



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 en Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

Synthèse et étude *in silico*, *in vitro* et *in vivo* de l'activité
biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline

Présentés Par :

Medeljel Sara & Tedjani Aicha

Devant le jury composé de :

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| ➤ Président : Mr Alia Zeid | M.A.A, Université d'El Oued |
| ➤ Examinatrice : Mme Boutellis Safia | M.A.A, Université d'El Oued |
| ➤ Promoteur : Mr Lanez Touhami | Professeur, Université d'El Oued |
| ➤ Co-promotrice : Mme Adaika Aicha | Doctorante, Université d'El Oued |

-Année universitaire 2017/2018-

Dédicace

Je dédie ce travail :

À ma chère mère Medellel Nadja

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 medellel abdelghani.

À mes chères sœurs, Nadjah, Hania et Safa pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

À mes chers frères, Ismail, Abdelfattah, Ammar ,Belghacem et Ali pour leurs soutien.

À tous mes amies sourtot Tedjani Aicha, Soltane Teber, Meissa Nadjat et Bia Khadidja.

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

Sara



Dédicace

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

A ma chères maman: Tedjani Fatima. pour sa encouragement, tendresse, amour et soutien durant mes études, vous trouverez ici le fruit de vos sacrifice et je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêve par ce modeste travail.

Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mon père: Tedjani Taher.

A mes chères sœurs: Djamilla, Samah, Nadjat, Afaf, Renda et surtout Hasna et Kaouthar qu'elles m'aident beaucoup.

A mes chers frères: Ali et Hakim.

Pour leurs amour et compréhension.

A mes neveux: Mohammed Laroussi, Tasnime, Ritadj, Hadj ali, Mohammed Louay, Amdjed, Saousan, Raid, et la petite Montaha.

A mes amies du cœur: Adaika Djihade, Agabe Yesmine et Hannafi Anouare.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des Beaux moments au cours de mon cursus à l'université Meissa Nadjat, Soltane Teber, Meddellel Sara et Bia Khadidja.

A tous qui me connaisse de prés ou de loin.

Nicha

Remerciements

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 le Professeur Lanez Touhami directeur de laboratoire de recherche VTRS à l'université d'El oued, pour avoir accepté de nous encadrer et pour son dynamisme, nous ont permis d'avancer plus loin dans nos recherches.

Notre remerciements les plus sincères et le plus chaleureux s'adressent à notre co-encadreur de mémoire, Mme Adaïka Aïcha, 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 vont aussi à Mr ALIA Zaid qui nous avait fait l'honneur de présider ce Jury et à Mme BOUTELLIS Safia d'avoir accepté d'examiner notre travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos haute considération.

Notre remerciements s'adressent aussi à tout les personnes du laboratoire VTRS surtout Dr. Mouada hanane, Dr. Zegheb Nadjiba, Dr. Lanez El-hafnaoui, Dr. Hanni Mimouna. Nous remercions nos collègues et amies pour leur soutien et plus précisément: Meïssa Nadjet, Soltane Teber, Meïssa Saïda, Fouhima Fatima Zohra et Nesba Safa.

Nous exprimons aussi nos remerciements à Dr Tlili mouhamed laïd et Mme Mahboub Nassma enseignants de faculté de science et de la vie. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.

Nous n'oublions pas nos techniciens de laboratoire et surtout: Laïb Ibrahim de son qualité humaine et son soutien. Et à tous les membres de laboratoire de l'urgence médicale d'El-oued, laboratoire d'ELMEDJD et de laboratoire Ben Bordi.

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 famille. Merci 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.

Résumé

L'objectif de notre étude est de synthétiser le dérivé N-ferrocénylméthylaniline résulte de l'incorporation d'un motif ferrocénique dans le squelette de base de l'aniline et d'évaluation *in silico*, *in vitro* et *in vivo* de leur activité biologique. L'étude *in silico* et *in vitro* de l'interaction ADN-FMA montre qu'il y a une interaction spontanée entre le dérivé FMA et l'ADN qui se lie par intercalation ou par liaison électrostatique. L'étude de l'activité antioxydant de dérivé ferrocénique en appliquant le test de piégeage de radical libre DPPH[•] par spectrophotomètre et de test de piégeage de radical superoxyde par voltammétrie cyclique. Les résultats obtenus ont montré que le FMA possède une activité de piégeage du radical DPPH[•] plus élevée avec une IC₅₀=9,51×10⁻⁴ mg/ml. Et aussi une activité inhibitrice élevée du radical superoxyde avec une IC₅₀=0.077 mg/ml. L'étude de l'activité antibactérienne de ce composé testés a été effectuée vis-à-vis les cinq souches bactériennes: *Escherichia coli*, *Salmonella entericassp*, *Pseudomonas aéruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua* montrent clairement que le composé ferrocénique dépourvu d'une activité significative contre ces souches. L'évaluation de la cytotoxicité par le test d'hémolyse montre que notre dérivé présente une faible cytotoxicité vis-à-vis les globules rouges humain. L'analyse *in vivo*, montre une augmentation du poids relatif du foie de groupe exposé au métribuzine, Des changements remarquables dans les paramètres biochimiques étudiés et la présence des états de stress oxydatif. En revanche, le traitement par le FMA normalise le poids relatif de foie et les paramètres biochimiques étudiés en diminuant l'état de stress, ainsi l'étude histologique montre que le FMA protège le foie contre la nécrose tumorale.

Mots clé: FMA, ADN, DPPH[•], radical superoxyde, voltammétrie cyclique.

Abstract

The objective of our study is to synthesize the N-ferrocenylmethylaniline derivative resulting from the incorporation of a ferrocenic unit in the aniline and the evaluation *in silico*, *in vitro* and *in vivo* of their biological activity. The study *in silico* and *in vitro* of the DNA-FMA interaction shows that there's a spontaneous interaction between the FMA derivative and the DNA that binds by intercalation or electrostatic binding. The study of the antioxidant activity of the ferrocene derivative by applying the DPPH• free radical scavenging test by spectrophotometer and superoxide scavenging test by cyclic voltammetry. The results obtained showed that the FMA has a higher activity of trapping the radical DPPH• with an $IC_{50} = 9.51 \times 10^{-4}$ mg/ml. And also a high activity of inhibition of the superoxide radical with an $IC_{50} = 0.077$ mg/ml. The study of the antibacterial activity of the tested compound carried out against the five bacterial strains: *Escherichia coli*, *Salmonella entericassp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Listeria innocua*, clearly shows that the ferrocenic compound has no significative activity against these strains. The evaluation of cytotoxicity by hemolysis test shows that our derivative compound has low cytotoxicity against human red blood cells. The study *in vivo* shows an increase in the relative weight of the liver of the group that exposed to metribuzin, remarkable changes in the biochemical parameters and an oxidative stress states. In contrast, treatment with FMA normalizes the relative liver weight and biochemical parameters and decreasing the state of stress, so the histological study shows that the FMA protects the liver against tumor necrosis.

Key words: FMA, DNA, DPPH•, superoxide radical, cyclic voltammetry.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى تصنيع المشتق الفيروسي N-فيروسينيل ميثيل أنيلين الناتج من دمج وحدة الفيروسين مع الهيكل الأساسي من الأنيلين والدراسة حاسوبيا (*in silico*) ، في المختبر (*in vitro*) وفي الجسم الحي (*in vivo*) للفعالية البيولوجية لهذا المركب. بينت الدراسة حاسوبيا وفي المختبر أن هناك تداخل تلقائي بين FMA و ADN الذي يرتبط عن طريق إقحام أو عن طريق روابط هيدروجينية تترجم من قبل معايير التداخل من ΔG و K. كما تم دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمشتق الفيروسيني بتطبيق اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH• باستخدام التقنية الضوئية، واختبار تثبيط جذر السوبروكسيد باستخدام تقنية الفلظامتري الحلقي. بينت النتائج المتحصل عليها أن المشتق الفيروسيني يملك فعالية عالية مثبطة لجذر DPPH• المقدرة ب-IC₅₀ : 9.51×10^{-4} مغ/مل، وفعالية عالية أيضا مثبطة لجذر السوبروكسيد مقدرة ب-IC₅₀ : 0.077 مغ/مل. كما بينت الدراسة المضادة للبكتيريا للمركب الفيروسيني عند إختباره على خمس سلالات بكتيرية : *Escherichia coli*, *Salmonella entericassp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua* أن هذا المشتق لا يملك فعالية مضادة لهته البكتيريا. كما قد بين إختبار انحلال الكريات الحمراء أن FMA لديه قدرة ضعيفة على تحليل الكريات الحمراء. وقد أظهر التحليل في الجسم الحي عند المجموعة التي تعرضت للمتروبيزين زيادة في الوزن النسبي للكبد، تغيرات في المعايير البيوكيميائية المدروسة ووجود إجهاد تأكسدي. غير أن العلاج بالمشتق الفيروسيني أعطى نتائج بتعديل الوزن النسبي للكبد، وتعديل في المعايير البيوكيميائية المدروسة وخفض في حالات الإجهاد التأكسدي. أظهرت الدراسة النسيجية للكبد أن المركب الفيروسيني يعمل على حماية الكبد ضد التورم.

