hydrogène, et les atomes de Fc3F et protéine	64
Tableau 14	Interaction de liaison hydrophobe et atome de Fc3F et protéine <i>E. coli</i>	64

Tableau 15	Diamètres des zones d'inhibition des trois souches bactériennes	65
Tableau 16	Valeurs de l'absorbance de la culture du développement de l'Escherichia coli obtenus à partir des données de zone d'inhibition.	66
Tableau 17	Valeurs de l'absorbance de la culture du développement de l'Escherichia coli obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis.	68
Tableau 18	Valeurs de l'IC50 des composés étudiés obtenu à partir de la méthode in vitro.	70
Tableau 19	Valeurs des K et $\Delta G$ des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques.	71

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Å**: Angström

**AA**: Acideaminé

**Abs**: Absorbance

**AcrB** : Acridine resistance protein B

**ADME**:Absorption,D:Distribution,M:Métabolisme

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNt** : Acide ribonucléique de transfert

**ATP**: adénosine triphosphate

**C°**: Degrés Celsius

**cm**: centimètre

**CO<sub>2</sub>**: anhydride carbonique

**Da** :Dalton

**DFc**: Dérivé ferrocénique

**DL50**:Dose létale 50%

**EmrE**:amino-acid multidrug transporter

**Fc**: Ferrocène

**Fe**: Fer

**gyrA et gyrB**: L'ADN gyrase

**H**: Hydrogène

**H<sub>2</sub>O**: eau

**IC<sub>50</sub>**: Concentration causant une inhibition de 50% d'une activité

**K**:constant de liaison

**Kg:** Kilogramme

**KJ:** Kilojoule

**l:** litre

**M:** molaire

**MexB:** efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*

**ml:** millilitre

**PABA:** acide para-amino-benzoïque

**PLP :** protéines de liaison des pénicillines

**RND :** Resistance Nodulation Division

**Teta/B/C/D/E :** Tetracyclineresistanceprotein

**UV:** Ultraviolet

**µl:** microlitre

**ΔG:** énergie libre de liaison

# SOMMAIRE

Remerciement
Dédicaces
Résumé et mots-clés
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations
Introduction
<b>Première Partie Synthèse Bibliographique</b>

## Chapitre I Ferrocène et de dérivé Ferrocénique

I.1. Histoire de la découverte de ferrocène.....	6
I.2. Définition du ferrocène .....	7
I.3. Structure Cristalline .....	7
I.3.1. Liaison et structure électronique du ferrocène .....	8
I.3.2. Synthèse et structure du ferrocènes .....	8
I.4. Propriétés du ferrocène .....	9
I.4.1. Propriétés physiques du ferrocène.....	9
I.4.2. Propriétés spectrales .....	9
I.4.3. Propriétés électrochimiques.....	10
I.4.4. Le Processus chimique .....	12
I.5. Réactivité.....	14
I.5.1. Réaction de Substitution.....	14
I.5.2. Réaction d'Oxydation .....	15
I.5.3. Réaction Avec les électrophiles.....	16
I.6. Applications et utilisation du Ferrocène .....	16
I.7. Utilisation des dérivés ferrocéniques .....	17

I.8. Dérivé N-Ferrocène.....	19
I.8.1. Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline.....	19
I.8.2. Propriétés physique et analytique des dérivés ferrocéniques synthétisées.....	20
I.8.3. Caractérisation structurelle et identification des dérivés synthétisés .....	20
I.8.2.1. Caractérisation UV-VIS .....	21
I.8.2.2. Comportement électrochimique par voltamétrie cyclique.....	22
I.8.2.3. Caractérisation par la méthode spectroscopique d'identification FTIR .....	23

## **Chapitre II Généralité sur les bactéries et les antimicrobiennes**

Introduction .....	26
2. les bactéries .....	26
2.1. Définition .....	26
2.2. Structure bactérienne .....	27
2.3. Les Morphologies bactériennes .....	27
2.4. La structure de la paroi entre les bactéries à Gram+ et à Gram-.....	28
5. Les antibiotiques.....	29
5.1. Définition.....	29
5.2. Mode d'action des antibiotiques .....	30
5.2.1. Antibiotiques agissant sur la paroi .....	30
5.2.2. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique .....	31
5.2.3. Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques.....	31
5.2.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique.....	32
5.2.5. Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique .....	32
5.3. Résistance aux antibiotiques .....	32
5.3.1. Définition .....	32
5.3.2. Mécanismes génétiques de la résistance .....	33
5.3.3. Mécanismes biochimiques de la résistance .....	34

## **Chapitre III Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées**

3.1. L'amarrage moléculaire .....	37
-----------------------------------	----

3.1.1. Principe .....	37
3.2. SwissADME .....	39
3.3. admetSAR.....	40
3.4. Protocoles .....	40
3.4. Le spectroscopie UV-visible .....	41
3.4.1. Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible .....	41
3.4.2. La loi de Beer Lambert .....	41
3.4.3. Appareillage.....	42

## Deuxième partie Etude expérimentale

### Chapitre I Matériels et Méthodes

I. Matériels et méthodes .....	46
I.1. Matériels d'études.....	46
II.1.1. Produits chimiques et réactifs .....	46
II.1.2. Matériels biologiques .....	46
I.1.3. Matériels de laboratoire: .....	47
I.1.4. Les logiciels bioinformatiques.....	47
II.2. Méthodes.....	48
II.2.1. La synthèse de la Fc3FManiline .....	48
II. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de Dérivé Ferrocénique .....	48
II.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in silico</i> .....	48
II.3.1.1. Docking (Amarrage moléculaire).....	48
II.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> : .....	50

### chapitre II Résultats et discussion

I. Résultats .....	55
I.1. Evaluation <i>in-silico</i> de l'activité antibactérienne : .....	55
I.1.1. Prédiction des propriétés ADMET : .....	55
I.1.1.1. Propriétés physico-chimiques : .....	55

I.1.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques : .....	56
I.1.1.1. 3. Prédiction de la toxicité : .....	57
I.1.1.1.3. Généralité sur un drug-like : .....	58
I.2.Étude de l'inhibition de l' <i>Escherichia Coli</i> par amarrage moléculaire : .....	59
I.2.1. Optimisation structurelle : .....	59
I.2.2. Simulations d'amarrage : .....	61
I.3.Etude in vitro de l'activité antibactérienne .....	64
I.3.1.Evaluation du l'activité antibactérien par diamètre d'inhibition .....	65
I.4.1.2 Détermination de l'efficacité inhibitrice (IC50 par données de zone d'inhibition ) : .....	67
I.4.Etude Spectroscopique de l'activité antibactérienne : .....	67
I.4.1.1 Détermination de l'efficacité inhibitrice (IC50 par données spectroscopiques) : .....	68
I.4.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de liaison (K et $\Delta G$ ) : .....	70
Discussions des résultats .....	73
Conclusion .....	77
Références Bibliographiques .....	79

# Introduction

Le XIX<sup>e</sup> siècle a été marqué par l'essor de la chimie organique qui a permis du développement en chimie médicinale (**Le Borgne, M.**). Elle-même une science qui a encore beaucoup à apprendre. (**Batu Dirersa, W., 2014**). L'un des objectifs essentiels de la communauté médicale est de présenter des nouveaux agents thérapeutiques antimicrobiens

La chimie organométallique a réalisé une grande avancée, après la découverte du ferrocène où les chimistes organométalliques ont permis l'élimination de la barrière existante entre la chimie organique et la chimie inorganique en traitant tous les composés inorganiques et organiques à un niveau moléculaire (**Mokhtari R ., 2012**).

Cet intérêt ne cesse de croître vu que les composés à base des métaux de transitions présentent un large spectre d'activités pharmacologiques qui leur a permis d'être largement explorés en médecine pour le traitement de diverses maladies (**K. Dhahagani .,2018 ; K. Venkateswarlu et al,2018**).

Le monde microbien était inconnu et invisibles à l'œil nu. Mais et à partir du 17<sup>ème</sup> siècle, le chercheur néerlandais Van Leeuwenhoek a pu développer un instrument de laboratoire qui lui permettait de voir les microorganismes et les appela communément les microbes, ou animalcules. (**Sow, 2013**).

Considérés comme une des révolutions médicales du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont apporté un immense bénéfice à l'humanité, en de tuer (effet bactéricide) ou d'inhiber la croissance (effet bactériostatique) les bactéries pathogènes à faible concentration, et possédant une toxicité spécifique vis-à-vis de celles-ci. (**F. Bambeke et al., 2008 ; J. Berthet et al.,2006**) Malheureusement, l'utilisation de ces molécules a rapidement été suivie par l'apparition d'une résistance bactérienne aux traitements.

La résistance microbienne peut être intrinsèque ou acquise. Les microbes peuvent acquérir une nouvelle résistance lorsqu'il se produit une mutation spontanée dans leurs gènes ou lorsqu'il y a un transfert de nouveaux gènes provenant d'une autre espèce. L'information génétique portant la résistance qui est transférée d'une espèce à une autre se trouve sur les chromosomes ou les plasmides. (**Madigan et coll., 1997**). Ces gènes codent pour des enzymes spécifiques à la destruction et l'inactivation des agents antimicrobiens. Ceux-ci sont nommés les plasmides de résistance, ou les plasmides R.

Au cours des décennies, la résistance microbienne a évolué jusqu'au point où elle présente un grand problème dans le domaine de la santé publique à l'échelle mondial. Il n'y a que quelques agents antimicrobiens pouvant être utilisés contre certains pathogènes et ce

nombre continue à diminuer (Mitscher et coll., 1999). Il est donc devenu nécessaire de trouver de nouvelles molécules à activité antibactérienne.

A la lumière de ces travaux nous avons effectué cette étude qui a pour objectif de synthétiser le dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline et d'étudier ses effets biologiques par deux approches. D'abord l'étude in silico a été fait par trois méthodes, premièrement nous avons étudié les propriétés physicochimique et pharmacocinétique par le serveur web SWISS ADMT et la prédiction de la toxicité par le serveur PROTOX II, En fin le docking moléculaire est fait pour déterminer les paramètres d'interaction et le IC50. Ensuite l'étude in vitro comporte l'évaluation de son effet antimicrobienne. En effet, Cet dernière a été effectué par la méthode spectroscopique (UV-VIS) et par la détermination de diamètre de zone d'inhibition pour déterminer le IC50 de pouvoir antimicrobien comparer avec la gentamycine

Pour cela notre travail est reparti en deux parties essentiels:

- ✓ **La première partie:** comporte un aperçu bibliographique constitué de trois chapitres : le premier chapitre comporte la chimie de ferrocène et de dérivé ferrocénique étudié, le deuxième chapitre contient une généralité sur les bactéries et les antimicrobiennes et le troisième chapitre inclut le contexte théorique des techniques expérimentales utilisées).
- ✓ **La deuxième partie:** se compose de deux chapitres, le premier comporte les matériels et les méthodes et le deuxième intitulé résultats et discussion comprenant la présentation des différents résultats obtenus et ses interprétations.
- ✓ En fin une conclusion générale qui valorise notre travail avec des perspectives

# Première partie

## Synthèse Bibliographique

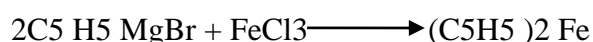
**Chapitre I**

**Ferrocène et de dérivé**

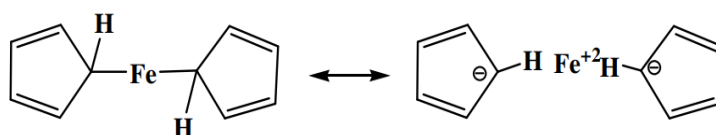
**Ferrocénique**

### I.1. Histoire de la découverte de ferrocène

La chimie des métaux de transition était maîtrisée par les chimistes allemands avant la deuxième guerre mondiale. Cette discipline a été transférée aux anglais et aux américains après la deuxième guerre mondiale. En 1951, **Kealy et Pauson** ont publié pour la première fois dans un article célèbre au journal Nature, la synthèse de bis(cyclopentadiényle) ferrocène (1). T.J. Kealy et P.L. Pauson ont essayé de préparer le dihydrofulvalène par oxydation d'un réactif de Grignard de cyclopentadiényle suivant l'équation. Le composé obtenu à partir de cette réaction était un produit orange et thermiquement très stable.

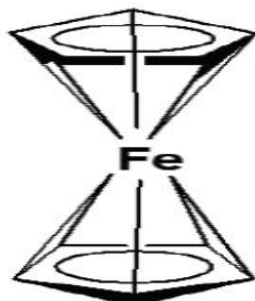


La structure proposée par Pauson pour ce composé a une forme de résonance dans laquelle le fer est lié au cyclopentadiényle par une liaison sigma avec une formule ionique canonique comme le montre le figur 01



**Figure 01** : La structure de résonance proposée par Kealy et Pauson (**Ahmed, S.A., 2016**)

En 1952, G. Wilkinson et R. B. Woodward ont déduit correctement la structure sandwich (Laszlo & Hoffmann, 2000). La structure sandwich unique du ferrocène a d'abord été prédite par spectroscopie infrarouge et par résonance magnétique nucléaire, puis confirmée par cristallographie aux rayons X en 1954 (**Behera, 2005**). En fait, Wilkinson a partagé le prix Nobel pour son travail En 1973 (**Kauffman, 1983**).



**Figure 02** : La structure du ferrocène proposée par Wilkinson et ses collaborateurs (**Madani, 2012**).

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

---

Robert Burns Woodward qui fit la découverte avec Geoffrey Wilkinson, ne reçut pas le Prix Nobel de chimie contrairement à ce dernier. Certains historiens pensent que Woodward aurait dû partager ce prix avec Wilkinson. Du même avis que les historiens, Woodward lui-même écrivit une lettre au comité Nobel<sup>12</sup>

### I.2.Définition du ferrocène

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



Figure 03 : Ferrocène sous forme de poudre orange (Zayya, 2013).

### I.3.Structure Cristalline

La structure cristalline de ferrocène a été étudiée par Wilkinson et al. Par diffraction des RX. C'est grâce à ces analyses que les longueurs des liaisons C-C C-Fe, et C-H ont été déterminés exactement. Figure 4

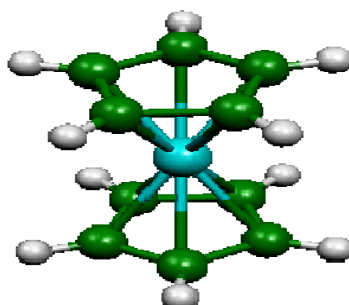


Figure 04 : structure cristalline de ferrocène

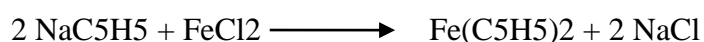
### I.3.1. Liaison et structure électronique du ferrocène

La longueur moyenne de la liaison C-C dans les deux cycles pentadiényle du ferrocène est de 1.389 Å, une valeur qui est très proche de celle du benzène (1.395Å). En plus de la longueur de liaison C-C dans les cycles pentadiényle qui est différente pour chaque métalocènes, une autre liaison caractéristique de chaque métalocènes est celle de M-C. Pour le ferrocène, la longueur Fe-C est égale à 2.03Å (Terki, 2007).

Le ferrocène est de loin le plus stable des métalocènes. L'atome de fer dans le ferrocène est à l'état d'oxydation +2. Chaque cycle pentadiényle est donc chargé une fois négativement, amenant le nombre d'électrons  $\pi$  à six sur chaque cycle. Ils sont donc aromatiques. Ces douze électrons -6 pour chaque cycle forment des liaisons covalentes avec le métal. Ajoutés aux six électrons de la couche d du fer, le complexe complait à la règle des 18 électrons (Bioud & Lassoued, 2015).

### I.3.2. Synthèse et structure du ferrocènes

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



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

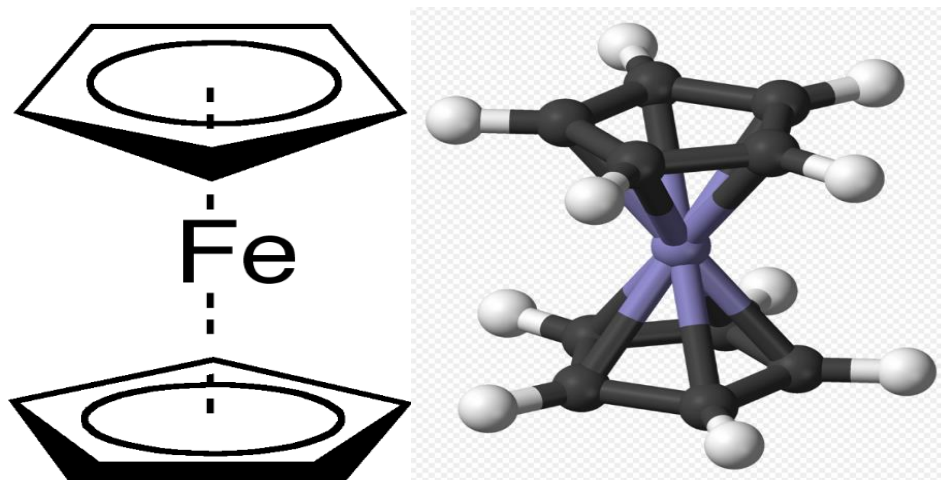


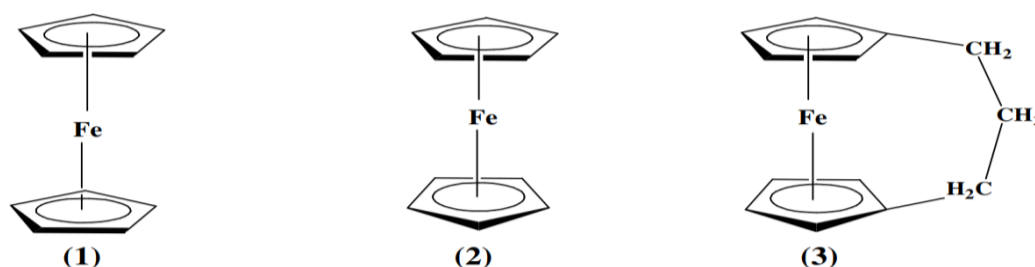
Figure 05 : Structure correcte de ferrocène (Kotz, J, 2008).

### I.4 .Propriétés du ferrocène

#### I.4.1. Propriétés physiques du ferrocène

Le ferrocène est un solide cristallin orange, de masse molaire 186,04 g.mole<sup>-1</sup> , de point d'ébullition 249°C et d'un point de fusion 173-174 °C. le ferrocène se décompose à partir de 400°C, 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. Le ferrocène est également soluble dans l'acide nitrique dilué, l'éther, le benzène, l'acide sulfurique concentré mais insoluble dans l'acide chlorhydrique concentré.

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 lumière. Le ferrocène forme avec l'acide nitrique dilué et l'acide sulfurique concentré des solutions rouge foncé avec une fluorescence bleue. La diffraction par



rayons X et la diffraction électronique en phase gazeuse (**K. L. Rinchart, et coll, J., 1960**) indiquent que la conformation la plus stable est celle dans laquelle les deux cycles sont pratiquement éclipsés<sup>2</sup> La conformation décalée des cycles a une énergie supérieure d'environ 4 kJ.mol rapport à celle de la conformation éclipsée. En solution, la libre rotation des deux cycles peut être bloquée par la formation d'une liaison intramoléculaire<sup>3</sup> .