الكلمات المفتاحية : N-فيروسينيل ميثيل أنيلين، ADN، DPPH•، السوبروكسيد، الفلظامتري الحلقي.

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine	K₂HPO₄ : Phosphate de potassium dibasique
Å : Ångström	Kcal : Kilocalorie
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	Kg : Kilogramme
ADT : AutoDockTools	KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique
AFP : Alpha-FoetoProtéine	KJ : Kilojoule
AG : Acide gallique	l : litre
ALAT : alanine aminotransférase	LDH : Lactate deshydrogénase
ARN : Acide RiboNucléique	M : molaire
ASAT : aspartateaminotransférase	μA : micro-ampère
BHT : Butylhydroxytoluène	MDA : malondialdéhyde
BSA : Sérum bovin albumine	MDH : Malate déshydrogénase
°C : Degrés Celsius	mg : milligramme
C : Cytosine	MgSO₄ : sulfate de magnésium anhydre
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène	min : minute
Cispt : Cisplatine	ml : millilitre
cm : centimètre	mmol : millimole
CO₂ : anhydride carbonique	Moy : moyenne
CV : Voltamétrie Cyclique	mV : milliVolte
D0.2 : Dose 0.2 mg/kg	mV/s : millivolt sur seconde
DA : deoxyadénine	N : Azote
dlg : AutoDock docking log	NaCl : Chlorure de sodium
DPPH : 2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl	NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
DMF : N,N-diméthylformamide	NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
DMSO : Dimethyl sulfoxide	NH₃ : ammoniac
DO : Densité Optique	NH₄Cl : Chlorure d'ammonium
DT : deoxythymidine	nm : nanomètre
DTNB : 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque	NS : différence Non Significative
E₀ : Potentiel formel	O₂⁻ : superoxyde
ECL : électrochimiluminescence	PAL : phosphatase alcaline
EDTA : Acide éthylène Diamine Tétracétique	Pdb : Protein Data Bank
Epa : potentiel de pic anodique	PBS : phosphate salé de sodium
Epc : potentiel de pic cathodique	Pdbqt : Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)
ESM : Ecartype moyenne	pH : potentiel Hydrogène
Fc : Ferrocène	pNPP : p-nitrophénylphosphate
Fe : Fer	POD : peroxydase
FMA : Ferrocènylméthylaniline	ppm : Parties par million
g : gramme	prot : protéine
G : Guanine	QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship
GB : globule blanc	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
GGT : Gamma Glutamyl Transférase	S : Taille de site de liaison
GLDH : glutamate déshydrogénase	SDS : Sodium Dodecyl Sulfat
GPT : Glutamate pyruvate transaminase	T : Thymine
GSH : Glutathion réduite	TBA : Acide thiobarbiturique
H : Hydrogène	TCA : Acide trichloroacétique
H₂O : eau	TGO : glutamate oxaloacétate-transaminase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène	
Ipa : courant de pic anodique	
Ipc : courant de pic cathodique	
K : constant de liaison	

TBS : tampon phosphate salé
TGP : glutamate-pyruvate-transaminase
Tm : Température de fusion
TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha
TP : Témoin Pesticide
trs : Tours
U : Uridine
UV : Ultraviolet

Vis : Visible
VTRS : Valorisation et Technologie des
Ressources Sahariennes
 ΔE_p : Différence de potentiel
 μl : microlitre
 ΔG : énergie libre de liaison

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	La structure du ferrocène proposée par Wilkinson et ses collaborateurs	3
Figure 02	Ferrocène sous forme de poudre orange	4
Figure 03	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène	7
Figure 04	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	8
Figure 05	Chemin réactionnel de dérivé N-Ferrocénylméthylaniline	9
Figure 06	Structure chimique de dérivé N-Ferrocénylméthylaniline	9
Figure 07	Le nucléotide (à gauche) et la structure moléculaire de l'ADN	13
Figure 08	Structure physique de l'ADN	14
Figure 09	Conformations canoniques de l'ADN	15
Figure 10	Représentation de l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentée en abscisse	17
Figure 11	Détermination de la température de fusion par la mesure d'absorbance d'une solution d'ADN double brin à différentes température et mise en évidence du caractère coopératif de la réaction	18
Figure 12	Les effets directs et indirects des rayonnements. Les rayonnements entraînent une réaction d'ionisation de la matière à l'origine des effets sur l'ADN	19
Figure 13	Mécanisme des étapes d'apparition et du développement de cancer	20
Figure 14	Les étapes de docking moléculaire	26
Figure 15	L'allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques	30
Figure 16	Structure d'ADN d'un dodécamère	33
Figure 17	Forme libre et réduite du 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle DPPH•	38
Figure 18	Le dérivé N-ferrocényl méthyl aniline synthétisé en poudre.	46
Figure 19	Interaction de FMA avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de	47

	l'interaction FMA-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, (B) : Vue en surface de FMA amarré avec de l'ADN, Il montre que le FMA est attaché dans le petit sillon par liaison H.	
Figure 20	Spectre d'absorption de l'ADN.	48
Figure 21	Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.	49
Figure 22	Spectre d'absorption UV-Vis de FMA ($10^{-3}M$) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans Le DMF.	49
Figure 23	Voltammogramme cyclique de dérivé ferrocénique ($10^{-3}M$) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.	50
Figure 24	Droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	51
Figure 25	Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de FMA libre et celui lié à l'ADN.	52
Figure 26	Voltammogrammes cycliques de FMA ($10^{-3}M$) en absence d'ADN (ligne rouge) et en présence de $3.31163 \mu M$ d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux.	52
Figure 27	Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (noire) et en présence (rouge) de l'ADN.	55
Figure 28	Tracé de C_1/C_n en fonction de [ADN].	56
Figure 29	Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de FMA.	57
Figure 30	Spectre d'absorption UV-Vis de DPPH* en absence et en présence de différentes concentrations d'FMA.	57
Figure 31	Droite de régression du I% en fonction de concentration massique pour le composé FMA.	58
Figure 32	Histogramme de la variation des valeurs IC50 pour l'acide gallique et le dérivé FMA.	58

Figure 33	Voltammogrammes cycliques de radical d' ($O_2^{\cdot-}$) en absence et en présence de concentration croissant de dérivés ferrocénique enregistré sur une électrode de carbone vitreux à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.	59
Figure 34	Droite de régression du I% en fonction de la concentration massique pour le FMA.	60
Figure 35	Histogramme de variation des valeurs d'IC50 pour l'AG et le dérivé FMA.	60
Figure 36	Taux d'hémolyse des Globules en fonction des différents concentration de FMA.	62
Figure 37	Taux d'hémolyse des différents concentration de FMA et de DMSO (C-) et de Tween 80 (C+).	62
Figure 38	Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.	63
Figure 39	Poids relatif des organes (coeur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.	63
Figure 40	Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO,TGP et le taux de PAL) chez les rattes exposées au métribuzine.	64
Figure 41	Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, urée et créatinine chez les rattes exposées au métribuzine.	65
Figure 42	Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations sériques la de LDH et GGT chez les rattes exposées au métribuzine.	66
Figure 43	Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine “AFP”) chez les rattes exposées au métribuzine.	66
Figure 44	Concentration hépatique et rénal de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux	67
Figure 45	Concentration cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux	68
Figure 46	Concentration hépatique et rénal de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux	68

Figure 47	Concentration cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux	69
Figure 48	Concentration hépatique et rénal de catalase (CAT) chez les différents groupes expérimentaux.	69
Figure 49	Concentration hépatique et rénal de catalase (CAT) chez les différents groupes expérimentaux.	70
Figure 50	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie.	71

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Valeurs caractéristiques des paramètres électrochimiques de ferrocène	8
Tableau 02	Conformation de l'interaction FMA-ADN et leur énergie libre ΔG et constante de liaison K.	46
Tableau 03	Distance et énergie de liaison hydrogène, et les atomes de FMA et de l'ADN impliqués dans ce liaison.	47
Tableau 04	Représentation des résultats des ratios DO260/DO280 des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.	48
Tableau 05	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-FMA obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.	49
Tableau 06	Constante et énergie libres de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	51
Tableau 07	Données électrochimiques de la forme libre de FMA et celui de l'adduit FMA-ADN.	53
Tableau 08	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.	53
Tableau 09	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.	54
Tableau 10	Coefficients de diffusion de FMA de l'adduit FMA-ADN.	55