#### I.4.2. Propriétés spectrales

- ✓ **Infrarouge:** La spectroscopie infrarouge du ferrocène est relativement simple à cause de sa structure symétrique. Il présente une bande d'absorption à 3075 cm<sup>-1</sup> équivalente à l'élongation de la liaison C-H aromatique. Il existe uniquement quatre bandes apparentes : deux à 811 et 1002 cm<sup>-1</sup> sont équivalentes à la vibration de flexion de C-H, et une à 1108 cm<sup>-1</sup> équivalente à la vibration antisymétrique du cycle de pentadiényle. La bande d'absorption à 1411 cm<sup>-1</sup> est équivalente à la vibration d'éloignement antisymétrique de C-C du cyclopentadiényle non substitué (**W. E. Moffitt, J. Am. Chem., 1954**)

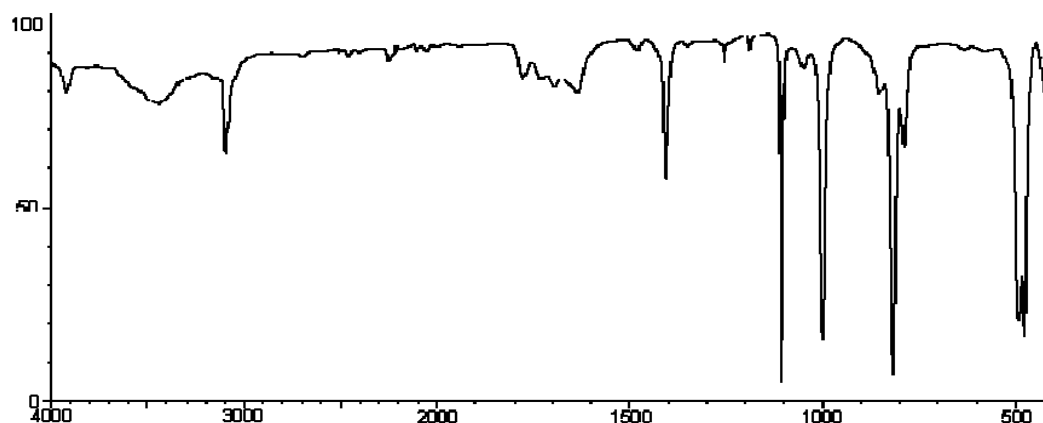


Figure 06: spectre IR de ferrocène

- ✓ **Résonance Magnétique Nucléaire RMN <sup>1</sup>H** Le spectre RMN <sup>1</sup>H de la molécule de ferrocène est très simple, il présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4.15 ppm. Figure 7. RMN <sup>13</sup>C De même le spectre RMN <sup>13</sup>C de la ferrocène présente un seul pic à 68 ppm correspond aux dix atomes de carbone de deux cycles de cyclopentadiényles. Figure 8.

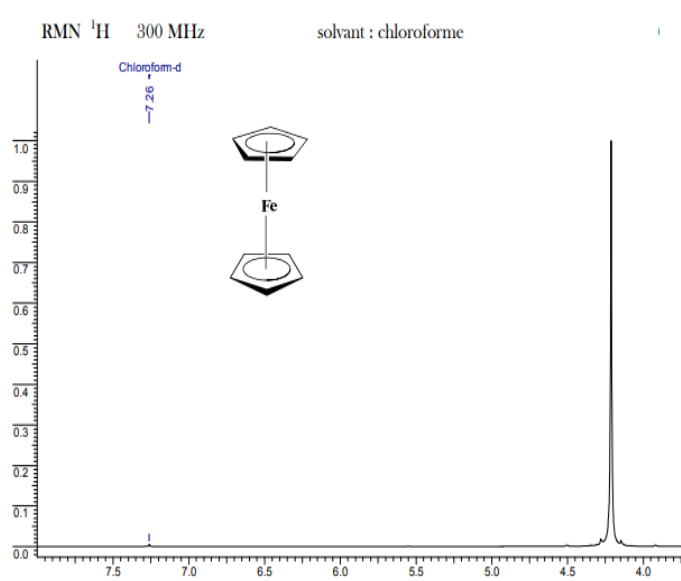


Figure 07: spectre RMN <sup>1</sup>H de ferrocène

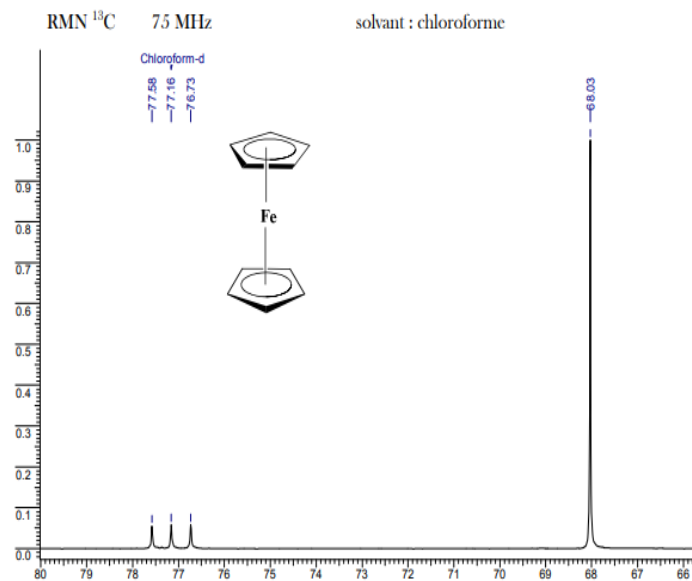
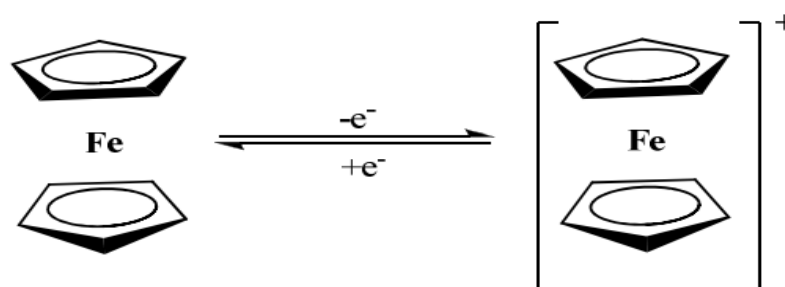


Figure 08: spectre RMN <sup>13</sup>C de ferrocène

### I.4.3. Propriétés électrochimiques

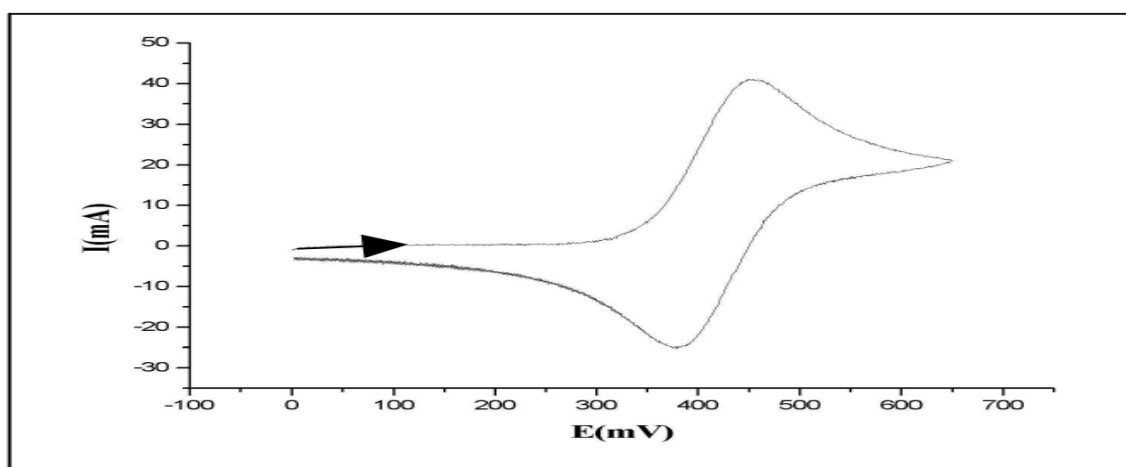
Beaucoup d'études et des analyses par des méthodes électrochimiques ont été effectuées sur les propriétés oxydo-réductrices de ferrocène. D'une manière générale, le comportement cathodique habituel de ferrocène en milieux organiques tel que le

dichlorométhane, l'acétonitrile et le DMF peut être décrit par une réduction réversible à un électron, conduisant au ion ferrocérium (N. Walker, D.Stuart., 1983).



**Figure 09:**Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène

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



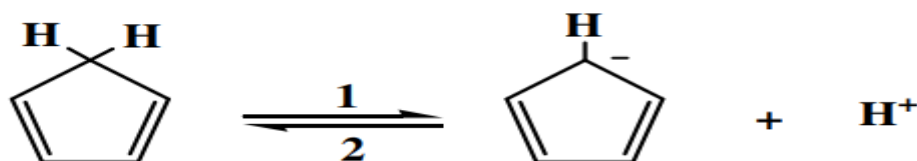
**Figure 10:**Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile  $10^{-3}$  M en présence de tétrabutylammonium perchlorate  $10^{-1}$ M à  $v = 100$  mV/s.

Les valeurs des paramètres électrochimiques tirées de voltammogramme de la figure I.5 sont regroupées dans le tableau I.1. Ces valeurs renseignent sur les critères de rapidité et de réversibilité.

**Tableaux 01:** Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène

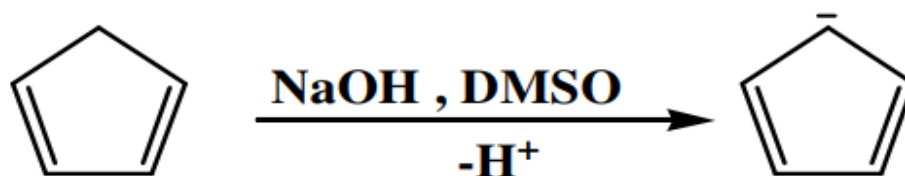
$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$I_{pa}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$I_{pc}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$E_{1/2}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)
439	362	16.9	-16.69	380	77

### I.4.4. Le Processus chimique



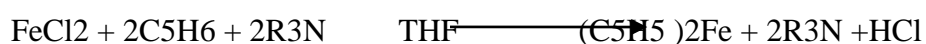
L'acidité du cyclopentadiène ( $pK_a = 20$ ) est relativement forte en comparaison avec les alcanes (le  $pK_a$  de méthane est de l'ordre de 60)

Cette acidité 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 solvates très efficacement le contre-ion Na

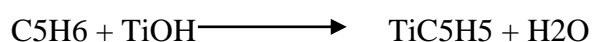
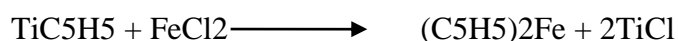


Une amine suffisamment basique comme le diéthylamine peut être utilisée pour former l'ion cyclopentadiényle à partir du cyclopentadiène (**Khalef, 2012**).

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



Le cyclopentadiénylthallium peut être utilisé également comme un produit de départ pour la préparation du ferrocène (**Mahmoudi & Nemsy, 2009**).



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.

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

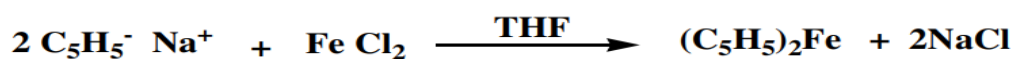
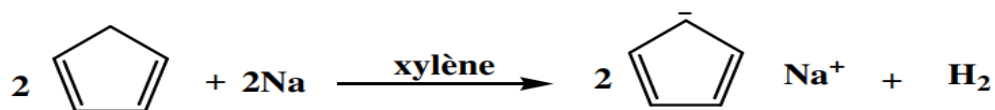
---



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 (**G.F. Cor1954**). 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 (**G. Wilkinson, Paus1954**).

Une méthode de préparation du ferrocène et des composés analogues a été développée par Wilkinson suite à une synthèse de travaux de plusieurs équipes de



recherche. Cette méthode est basée essentiellement sur la déprotonation du cyclopentadiène par oxydoréduction avec le sodium dans le xylène, suivie par une réaction du sel de cyclopentadiényle avec le chlorure ferreux dans le THF.

D'autres méthodes importantes de la préparation du ferrocène sont regroupées dans le tableau. I.2

**Tableau. 02:** Synthèse du ferrocène à partir du cyclopentadiène

SOURCE DU FER	BASE	SOLVANT	RENDEMENT
FeCl <sub>2</sub>	Na	T.H.F.	67-73
FeCl <sub>3</sub>	Na	Et <sub>2</sub> O	44
FeCl <sub>2</sub>	Na	EtOH	Ca.50-90
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Na	EtOH	30
FeCl <sub>2</sub>	K	(Et) <sub>2</sub> O	50
FeCl <sub>3</sub>	Tl	THF	98
FeCl <sub>2</sub>	Tl	(Et) <sub>2</sub> NH	68
FeCl <sub>3</sub>	NaC <sub>2</sub> H	NH <sub>3</sub>	44
FeCl <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> MgBr	THF	51
FeCl <sub>3</sub>	EtMgBr	PhOCH <sub>3</sub>	38
FeBr <sub>2</sub>	(Et) <sub>2</sub> NH	(CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	ca.90
FeCl <sub>2</sub>	(Et) <sub>3</sub> N	Excès d'amine	14-20
Fe(CO) <sub>5</sub>		275-400°C	ca.40
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		300°C	ca.50
FeO(from FeCO <sub>3</sub> )		350-400C	15
Fe	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	300C	40-50
Fe	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na		

### I.5.Réactivité

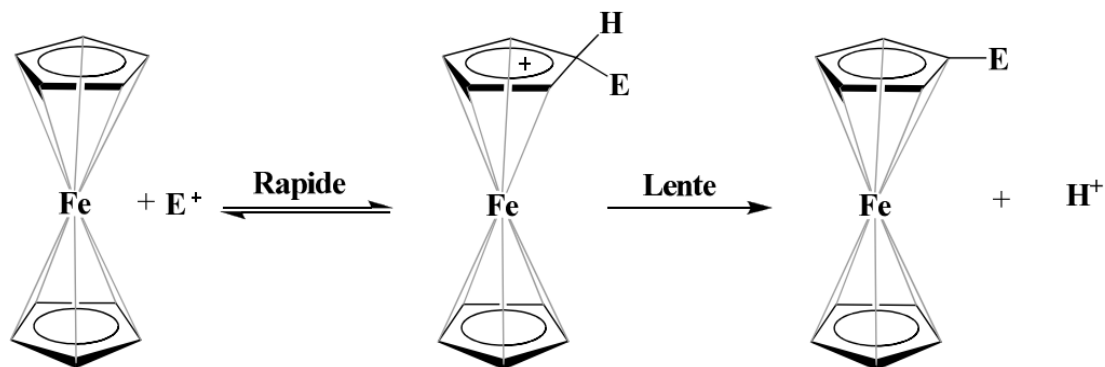
Les ferrocènes substitués peuvent être préparés directement ou indirectement. Dans la préparation indirecte, la molécule de ferrocène est utilisée comme un point de départ pour la synthèse des autres dérivés ferrocéniques, tandis que dans la synthèse directe, le ferrocène substitué est préparé par la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

#### I.5.1. Réaction de Substitution

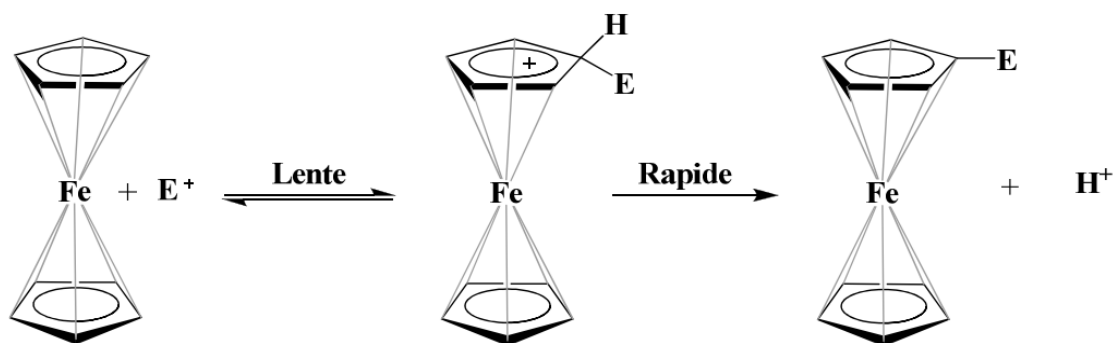
Les propriétés semblables entre le ferrocène et le benzène ont contribué au développement de la chimie de cette nouvelle molécule, et ont facilité la réalisation d'une grande variété de réactions de substitution sur le ferrocène. Le mécanisme des réactions de substitution sur le cycle pentadiényle repose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

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

**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



**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.



### I.5.2. Réaction d'Oxydation

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

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

---

Le ferrocène peut exister sous d'autres formes d'oxydation. Ces différents états redox se caractérisent électro chimiquement 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.

### I.5.3.Réaction Avec les électrophiles

Le ferrocène se comporte comme la plupart des aromatiques, permettant la synthèse de dérivés substitués. Une expérience classique de démonstration est une réaction de Friedel Crafts avec l'anhydride acétique en présence d'acide phosphorique comme catalyseur. En présence de chlorure d'aluminium,  $\text{Me}_2\text{NPCI}_2$  et le ferrocène réagissent pour donner la ferrocenyldichlorophosphine, alors que le traitement avec la phenyldichlorophosphine dans les mêmes conditions conduit à la P,P-diferrocenyl-P-phenyl phosphine (P. Coppens in *Cristallographique Computing* 1970).

### I.6. Applications et utilisation du Ferrocène

Les applications du ferrocène dans la chimie sont en effet vastes. De nouveaux catalyseurs complexes utilisant des dérivés ferrocéniques sont produits chaque jour. Des polymères aux catalyseurs, aux composés chiraux, le ferrocène a attiré l'intérêt de nombreux chimistes. Les possibilités d'employer ce composé sont illimitées; ainsi il y a beaucoup de domaines de recherche sur le ferrocène qui n'ont pas encore été explorés.

Le ferrocène s'est avéré être l'un des composés les plus utiles et les plus intrigants dans les composés organométalliques et a apporté un grand changement à la communauté chimique.

Et voici quelques utilisations du ferrocène et ses dérivés :

- Le ferrocène est utilisé, comme matière à ajouter au carburant, des puissants réacteurs puisque elle permet aux propriétés d'oxydation, d'augmenter l'énergie de la réaction, thermique ce qui donne au réacteurs une énergie supplémentaire de propulsion équivalent à 40% ,Comme, il peut être (le ferrocène) associé dans différents types de combustion, étant donné qu'il joue un rôle important dans la réduction de la fumée, le contrôle de la pollution et l'allongement de la durée de vie des réacteurs de propulsion (R.H. Blessing, *Cryst.*, 1987) .

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

---

- Il peut être utilisé comme un facteur de protection dans le polyéthylène.
- Quelques dérivés du ferrocène peuvent être utilisés dans la protection des fines couches des pôles photo électrochimiques (PATSEE., 1985) .
- L'ajout du ferrocène fixe la polymérisation de la matière cellulosique et lui donne une certaine rigidité, contre la chaleur et l'air (Cano, J.Benito., A1995).
- Certains dérivés du ferrocène sont utilisés comme insecticides (Torres, J. C., Pili2002).
- Le ferrocène est utilisé dans l'amélioration de la stabilité thermique, du plastique et du caoutchouc.
- l'application biologique et pharmaceutique (fabrication des médicaments telle que : La pénicilline, céphalosporine, et réfamycines)
- La lutte contre certaines bactéries

### I.7. Utilisation des dérivés ferrocéniques

#### ✓ Chimie pharmaceutique de ferrocène :

Un autre domaine de recherche d'intérêt particulier pour l'industrie pharmaceutique et d'autres industries, est la préparation des dérivés du ferrocène pour l'utilisation en tant que catalyseurs chiraux. Le dérivé du ferrocène qui a au moins deux substituants différents dans le même cycle pentadiényle est un composé de chiralité planaire. Ivar Ugi a réalisé la première synthèse des ferrocènes disubstitués de chiralité planaire en 1970 à Munich, en Allemagne.

La synthèse des composés chiraux est développée, et une grande famille de produits d'intérêt pharmaceutique et industriel a été synthétisée. Les expériences ont également montré que le ferrocène peut être utilisé dans le domaine croissant de la recherche pharmaceutique pour la synthèse des complexes, impliquant les Tc(V) et les Re(V) du ferrocène dithiocarboxylate ( $\text{FcCS}_2 = [\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5\text{CS}_2)(\text{C}_5\text{H}_5)]^-$ ) [70] et le ferrocène contenant un groupe de  $\text{CS}_2$ , dont la structure a permis de réaliser des échanges simples ou multiples d'électrons.

Ce comportement redox pourrait alors être utilisé dans la médecine nucléaire en tant qu'agent diagnostique ou thérapeutique. Plusieurs autres travaux en synthèse

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

---

organique et organométallique ont développé des médicaments pour différentes maladies en utilisant les ferrocènes et ses dérivés.

### ✓ **La Chimie médicinal de ferrocène :**

Le ferrocène a attiré une attention particulière car il offre des propriétés attrayantes telles que l'neutralité, la lipophilie, de bonnes propriétés redox, une stabilité chimique et une faible toxicité. De nombreux composés ferrocéniques présentent une fascinante activité antibactérienne, antifongique, clivage d'ADN, cytotoxiques et activité anti tumorale. 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**).

### ✓ **L'activité anti-oxydante:**

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 antioxydant. L'activité antioxydant 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 antioxydant de certain nombre de ferrocène carboxyamides N-substitués et de dérivés de ferrocénylamine. Zhang et Liu ont également étudié l'activité antioxydant des ferrocénylhydrazones et ont découvert qu'ils présentaient une activité antioxydant intéressante. Depuis lors, un grand nombre de composés ferrocéniques ont été synthétisés et évalués en termes d'activité antioxydant (**Khelef et Lanez., 2015**).

### ✓ **L'activité anticancéreuse**

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

### ✓ **L'activité 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 R<sub>2</sub>, se sont révélés actifs sur des souches Toxoplasmes. De plus, ces nouveaux

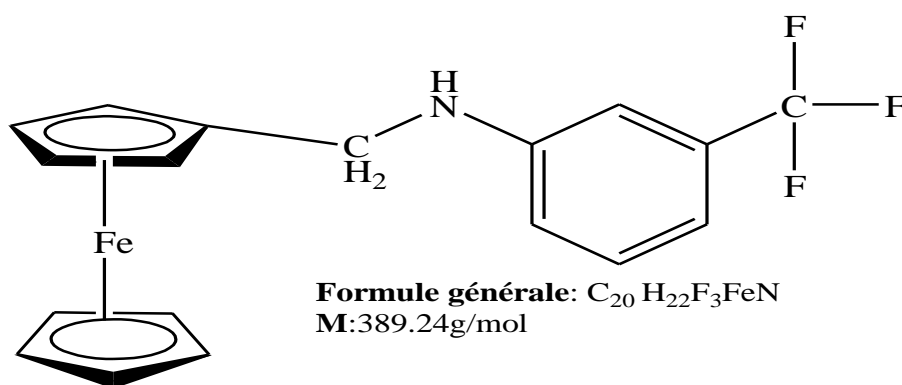
composés sont particulièrement efficaces sur des souches résistantes à l'Atovaquone (Baramaea *et al.*, 2006).

### ✓ L'activité antivirale:

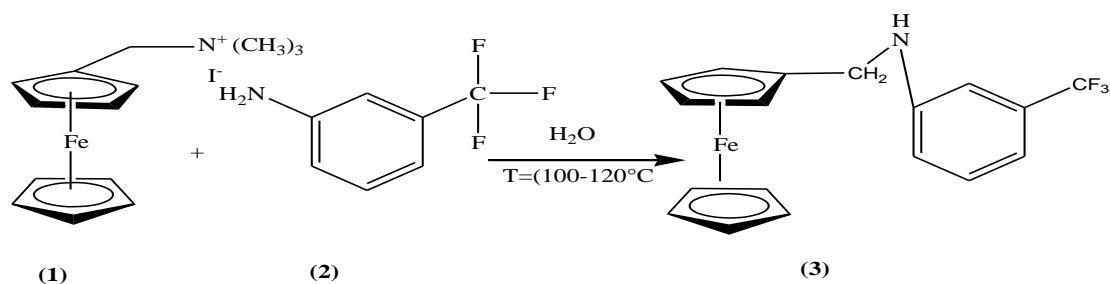
L'activité des dérivés ferrocéniques antiviral basé sur l'étude de l'effet de ces composés sur virus VIH, responsable des symptômes du syndromed'immunodéficience ; Il a été montré que les dérivés ferrocéniques entravent la multiplication du virus de SIDA en inhibant l'enzyme de transcriptase inverse,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

## I.8. Dérivé N-Ferrocène

### I.8.1.Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline



**Figure 11 :** Structure chimique de N-Ferrocenylmethyl N-3-trifluorométhylaniline. Le dérivé N'-ferrocénylméthyl-N'-3 trifluorométhylaniline a été préparé à partir de la réaction de sel quaternaire de l'iodure de Ferrocenylmethyltriméthylammonium(500 mg, 1,28 mmol)avec le 3-trifluorométhylaniline(1 ml, 2,56 mmol) dans l'eau bidistillé a une température 110°C durant 6h, selon le chemin réactionnel de synthèse illustré dans le schéma suivant:



**Figure12 :** chemin réactionnel de synthèse de dérivé N-Ferrocenylmethyltrifluoromthylaniline (1) :sel quaternaire, (2) : la base 3-trifluorométhylaniline et (3) : le dérivé ferrocénique synthétisé).

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

Le produit de synthèse donne une masse de 72 mg (rendement : 31,30%) de poudre solide d'une couleur orange avec une Rf 0.888. Le composé est recristallisé à partir d'un mélange d'éthanol. Eau pour donner des cristaux orange avec un point de fusion de 71,7 °C

### I.8.2. Propriétés physique et analytique des dérivés ferrocéniques synthétisés

Les dérivés synthétisés sont des solides qui se présentent sous forme d'une poudre colorée. Ils sont d'une grande stabilité à l'air et à température ambiante et ne demandent pas de conditions particulières de conservation. Les résultats des données analytiques et spectroscopiques de ces composés sont conformes aux structures proposées.

Des tests de solubilité sur l'ensemble des dérivés révèlent que les dérivés (Fc-tris, DMAMF, Sel quaternaire) sont solubles dans l'eau ainsi que les autres solvants organiques. En revanche, les dérivés (Fc3FManiline, Fc2Claniline et Fc3Claniline) sont solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau.

Les propriétés analytiques et physiques des complexes synthétisés sont regroupées dans le tableau 3.

**Tableau 03** : Caractéristiques physicochimiques des dérivés ferrocéniques synthétisés

Nom de dérivé ferrocénique	M (g/mol)	Formule brute	Point de fusion °C	Temps (h)	Rdt (%)	Rf (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )
Fc3FManiline	389.24	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> 3FFeN	71.7	6	31.30	0.88

### I.8.3. Caractérisation structurelle et identification des dérivés synthétisés

Après avoir procédé à la synthèse organique de dérivés ferrocéniques, nous passerons à l'identification de la structure des produits obtenus qui se fait par une analyse spectroscopique à savoir UV-Vis, FTIR et RMN H<sup>1</sup> et RMN C<sup>13</sup> et une caractérisation électrochimique.

### I.8.2.1. Caractérisation UV-VIS

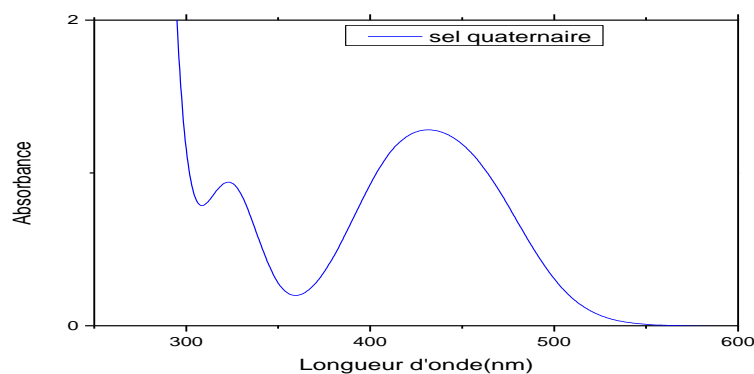
Les dérivés ferrocéniques sont des produits colorés, ils absorbent donc dans le UV-visible. Ils sont de couleur jaune- orange à marron foncé, il absorbe donc les longueurs d'onde complémentaires, correspondant à leurs couleurs.

**Tableau 04:** Tableau de correspondance Couleur – Longueur d'onde

Couleur	Rouge	Orange	Jaune	Vert	Cyan	Bleu	Indigo	Violet
Longueur d'onde (nm)	750	600	580	540	510	475	440	400

De manière générale, les spectres des composés ferrocéniques présentent ses bandes dans le domaine UV- visible. Donc, nous avons réalisé le spectre d'absorption de nos produits synthétisé pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 900 nm.

Les spectres UV-Vis des composés abordés dans ce chapitre sont en grande partie invariants, deux bandes de faible énergie étant observées dans la plage des 440 et 300 nm, indiquant que la nature du substituant a un impact négligeable sur les propriétés électroniques du ferrocenyl.



**Figure 13 :** Spectroscopie électronique UV-Vis de dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline

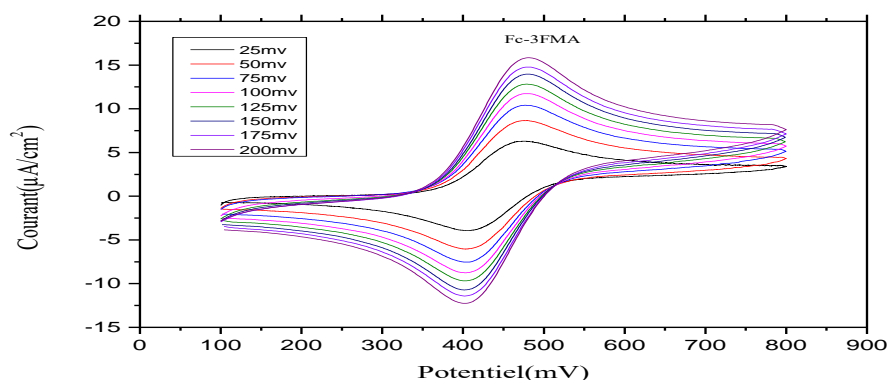
Le spectre UV-vis de composé de base de la préparation de la plus part des dérivés ferrocéniques affiche deux bandes caractéristiques, la première est signalé à la longueur d'onde signalé dans l'UV,  $\lambda_{\max 1} = 322$  et la deuxième dans le domaine du visible à une longueur d'onde  $\lambda_{\max 2} = 432$  nm correspondant à la transition ( $n \rightarrow \pi^*$ ).

### I.8.2.2. Comportement électrochimique par voltamétrie cyclique

L'étude électrochimique par voltamétrie cyclique des dérivés synthétisés été effectuée en solution organique, l'acétonitrile (ACN), l'électrolyte support est le Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> à une vitesse de balayage 100 mV/s.

Le produit à étudier est dissous dans la solution contenant le sel du fond. Des voltammogrammes cycliques de tous les composés ont été enregistrés en utilisant le couple ferrocène / ferrocénium comme étalon redox interne. Chacune présentait un pic réversible à un électron, dû à l'oxydation du groupe ferrocenyl en cation ferricénium. Les mesures sont effectuées en générale dans le domaine 100-900mV. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 4.

Les potentiels électrochimiques du composé sont caractérisés par deux vagues bien définies dans la région de potentiels positifs qui montrent un processus redox correspondant au couple Fe (III)/Fe(II). (ADAIKA, 2020).



**Figure 14:** Voltammogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques FM3FManiline 10<sup>-3</sup>M enregistré en milieu organique (acétonitrile) en présence de Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> 10<sup>-3</sup>M à différentes vitesses de balayage sur une électrode de CV.

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

Les valeurs des paramètres électrochimiques du ferrocène renseignent sur les critères de la rapidité et de réversibilité.

## Chapitre I ferrocène et de dérivé Ferrocénique

**Tableau 05 :** Valeurs caractéristiques des données électrochimiques tirés des voltamogrammes des produits synthétisés à une vitesse de balayage 100mV/s

Produits	$I_{pa}(\mu A)$	$I_{pc}(\mu A/cm^2)$	$\left  \frac{i_{p_a}}{i_{p_c}} \right $	$E_{pa} (V)$	$E_{pc}(V)$	$E_{1/2} (V)$
<b>Fc3FMA</b>	6.914	-5.411	1.277	0.511	0.443	0.477

D'après le tableau 5, le rapport  $\left| \frac{i_{p_a}}{i_{p_c}} \right|$  est proche à l'unité, le couple étudié constitue alors

un système rapide et réversible. En comparant les valeurs de potentiel de demi-vague de composé étudié avec celui de ferrocène on constate qu'il est déplacé vers les valeurs les plus positives. Les composés étudiés deviennent difficilement oxydables, donc on pourra dire que les groupements substitués sur le ferrocène a un effet électro attracteurs et que la réaction est rapide et mono électrique.

En résumé les données caractéristiques des résultats spectroscopique UV-Vis et électrochimiques pour les dérivés synthétisés sont tabulés dans le tableau 6

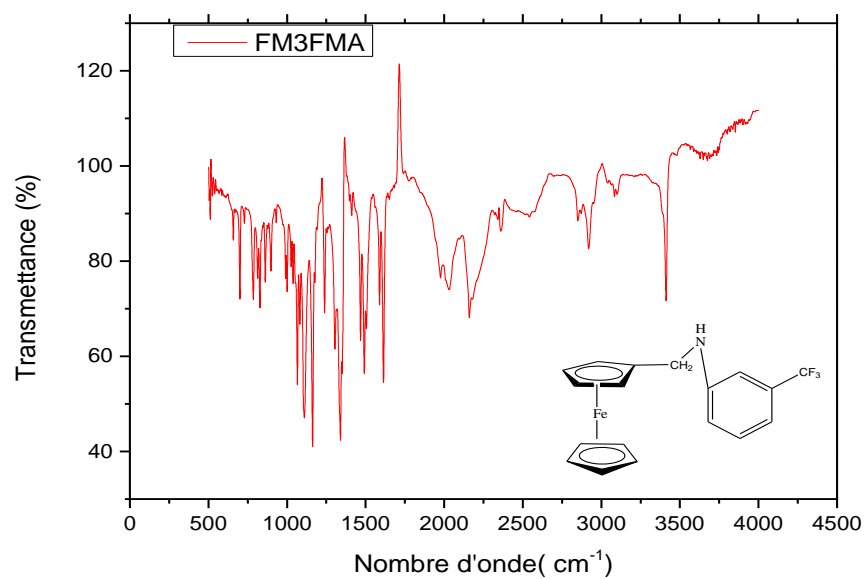
**Tableau 06 :** Données spectroscopique et électrochimiques de dériver ferrocénique.

Composé ferrocénique	$\lambda_{max} (nm)$	$E_{1/2} (V)$ à 100mV/s
FM3FMA	314	0.477

### I.8.2.3. Caractérisation par la méthode spectroscopique d'identification FTIR

L'analyse par spectrométrie infrarouge se base sur la caractérisation des composés et l'identification des groupements fonctionnels des molécules, à partir de ce principe nous sommes amenés à utiliser cette méthode d'analyse dans la caractérisation de nos composés à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU entre 4000 et 400  $cm^{-1}$ .

Les échantillons ont été analysés sous forme de pastilles KBr.



**Figure 15:** Spectroscopie FT-IR de dérivé FM3FMA

L'examen des spectres IR des dérivés synthétisés a permis de relever les principales bandes d'absorption (en  $\text{cm}^{-1}$ ) qui sont les suivants :

**IR FM3FMA**  $\nu(\text{cm}^{-1})$  : 3413 (N-H), 2920 (C-Haromatic), 1102.42,1059.15,1155.10 (ferrocène),1599.080 (C=C aromatique), 2026.128(C-C), 814.590 (phenyl à deux substitution, 2920 (aromatic-H group), 1160 (C-F).

**Chapitre II**

**Généralité sur les**

**bactéries et les**

**antimicrobiens**

## Introduction

La bactériologie est une discipline scientifique consacrée à l'étude des bactéries. La bactériologie a pour but d'identifier les bactéries, de les classer et d'étudier leurs interactions, c'est-à-dire, chez l'homme et l'animal, le rôle de l'une par rapport à l'autre avec le milieu extérieur. Le but de la bactériologie médicale est d'identifier les substances pouvant exister entre différentes souches bactériennes, source d'infection chez l'homme. Les micro-organismes font partie d'un groupe d'organismes vaste et extrêmement diversifié. Ces organismes sont regroupés en fonction d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être observés sans l'aide d'un microscope. Les micro-organismes sont essentiels à la vie. En revanche, ils peuvent être à l'origine de nombreuses maladies animales et végétales et de contaminations alimentaires. **(Nicklin *et al.*, 2000).**

Les termes « antimicrobiens » ou « agents antimicrobiens » font simplement référence à tous les types de médicaments naturels et/ou synthétiques susceptibles de diminuer la multiplication de microorganismes ou de les détruire sans endommager les tissus de l'organisme. L'utilisation de tel ou tel moyen dépend des microorganismes visés, de son environnement et de l'intensité de l'action souhaitée. Parmi eux, on retrouve notamment les agents physiques et aussi les agents chimiques comme : les antibiotiques, les antiseptiques et les sulfamides. Les agents antimicrobiens sont couramment utilisés pour le traitement et la prévention des maladies chez l'humain et les animaux. **((Meyer *et al.*, 2004) et (Billing et Sherman,1998)).**

## 2. Les bactéries

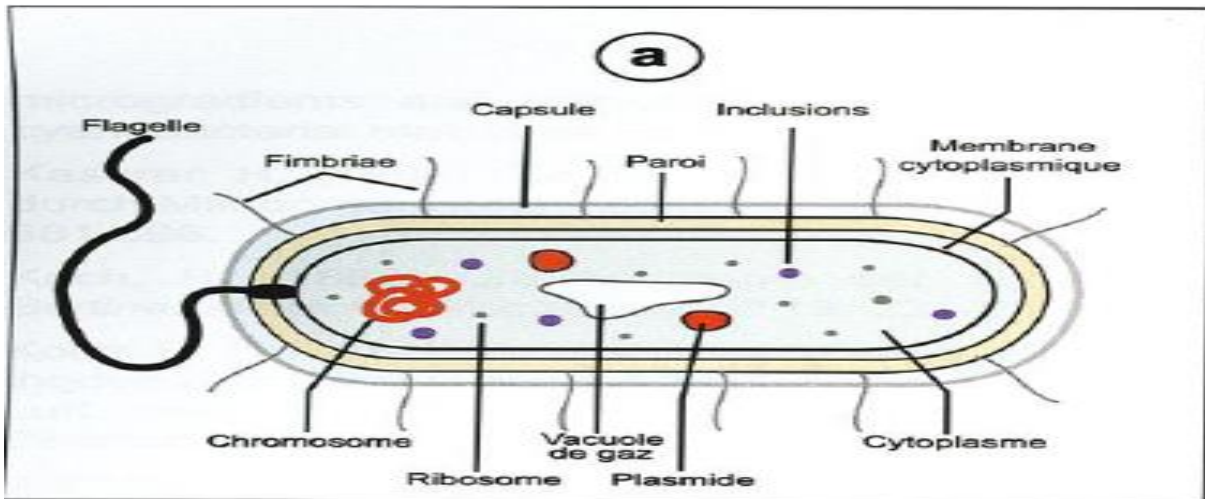
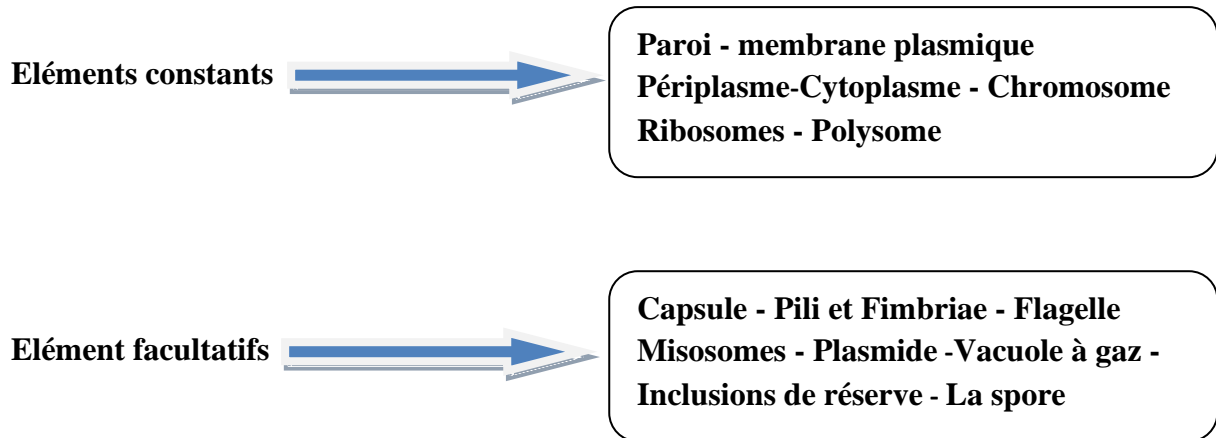
### 2.1. Définition

Les bactéries sont des micro-organismes qui provoquent des maladies graves ou une colonisation mineure de la peau. La plupart des bactéries se multiplient en quelque heure ou jours, d'autre se développent plus lentement, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. Les bactéries ont un grand potentiel d'adaptation génétique. Ils contiennent souvent de l'ADN plasmidique, qui est capable de transférer du matériel génétique au sein d'une espèce ou dans différentes espèces.