Tableau 11	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique.	56
Tableau 12	Le taux d'inhibition DPPH [•] % pour le composé FMA.	57
Tableau 13	Les valeurs d'IC ₅₀ pour les composés FMA et AG.	58
Tableau 14	Le taux d'inhibition O ₂ ^{-•} % pour le FMA et AG.	59
Tableau 15	Les valeurs d'IC ₅₀ pour le FMA et L'AG.	60
Tableau 16	Activité anti-microbienne de FMA	61

Tableau de matière

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

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01: Chimie de ferrocène et de dérivé ferrocénique étudié	03
I.1.1 Histoire de la découverte de ferrocène	03
I.1.2. Définition	03
I.1.3. Liaison et structure électronique du ferrocène	04
I.1.4. Processus chimique de synthèse de ferrocène	04
I.1.4.1. Réaction du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux	05
I.1.4.2. Réaction du cyclopentadiénylthallium avec le chlorure ferreux	05
I.1.4.3 Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux.....	05
I.1.4.4 Réactivité	05
I.1.5. Propriétés de ferrocène	06
I.1.5.1. Propriétés spectrales	06
I.1.5.2. les propriétés physico-chimique de ferrocène	07
I.1.5.3. Propriétés électrochimiques	07
I.1.6. Le dérivé N-Ferrocénylméthylaniline	08
I.1.6.1. Synthèse de N-ferrocénylméthylaniline	08
I.1.6.2. Structure finale	09
I.1.7. La Chimie médicinale de ferrocène	09
I.1.7.1. Activité antibactérienne	09
I.1.7.2. Activité antifongique	10
I.1.7.3. Activité antioxydants	10
I.1.7.4. Activité anti-cancéreux	10
Chapitre 2 : L'acide désoxyribonucléique (ADN)	12
I.2.1. Histoire de la découverte de l'ADN	12

I.2.2. Définition	12
I.2.3. Compositions et structure de l'ADN	12
1.2.3.1. Les compositions chimiques de l'ADN	12
I.2.3.2. La structure physique de l'ADN	13
I.2.3.3. Les différents structures de l'ADN	14
I.2.4. Les rôles biologiques de l'ADN	15
I.2.4.1. Transmission des caractères héréditaires et de l'information génétique	15
I.2.4.2. La synthèse protéique	15
I.2.5. Les propriétés de ADN	16
I.2.5.1. La solubilité	16
I.2.5.2. L'instabilité chimique de l'ADN	16
I.2.5.3. L'absorption de la lumière Ultra-Violette (UV)	17
I.2.5.4. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)	17
I.2.6. Le stress oxydative et dommage de l'ADN	18
I.2.6.1. Définition de stress oxydative	18
I.2.6.2. Définition des radicaux libres	18
I.2.6.3. Dommage de l'ADN par le stress oxydatif	19
I.2.7. Le cancer en tant que contexte de recherche	20
I.2.7.1. Définition	20
I.2.7.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses	20
I.2.8. Le traitement	21
I.2.8.1. La chirurgie	21
I.2.8.2. La radiothérapie	21
I.2.8.3. L'hormonothérapie	21
I.2.8.4. L'immunothérapie	22
I.2.8.5. La chimiothérapie	22
I.2.9. L'ADN une cible biologique de choix dans le traitement de cancer	22
I.2.9.1. Interaction covalente avec de l'ADN (Les agents alkylants)	22
I.2.9.2. Interaction non covalente	23
I.2.9.3. Interactions électrostatiques	23
I.2.9.4. Les agents dégradant l'ADN	23
Chapitre 3 : Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées ...	25
I.3.1. L'amarrage moléculaire	25
I.3.1.1. Principes	25

I.3.1.2. Les étapes de docking	25
I.3.1.3. Les différents types d'amarrage moléculaire	26
I.3.1.4. Modélisation du potentiel énergétique	26
I.3.2. Le spectroscopie UV-visible	27
I.3.2.1. Principe	27
I.3.2.2. La loi de beer lambert	27
I.3.3. Le méthode d'analyse électrochimique	28
I.3.3.1. La voltammétrie cyclique	28
I.3.3.2. Le loi de nernst	28
I.3.3.3 Le principe de voltammétrie cyclique	29

PARTIE II : Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes	31
II.1.1. Matériels	31
II.1.1.1. Les matériels d'études	31
II.1.2. Méthodes	32
II.1.2.1. La synthèse de la dérivé N-ferrocénylméthylaniline	32
II.1.2.2. Etude <i>in silico</i>	33
II.1.2.2.A. Préparation de l'ADN	33
II.1.2.2.B. Préparation du dérivé ferrocénique	33
II.1.2.2.C. Processus le logiciel AutoDockTools	33
II.1.2.3. Etude <i>in vitro</i>	35
II. 1.2.3.A. Extraction de l'ADN génomique	35
II. 1.2.3.B. Extraction des acides nucléiques à partir du sang total	35
II. 1.2.3.C. Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-FMA	37
II. 1.2.3.D. Evaluation de l'activité antioxydant de FMA	38
II. 1.2.3.E. Evaluation de l'activité antibactérienne	39
II. 1.2.3.F. Evaluation de l'activité hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains	41
II.1.2.4. Etude <i>in vivo</i>	42
II.1.2.4.A. Sacrifice des rattes et prélèvement du sang et des organes	42
II.1.2.4.B. Méthodes de l'analyse sanguine	42
II.1.2.4.C.. L'étude histologique	43
II.1.2.4.D. Dosage des paramètres de stress oxydatif	44
II.1.2.4.E. Méthode d'analyse statistique	45
Chapitre 2 : Résultats et discussion.....	46

II.2.1.Résultats.....	46
II.2.1.1. La synthèse de la dérivé ferrocénique.....	46
II.2.1.2. Etude <i>in silico</i>	46
II.2.1.3. Etude <i>in vitro</i>	47
II.2.1.3.A. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN.....	47
II.2.1.3.B. Etude de l'interaction entre la dérivé ferrocénique et ADN.....	49
II.2.1.3.C. Evaluation de l'activité antioxydant	57
II.2.1.3.D. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	60
II.2.1.3.E. Evaluation de l'activité cytotoxique de dérivé ferrocénique vis-à-vis les globules rouges humains.....	61
II.2.1.4. Etude <i>in vivo</i>	62
II.2.1.4.A. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine.....	62
II.2.1.4.B. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les rattes exposées au métribuzine.....	64
II.2.1.4.C. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine.....	67
II.2.1.4.D. Etude histologique de foie	71
Discussion	72
Conclusion générale	80
Prespective	81
Référenes bibliographiques	82
Annexes.....	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

La chimie organométallique concerne les transformations des composés organiques par des métaux (**Hanzab & Houas, 2013**), les champs des composés organométalliques se développent rapidement en raison de la grande variété de structures possibles pour les ligands. Ils ont de nombreuses applications dans de nombreux aspects biologiques, cliniques et médicales (**Gulam & Manohar, 2014**). L'identification des molécules à visée thérapeutique est un long processus, faisant intervenir de très nombreuses connaissances scientifiques dans les domaines de la chimie (bio)organique et la pharmacologie. Le XIX^e siècle a été marqué par l'essor de la chimie organique qui a permis de la développement en chimie médicinale (**Le Borgne, 2009**), elle-même une science qui a encore beaucoup à apprendre (**Batu Dirersa, 2014**). L'un des objectifs essentiels de la communauté médicale est de présenter des nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux et antimicrobiens, le traitement du cancer à l'aide des médicaments à base de métal est l'une des stratégies les plus efficaces (**Shafqat et al., 2015**). En outre, il a été démontré que les radicaux libres peuvent endommager les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant une augmentation des taux de cancer. Heureusement, les antioxydants peuvent prévenir ces dommages, en raison de leur activité de piégeage des radicaux libres. Par conséquent, il était très important de développer des composés possédant à la fois de fortes propriétés antioxydants et des propriétés de liaison à l'ADN pour une thérapie anticancéreuse efficace (**Abdel Aziz & Elbadawy, 2014**). Les métallointercalateurs sont très utiles pour étudier la structure et la fonction des acides nucléiques et le processus d'intercalation lui-même (**Majumder, Butcher & Bhattacharya, 2002**).