Cette adaptation génétique peut augmenter leur pathogénicité et leur résistance à l'antibiotique. (Hart et Shears,1997).

**2.2.Structure bactérienne**

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « constants » ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « inconstants » ou « facultatifs. » ((Fasquelle, 1971) et (Javillier *et al.*, 1972))



**Figure16** : Structure générale d'une cellule bactérienne (Bertrand *et al.*, 2011).

**2.3. Les Morphologies bactériennes**

Les bactéries peuvent être sphériques (coque ou cocci), en forme de bâtonnet (bacilles), ou intermédiaires (coccobacilles). La plupart prennent la coloration de gram, les bactéries à gram positif (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) en bleu-violet, les bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*) en rosé. (Hart et Shears,1997)

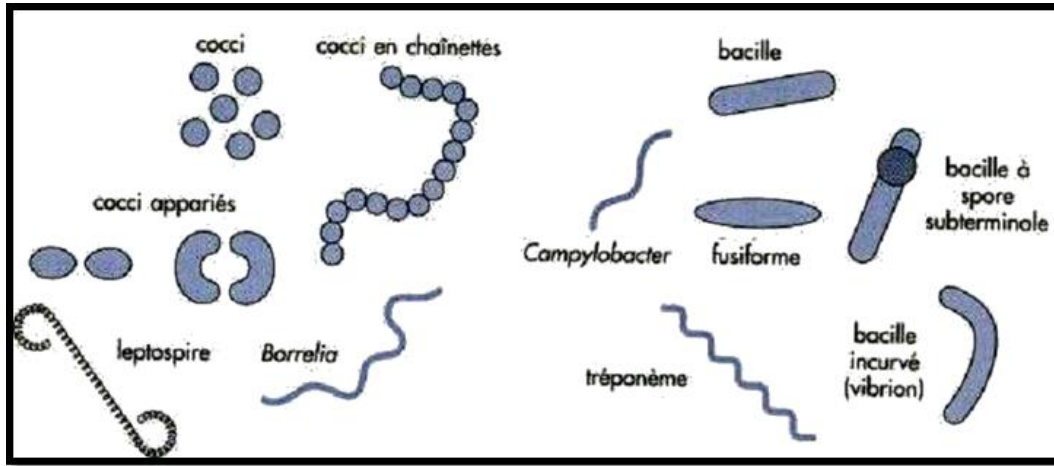


Figure17 : Les morphologies bactériennes (Hart et Shears, 1997).

### 2.4. La structure de la paroi entre les bactéries à Gram+ et à Gram-

Les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à gram positif ou négatif dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane. (Hart et shears, 1997).

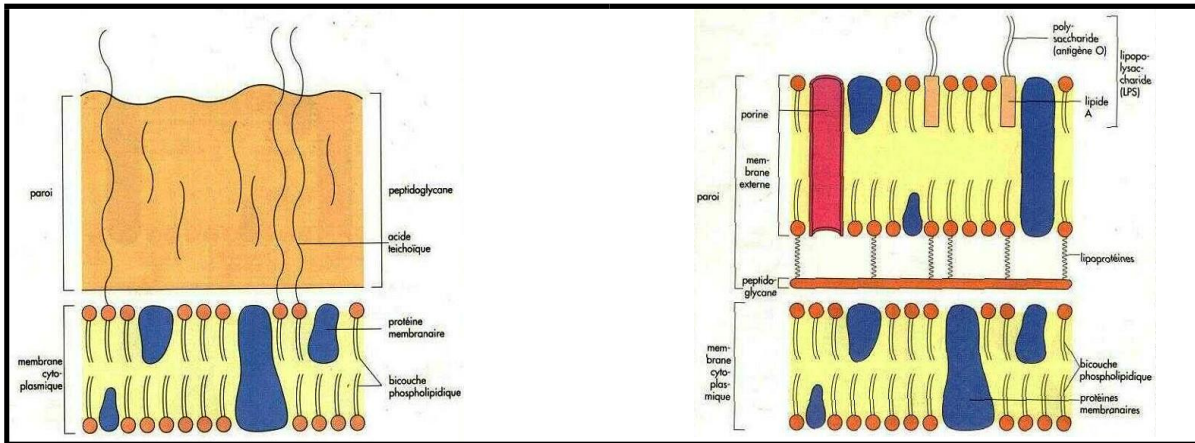


Figure18 : Comparaison de la structure pariétale entre les bactéries à Gram+ et à Gram- (Hart et Shears, 1997).

### 3. Effet des agents antimicrobiens

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, parmi c'est agent les dérivés ferrocéniques, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux

antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. (Milane, 2004), Depuis quelques décennies, la chimie du ferrocène a eu un impact énorme dans de nombreux applications tels que: les applications pharmaceutiques, les applications thérapeutiques, L'applications des dérivés ferrocéniques d'antibiotiques par Edwards et ces collaborateurs pour lutter contre certaines bactéries, certains de ces composés ont montré une bonne activité et une sélectivité pour les bactéries gram positif (Bioud et Lassoued, 2015).

#### 4. Les bactéries et métaux lourds

Les métaux lourds jouent des rôles biologiques et ils sont potentiellement toxiques pour les organismes vivants et en particulier pour les microorganismes (Bruins *et al.*, 2000) et (Abskharon *et al.*, 2008). L'interaction des bactéries avec les métaux se produit sur une gamme de concentrations en métaux allant du nanomolaire pour l'homoeostasie (métaux essentiels) au millimolaire pour la résistance (toxicité pour ces mêmes métaux) et jusqu'à la molaire pour certains chimiolithotrophes acidophiles (Monchy, 2007), les ions métalliques entrent dans la cellule selon deux voies principales :

La première, est empruntée par une large gamme de substrats. Elle est rapide, indépendante du métal, fait intervenir des protéines de type porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers de la membrane bactérienne. La seconde, demande une consommation d'énergie souvent sous la forme e d'hydrolyse de l'ATP. Ces system mes sont inductibles, synthétisés et mis en fonction en réponse à des besoins particuliers (Nies et Silver, 1995). Ils sont largement distribués chez les procaryotes et servent comme un moyen de défense vis-à-vis les ions métalliques.

D'autres, sont plus spécialisés et présents uniquement chez quelques bactéries, ce qui leur confèrent une forte résistance aux métaux lourds (Nies, 2003)

#### 5. Les antibiotiques

##### 5.1. Définition

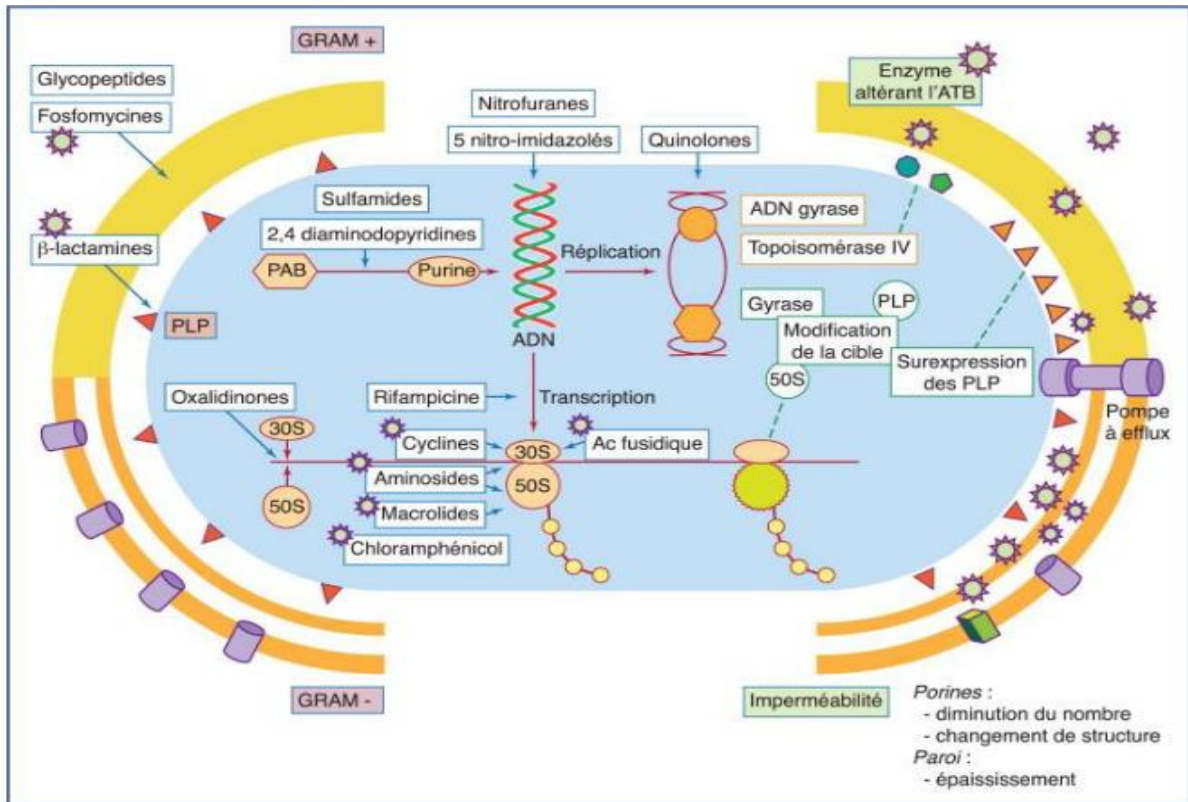
Les antibiotiques (du grec : anti, contre et bios, vie) sont des produits microbiens

(ou leurs dérivés) qui tuent les micro-organismes sensibles ou inhibent leur croissance. Les sulfamides sont parfois appelés antibiotiques, bien qu'il s'agisse de produits chimiothérapeutiques synthétiques d'origine non microbienne. Les antibiotiques ont les caractéristiques suivantes :

- Activité antibactérienne
- Activité in vivo différente des désinfectants.
- Bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme (**Prescott, 2003**).

**5.2. Mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le spectre d'activité et le mécanisme d'action (**Yala et al., 2001**). Selon leur mode d'action, les antibiotiques sont classés en 5 groupes.



**Figure19** : Mécanismes d'action des antibiotiques, d'après « Les médicaments antibiotiques en urologie » (**Chaussade et al., 2013**).

**5.2.1. Antibiotiques agissant sur la paroi**

- Il agit sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique. L'inhibition des PLP aboutit à

l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes rondes ou filamenteuses qui aboutissent à la lyse bactérienne (**Sedrati, 2014**).

- Ils bloquent la polymérisation du peptidoglycane en se fixant sur la partie D-Ala-D -Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane(**Perronne, 1999**).
- Elle se fixe sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide N-acétylmuramique qui est l'un des précurseurs du peptidoglycane (**Agregé et al., 2015**).

### 5.2.2. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

- Ils se fixent sur la sous unité 30S du ribosome ou ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines (**singleton, 2005**).
- Ils agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation (**yala et al., 2001**).
- Ils agissent au niveau de la sous unité 30S du ribosome en inhibant la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique, en empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt (**Bryskier, 1999**).
- Inhibition de la peptidyl-transférase, en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien (**wareham et wilson, 2002**)
- Ils se fixent sur la sous unité ribosomale 50S et empêche sa liaison à la sous unité 30S (**Nauciel et vildé, 2005**)

### 5.2.3. Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

- Ils agissent sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse: ADN gyrase (cible principale des BGN) il forme un complexe ADN-gyrase-Quinolone qui va bloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication ADN topo-isomérase IV L'interaction entre l'ADN, quinolone et topoisomérase stimule la coupure de l'ADN et inhibe la relégation (**Hooper, 2002**).
- Inhibition de la transcription de l'ADN en ARNm par inhibition de l'ARN polymérase. (**Nauciel et vildé, 2005**).
- Elles agissent directement sur l'ADN provoquant divers lésions (coupures et substitution de bases) (**Nauciel et vildé,2005**).

#### 5.2.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

- Elles se fixent sur les phospholipides, et perturbent ainsi les transferts transmembranaires de nutriments et inhibent les phosphorylations oxydatives du métabolisme énergétique (**Fauchère et al., 2002**).

#### 5.2.5. Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

- Inhibent la synthèse des folates, agissent en compétition avec le PABA pour le site actif, la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse une réaction essentielle à la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (DHF) nécessaire à la production des purines et pyrimidines pour la synthèse de l'acide nucléique (**Lambert, 1995**).
- Inhibent la synthèse des folates, en se fixant sur la dihydrofolate réductase (**Veyssier, 1999**).
- Agit sur les deux enzymes précédentes (**Veyssier, 1999**).

### 5.3. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques s'est principalement développée durant les 50 dernières années par l'utilisation répandue et fréquente des antibiotiques favorisant une pression de sélection (**Matyara et al., 2008**).

Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez les bacilles Gram négatif qui sont, par ailleurs, responsables de la majorité des infections hospitalières (60 %) et sont de plus en plus multirésistants (**Bolla et al., 2011**).

#### 5.3.1. Définition

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné, quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (**Leclerc et al., 1995**). On distingue deux types de résistance aux antibiotiques, naturelle et acquise.

##### A. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) (**Mathieu et Fonteneau, 2008**).

## B. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce, et elle a été observée dès le début de l'antibiothérapie (**Souna,2011**).

### 5.3.2. Mécanismes génétiques de la résistance

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique. (**Lozniewski et al., 2010**).

- **Résistance chromosomique**

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard et indépendant, Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle n'est pas provoquée par la présence de l'antibiotique, ce dernier révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes. Elle est transmissible ; et permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles). Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique(**Messaï,2006**).

- **Résistance extra-chromosomique (plasmides)**

Deux faits expliquent l'importance de la résistance plasmidique :

1/ la résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie(**Zogheib et Dupont., 2005**)

2/ de nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal ; ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes. Les plasmides de

résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments génétiques transposables. Les éléments génétiques transposables permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées (Serge., 2017).

Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extra-chromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries résistantes. (Lozniewski *et al.*, 2010).

### 5.3.3. Mécanismes biochimiques de la résistance

- **Modification de la cible**

Des modifications même minimales affectant la cible d'un antibiotique peuvent modifier et diminuer l'affinité des deux (cible-antibiotique) et entraîner une résistance. La résistance aux  $\beta$ -lactamines par altération des PLP a été décrite, mais ne semble pas être un mécanisme prédominant pour les entérobactéries ou d'autres espèces de bacilles Gram négatif comme *P.aeruginosa* ou *Acinetobacter baumani*. Ainsi, une résistance aux  $\beta$ -lactamines touchant essentiellement l'imipénème et le *mécilline* a pu être décrite chez une souche de *Proteus mirabilis* productrice d'une PLP2 altérée (Cavallo *et al.*, 2004).

La modification d'une des sous-unités de l'ADN gyrase (mutation des gènes *gyrA* et *gyrB*) provoque l'acquisition d'une résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones. (De Lastours et Fantin., 2010).

- **Modification de la perméabilité**

Les changements de la membrane externe des bactéries à Gram négatif peuvent gêner la pénétration de l'antibiotique en l'empêchant d'atteindre sa cible. Ce type de résistance est généralement attribué à la perte ou à la modification des porines. Celui-ci est très répandu chez *Pseudomonas aeruginosa* (Maiti *et al.*, 2006).

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistance acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Cavallo *et al.*, 2004).

La résistance acquise est d'autant plus forte vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines que la molécule est plus volumineuse, plus hydrophobe et chargée négativement (**Cavallo et al., 2004**).

- **Action des pompes d'efflux**

Les pompes d'efflux sont des transporteurs actifs. Il existe 5 familles de pompes d'efflux classées selon deux critères : d'une part la source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement (gradient électrochimique ou hydrolyse de l'ATP), d'autre part leur structure second-tertiaire. Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND (Resistance-Nodulation cell Division) comme AcrB chez *E. coli*, MexB chez *Pseudomonas aeruginosa* et EmrE chez *E. coli*. Les protéines TetA, TetB, TetC, TetD, TetE sont très largement distribuées chez les Enterobacteriaceae et les Pseudomonadaceae (**Cattoir, 2004**).

- **Production d'enzymes inactivant les antibiotiques**

C'est un mécanisme très fréquent, très important mais aussi très varié. Ces enzymes produites, inactivent l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant (**Poole, 2004**). Dans le cas des bacilles Gram négatif, la résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) capables d'hydrolyser le noyau  $\beta$ -lactame, inactivant l'antibiotique avant qu'il n'atteigne sa cible (PLP) (**Rodriguez et Struelens, 2006**).

L'inactivation enzymatique par des acétyltransférases, des nucléotidyltransférases et des phosphotransférases est le mécanisme de résistance le plus souvent observé pour les aminosides. Il permet d'expliquer la résistance de plus de 95 % des souches d'entérobactéries ainsi que d'*Acinetobacter* spp. Aux aminosides (**Magnet et Blanchard, 2005**).

Les estérases sont codées par deux gènes *ereA* et *ereB* portés par des plasmides, elles causent l'ouverture des macrolactones de l'érythromycine et de l'oléandomycine, ces enzymes sont présentes aussi bien chez *E. coli* que chez *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (**Katz et Ashley, 2005**).

# **Chapitre III**

**Contexte théorique des  
différentes techniques  
expérimentales utilisées**

Notre étude vise à évaluer l'activité N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline *in vitro*, cette activité peut être étudiée par différentes techniques d'analyse, parmi ceux-ci les plus utilisés dans ce type de test est la spectroscopie UV-Visible. Ainsi, l'étude *in silico* des différents paramètres physicochimiques, de Drug-likeness et de pharmacocinétique par l'outil bioinformatique SwissADME et aussi de l'interaction entre les DFC-BN et l'alpha amylase via Docking (L'amarrage moléculaire) qui permet de confirmer théoriquement nos résultats expérimentaux.

### 3.1. L'amarrage moléculaire

La première problématique de la biologie structurale est le eplieiment des macromolécules dans une structure tridimensionnelle biologiquement active. La compréhension de la communication moléculaire pour échanger des informations, s'activer ou s'inhiber est la seconde problématique, enjeu majeur de la biologie intégrée (**Brut, M., 2009**). L'amarrage moléculaire (ou le docking moléculaire) est l'un des outils qui confère à résolu ces problèmes.

#### 3.1.1.Principe

Le docking est utilisé pour prédire la structure du complexe intermoléculaire résultant de l'association entre au moins deux molécules. Il permet aussi de connaître la façon dont un ligand (petite molécule) interagisse avec un récepteur (macromolécule) et de calculer l'énergie de liaison entre eux. Il permet aussi de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec un récepteur cible (**Asses, Y., 2011; Lanez, E., 2016**).

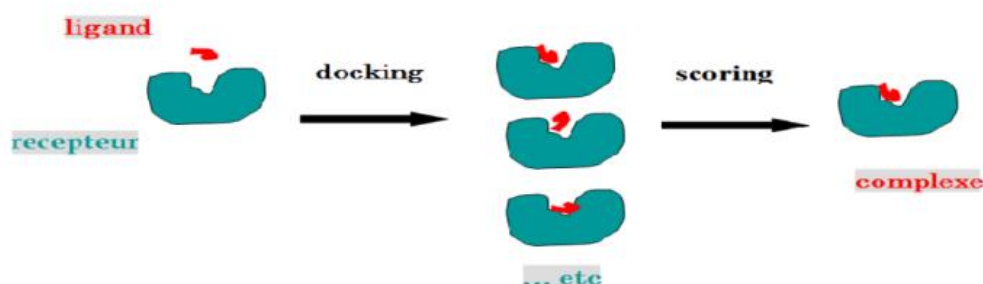
#### A. Le Docking

Est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la molécule et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique (**EL Hadj said, K., 2016; LANEZ, E., 2016**).

#### B. Le Scoring

Est une méthode mathématique pour le classement, utilisées pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules 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 (EL Hadj, S. K., 2016; LANEZ, E., 2016).



**Figure 20** : Les étapes de docking moléculaire (EL Hadj, S. K., 2016)

Différentes méthodes d'étude expérimentale telle que la voltamétrie cyclique et la spectroscopie électronique permettent généralement d'étudier les interactions récepteur ligand et de déterminer l'énergie de liaison, mais pour comprendre comment un récepteur interagisse avec un ligand il faut faire appel à des méthodes prédictives procédant par simulation, complémentaires à ces approches expérimentales (Lanez, E., 2016).

### C. La théorie d'AUTODOCK

Un champ de force d'énergie libre semi-empirique est utilisé lors de la procédure de simulation d'amarrage. le champ de force évalue la conformation en 2 étapes, la première étape est l'estimation de l'énergie intramoléculaire de transformation des statistiques non liées aux statistiques liées de la conformation du ligand cible, la seconde est l'évaluation de l'énergie intramoléculaire de la combinaison du ligand et du récepteur dans l'état lié.

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{Hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Où:

$\Delta G_{vdw}$  : est l'énergie de van der waal.

$\Delta G_{Hbond}$  : est l'énergie de la liaison hydrogène.

$\Delta G_{elec}$  : est l'énergie d'interaction électrostatique.

$\Delta G_{tor}$  : est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction des rotors libres du ligand et la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation avec le récepteur est un autre terme lié à l'entropie qui décrit les changements d'énergie du système lors de la désolvatation du ligand au moment de la complexation au niveau du récepteur.

### 3.2. SwissADME

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

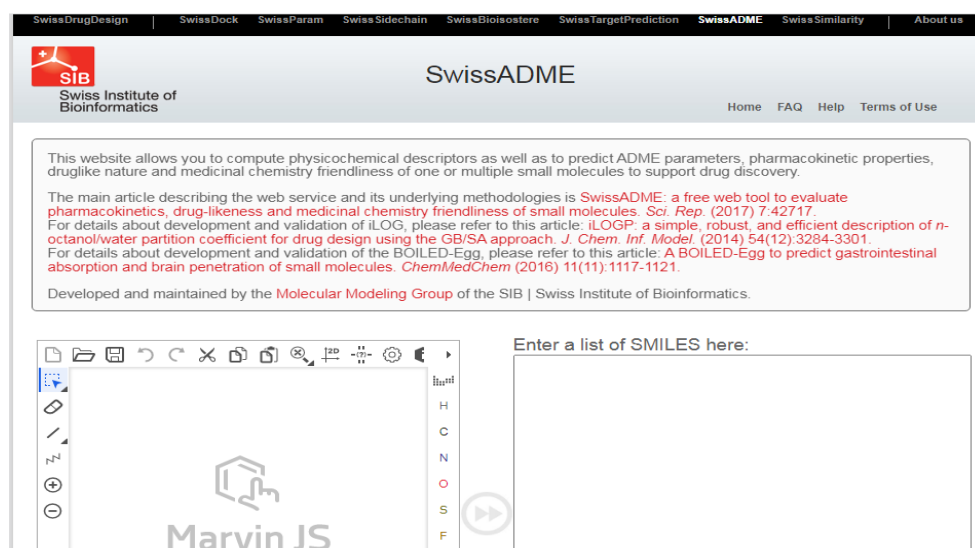
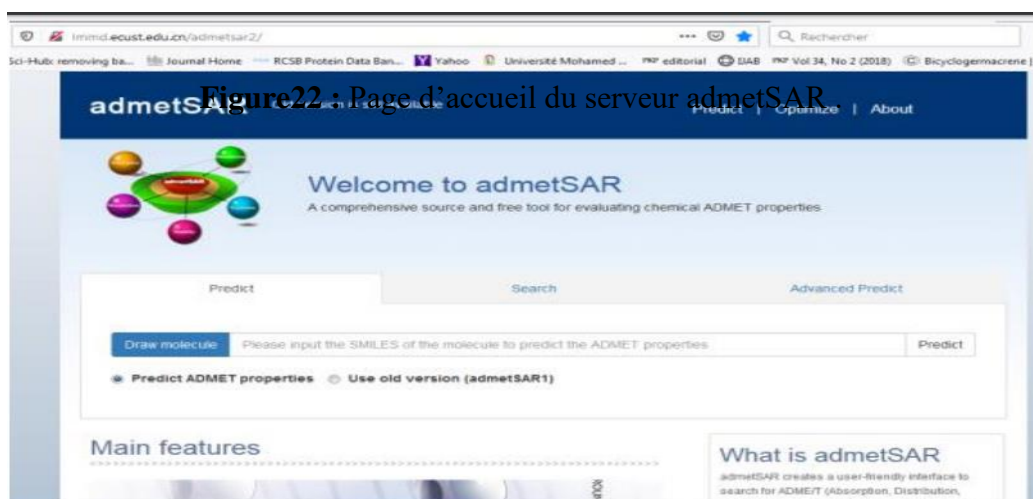


Figure 21: Page d'accueil du serveur SwissADME

### 3.3.admetSAR

Le serveur de relations structure-activité ADMET, intitulé admetSAR, est une connaissance et un outil complets pour prédire les propriétés ADMET des médicaments candidats et des produits chimiques environnementaux. Dans notre serveur, plus de 200 000 points de données annotés ADMET pour environ 96 000 composés uniques ont été sélectionnés manuellement à partir de grandes littératures. Le serveur admetSAR fournit une interface conviviale pour rechercher facilement des profils chimiques, par CASRN, par nom commun et par recherche de similarité. La nouvelle version d'admetSAR (version 2.0) se concentre principalement sur la prédiction in silico des propriétés chimiques d'ADMET. Plus de 40 modèles prédictifs ont été mis en œuvre dans admetSAR pour de nouvelles propriétés chimiques ADMET dans le filtrage silico (**Cheng et al., 2012**).



### 3.4.Protox

ProTox-II fournit un serveur Web gratuit pour la prévision de la toxicité in silico pour les toxicologues, les organismes de réglementation, les chimistes computationnels et médicaux, et tous les utilisateurs sans connexion à [http://tox.charite.de/protox\\_II](http://tox.charite.de/protox_II). Le serveur Web prend structure chimique deux-dimensionnelle en tant qu'intrant et indique le profil de toxicité possible du produit chimique pour 33 modèles avec des scores de confiance, et un tableau radar de toxicité globale avec trois composés les plus semblables ayant une toxicité aiguë connue (**P.Banerjee et al., 2018**).

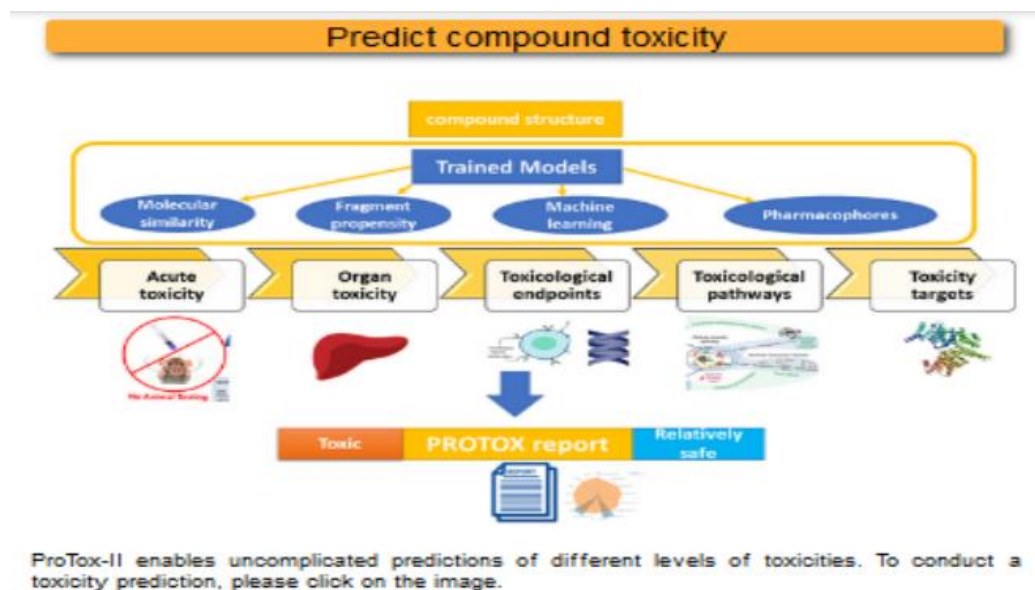


Figure 23 :Page d'accueil du serveur Protox(P.Banerjee *et al.*,2018).

### 3.4.Le spectroscopie UV-visible

La spectroscopie d'absorption ultra-violette visible est à la fois une méthode d'analyse quantitative et qualitative. Elle est essentiellement fondée sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance. les spectres U.V visible provenant des excitations électroniques sont obtenus à partir des composés qui contiennent des liaisons multiples et conjuguées, ils correspondent à des spectres d'émission ou d'absorption (Touri, F., 2012)

#### 3.4.1.Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible

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

#### 3.4.2.La loi de Beer Lambert

A une longueur d'onde spécifique pour substance donnée, il y a un rapport entre l'absorbance A, le nombre de molécules (la concentration) c, la longueur du chemin traversé l appelé aussi le trajet optique (l'épaisseur de l'échantillon) exprimée en cm, et une constante appelée le coefficient d'extinction spécifique qui indique l'intensité de l'absorption. Ce dernier dépend de la manière dont est exprimée la concentration.

Si la concentration est exprimée en g/l,  $\epsilon$  est appelé coefficient d'extinction spécifique. Si la concentration est exprimée en mol /l,  $\epsilon$  est appelé coefficient d'extinction molaire (l'absorptivité molaire) (**Mouafki, F., 2015**).

Cependant cette loi est définie par l'équation suivante :

$$\text{Log}(I_0/I) = \epsilon.l.c$$

Cette loi exprime le fait que la diminution de l'intensité lumineuse est proportionnelle au nombre de particules qui s'absorbent (**Bennamia, Z., 2015**).

#### **3.4.3.Appareillage**

Un spectrophotomètre se compose de quatre parties essentielles :

•Source lumineuse :

- Lampe au deutérium, utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm;
- Lampe à filament de tungstène, utilisée dans le domaine de 350 à 800 nm.

•Monochromateur : composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie, il a pour objet de sélectionner la longueur d'onde de travail.

•Cuve : contiennent la solution de référence et la solution à analyser. Ces cuves doivent être parallèles et transparentes aux radiations. Pour travailler dans l'UV et le visible, les cuves sont en quartz. Leur épaisseur caractérise la longueur du trajet optique ( $\ell$ ).

•DéTECTEUR : se compose de deux éléments, les photodiodes (semi-conducteurs) et le photomultiplicateur qui amplifie l'intensité du faisceau émergent (**Degallaix, S., Ilchner B., 2007**).

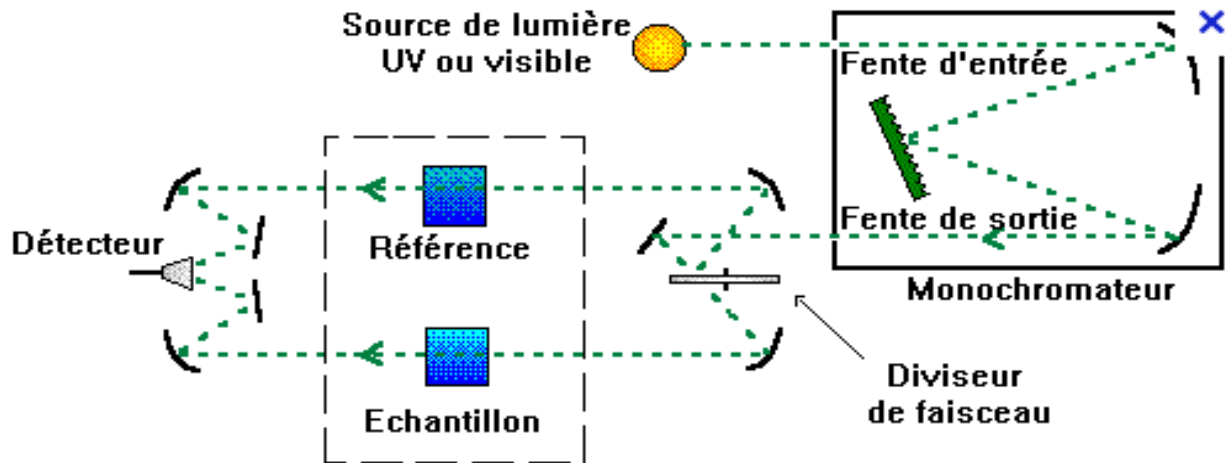


Figure 24: Quatre parties essentielles de spectrophotomètre (Burgot, G., Burgot, J-L.2011)

# **Deuxième partie**

## **Etude expérimentale**

# **Chapitre I**

## **Matériels et Méthodes**

### I. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'ELOUED et laboratoire de recherche :de la Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) à la faculté de science Technologie la même université, ET laboratoire d'analyses médicales EL-MEDJED

#### I.1. Matériels d'études

##### II.1.1. Produits chimiques et réactifs

- ✓ Milieu miler Hinton.
- ✓ Milieu gélose.
- ✓ Bouillon Nutritif.
- ✓ DMSO.
- ✓ N-Ferrocenylmethyl3 trifluorométhylaniline.
- ✓ Gentamicine.
- ✓ Eau distillé stérile.
- ✓ D'eau physiologique stérile( NaCl ) 0.9%.

##### II.1.2. Matériels biologiques

- Les microorganismes utilisés : (Souches microbiennes)

L'activité antimicrobienne a été évaluée en utilisant des souches référenciées :

**A. *Escherichia coli*** (ATCC 25922):bactérie de Gram négatif Bacille, appartient à la famille des Enterobacteriaceae(Paterson, 2006). De forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  (Steven *et al.*, 2004).*Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel *et al.*, 2005).

**B. *Pseudomonas aeruginosa*** (ATCC 27853) : Bacille, opportuniste, fréquemment incriminée dans les infections nosocomiales grâce à sa capacité de persister dans les milieux hospitaliers, sa résistance naturelle et son pouvoir d'acquisition de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques (Chinbo *et al.*, 2014). Elle est l'agent le plus pathogène courant provoquant une infection chronique (Pressler, 2011).P.

*aeruginosa* est impliquée dans les infections des plaies et de l'appareil respiratoire, infections des voies urinaires et les septicémies (Perry *et al.*, 2004).

**C. *Klebsilla pneumonie*** (ATCC 700603) :Genre de bactérie, non mobiles de famille Enterobacteriaceae, capsulés avec des colonies à aspect de muqueuses. (Garbannelle *et al.*, 1987). Il est un type de bactérie qui est souvent répandu dans les unités de soins intensifs ou les maisons de soins infirmiers. Il se trouve généralement dans le tractus intestinal, où il fait partie de l'écosystème d'un côlon sain. Ce bactérie peut se propager à d'autres parties du corps, cependant provoquer des maladies mortelles (Anadriamobololona, 2010).

### I.1.3. Matériels de laboratoire:

- ✓ Balance numérique
- ✓ Micropipettes ajustables avec des embouts stériles
- ✓ Bain marine
- ✓ Bucher
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Boite de pétrie
- ✓ Tubes a essai
- ✓ Etuve de type LAB TECH
- ✓ Anse de platine
- ✓ Les cuves
- ✓ Papier filtre de wattman
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU)
- ✓ cuves de Quartz
- ✓ Auto clave de type Pb international
- ✓ Eprouvette
- ✓ Bec benzène
- ✓ Pipette graduée
- ✓ Gants
- ✓ Béchers
- ✓ Densimètre
- ✓ Les disques d'antibiotiques

### I.1.4. Les logiciels bioinformatiques

Notre étude in silico a été réalisé avec les 4 logiciels suivantes :

- ✓ Autodock Tools.
- ✓ GaussView.
- ✓ Swiss ADME: permet de calculer des descripteurs physicochimiques ainsi que de prédire les paramètres ADME, les propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamique la nature médicamenteuse.
- ✓ Protox: permet de prévision de la toxicité orale pour le composé d'entrée et un Rapport sur le modèle de toxicité.

### II.2. Méthodes

#### II.2.1. La synthèse de la Fc3FManiline

Le dérivé ferrocénique a été synthétisé selon le protocole décrite dans le chapitre I,

### II. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de Dérivé Ferrocénique

#### II.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne in silico

##### II.3.1.1.Docking (Amarrage moléculaire )

- **Outils utilisés :**

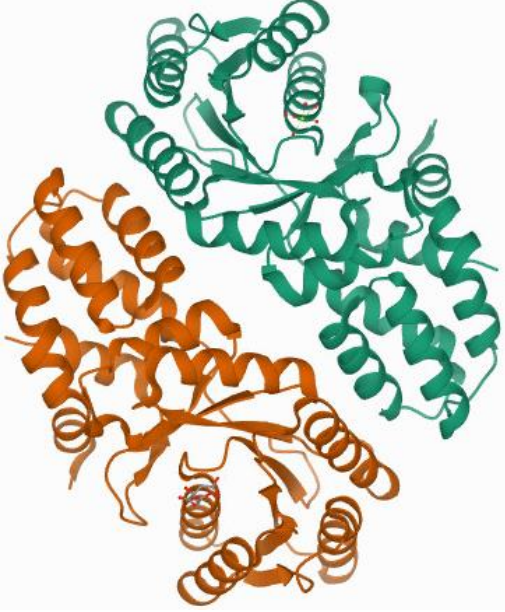
Afin de pouvoir réaliser l'amarrage moléculaire avec le logiciel AutoDock 4.2, l'ensemble d'outils suivant est nécessaire :

- Auto Grid
- AutoDockTools
- Les structures optimisées des ligands
- Le fichier d'Escherichia coli téléchargeable depuis le site de base de données de protéine ([www.pdb.com](http://www.pdb.com))

La structure chimique de Fc3Fma a été optimisée par le progiciel Gaussien 09, en utilisant le niveau de théorie B3LYP avec une bases 6-311<sup>++</sup>G (d,p). Les géométries des complexes ont été entièrement optimisées en utilisant la théorie de la densité, sans imposer de contraintes de symétrie.

Les expériences d'amarrage moléculaire des ligands Fc3F et la gentamicine ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle de la protéine de l'Escherichia coli (PDB ID : 1VMA) avec une longueur de séquence égal à 306 acide aminé , extrait de la Protéine Data Bank (<http://www.pdb.org>).

**Tableau 07:** Informations sur le récepteur cible choisie pour l'études d'amarrage.

	Transglycosylase de E.coli	
	PDB ID	1VMA
	Resolution(Å)	1.60
	Valeur R libre	0.253
	Valeur R	0.209
	Mutation (s)	No
	Chaînes	A
	Organisme(s)	Thermotogamaritima

### ✓ Les étapes d'AUTODOCK

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

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

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

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

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

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

## Chapitre I Matériels et méthodes

La recherche a été effectuée dans une grille de 41 et 51 points par dimension avec des points séparés par 1.000 Å. Les centres et les tailles de la grille ont été définis pour chaque ligand comme indiqué dans le Tableau 08, et une taille d'étape de 0.375 centrée sur le site actif de protéine. La meilleure conformation a été sélectionnée avec l'énergie d'amarrage la plus faible.

**Tableau08:** Paramètres d'amarrage sélectionnés pour l'Escherichia coli

Centre de la grille			Taille de la grille (Å)		
X	Y	Z			
44.922	128.608	6.551	70	70	70

- Analyse du résultat : A la fin du processus d'ancrage, un fichier dock.dlg est généré. Il contient les coordonnées ancrées finales regroupant les solutions proposées (confirmations) par similarité et les classes par énergies croissantes. La similarité entre deux solutions est calculée à l'aide de l'écart quadratique moyen (RMSD). ces conformations ancrées peuvent être visualisées à l'aide d'AutoDockTools, elles peuvent être écrites sous forme de fichiers ".pdbqt" à l'aide d'AutoDockTools, ou elles peuvent être lues directement à partir du fichier dock.dlg à l'aide d'un éditeur de texte. Théoriquement, la meilleure solution est celle avec l'énergie de liaison libre la plus faible qui doit être négative ( $\Delta G < 0$ ).

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

### II.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne in vitro:

#### ✓ Préparation des produits à tester:

Le dérivé N-Ferrocenylmethyl 3trifluorométhylaniline est dissous dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations différents de 4 jusqu' à 20 mg/ml.

### ✓ **Méthodes:**

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion des disques citée par (Yakhlef, 2010). La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration de dérivé ferrocénique .

### ✓ **Les milieux de culture:**

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- Le bouillon nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes;
- le gélose nutritif ensuite a été utilisé pour la réactivation de la souche bactérienne
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents Concentration de dérivé ferrocénique;

### ✓ **Conservation des souches:**

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive)

### ✓ **Préparation des pré cultures:**

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

### ✓ **Préparation des disques:**

Nous avons préparé les disques par papier wattman de 6mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, pour la stérilisation 30 minutes à 120°C dans l'autoclave. Les disques sont gardés jusqu'à l'utilisation.