L'application de la chimie médicinale est stimulée par la découverte de $\text{cis- [PtCl}_2\text{ (NH}_3\text{)}_2\text{]}$, souvent appelé cisplatine (**Batu, 2014 ; Haiyan et al., 2016**). L'agent chimiothérapeutique cisplatine, qui est un composé de platine à l'origine d'inhiber la croissance bactérienne. Ensuite, il a été identifié comme anticancéreux (**Haiyan et al., 2016**). Le médicament cependant, présente de sérieux inconvénients, tels que des problèmes de solubilité et des effets secondaires graves, y compris la neurotoxicité, la néphrotoxicité, l'ototoxicité, la myélosuppression, la nausée et le vomissement. De plus, de nombreux cancers humains développent maintenant une résistance naturelle au cisplatine ou acquièrent une résistance pendant le traitement. Pour ces raisons, des versions modifiées du cisplatine ont été étudiées, connues sous le nom de médicaments de 2^{ème} et 3^{ème} génération. Le succès et l'inconvénient du cisplatine ont incité les chimistes à concentrer leurs efforts sur l'utilisation de médicaments à base de métaux de transition alternatifs en tant qu'agents anticancéreux avec des effets

secondaires minimum. Une attention considérable a été accordée au ferrocène et ses dérivés en raison de leurs applications potentielles en chimie médicinale **(Shafaqat et al., 2013)**. Le ferrocène et ses dérivés ont joué un rôle important en tant que chimiothérapeutique potentielle en particulier, en plus de leur activité anti-inflammatoires, antimicrobiens, cytotoxiques et de clivage de l'ADN dans les cellules cancéreuses. La stabilité, l'électro-activité et l'activité spectroscopique élevée en font des candidats prometteurs pour de nombreuses applications biologiques **(Majumder et al., 2002)**. Le mode d'interaction et l'étendue de liaison du ferrocène avec l'ADN sont des sujets d'un intérêt considérable en raison de la complexité de leur structure sandwich. **(Shafaqat et al., 2013)**. L'interaction médicament-ADN ont été étudiées par diverses techniques analytiques. Parmi ces méthodes, les méthodes électrochimiques sont largement utilisés dans les études de liaison médicament-ADN en raison de leurs avantages comme une sensibilité élevée, une sélectivité efficace, l'affectivité des coûts, plus de fiabilité, une polyvalence étendue et une capacité de détection rapide **(Mohamed et al., 2014)**. La technique spectroscopique UV-Vis est la mieux adaptée aux ferrocènes en raison de leurs couleurs intenses **(Shah et al., 2010)**.

A la lumière de ces travaux nous avons effectué cette étude qui a pour l'objectif de synthétiser le dérivé N-ferrocénylméthylaniline et d'étudier leurs effets biologiques par trois approches. D'abord l'étude *in silico* par la méthode de docking moléculaire. Ensuite l'étude *in vitro* comporte l'évaluation de son effet antimutagène par la méthode spectroscopique (UV-VIS) et la méthode électrochimique (Voltamétrie cyclique), ainsi son effet antibactérienne, antioxydante et aussi leur effet hémolytique. Enfin, l'étude *in vivo* comprend l'évaluation de leur effet anticancéreuse chez les rattes *Wistar Albinos* exposées au métribuzine puis traiter par ce dérivé ferrocénique, et en le compare avec ceux traités par le cisplatine.

Ce travail est repartie en trois parties essentiels:

- ✓ **La première partie:** comporte une aperçus bibliographique se dévise elle-même en trois chapitre (chimie de ferrocène et de dérivé ferrocénique étudié, l'acide désoxyribonucléique et contexte théorique des techniques expérimentale utilisées).
- ✓ **La deuxième partie:** comporte les matériels et les méthodes.
- ✓ **La troisième partie:** s'intitulé résultats et discussion comprenant la présentation des différents résultats obtenus et ses interprétations.

En fin une conclusion générale.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Chimie de ferrocène et de dérivé ferrocénique étudié

PARTIE I: Synthèse bibliographique**Chapitre 1: Chimie de ferrocène et de dérivé ferrocénique étudié****I.1.1. Histoire de la découverte de ferrocène**

Jusqu'à la deuxième guerre mondiale, la chimie moléculaire des métaux de transition était dominée par les chimistes allemands, les anglais, puis les américains se joignirent aux allemands dans les années cinquante (**Mathey & Sevin, 2000 ; Benlatreche, 2013**). Le ferrocène a accidentellement été découvert en 1951 à l'Université Duquesne à Pittsburgh, en Pennsylvanie Par T.J. Kealy et P.L. Paulson. Le bromure de cyclopentadiénylmagnésium (CpMgBr) a été mis à réagir Avec du chlorure de fer (II) pour tenter de créer un fulvalène. Quand un complexe orange s'est formé à la place, les chimistes ont émis l'hypothèse que le fer était lié à un carbone dans chaque anneau (**Werner, 2012 ; Brennan, 2010**). Un an plus tard, 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**).

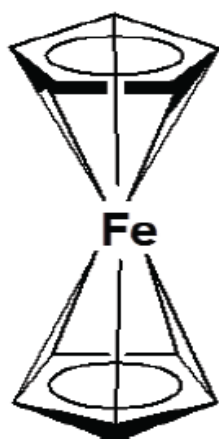


Figure 01 : La structure du ferrocène proposée par Wilkinson et ses collaborateurs (**Madani, 2012**).

I.1.2. Définition

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il se présente sous forme d'un solide orange avec une odeur caractéristique. Il fait partie de la famille des métallocènes. Ils sont aussi appelés composés « sandwich » (**Zerari, 2013**).



Figure 02 : Ferrocène sous forme de poudre orange (Zayya *et al.*, 2013).

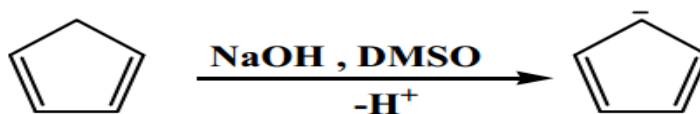
I.1.3. Liaison et structure électronique du ferrocène

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 (1.395 Å). En plus de la longueur de liaison C-C dans les cycles pentadiényle qui est différente pour chaque métallocène, une autre liaison caractéristique de chaque métallocène est celle de M-C. Pour le ferrocène, la longueur Fe-C est égale à 2.03 Å (Terki, 2007).

Le ferrocène est de loin le plus stable des métallocènes. 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 π à six sur chaque cycles. 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.1.4. Processus chimique de synthèse de ferrocène

L'acidité du cyclopentadiène est suffisante pour réagir avec l'hydroxyde de sodium dans le DMSO et produire l'anion cyclopentadiényle. Le DMSO est un solvant dipolaire aprotique exaltant la basicité de l'ion OH^- en solvatant très efficacement le contre-ion Na^+ .



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

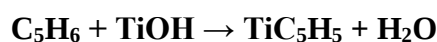
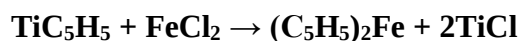
I.1.4.1. Réaction du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux

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**).



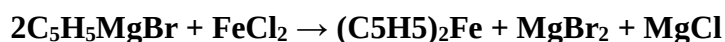
I.1.4.2. Réaction du cyclopentadiénnylthallium avec le chlorure ferreux

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



I.1.4.3. Réaction du réactif de Grignard du cyclopentadiène avec le chlorure ferreux

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



Le succès de cette méthode est due 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'acétylacetone-dipyridine. Dans la réaction de Grignard, un excès du réactif est nécessaire (**Bechki, 2012**).

I.1.4.4. Réactivité

A. Réaction de substitution

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

intermédiaire cationique π -diénique. ce mécanisme explique pourquoi dans le cas des substitutions électrophiles les réactivités relatives des différents dérivés du ferrocène vont de pair avec la facilité d'oxydation de l'atome de fer (**Hanzab & Houas, 2013**).

B. Acylation

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

I.1.5. Propriétés de ferrocène

I.1.5.1. Propriétés spectrales

A. Infrarouge

Le ferrocène absorbe dans l'infrarouge à 3075 cm^{-1} équivalente à l'élongation de la liaison C-H aromatique, et à 811 et 1002 cm^{-1} équivalentes respectivement à la vibration de flexion de C-H, et une à 1108 cm^{-1} équivalente à la vibration antisymétrique du cycle de pentadiényle. Il présente aussi une absorption à 1411 cm^{-1} correspond à la vibration d'éloignement antisymétrique de C-C du cyclopentadiényle (**Abia, 2013**).

B. Résonance magnétique

-RMN ^1H

Le spectrale RMN ^1H de la molécule de ferrocène est très simple, il présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4.15 ppm (**Madani, 2012**).

-RMN ^{13}C

De même le spectrale RMN ^{13}C de la ferrocène présente un seul pic à 68 ppm correspond aux dix atomes de carbone de deux cycles de cyclopentadiényles (**Madani, 2012**).

I.1.5.2. Les propriétés physico-chimique de ferrocène

Le ferrocène est un solide cristalin orange de masse molaire 186,04 g.mole⁻¹, très stable à l'air avec un point de fusion de 173 °C et point d'ébullition 249°C. il possède un moment dipolaire nul, ce qui explique sa solubilité dans une majorité de solvants organiques (**Alavi, 2013 ; Khalef, 2014**) (éthanol, dichlorométhane, cyclohexane), sa solubilité dans l'eau est d'environ 0,1 mg/ml à 21°C, 100 mg/ml dans le DMSO à 19.5°C. Il est stable à haute température, jusqu'à 400°C (**Henni, 2017**).

A température ambiante, le ferrocène est le plus stable des métallocènes, d'une odeur de camphre. Les études ont montré qu'il est sensible à l'exposition prolongée à l'air et à la lumière. Le ferrocène forme avec l'acide nitrique dilué et l'acide sulfurique concentré des solutions rouges foncées avec une fluorescence bleue (**Khalef, 2014**).