### ✓ **Préparation des suspensions bactériennes:**

## Chapitre I Matériels et méthodes

---

A l'aide d'une pipette pasteur nous avons prélevée quelques colonies bienisolées et parfaitement identiques et sont été mises dans 10 ml d'eau physiologiquestérile à 0.9% de sel (Na Cl). La suspension bactérienne standardisé de bactéries (0.5

McF =  $1.5 \times 10^{-8}$  CFU/ml) est préparée à l'aide de densimètre (densiCHEK plus biomérieux).pour l'ensemencement dans le milieu MH

### ✓ **Test de l'activité antibactérienne:**

La gélose Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boites Pétrie stériles à 4mm d'épaisseur et laissée se gélifier. a l'aide d'une écouvillon stérile, la suspension préalablement Préparé a été étalé sur la surface entière de la gélose

Mueller Hinton (GMH) à trois reprises, et laisser sur la paillasse pendant 30 minute

### ✓ **Lecture:**

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition et comparée avec celle de DMSO comme contrôlenégatif et les antibiotiques comme contrôle positif (Gentamicine 120µg/disc)

(Khadri, 2009), et par mesure de l'absorbance par la spectroscopie UV-vis

### ✓ **Par détermination de diamètre d'inhibition:**

Après 18-24 d'incubation à 35-37° dans l'étuve Mesurer les diamètres des zones d'inhibition complète (comme jugé à l'œil nu), y compris le diamètre du disque.

Mesurez les zones au millimètre entier le plus proche, à l'aide d'étriers coulissants et d'une règle. La comparaison se fait par le test positif la gentamycine

### ✓ **Mesure spectroscopique par spectroscopie UV -Vis**

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

#### - **Procédure :**

La suspension bactérienne étalée sur la gélose MH de chaque boîte de pétri a été prélevée à l'aide d'un écouvillon stérile sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en les grattant délicatement afin de ne pas prélever la gélose en suite la suspension est diluée dans un volume de Na Cl 0.9% stérile dans un tube à essai. La densité optique des échantillons préparés (en absence et en présence de ferrocénique) a été déterminée à une longueur d'onde de 620nm. Le pourcentage d'inhibition de l'*Escherichia coli* était calculé par la relation suivante (P. P. McCue *et al.*, 2004)

Avec :

$$I\% = (1 - A/B) \times 100$$

**A** = La valeur de la densité optique en absence de l'inhibiteur (disque de DMSO).

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

Pour les dérivés ferrocéniques qui interagissent avec l'*Escherichia coli* la constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation de Benesi-Hildebrand suivante (Lesueur D *et al.*, 2007).

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

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

La constante de liaison,  $K$  est évaluée à partir du rapport pente/interception du tracé du terme de l'équation précédant en fonction de l'inverse de la concentration de produits.

# **Résultats et discussion**

## I. Résultats

### I.1. Evaluation *in-silico* de l'activité antibactérienne :

#### I.1.1. Prédiction des propriétés ADMET :

Il est estimé que près de 90% des candidats-médicaments échouent en raison d'une efficacité inacceptable ou en raison de leur toxicité. Il est donc devenu évident que les études ADMET jouent un rôle crucial dans le succès d'un candidat-médicament. C'est pourquoi, nous avons jugé utile de prédire les propriétés ADMET de dérivé étudié N- Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline.

Les résultats obtenus ont été comparé à ceux d'une molécule de référence en l'occurrence la Gentamicine, un médicament antibiotique et utilisé pour traiter divers types d'infections bactériennes.

##### I.1.1.1. Propriétés physico-chimiques :

Nous avons prédit les paramètres physicochimiques des inhibiteurs de Escherichia coli étudié en utilisant le serveur online Swiss ADME, les valeur des propriétés observée sont montrée dans le tableau qui suivent.

**Tableau 09:** Propriétés physicochimiques des composé N- Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline et gentamicine.

Propriétés	Gentamicine	Fc3FManiline
<b>Formule</b>	C <sub>12</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> F <sub>3</sub> Fe N
<b>Poids moléculaire(g/mol)</b>	477.60	333.21g/mol
<b>Nom. atomes lourds</b>	33	22
<b>Fraction Csp3</b>	1.00	0.42
<b>Nom. Liaison Flexibles</b>	7	4
<b>Nom. Accepteurs de liaison H</b>	12	1
<b>Nom. Donneurs de liaison H</b>	8	1
<b>Log P</b>	-2.15	2.43

Log S	Soluble	Soluble
Réfractivité molaire	118.31	86.06
TPSA (Å <sup>2</sup> )	199.73	29.10

Les résultats indiquent que le composé ferrocénique Fc3FManiline répondent à la règle de Lipinski et celle de Veber, les paramètres : poids moléculaire, nombre de H-bond donneur et accepteur d'hydrogène, le Log P et le nombre de liaison flexible sont respecté pour le composé. En plus nous avons noté que le composé sont soluble dans les milieux aqueux.

Les dix composés ont des poids moléculaires  $\leq 500$  g/mol. D'autre part, nous n'observons que les valeur de lipophile (LogP) de notre compose inférieur à 5, ils ont donc montré de très bon résultat et peuvent être facilement absorbé par le corps. Cependant le composé ont un nombre de donneur de liaison hydrogène  $\leq 5$ , un nombre d'accepteur de liaison hydrogène :  $\leq 10$ . Nous pouvons donc dire que la règle des cinq Lipinski a été vérifiée.

Concernant la règle de Veber, la surface polaire topologique de ce composé est moins de 140 Å<sup>2</sup>. Ainsi que, un nombre inférieur ou égale à 10 de liaison flexible.

Donc on peut dire, que les résultats de ce tableau montrent que la molécule étudiée s'inscrivent parfaitement dans la marge de ces critères.

#### **I.1.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques :**

Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastro-intestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages. Nous avons prédit les paramètres pharmacocinétiques afin d'affirmer notre sélection et d'aller vers le composé ayant le plus de chance d'être un candidat médicament. Les résultats de l'évaluation des propriété pharmacocinétique des dérivé ferrocéniques Fc3F étudié à l'aide du serveur SwissADME sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés N-Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline et du gentamicine.

Propriétés	Gentamicine	Fc3FManiline
<b>GI Absorption</b>	Faible	Élevée
<b>BBB perméabilité</b>	No	Yes
<b>CYP1A2 inhibition</b>	Négative	Négative
<b>CYP2C19 inhibition</b>	Négative	Négative
<b>CYP2C9 inhibition</b>	Négative	Négative
<b>CYP2D6 inhibition</b>	Négative	Négative
<b>CYP3A4 inhibition</b>	Négative	Négative

Les résultats de la prédiction des propriétés pharmacocinétique montrent que le dérivé ferrocénique Fc3FManiline présentent une forte absorption par la membrane intestinale ce qui rend possible leur accès au sang, alors que le médicament de référence est caractérisé par une faible absorption intestinale.

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

Dans ces résultats nous n'avons remarqué aucune inhibition ou modification sur les différents isoformes de Cytochrome P450 pour le Fc3f.

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

#### **I.1.1.1. 3.Prédiction de la toxicité :**

Les résultats de la prédiction de la toxicité de dérivé ferrocéniques N-Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline et gentamicine établie à partir du serveur online Pro-Tox-II sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 11:**Prédiction de la toxicité des composé étudié Fc3FManiline et de la gentamicine.

Toxicités	Gentamicine	Fc3FManiline
Prédite LD50	5000mg/kg	380mg/kg
Prédite class toxicité	5	4
Hépatotoxicité	Inactif	Inactif
Cancérogénicité	Inactif	Inactif
Immunotoxicité	Active	Inactif
Mutagénicité	Inactif	Inactif
Cytotoxicité	Inactif	Inactif

Il est révélé par la prédiction de toxicité que notre composé ne peut pas induire des effets néfastes pour l'organisme pour les 5 types de toxicités présentés qui sont mieux même par rapport au médicament témoins.

#### I.1.1.1.3.Généralité sur un drug-like :

Pour qu'une molécule soit un candidat médicament devenir un médicament, elle doit avoir une bonne activité biologique, une efficacité thérapeutique et absence ou peu de toxicité ainsi Il devrait posséder des propriétés qui lui permet d'avoir une très bonne biodisponibilité. Ce sont donc des molécules dites drug-like qui possèdent des propriétés ADME permettant une bonne absorption orale (règle de Lipinski) (Lipinski CA.,2000 ; Lipinski CA *et al.*,1997), et ces sont aussi d'après Walters et Murcko(Walters WP *et al.*,2002) des molécules qui contiennent des groupes fonctionnels et/ou qui ont des propriétés physicochimiques similaires à la plupart des médicaments connus.

Après le passage avec succès des tests cliniques de la phase II, les chercheurs ont observé que les molécules « drug-like » (Lipinski.,2004) arrivent à satisfaire au moins trois des propriétés de Lipinski (Lipinski *et al.*,1997) suivantes :

- Poids moléculaire inférieur à 500 Dalton.
- Log P calculé inférieur à 5.

- Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 10.
- Nombre de donneurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 5.

Des compléments ont été apportés, notamment par Veber (**Veber *et al.*,2002**) :

- Nombre de liaisons rotatives NROT : ( $0 < \text{NROT} < 10$ )
- Polarité TPSA : ( $20 < \text{TPSA} < 130$ )
- Saturation Csp3 : ( $0.25 < \text{Fraction Csp3} < 1$ )
- Solubilité (Log S) : ( $-6 < \text{Log S} < 0$ )

Rappelons que la règle de Lipinski est une technique qui permet d'identifier les composés qui ont des problèmes de perméabilité et d'absorption (**Van De Waterbeemd *et al.*,1996**). Elle a été établie à partir d'une liste de composés qui ont passé avec succès les tests cliniques de la phase II.

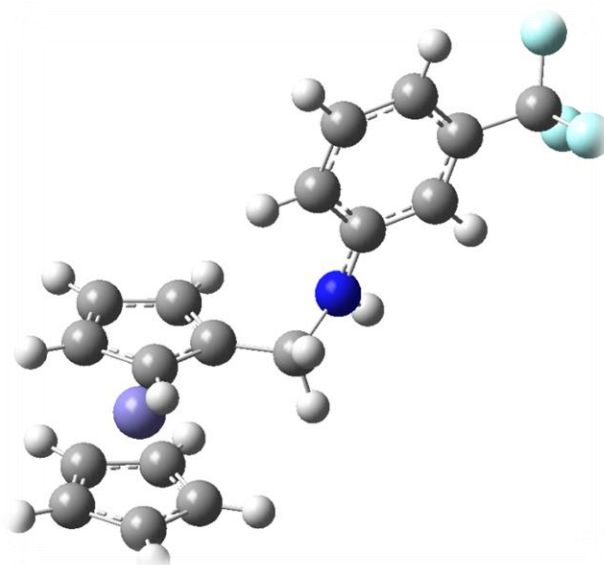
### **I.2.Étude de l'inhibition de l'*Escherichia Coli* par amarrage moléculaire :**

L'étude de l'amarrage moléculaire des complexe synthétisé Fc3F ont été ancrés dans l'enzyme Transglycosylase de l'*Escherichia Coli* afin de prédire le mode de liaison possible des complexe avec la protéine et de mieux visualiser les interactions.

Les études de simulation moléculaire prédisent également le site de liaison sélectionné ainsi que la meilleure configuration des ligands étudiés à l'intérieur de protéine.

#### **I.2.1. Optimisation structurelle :**

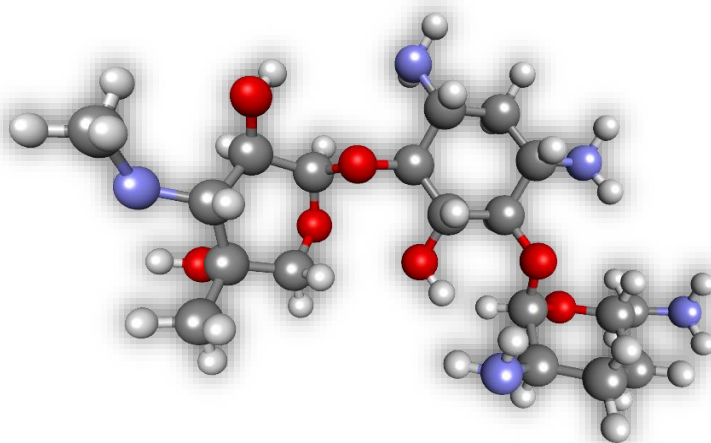
Les structure de conformation 3D entièrement optimise de Fc3F sont présente à la Figure 25.



**Figure 25:** Représentation ORTEP de Fc3F .

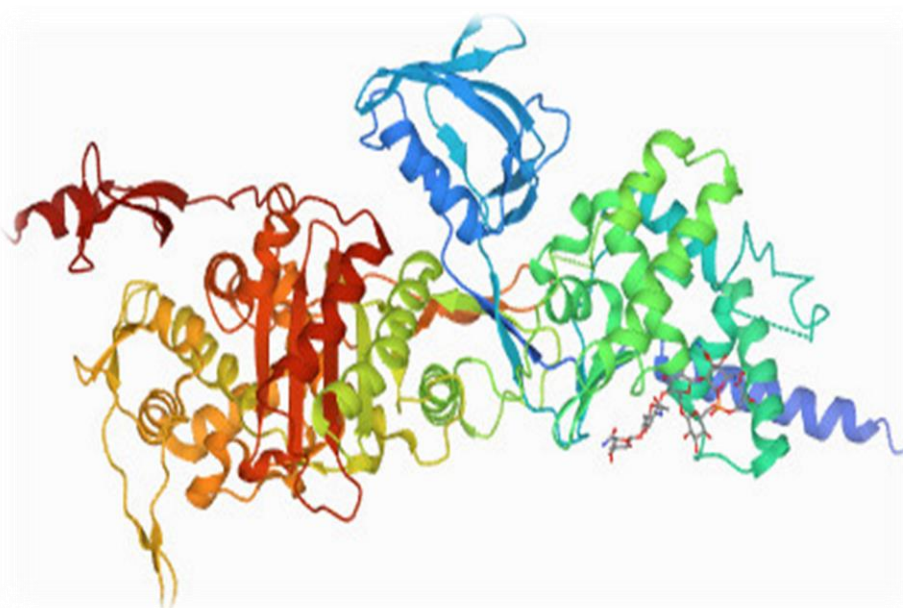
Les ellipsoïdes de déplacement sont dessinés au niveau de probabilité de 30 % et les atomes H sont représentés sous forme de petites sphères de rayons arbitraires. Les codes de couleur sont : le carbone gris, l'hydrogène blanc, l'azote bleu, l'oxygène rouge et le fer vert.

La structure tridimensionnelle de la Gentamicine (Numéro d'accès Drug Bank : DB00798) provient du Bank du médicament (<https://go.drugbank.com/>) est présenté dans la Figure 26 (George *Het al.*, 1975).



**Figure 26:** Structure tridimensionnelle de la Gentamicine téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès Drug Bank : DB00284.

Les études d'amarrage moléculaire des ligand Fc3F ainsi que la Gentamicine ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle Figure 3 de l'enzyme Transglycosylase PBP1b de longueur complète d'Escherichia Coli(PDB ID : 3VMA) avec une longueur de séquence égal à 768 acide aminé, extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>)(Huang, C.Y.*et al.*, 2012).



**Figure 27:** Structure tridimensionnelle de l'enzyme Transglycosylase d'Escherichia Coli(PDB ID : 3VMA) téléchargé depuis Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

### I.2.2.Simulations d'amarrage :

L'amarrage moléculaire a été réalisé afin de prédire le mode de liaison possible de dérivé de ferrocène Fc3FManiline préparé à l'Escherichia Coli et de visualiser davantage les interactions. Avant d'effectuer les calculs d'amarrage, toutes les molécules d'eau cristallographiques ont été retirées de la structure cristalline de l'Escherichia Coli, des atomes d'hydrogène ont été ajoutés et des charges partielles ont été attribuées au fichier de structure de l'Escherichia Coli.

Les énergies libres de liaison, le constante la liaison et le valeur de l'IC50 résultante des adduit ancré Escherichia Coli-Fc3F et Escherichia Coli-gentamicine est résumée dans le Tableau12.

**Tableau 12:** Constante de liaison, l'énergie libre la liaison et les concentrations minimale inhibitrice obtenue pour le complexe étudié par approche d'amarrage moléculaire

Adduits	K ( $M^{-1}$ )	$-\Delta G$ ( $KJ.mol^{-1}$ )	IC50 ( $mol/l$ )
<b>Fc3F- Escherichia Coli</b>	$1.01 \times 10^4$	22.85	0.1254
<b>Gentamicine-Escherichia Coli</b>	$1.36 \times 10^5$	29.33	0.0125

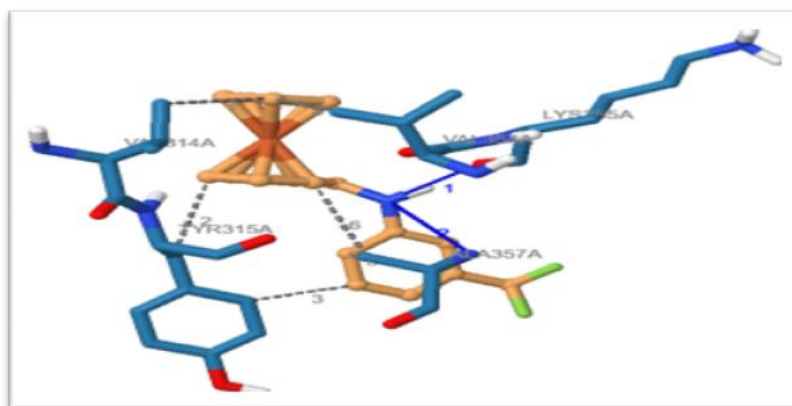
L'amplitude d'énergie libre de liaison calcule indique une affinité de liaison élevée entre l'Escherichia coli et le ligand étudié. Les constantes de liaison ont été conclues à partir des valeurs d'énergie de liaison à l'aide de l'équation suivante :

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

Ou R : La constante des gaz parfait, T : La température en Kelvin. Les valeurs d'énergie libre de liaison obtenues ainsi l'IC50 sont très proches de celles obtenues in-vitro. Ainsi, nous pouvons voir qu'il y avait un complément mutuel entre les études expérimentales et la technique d'amarrage moléculaire, ce qui peut valider nos tests expérimentaux et fournit une preuve supplémentaire de l'interaction d'inhibition.

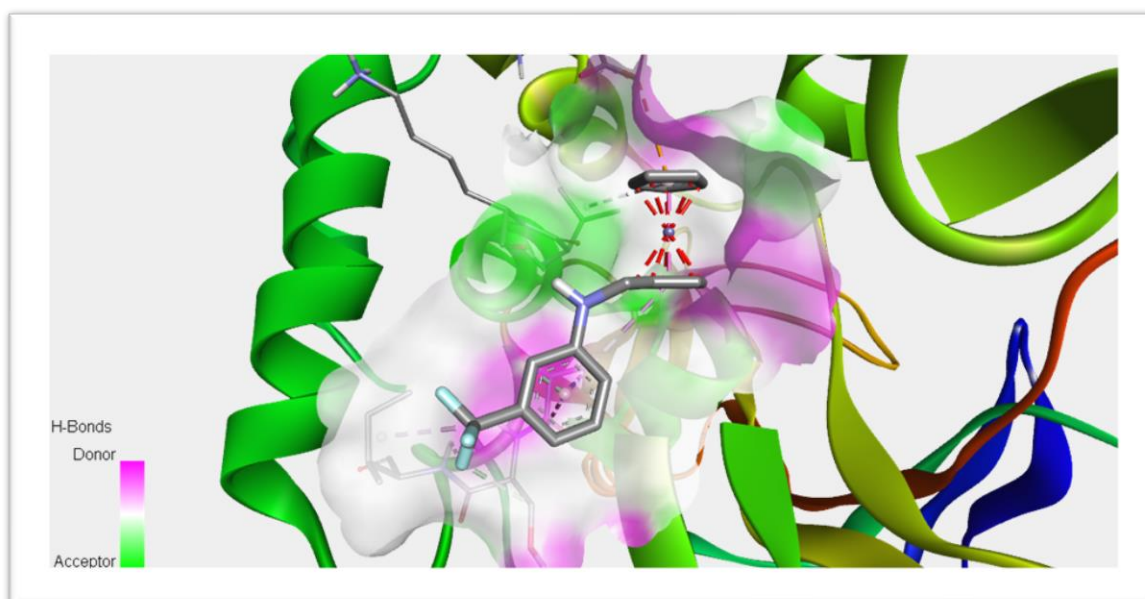
La vue de l'interaction présentée dans la Figure 27 indique le positionnement des complexe étudiés dans le site actif de la protéine.