I.1.5.3. 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 (**Bechki, 2012**).

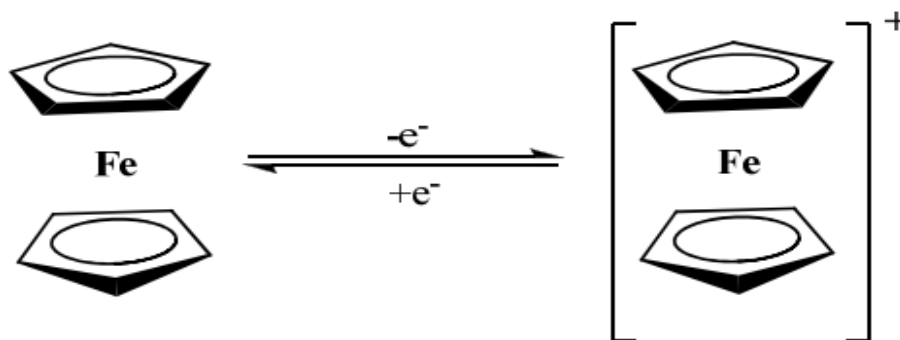


Figure 03 : Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène (**Neghmouche et al., 2010**).

La réversibilité de la réaction d'oxydo-réduction a été démontrée par voltamétrie cyclique, les paramètres électrochimiques tirés de voltammogramme de ferrocène montrent que le processus d'oxydo-réduction se fait d'une façon rapide, réversible et monoélectronique (**Bechki, 2012**).

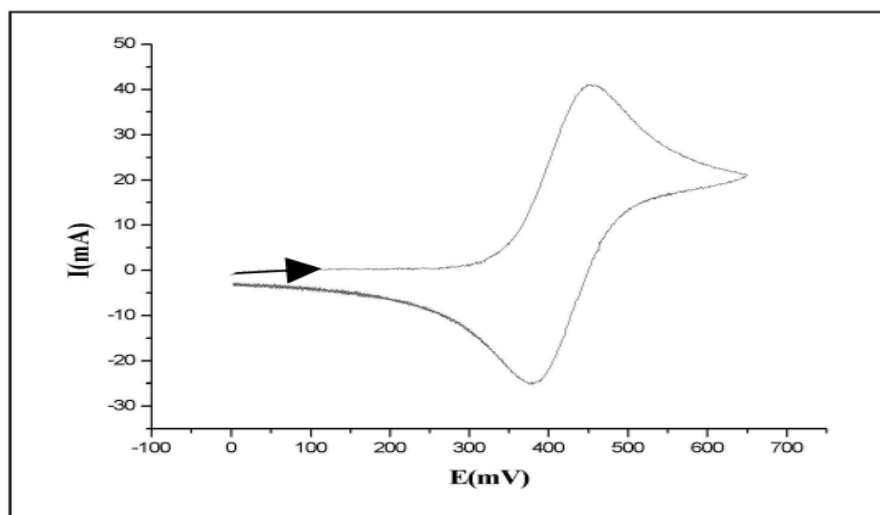


Figure 04 : Voltammogramme de ferrocène enregistré sur une électrode de platine dans l'acétonitrile 10^{-3} M en présence de tétrabutylammonium perchlorate 10^{-1} M à $v = 100$ mV/s (Mahmoudi & Nems, 2009).

Les valeurs des paramètres électrochimiques tirées de voltammogramme de la figure 4 sont regroupées dans le tableau 1. Ces valeurs renseignent sur les critères de rapidité et de réversibilité (Bechki, 2012).

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

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

I.1.6. Le dérivé N-Ferrocénylméthylaniline

Ce dérivé obtenus solides est thermodynamiquement et thermiquement très stable, il peut être recristallisé dans différents solvant organique pour produire des monocristaux (Khelef et al., 2012).

I.1.6.1. Synthèse de N-ferrocénylméthylaniline

La synthèse de N-ferrocénylméthylaniline par le traitement du sel quaternaire avec un excès d'aniline dans l'eau distillée, une température comprise entre 100 à 110°C en émergent le réacteur dans un bain d'eau bouillante (Khelef et al., 2012).

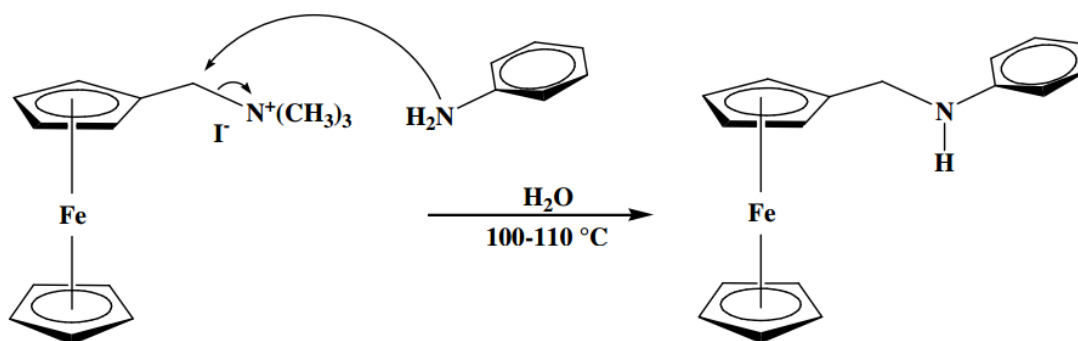


Figure 05 : Chemin réactionnel de dérivé N-Ferrocènylméthylaniline (Terki, 2007).

I.1.6.2. Structure finale

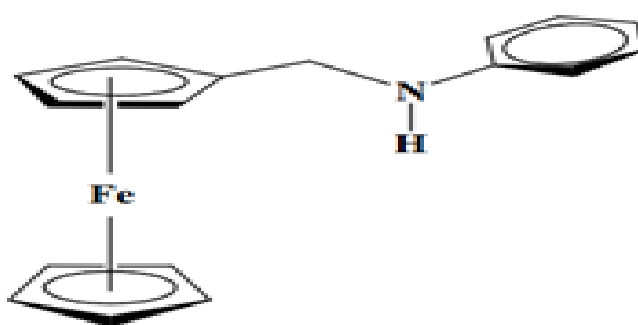


Figure 06 : Structure chimique de dérivé N-Ferrocènylméthylaniline (Khelef et al., 2012).

Les motifs ferrocényles conjugués au groupement aniline montrent également de haute activité anticancéreuses (Görmen et al., 2010).

I.1.7. La Chimie médicinale de ferrocène

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

I.1.7.1. L'activité antibactérienne

Depuis quelques décennies, la chimie du ferrocène a eu un impact énorme dans de nombreux applications tels que: les applications pharmaceutiques (fabrication des

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

I.1.7.2. L'activité antifongique

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

I.1.7.3. L'activité antioxydant

Les dérivés du ferrocène contenant des atomes d'azote sont connus pour avoir in vitro une capacité de piégeage des radicaux libres et une activité antioxydante. L'activité antioxydante des dérivés de ferrocène a d'abord été étudiée à la fin des années 1950, lorsque Acton et Silverstein ont rapporté la synthèse et l'évaluation antioxydant de certain nombre de ferrocénecarboxyamides 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 antioxydante intéressante. Depuis lors, un grand nombre de composés ferrocéniques ont été synthétisés et évalués en termes d'activité antioxydant (**Khelef & Lanez, 2015**).

I.1.7.4. L'activité anti-cancéreux

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

L'application des dérivés du ferrocène dans la thérapeutique du cancer, est un domaine de recherche actif, et de nombreux rapports ont démontré que certains composés ferrocéniques

sont hautement cytotoxiques in vitro contre plusieurs lignées de cellules de cancer, notamment du sein, de la prostate, du poumon, du colon et des cellules cancéreuses de la leucémie. Cependant, seuls quelques-uns ont été testés in vivo (**Bioud & Lassoued, 2015**).

Les ferrocifènes sont les premières molécules actives contre les certaines cellules cancéreuses hormono-dépendantes et hormono-indépendantes (**Sansook, 2017**).

Plusieurs études ayant montrées que les dérivés ferrocénique peuvent se lier à l'ADN par modes d'interaction covalents et non covalent. L'activité anticancéreuse des dérivés du ferrocène dépend de l'état d'oxydation du fer dans le fragment ferrocène, certains résultats indiquant que le composé ferrocényle Fe (II) est plus actif que le fer (III) (**Chavain, 2008 ; Monserrat, 2012**).

Chapitre 2

L'acide désoxyribonucléique (ADN)

Chapitre 2 : L'acide désoxyribonucléique (ADN)

I.2.1. Histoire de la découverte de l'ADN

C'est en 1868 que commence l'histoire de la découverte de l'ADN lorsque le Suisse, Friedrich Miescher, isole une substance riche en phosphore dans le noyau des cellules, qu'il nomme nucléine (**Dahm, 2007**). Puis, en 1889, l'Allemand, Richard Altmann sépare à partir de la nucléine des protéines et une substance acide, l'acide nucléique (**Maillet, 2013**). et en 1896, l'Allemand, Albrecht Kossel, découvre les 4 bases azotées (**Burnstock & Verkhatsky, 2012**). Ce n'est que plus tard, en 1929, que le désoxyribose fut identifié par Phoebus Levene et Walter A. Jacobs. A partir de 1935, on parle alors d'acide désoxyribonucléique (**Cohen & Franklin, 1974**). C'est en 1952 qu'Alfred Hershey et Martha Chase confirment que l'ADN est le support de l'information génétique par une série d'expériences (**Hershey & Chase, 1952**). puis il obtient le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1969 pour cette découverte qu'il partagea avec Salvador Luria et Max Delbrück (**Prado, 2011**). A la même époque, James Watson et Francis Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN. Ils commencent par montrer que l'ADN a une structure hélicoïdale. Puis, ils s'attachent à élucider la structure de l'ADN. Cette découverte n'aurait pu se faire sans les clichés de diffraction aux rayons X effectués par Rosalind Franklin. J. Watson et F. Crick reçurent le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1962 (**Elkin, 2003**). Ces découvertes ont ouvert la voie à la biologie moléculaire et à la biochimie, domaine scientifique en pleine expansion depuis (**Prado, 2011**).

I.2.2. Définition

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le grand architecte du développement de la vie sur terre. Il s'agit d'une molécule présente dans les noyaux des cellules, des chloroplastes et des mitochondries et qui porte la totalité de l'information génétique d'un individu. L'unité de base de l'information génétique est le gène, il s'agit d'un segment d'ADN qui pourra être exprimé sous la forme d'une macromolécule " la protéine " (**Madonna, 2010**).

I.2.3. Compositions et structure de l'ADN

1.2.3.1. Les compositions chimiques de l'ADN

Les acides nucléiques sont des polymères dont l'unité de base est le nucléotide. Chaque nucléotide est constitué d'un groupe phosphate (l'acide phosphorique H_3PO_4), d'un pentose (D-désoxyribofuranose) et d'une base azotée.

Les bases soit des bases puriques: l'adénine (6-aminopurine) et la guanine (2-amino-6-oxy-6-oxypurine). Ou bien des bases pyrimidiques: la cytosine (2-oxy-4-aminopyrimidine) et la thymine (2,4-dioxy-5-méthylpyrimidine) (Ahluwalia, 2009 ; Swynghedauw, 2008).

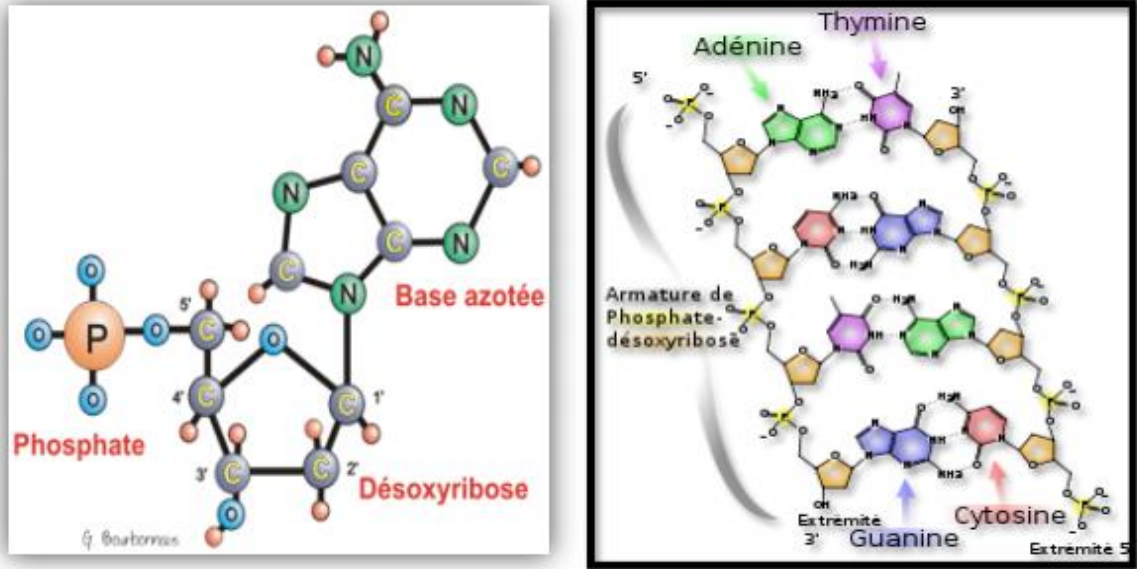


Figure 07 : Le nucléotide (à gauche) et la structure moléculaire de l'ADN (Anonyme 2010).

I.2.3.2. La structure physique de l'ADN

La structure physique de l'ADN double Brins est déterminée par son caractère amphiphile. Cela signifie qu'une partie de la chaîne d'ADN (le squelette du phosphate) est hydrophile alors que l'autre (les bases) est hydrophobe. Avec la flexibilité du squelette, ce caractère amphiphile est une cause de la structure en double hélice (Klajner, 2011).

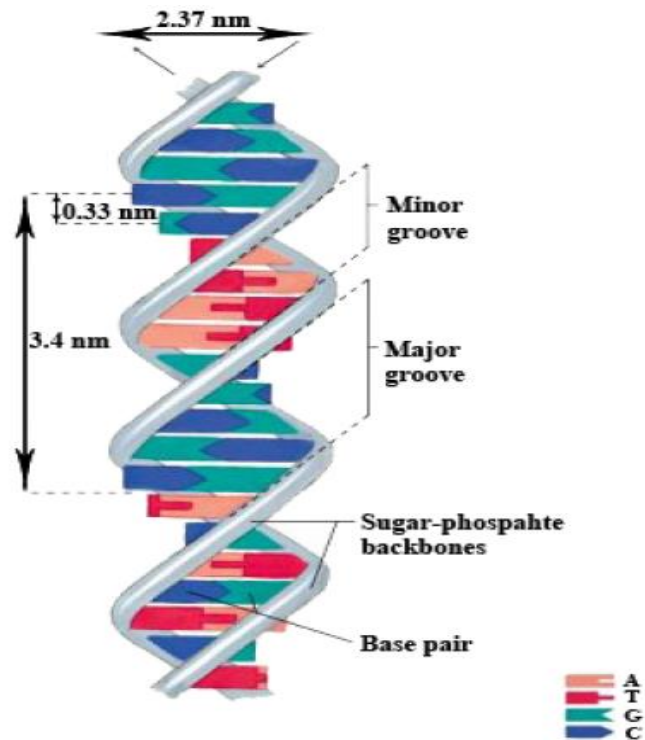


Figure 08 : Structure physique de l'ADN (Klajner, 2011).

I.2.3.3. Les différents structures de l'ADN

Les deux brins de l'ADN forment une double hélice qui peut prendre plusieurs conformations différentes:

- **L'ADN B**, qui est la forme la plus commune de l'ADN, et qui présente un grand et un petit sillon.
- **L'ADN A**, qui correspond à la forme de l'ADN quand celui-ci est apparié à un ARN lors de la transcription, ou lorsque l'on déshydrate la forme B de l'ADN.
- **L'ADN Z**, seule forme de l'ADN à posséder une hélice gauche, relativement rare dans l'ADN et dont la fonction est encore floue (Weaver, 1942).

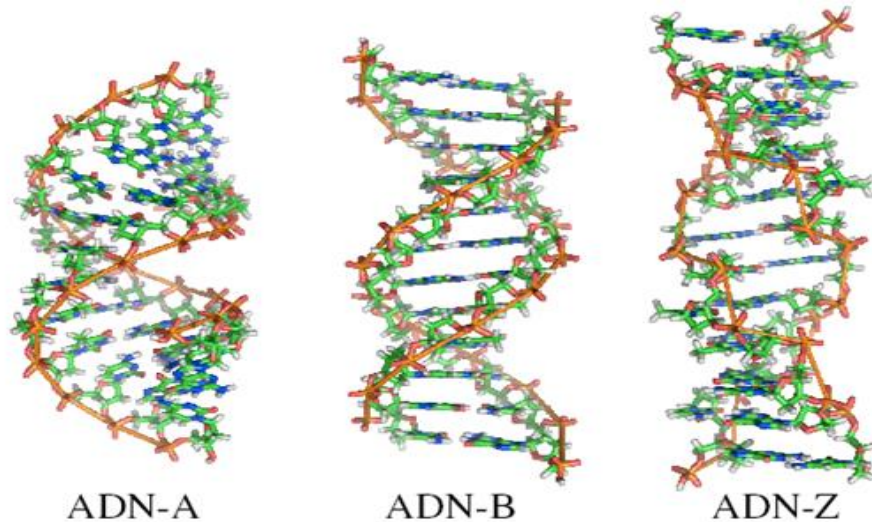


Figure 09 : Conformations canoniques de l'ADN (Bihan, 2009).