De plus, les résultats d'amarrage de Fc3F avec l'Escherichia coli ont clairement montré la formation des liaisons électrostatique (Figure 28) entre les acides aminés de la protéine et le ligand étudié.



**Figure 28 :** Pose d'amarrage Fc3F et avec l'Escherichia coli (PDB ID : 3VMA) illustrant l'interaction le ligand.

Fc3F forme 2 liaisons hydrogène, la première entre l'atome d'azote de Fc3F et le numéro 355 acide lysine (LYS355) de la chaîne A, les restes des liaisons hydrogène sont formé entre l'atome d'oxygène de Fc3A et les acides aminés : alanine (ALA357)



**Figure 29:** interaction de liaisons hydrophobique et atomes de Fc3F et protéine E.COLI : VAL 314 TYR 315 ALA357

**Tableau 13:** Distances des liaisons hydrogènes, et les atomes de Fc3F et protéine E.COLI

Liaison H	Résidu	Acide amine	Distance H-A	Distance D-A
1	335A	LYS	1.93	147.00
2	357A	ALA	3.15	118.00

**Tableau 14:** Interaction de liaisons hydrophobique et atomes de fc3f et protéine E.coli

	Résidu	Acide amine	Distance	Ligand atome	Protéine atome
1	314A	VAL	3.95	6855	2253
2	315A	TYR	3.42	6850	2260
3	315A	TYR	3.92	6865	2662
4	354A	VAL	3.24	6855	2629
5	357A	ALA	3.27	6866	2653
6	357A	ALA	3.46	6853	2653

### I.3.Etude in vitro de l'activité antibactérienne

Cette partie vise à déterminer l'activité antibactérienne de dérivé ferrocéniques avec trois souches, à savoir : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsilla pneumonie* (ATCC 700603) .

Le dérivé utilisé pour déterminer cette activité est le dérivé N-Ferrocenylmethyl 3trifluorométhylaniline, qui est dissous dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations de 4 et 20 mg/ml.

### I.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par diamètre d'inhibition

Le tableau 15 présente les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour chaque souche bactérienne et chaque concentration (mg/ml)

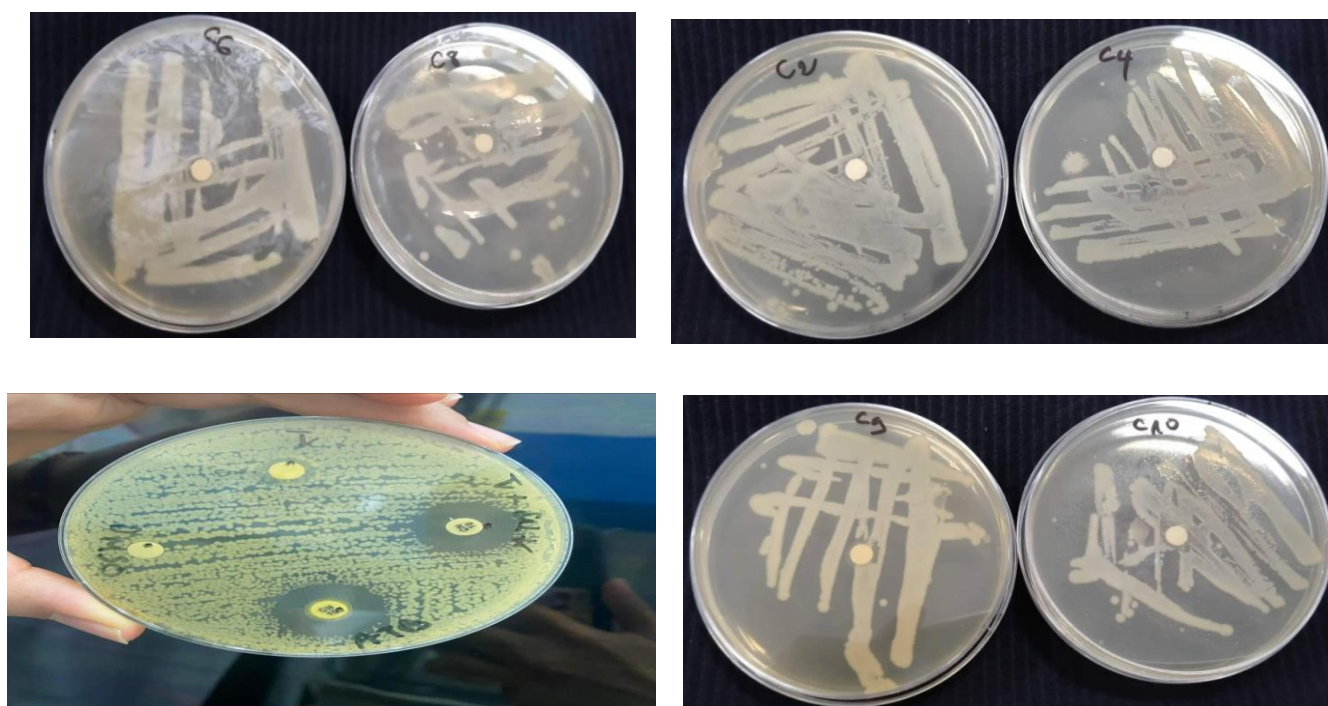
**Tableau 15:** Diamètres des zones d'inhibition des trois souches bactériennes.

Diamètre par (mm)			
Souches testés	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Klebsilla pneumoniae</i>
Concentration (mg/ml)			
04	7	0	0
08	9	0	0
12	6	0	0
16	10	0	0
20	7	0	0
Contrôle + (gentamicine)	20	20	20

L'analyse des résultats montre que les diamètres des zones d'inhibitions augmentent pour une seule souche testée sensible dans ce travail en augmentant les concentrations de dérivé.

#### ✓ *Escherichia coli*:

Le diamètre de la zone d'inhibition varie de 7 mm à 10 mm avec le dérivé ferrocénique, et pour le contrôle positif (gentamicine) est 20mm. La plus grande zone d'inhibition (10mm) est obtenue par la concentration (16mg/ml), alors que la plus faible (6mm) est obtenue par la concentration.



**Figure30 :** Activité antibactérienne de dérivé ferrocénique sur *Escherichia coli*.

✓  *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsilla pneumonie*:

Le dérivé ne montre aucun inhibition de la croissance bactérienne vis-à-vis le contrôle positive (gentamicine) avec diamètre de zone d'inhibition égale 20mm.

**Tableau 16:** Valeurs de l'absorbance de la culture du développement de l'*Escherichia coli* obtenus à partir des données de zone d'inhibition.

Concentration Fc3f (mg/ml)	Diamètre (mm)	I%
(gentamicine)	20	
4	7	65
8	9	55
12	6	70
16	10	50
18	6	70
20	7	65

#### I.4.1.2 Détermination de l'efficacité inhibitrice (IC<sub>50</sub> par données de zone d'inhibition) :

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

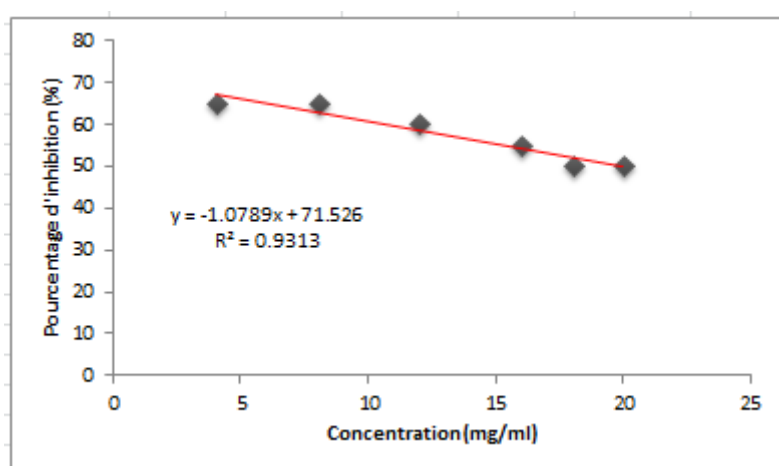
$$I\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Avec :

**A** = La valeur de diamètre d'inhibition de différentes concentration de dérivé .

**A<sub>0</sub>** = La valeur de diamètre d'inhibition de contrôle positif gentamicine.

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



**Figure 31** : Pourcentage d'inhibition de la dérivé ferrocénique par chaque concentration a partir des diamètres d'inhibition.

#### I.4. Etude Spectroscopique de l'activité antibactérienne :

Dans ce qui suit les résultats de mesure des paramètres de liaison et d'IC<sub>50</sub> de dérivés ferrocénique étudiés obtenu par la spectroscopie électronique de dérivé contre l'Escherichia coli.

Ces deux paramètres ont été déterminés par l'étude de la variation de l'absorbance du milieu de culture de l'Escherichia coli en absence et en présence des concentrations croissante de dérivé ferrocénique. Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisé par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans

La solution NaCl 0.9% mesurer à 620 nm. Le Tableau ci-dessous présent la variation de l'absorbance de la réaction d'inhibition de développement de la bactérie en fonction de la concentration de dérivé ferrocénique ajouté. Les valeurs de

l'absorbance représenté dans le Tableau 11 révèlent que quel que soit la portion de ferrocène ajouter il y a toujours une diminution de l'absorbance moléculaire.

**Tableau 17:** Valeurs de l'absorbance de la culture du développement de l'Escherichia coli obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis.

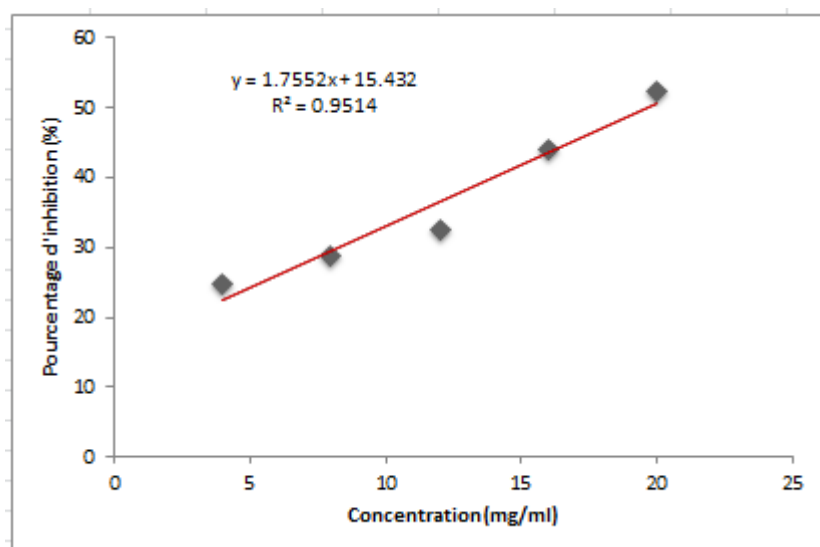
Concentration Fc3f (mg/ml)	Absorbance	I%
0 (DMSO)	2.023	
4	1.597	24.875
8	1.184	28.671
12	1.513	31.318
16	1.216	44.055
18	1.465	44.955
20	1.036	52.847

En se basant sur la diminution d'absorbance du milieu réactionnelle en fonction des différentes concentrations du dérivé ferrocénique (Tableau 17), les paramètres de liaison et l'IC50 de l'interaction entre ces dérivés et l'Escherichia coli a été calculé à partir des données spectroscopiques.

#### I.4.1.1 Détermination de l'efficacité inhibitrice (IC50 par données spectroscopiques) :

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

$$I\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$



**Figure 32 :** pourcentage d'inhibition de la dérivé ferrocénique par chaque concentration a partir de donn"s spectroscopique.

Avec :

**A** = La valeur de l'absorbance de déférentes concentration de dérivé .

**A<sub>0</sub>** = La valeur de l'absorbance de DMSO.

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

A partir des équations linéaires, on peut calculer les IC<sub>50</sub> en mg/ml (tableau 18). D'après les figures 31 et 32, nous pouvons constater une fonction linéaire entre le pourcentage d'inhibition de l'*Escherichia coli* et la concentration utilisée de dérivé ferrocénique étudiés aussi pour le contrôle positif (gentamicine).

Les valeurs obtenues de la concentration inhibitrice 50 de l'interaction de composés étudiés avec de l'*Escherichia coli* sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 18:** valeurs de l'IC<sub>50</sub> des composés étudiés obtenus à partir de la méthode *in vitro*.

Composés Fc3F	IC 50 (mol/mg)
A partir Méthode spectroscopique	0.0590
A partir Zone d'inhibition	0.0598

#### I.4.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de liaison (K et ΔG) :

L'énergie libre de liaison ΔG de l'*E. coli* avec le Fc3f a été déterminé par l'étude du comportement spectroscopique en absence et en présence d'une concentration croissante des ferrocène.

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

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

Avec :

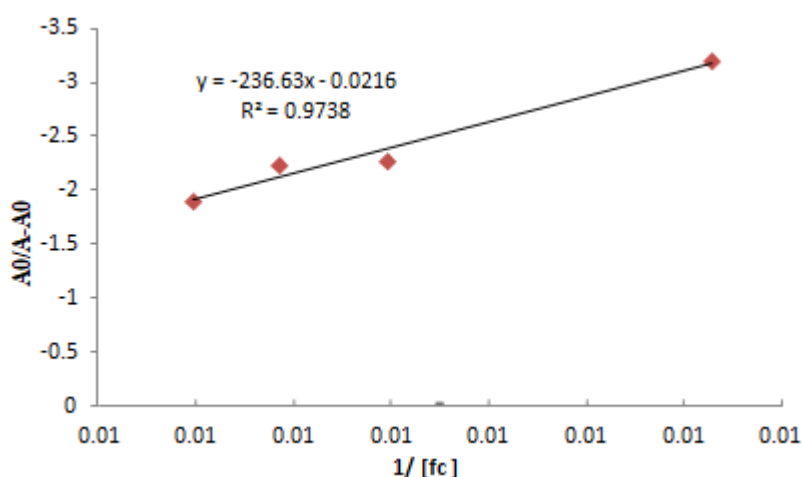
$A_0$  : est l'absorbance du composé libre.

$A$  : est l'absorbance de l'adduit.

$\varepsilon_0$  et  $\varepsilon$  : sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire.

La constante de liaison a été évaluée à partir du tracé de  $\frac{A_0}{A - A_0}$  en fonction de

$\frac{1}{[Fc]}$  (Figure 33). Le rapport pente/intersection peut nous permettre de calculer la constante de liaison.



**Figure 33 :** Tracés de  $\frac{1}{[Fc]}$  en fonction de  $\frac{A_0}{A-A_0}$  utilisés pour calculer les constantes de liaison de dérivé ferrocénique étudié avec l'Escherichia coli.

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

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

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

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

**Tableau 19:** Valeurs des K et  $\Delta G$  des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques.

Composes	$\frac{1}{[Fc]}$	$\frac{A_0}{A-A_0}$	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
N-ferrocenylmethyl 3trifluorométhylalaniline	0.013	-3.192	$9.21 \cdot 10^{-5}$	23
	0.009	-2.269		
	0.008	-2.224		
	0.007	-1.892		

La conformation du dérivé avec une valeur de  $\Delta G$  négative : 23 KJ/mol, ce qui traduit la bonne interaction entre le dérivé et l'Escherichia coli.

### Discussions des résultats

L'objectif principale de ce travail est de synthétiser des dérivés ferrocéniques qui peuvent donner une activité biologique vis-à-vis certaines souches bactérienne. En effet, l'activité antibactérienne de dérivé synthétisé ferrocenylmethylfluoromethylaniline a été évaluée par deux approches: *in silico* et *in vitro*. Dans ce travail, l'étude *in silico* de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et la protéine membranaire Transglycosylase de la souche E.coli a été évaluée par la méthode de docking moléculaire en utilisant l'AutoDockTools afin de déterminer le type et le nombre de liaisons ainsi que le  $IC_{50}$ . Ensuite cette activité antibactérienne a été étudiée *in vitro* par deux méthodes: détermination  $IC_{50}$  par la mesure de diamètres d'inhibition de différentes concentrations de dérivé et celle du contrôle positif la Gentamycine. En revanche, par méthode spectroscopique UV-vis nous avons pu évaluer le type d'interaction par la détermination des paramètres  $K$  et  $\Delta G$  ainsi que le  $IC_{50}$ .

Avant d'étudier une activité biologique de n'importe quel composé il a fallu prédire leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques afin de garantir leur utilisation comme futur médicament. Pour cela nous avons utilisé les serveurs admetSAR, et SwissADME, sur le composé synthétisé, les résultats permettent de calculer des descripteurs physicochimiques ainsi que de prédire les paramètres ADME, les propriétés pharmacocinétiques, la nature médicamenteuse et la compatibilité avec la chimie médicinale d'une ou plusieurs petites molécules pour soutenir la découverte de médicaments. En fin la molécule répond aux conditions drug-like, elle pourra alors être un vrai candidat médicament pour une activité biologique importante.

L'achèvement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir éviter tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives, nous avons utilisé le serveur Web Pro-Tox-II pour l'étude toxicologique. En effet les études de la Cytotoxicité confirment l'intérêt biologique probable de ce dérivé. Ces résultats obtenus peuvent aider davantage à comprendre et à développer des composés d'intérêt biologique et surtout pharmaceutique.

L'étude *in silico* Nous avons prédit les paramètres physicochimiques des inhibiteurs de Escherichia coli étudiés en utilisant le serveur online SwissADME, les

valeurs des propriétés observée que Les dix composés ont des poids moléculaires  $\leq 500$  g/mol. D'autre part, nous n'observons que les valeurs de lipophile (LogP) de notre composé inférieur à 5, ils ont donc montré de très bon résultat et peuvent être facilement absorbé par le corps.

Cependant le composé ont un nombre de donneur de liaison hydrogène  $\leq 5$ , un nombre d'accepteur de liaison hydrogène :  $\leq 10$ . Nous pouvons donc dire que la règle des cinq Lipinski a été vérifiée, concernant la règle de Veber, la surface polaire topologique de ces composé est moins de  $140 \text{ \AA}^2$ . Ainsi que, un nombre inférieur ou égale à 10 de liaison flexible. donc on peut dire, que les résultat de ce tableau montrent que le molécule étudiée s'inscrivent parfaitement dans la marge de ces critères. Et d'autre coté de les propriétés pharmacocinétiques Les résultats montrent que le dérivé ferrocénique Fc3FManiline présentent une forte absorption par la membrane intestinale ce qui rend possible leur accès au sang, alors que le médicament de référence est caractérisé par une faible absorption intestinale. L'analyse des molécules par le paramètre de barrière hémato-encéphalique (BBB) qui protège le système nerveux central, montre que les composé ont été prédits comme perméable à la membrane hémato-encéphalique, ce qui présent un bon résultat pour les médicaments destinés à agir au niveau du système nerveux central, les résultats montrent Cependant, nous n'avons remarqué aucune inhibition ou modification sur les différents isoformes de Cytochrome P450 pour le Fc3f, L'inhibition de ces enzymes est une source importante d'interactions médicamenteuses indésirables étant donné que les changements dans l'activité enzymatique CYP peuvent affecter le métabolisme des médicaments. Et nous avons utilisées le serveur online Pro-Tox-II qui a donné les Prédiction de la toxicité de Fc3f et gentamicine , qui a montré que notre composé ne peuvent pas induire des effets néfastes pour l'organisme pour les 5 types de toxicités présentés qui sont mieux même par rapport au médicament témoins.

L'interaction entre le dérivé ferrocénique et la bactérie révèle que ce dérivé ferrocénique interagit avec l'*Escherichia Coli* vis a vis protéine membranaire d'une façon spontané traduit par le signe négative de la valeur de l'énergie libre. D'ailleurs, le dérivé ferrocénique se lie à l'*Escherichia Coli* et peut provoquer des changements conformationnels en formant des liaisons électrostatiques de type hydrogénique entre les acides aminés (LYS335de la chaine A, et ALA357de la chaine A) et formant des liaisons de type hydrophobes entre les acides aminés ( VAL 314A, VAL 354A , TYR

315A, ALA 357A) de la protéine transglycosylase et le dérivé ferrocénique étudié ce qui freine l'activité biologique de la bactérie.

L'étude *in vitro* vise à déterminer l'activité antibactérienne de Fc3F avec trois souches, à savoir : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsilla pneumonie* (ATCC 700603) .