I.2.4. Les rôles biologiques de l'ADN

I.2.4.1. Transmission des caractères héréditaires et de l'information génétique

Chaque noyau cellulaire eucaryote contient notre matériel héréditaire entier (l'ADN). Une des singularités de l'ADN est d'être formé de deux brins "complémentaires" et antiparallèles, semblables à une photographie et son négatif. C'est la clé du mécanisme de son dédoublement, ou réplication, qui se produit lors de la division cellulaire. Les deux brins complémentaires se séparent alors, et le négatif de chaque brin est synthétisé, via le processus de réplication. Cette dernière donne lieu à la formation de deux molécules d'ADN strictement identiques à la molécule initiale. Cette réplication a lieu durant la phase S du cycle cellulaire. La réplication de l'ADN est dite semi conservative, la nouvelle molécule contient une moitié de la molécule parentale et une moitié nouvellement synthétisée. La vitesse de réplication de l'ADN dans une cellule eucaryote est d'environ 50 paires de bases à la seconde. Il faut donc plusieurs origines de réplication simultanées pour que la duplication de l'ADN se fasse en un temps raisonnable (Chollat, 2006).

I.2.4.2. La synthèse protéique

L'ADN est relativement inerte chimiquement. Aussi, les informations génétiques qu'il contient sont continuellement déchiffrées par d'innombrables systèmes protéiques sur la base d'un code à quatre lettres (A, T, G, C). Certaines régions des gènes, dites codantes, possèdent l'information nécessaire à la synthèse des protéines, alors que d'autres régions dites non codantes permettent la régulation de l'expression des gènes, *via* la fixation de protéines régulatrices ayant une fonction répressive ou activatrice.

Les gènes sont situés dans le noyau alors que leur expression a lieu dans le cytoplasme. Une molécule intermédiaire, l'ARN messager, permet cette translation (**Bourdat, 2000**).

La synthèse d'une chaîne polypeptidique comprend les étapes successives d'initiation, d'élongation, et de terminaison. L'initiation débute par la mise en place d'une petite sous-unité ribosomale, d'un ARNt porteur d'un premier acide aminé, puis de la grosse sous-unité ribosomale. L'élongation s'effectue en trois temps : association codon-anticodon (ARNm-ARNt), puis formation d'une liaison peptidique avec l'acide aminé précédent. Enfin, la translocation du ribosome permet de décaler ce dernier sur l'ARNm de la longueur d'un codon. Un nouvel ARNt peut alors apporter son acide aminé. Lorsque le ribosome arrive à l'un des codons signifiant l'arrêt de la traduction, il se détache du messager, libérant ainsi une protéine complète (**Muller, 2002**).

I.2.5. Les propriétés de ADN

I.2.5.1. La solubilité

Les groupements phosphate donnent un caractère acide à ses acides nucléiques. De ce fait, ils sont solubles dans l'eau en formant des solutions visqueuses.

Une forte concentration saline (NaCl 0,15M) empêche la séparation des deux brins de l'ADN (Na^+ neutralise les charges négatives des groupements phosphates). On obtient la formation de sel d'ADN qui peuvent être précipités par l'éthanol, l'isopropanol (diminution de l'hydratation des molécules et précipitation).

Ils sont récupérés sous forme d'un long filament translucide (méduse) (**Amarani, 2017**).

I.2.5.2. L'instabilité chimique de l'ADN

Les acides nucléiques se décomposent spontanément en solution. De plus, la présence du 2-désoxyribose rend les liaisons N-glycosidiques particulièrement sensibles à l'hydrolyse, notamment celles des purines qui sont vingt fois plus instables que celles des pyrimidines. Par ailleurs, les fonctions amine exocycliques des bases peuvent être sujettes, à température et pH physiologiques, à des réactions d'hydrolyse. La cytosine est la base la plus sensible à cette réaction de désamination, elle est alors convertie en uracile. La désamination des bases puriques existe également mais est beaucoup moins rapide que celle de la cytosine; l'adénine et la guanine sont alors respectivement transformées en hypoxanthine et en xanthine. La structure en double hélice de l'ADN assure une bonne protection contre ces réactions et par

conséquent la fréquence de celles-ci est relativement faible dans l'ADN double brin. Cependant, la présence de ces lésions peut avoir des conséquences délétères pour la cellule car l'appariement des bases désaminées est différent de celui des bases normales et la réplication des bases induit des mutations (**Rapin, 2006**).

I.2.5.3. L'absorption de la lumière Ultra-Violette (UV)

Les acides nucléiques absorbent la lumière ultra-violette (UV) à une longueur d'onde comprise entre 254 et 260 nm. en raison de l'interaction entre la lumière ultraviolette et le cycle des molécules de purine et de pyrimidine.

N'importe quelle molécule contenant une base azotée (c'est-à-dire des nucléotides) peut donc être analysée par lumière ultraviolette. Cette technique est particulièrement important pour localiser, isoler et caractériser les acides nucléiques (**William et al., 2006**).

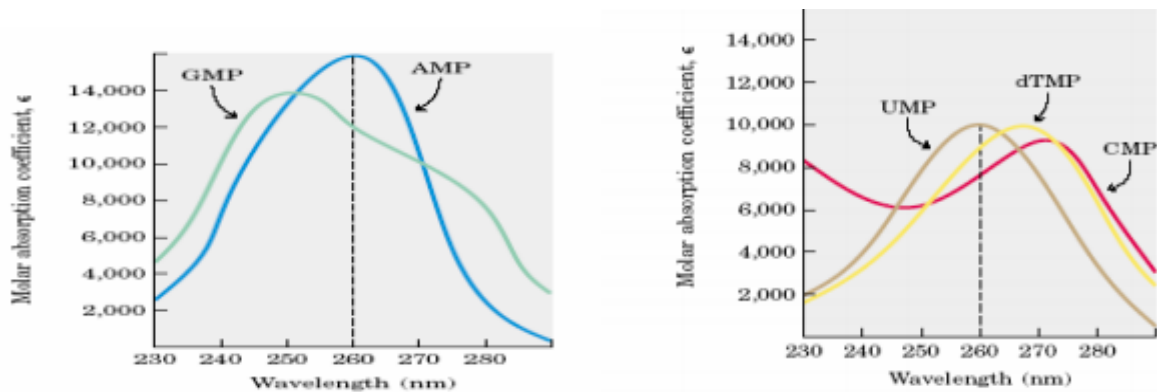


Figure 10 : Représentation de l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentée en abscisse (**Chennouf, 2011**).

I.2.5.4. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

L'hybridation est régie par la température de fusion (T_m) des acides nucléiques. C'est la température à laquelle 50 % des doubles hélices sont dissociées. La méthode la plus simple pour suivre la dénaturation à partir de l'état natif consiste à déterminer l'évolution du spectre d'absorbance des UV par la solution d'ADN (**Kästner, 2011**).

Pendant la dénaturation, la séparation des deux chaînes entraîne un accroissement d'absorbance d'environ 27%, c'est l'effet d'hyperchromicité qui provient de la rupture des interactions entre les bases. A 260 nm, l'absorbance de l'ADN simple brin est supérieure à celle de l'ADN double brin car les bases qui ne sont plus ordonnées dans des plans parallèles ne se masquent plus les unes les autres (**Laisné, 2011**).

- ✓ Le pH est aussi important, aux pH extrêmes, l'ADN est dénaturé. A température ambiante, on utilise souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.
- ✓ Certains composés tels que la formamide ou l'urée abaissent le T_m . Ces composés forment des liaisons H avec les bases et donc entrent en compétition avec les liaisons interbases (Chennouf, 2011).

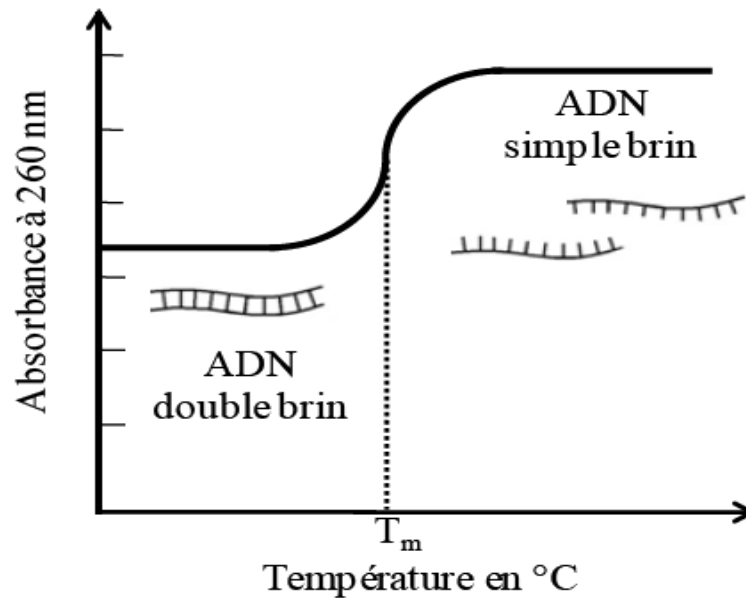


Figure 11 : Détermination de la température de fusion par la mesure d'absorbance d'une solution d'ADN double brin à différentes température et mise en évidence du caractère coopératif de la réaction (Laisné, 2011).