Nous avons évalué l'activité antibactérienne par diamètre des zones d'inhibitions qui montre une augmentation en fonction de la concentration de dérivé pour une seule souche testée (E.coli) sensibles dans ce travail .

Puis nous avons étudié la variation de l'absorbance du milieu de culture de l'*Escherichia coli* en absence et en présence des concentrations croissantes de dérivé ferrocénique. Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisée par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans l'eau physiologique mesurée à 620nm. A partir des valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes étudiées, ainsi que les concentrations correspondantes de dérivé ferrocénique comme antibactériens, on peut dire que, ce dérivé ne montre aucune activité significative contre les deux souches bactériennes à GRAM (-) testées.

Cependant, Les valeurs de IC50 des composés étudiés obtenus à partir de la méthode *in vitro* en terme de zone d'inhibition (0.0598 mol/mg) et en terme de l'absorbance (0.0590mol/mg) prouvent que notre composé n'est pas toxique.

En revanche l'étude spectroscopique UV-vis de la variation d'absorbance en absence et en présence d'une concentration croissante de dérivé ferrocénique donne une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G_{Fc3f-E.coli} = -22.85 \text{ KJ.mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{Genta-E.coli} = -29.33 \text{ KJ.mol}^{-1}$  de ces résultats nous concluons que l'interaction de Fc3F-E.coli et genta-E.coli est physique de type électrostatique et cela indique la spontanéité de la réaction entre ce dérivé et la bactérie, Ainsi le IC50 Fc3f-E.coli = 0.1254 mol/l et IC50 Genta-E.coli = 0.0125 mol/l confirme les résultats de l'étude *in vitro*.

Nos résultats obtenus sont équivalents et comparables à ceux trouvés par **(Ben abdesselam, 2017)** qui déterminent l'activité antibactérienne des différents dérivés ferrocéniques, ils trouvent que ces composés n'exercent aucun effet significatif d'inhibition contre les souches *Klebsilla* et *Pseudomonas* qui confirme nos

résultats par l'étude de (Bioud & Lassoued, 2015) qui trouvent que l'activité antimicrobienne, contre les bactéries Gram (-) *Escherichia coli* est nulle. Ce comportement n'est pas surprenant à cause la probable implication de la méthodologie dans l'évaluation de l'activité antibactérienne, la structure de la membrane cellulaire des bactéries pourrait aussi y jouer un grand rôle, En effet la membrane externe des bactéries gram (-), constitue une barrière de perméabilité efficace, qui empêche la diffusion des molécules hydrophobes et ce par la présence de charges négatives de surface (Nikaido, 2003). la présence de cette membrane principalement constituée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. Ce type de membrane, relativement étanche aux substances externes, comporte néanmoins des systèmes de transports, appelés porines. Ces porines sont en fait des protéines transmembranaires qui permettent des échanges moléculaires entre la bactérie et le milieu extérieur, principalement pour acheminer les nutriments, sels minéraux ou les petites molécules organiques, ou pour détoxifier le cytoplasme. L'altération du nombre ou de la taille de ces porines peut entraîner une résistance à certaines molécules où l'activité antimicrobienne est nulle .

En fin, Selon les valeurs de coefficients K et les énergies libres de liaison  $\Delta G$  obtenu in vitro par méthode spectroscopie et in silico par le Docking moléculaire, il est remarquable que toutes les valeurs ayant la même ordre de grandeurs ainsi que les valeurs de l'IC50 obtenues par la même technique expérimentale, cela confirme le bonne accorde entre les deux résultats in-vitro et in silico.

# Conclusion

### Conclusion

Au terme de ce travail visant à étudier l'activité biologique de dériver N-Ferrocenylmethyl 3-fluorométhylaniline, et la contribution pour l'amélioration des traitements efficace. Il ressort que ce composé possède des vertus pouvant justifier l'utilisation des ferrocène et ces dérivés ferrocéniques en chimie médicinale

Les résultats obtenus grâce à l'étude in silico et in vitro ont montré que le dérivé de ferrocène a un effet biologique et une activité antibactérienne.

L'étude in silico via un serveur web a montré que le dérivé a un effet en répondant à la règle de Lipinski et celle de Veber par la solubilité en milieu aqueux, la facilité d'absorption par le corps et la membrane intestinale, ainsi que l'inhibition des enzymes qui sont une source d'interactions médicamenteuses indésirables. ce composé a montré un peu plus de toxicité par rapport à Gentamicine.

Enfin, l'étude in vitro nous a montré que le dérivé ait un effet sur Escherichia coli où plus la concentration est élevée plus les diamètres des zones d'inhibition sont grands. En revanche, ces résultats ont été confirmés in silico par Docking moléculaire à travers le nombre de liaison hydrogène qui lie ce produit avec la protéine membranaire de colis ainsi les paramètres d'interaction K et l'énergie libre de Gibbs.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine organométallique biologiquement active il serait intéressant de développer cette recherche d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de l'activité des dérivés ferrocéniques dans l'organisme pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antimicrobiennes de cette le dérivés ferrocénique.

De plus, le développement de la technologie conduit à l'expansion et à l'amélioration de cette étude à l'avenir. En perspectives il sera très intéressant d'étudier d'évaluer l'activité antibactérienne avec des autres souches à différentes doses de ce dérivé ferrocénique, ainsi-il souhaitable d'approfondir l'étude de la résistance bactérienne ainsi que la synergie avec certains antibiotiques pour renforcer leurs effets bactéricides ou bactériostatiques. En fin la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide CMB seront très intéressants pour compléter ce travail.

# **Références**

## **Bibliographiques**

### Références Bibliographiques

- ✚ **Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR. (1997).** Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr* 65:1774-1782
- ✚ **Abbas, K. et Djermoun, M. (2015).** Étude de l'effet de l'extrait aqueux de *Portulaca oleracea* sur l'obésité chez les rats Wistar. Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-OUED. P17.
- ✚ **Abia, S. (2013).** Fabrication et purification de certains composés férrocéniques aminés. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah Ouargla. P7.
- ✚ **Absharon, R, S. H. A. Hassan, S. M. F. Gad El-Rab & A. A. M. Shoreit (2008).** Heavy Metal Resistant of *E. coli* Isolated from Wastewater Sites in Assiut City, Egypt. p:7
- ✚ **ADAÏKA Aïcha. (2020).** Synthèse, caractérisation, étude in vitro de l'activité biologique et analyse in silico et in vivo de quelques dérivés N-ferrocénylméthyltrishydroxyméthylaminométhanes et N-ferrocénylméthyltrifluorométhylanilines. Thèse de doctorat. Université Echahid Hamma Lakhdar-EL-OUED-. P:142
- ✚ **Agregé S., Belguith J., Hadji R., 2015. Généralités sur les Anti-infectieux, en médecine vétérinaire.** Thèse : Méd. Vét, école nationale de médecine vétérinaire Sidi Thabet, P :13-14.
- ✚ **Asses, Y. (2011).** Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur Met. Thèse de doctorat. - Université Henri Poincaré – Nancy I.
- ✚ **Azzi, M. et Hamida, A. (2016).** Effet de l'extrait aqueux de *Phragmites australis* (1841) chez les rats diabétiques Wistar albinos. Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-OUED. P10
- ✚ **Batu Dirersa, W. (2014).** Contribution of Cis and Trans-platinum(II) Complexes in Synthetic Drug and Medicinal Chemistry from the view of Coordination Chemistry. *International journal of chemical and pharmaceutical*, 2:40-47.
- ✚ **Baudouin, A. (2012).** La spectroscopie, l'université Lyon 1., rapport de Formation pour professeurs du 2nd degré, CEPEC, Craonne
- ✚ **Bechki, MKh., (2012).** Étude du comportement électrochimique de 1-(ferrocényl)éthanolet nitrophenyleferrocènes, Mémoire Du Magister Université Kasdi Merbah – Ouargla, Algérie, p83
- ✚ **Behera, N. (2005).** Synthesis and characterization of ferrocene containing organometallic compounds. National institute of technology. P06.

- ✚ **Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P (2011.)**Écologie microbienne, Microbiologie des milieux naturels et anthropisés, PUPPA (Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour).
- ✚ **Billing Jennifer, and Paul W. Sherman (1998).** Darwinian Gastronomy: Why We Use Spices: Spices taste good because they are good for us BioScience, Volume 49, Pages 453–463.
- ✚ **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.
- ✚ **Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, Kiec-Kononowicz K et Pages JM .(2011).**Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. Federation of EuropeanBiochemicalSocietiesLetters. 585, 1682-1690.
- ✚ **Borgne. M.,** Professeurde chimie thérapeutique ,université Claude Bernard Lyon1 ,Institut des sciences Pharmaceutiques et biologiques de Lyon.
- ✚ **Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. (2000).** Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf45:198–207.
- ✚ **Brut,M.(2009).**Nouvelleapproche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques: Les Modes Statiques. Thèse de doctorat. Université Toulouse eIII-PaulSabatier.P90.
- ✚ **Bryskier A. (1999).** Antibiotiques et agents Antibactériens : classification et relation structure activité. In : Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses, Paris. pp. 54-57.
- ✚ **Cattoir V. (2004).** Pompe d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Pathologie Biologie. 52, 607-616.
- ✚ **Cavallo J D, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Garrabé E. (2004).**Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses. 1, 129–202.
- ✚ **Chaussade. H., S. Sunder, L. Bernard P. Coloby, L. Guy, G. Karsenty, C. Bastide, F. Bruyère. (2013).** Antibiotic treatments in urology Les médicaments antibiotiques en urologie Vol 23 - N° 15 p : 15.
- ✚ **ChengF.,LiW.,ZhouY.,ShenJ.,WuZ.,LiuG.,TangY.2012.**admetSAR:acomprehensivesour ceandfreetoolforassessmentofchemicalADMETproperties.JournalofChemical InformationandModeling.2012,52,3099-3105.

- ✚ **Cyril, K. (2010).** Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électroactifs basés sur le couple ferrocène/ferrocénium. Thèse pour l'obtention du titre de docteur ès Science. Université de Neuchâtel. France
- ✚ **DeLastours V et Fantin B. (2010).** Resistance to fluoroquinolones in 2010: What are the consequences for prescriptions in intensive care units? *Réanimation*. 19, 347-353.
- ✚ **Edition :Durot .** Paris. 100-102p.
- ✚ **ELHadj, S.K. (2016).** Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazolique par modélisation moléculaire. Mémoire de master. Université de Tlemcen. P19-20.
- ✚ **F. Van Bambeke et P. Tulkens,** « Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse ». 2008-2007.
- ✚ **Fasquelle, R. (1971)** .Eléments de virologie médicale, Flammarion, Paris
- ✚ **Fauchère JL. et Avril JL. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses, Paris. 365 :367 :520p.
- ✚ **Gago, F. (1998).** Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Academic Press*. (14) 277–292.
- ✚ **Görmen, M., Pigeon, P., Top, S., Hillard, E.A., Huché, M., Hartinger, G.C., Montigny, F.D., Plamont, M.A., Vessières, N., Jaouen, G. (2010).** Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]Ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives against Human Cancer Cells. *ChemMedChem*. 5, 2039–2050. DOI:10.1002/cmdc.201000286
- ✚ **Kauffman, G.B. (1983).** The discovery of ferrocene, the first sandwich compound. *Journal of chemical education*. (60) 185-186.
- ✚ **Hanzab, N., Houas, M. (2013).** Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocényl-2-nitrobenzène mono et bis substitué. Mémoire de master. Université de Kasdi Marbah Ouargla. P:01.
- ✚ **Hanzab, N., Houas, M. (2013).** Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocényl-2-nitrobenzène mono et bis substitué., mémoire de master académique, Université de Kasdi Marbah Ouargla., Algérie, 24p
- ✚ **Hart T, Shears P. (1997).** Atlas de poche de microbiologie (1 édition). France :flammarion
- ✚ **Hooper DV. (2002).** Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 7, 337-341.
- ✚ **J. Berthet et A. Amar-Costesec,** Dictionnaire de biologie. Bruxelles :De Boeck, 2006.
- ✚ **Javillier, M., et al. (1972)** "Traite de biochimie générale", Tome III, fasc. III, Masson & Cie, Paris

- ✚ **K.Dhahagani,M.P.Kesavan,G.V.Kumar,L.Ravi,G.Rajagopal,J.Rajesh**,*Mater.SciEng. C9* 0(2018)119-130
- ✚ **K.Venkateswarlu,M.P.Kumar,A.Rambabu,N.Vamsikrishna,S.Daravath,K.Rangan,Shivaraj**,*J.Mol.Struct.* **1160**(2018)198-207.
- ✚ **Katz L. et Ashley GW. (2005)**. Translation and Protein Synthesis: Macrolides Chemical Reviews. 105 (2), 499-527.
- ✚ **Kealy,T.J.,Pauson,P.L.,(1951)**.ANewTypeofOrganoIronCompound,dansNature,*vol.168,19* 51,p.1039
- ✚ **Khalef,A.(2012)**.Etudeducomportementélectrochimiquede1-(ferrocenyl)ethanoletnitrophenyleferrocenes.Mémoiredemagister.UniversitédeMohamedKhider ,Biskra.P:8
- ✚ **Khelef,AetLanez,T.(2015)**.Invitroassaysoftheantioxidantactivitiesofferrocenederivativesbearingamine,amideorhydrazinegroups.DerPharmaChemica,7(6):318-323.
- ✚ **Klajner,M.J.(2011)**.Organometalliccompoundsasaanti-canceragents:interactionwithDNAandmigrationincell.Thèsededoctorat.UniversitédeSTRASBOURG.P05-06
- ✚ **Lambert NZ. (1995)**. Antibiothérapie en pratique clinique. Edition : Bergogne-Berezin P.Dellamonica. 33-35 p.
- ✚ **Lanez,E.(2016)**.Etudeinsilicoetinvitrodel'interactiondequelquesamidesferrocéniquesavecl'ADN.Mémoiredemaster.UniversitéMohamedKhider–Biskra.
- ✚ **Lanez,T.etLanez,E.(2016)**.AmoleculardockingstudyofN-ferrocenylmethylnitroanilinesaspotentialanticancerdrug.InternationalJournalofPharmacology,PhytochemistryandEthnomedicine.2(5-12).
- ✚ **Lanez.T.,Henni.M.,(2016)**.Antioxidantactivityandsuperoxideanionradicalinteractionwith2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrileand3-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile.JIRANCHEMSOC.DOI10.1007/s13738-016-0891-1.
- ✚ **Lassoued.M.(2007)**.PolymorphismedesantigènesplaquettaireshumainsdanslapopulationTunisienne.Mémoiredemaster.UniversitédeTunisEL-MANAR.P52.
- ✚ **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M, (1995)**.Microbiologie générale : La bacterie et le monde bactérien, DOIN, Paris, 1995, 517p
- ✚ **Lozniewski A, Rabaud C et Nancy. (2010)**. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.

- ✚ **Madani,Z.(2012).**Influencedesgroupementshydroxyéthyletl'ioduredeméthyltriméthylammoniumsurladiffusionduferrocèneetferrocénium.Mémoiredemagister.UniversitéKasdiMarbahOuar gla.P32-33.
- ✚ **Madigan, M .T ., Martinko, J. M. and Parker, J.(1997).***Brock Biology ofMicroorganism*,8<sup>th</sup>Edition. US, Prentice Hall.
- ✚ **Magnet Sophie and John S. Blanchard (2005),** Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance 105, 477–497 p: 22.
- ✚ **Mahmoudi,N.&Nemsi,A.(2009).**EtudeducomportementanodiquedeNphényl-Nbenzoylferrocénylméthylamine.Mémoiredelicenceacadémique.CentreUniversitaired'ELOUE D,Algérie.P:4
- ✚ **Maiti SN, Kamalesh Babu RP et Shan R. (2006).** Overcoming Bacterial Resistance: Role of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. Topics in Heterocyclic Chemistry. 2, 207-246.
- ✚ **Marie-José Mathieu, Jean-Marie Fonteneau.Porphyre, 2008.** Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie - 1410 pages
- ✚ **Matyara F, KayabA et DinçerbSk. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment. 407, 279-285.
- ✚ **Messaï A., 2006. Analyse Critique Des Pratiques De L'antibiothérapie En ÉlevagesAvicole.** Thèse : Méd. Vét, Université Mentouri de Constantine, Algérie, p:4-24.
- ✚ **Meyer A., Deiana J., Bernard A., (2004).**Cours de microbiologie générale avec cours et exercices corrigés. Ed. Doin, Paris
- ✚ **Milane H. 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, thèse de doctorat, Strasbourg.
- ✚ **Mitscher, L .A.,Segaran, P .P ., Gentry, E. J. et Shankel , D.M.(1999) .**“MultipleDrug Resistance”. *Medicinal Research Reviews*,vol.19,no6,p.477-496.
- ✚ **Mokhtarrosza,** université mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.2012
- ✚ **Monchy, S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez Cupriavidusmetallidurans CH 34. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. Université libre de Bruxelles, p :99
- ✚ **Nauciel C et Vildé JL. (2005).** Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action Edition : Masson. Paris .p:49-56.
- ✚ **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. P : 210-216.

- ✚ **Nies Dietrich H. and simon silver (1995).** Ionefflux systems involved in bacterial metal resistances, journal of industrial microbiologie, society for industrial microbiology.14,186 p:14.
- ✚ **Nies, D.H. (2003).** Efflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FE M S Microbiology Reviews 27, 313-339. .
- ✚ **Perronne C., 1999.** Maladies infectieuses. Wolters kluwerFrance.p: 406.
- ✚ **Poole K. (2004).** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Cellular and Molecular Life Sciences. 61, 2200-2223.
- ✚ **Prescott L., Harley J., Klein D., 2003.***Microbiologie.* Ed. De Boek université
- ✚ **Rodriguez-Villalobos H. et Struelens MJ. (2006).**Extended spectrum  $\beta$ -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. Réanimation. 15, 205-213.
- ✚ **Sansook,S.(2017).**BiologicalEvaluationofFerroceneDerivatives.Doctoratthesis.Universityof Sussex.P:06-09
- ✚ **Sedrati A., 2014.** Étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes à l'origine desinfections infantiles à L'EPH d'Ouargla. Mémoire. Université Kasdi Merbah-Ouargla.44 P.
- ✚ **Serge Blaise Emaleu, 2017,** Editions Publibook, 248 pages.
- ✚ **Singleton P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et la bactériologie.
- ✚ **Souna D., (2011).** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactériesau niveau du C.H.U sidi Bel Abbes. Mémoire. Université Abou BekrBelkaid. 104p
- ✚ **Sow,A.I.2013.**Incursion dans le monde "invisible" des bactéries. *EditionsL'Harmattan.* P:68
- ✚ **Terki,B.(2007).**Synthèse,cyclisation,étudeélectrochimiqueetstructuraledequelqueN-acyl-N'alkylférocenylméthylehydrazide.Thèsededoctorat.UniversitédeHadjLakhdar-Batna.P06
- ✚ **Veyssier P. (1999).** Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, nitrohétérocycles et 8-hydroxyquinoléines. In : Bryskier A (Eds.), Antibiotique, agents antibactériens et antibiotiques. Ellipses, Paris, pp. 1008-1009.
- ✚ **Wareham DW et Wilson P. (2002).**Chloramphénicol in 21st century. 63, 157-161.
- ✚ **Weaver,R.F.(1942).**MolecularBiology.fifthedition.P23-24.
- ✚ **Yala D, Merad AS, Mohamedi D. etOuarkorich MN. (2001).** Resistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb. 91, 6-14.
- ✚ **Zayya,I.A.;JonathanSingh,J.andSpencer,J.L.(2013).**SynthesisandReactionsofFerrocene.C hemicalandPhysicalSciences.
- ✚ **Zerari,A.(2013).**Synthèse,séparationetidentificationdeMNitrophenylferrocènemonoetbissub stitue.Mémoiremaster.UniversitéKasdiMarbahOuargla.P02

- ✚ **Zogheib M, E, Dupont H, Petiot S, Guinot PG, Diouf. (2005).** Yeo WX, Phua CQ, Lo S. Is routine chest X-ray after surgical and tracheostomy. Learning curve for real-time ultrasound guided percutaneous tracheostomy.; 71:51–3.
- ✚ **Zozaya, C. (2011).** Déterminants de trajectoires de détresse pendant la première année qui suit l'an non cancer primitif ou récidivant. Thèse de doctorat. Université Bordeaux Segalen P40.