I.2.6. Le stress oxydative et dommage de l'ADN

I.2.6.1. Définition de stress oxydative

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes (Kirschvink et al., 2008), ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles par les radicaux libres qui peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acide nucléiques (Azzi & Hamida, 2016).

I.2.6.2. Définition des radicaux libres

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atome ou molécule possédant un électron non apparié (célibataire) sur leur orbitale externe. Il s'agit d'espèces chimiques très

réactives qui cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier (c'est-à-dire pour former une liaison chimique) (**Jadot, 1994**). Les radicaux libres peuvent être produit d'origine exogène (UV, radiation ionisantes, xénobiotiques, ozone, etc.) (**Ghaffour, 2015**) ou par des processus cellulaire normaux: la respiration mitochondriale (**Hechifa & Merad, 2016**).

Dans les cellules, On peut distinguer les radicaux primaires (radical) qui jouent un rôle particulier en physiologie (**Favier, 2003**). Les autres, dits radicaux secondaires (non radicalaire) tels peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) qui génèrent à la suite de l'action oxydante de radicaux libre oxygénés "primaire" (**Gharbi & Zeghib, 2016**). Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO^{\cdot}$ (**Favier, 2003**).

1.2.6.3. Dommages de l'ADN par le stress oxydatif

Les dommages oxydatifs à l'ADN peut être le plus dangereux pour la cellule car il affecte le cycle cellulaire et conduit à des mutations et le cancer. L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) à 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG), qui a finalement conduit à GC $\rightarrow$ TA transversions lors de la réplication de l'ADN (**Abbas & Djermoun, 2015**).

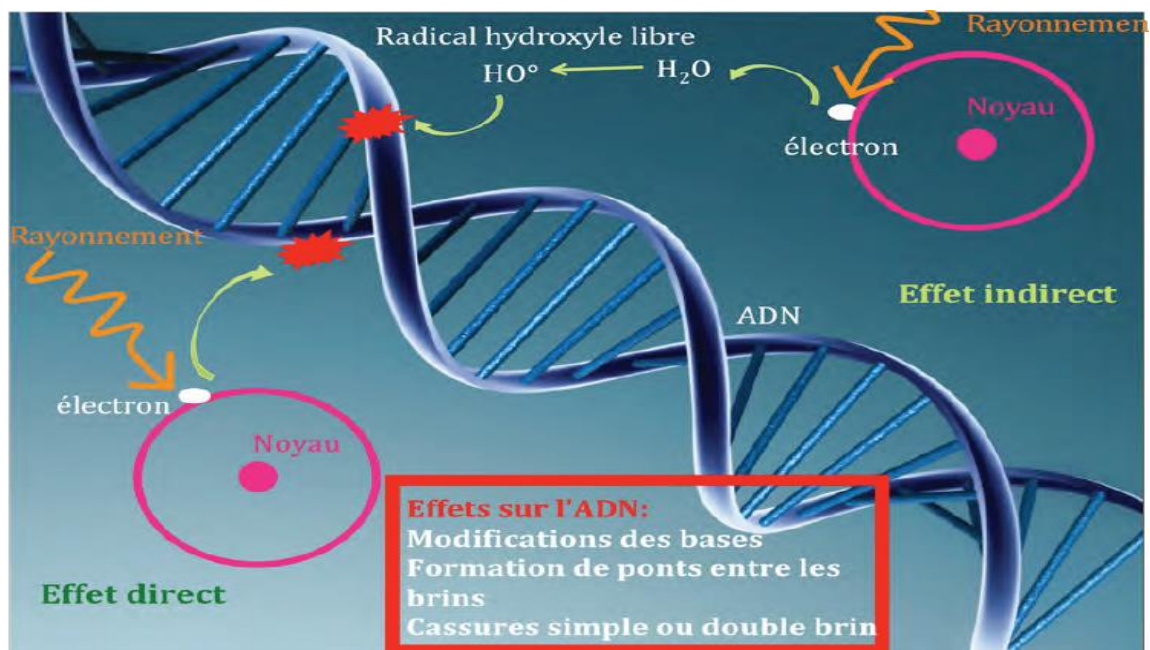


Figure 12 : Les effets directs et indirects des rayonnements. Les rayonnements entraînent une réaction d'ionisation de la matière à l'origine des effets sur l'ADN (**Hontaas, 2014**).

Le cancer se développe suite à l'accumulation de plusieurs mutations, au fil du temps, dans une même cellule. À chaque stade, les cellules mutées continuent de se diviser, pour former une masse appelée tumeur cancéreuse (**Catherine, 2008**).

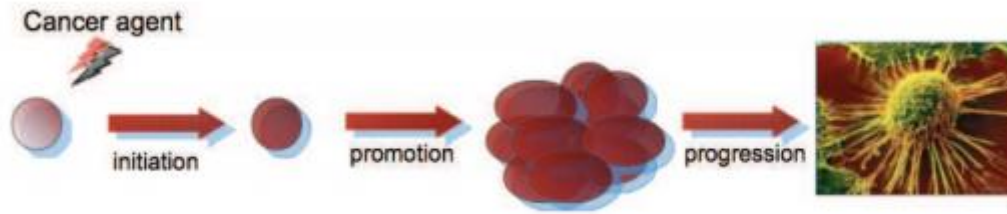


Figure 13 : Mécanisme des étapes d'apparition et du développement de cancer
(Despax, 2014).

I.2.7. Le cancer en tant que contexte de recherche

I.2.7.1. Définition

Le cancer ou néoplasie est une maladie caractérisée par une prolifération anormale indiquant une multiplication cellulaire qui ne vise aucun but utile, et qui n'est pas contrôlée par les lois de la croissance normale ou homéostasie.

Les mécanismes normaux qui régulent la croissance et la division cellulaire ne fonctionnent plus. Il en résulte une suppression des limites normalement imposées au nombre de division cellulaire (**Houali & Lahcene, 2014**).

I.2.7.2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses

La cellule cancéreuse va au cours de son développement acquérir une série de capacités que ne possèdent pas les cellules normales. En 2000, Weinberg et Hanahan ont suggéré que l'apparition de cellules cancéreuses passe par l'acquisition d'au moins six propriétés (**Hanahan & Weinberg, 2011**).

- ✓ Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération .
- ✓ Insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération cellulaire.
- ✓ Abolition de l'apoptose ou mort cellulaire programmée.
- ✓ Capacité proliférative illimitée: Les cellules tumorales continuent de se diviser sans limite visible grâce à l'activité de la télomérase qui est fortement active dans toutes les cellules cancéreuses.

- ✓ Capacité de susciter l'angiogenèse: puisque les cellules tumorales ont un besoin important en oxygène et en nutriments pour survivre.
- ✓ Acquisition d'un pouvoir invasif: les cellules tumorales sont capables de passer à l'intérieur d'un vaisseau sanguin afin d'être transportées dans un autre organe où elles vont générer une seconde tumeur (**Teniou, 2012**).

I.2.8. Le traitement

Les principaux moyens pour traiter un cancer sont :

I.2.8.1. La chirurgie

La chirurgie est un traitement locorégional qui permet d'extraire les tumeurs les plus importantes. Ce traitement est en général préconisé pour le cas des tumeurs solides, non métastatiques. Néanmoins, elle ne peut éliminer toutes les cellules cancéreuses et doit être souvent assistée de traitements complémentaires tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie (**Lecerf, 2015**).

I.2.8.2. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement loco-régional du cancer. Elle peut-être utilisée seule ou en association avec des autres techniques telles que la chirurgie ou la chimiothérapie et reste peu mutilante. La radiothérapie peut être curative et participe à la guérison de 40% des cancers, elle peut être aussi palliative afin de diminuer les douleurs ou les symptômes du cancer. Lorsqu'elle est utilisée en pré-opératoire elle permet de diminuer la taille d'une tumeur tandis qu'en post opératoire la radiothérapie est utilisée pour détruire les cellules cancéreuses qui ont pu rester après l'intervention (**Hontaas, 2014**).

I.2.8.3. L'hormonothérapie

Certaines cellules cancéreuses sont stimulées par des hormones. Ainsi, l'hormonothérapie peut aider à contrôler et à guérir le cancer hormono-dépendants. Elle vise souvent à réduire le taux de certaines hormones dans le corps, ou à empêcher la tumeur d'utiliser ces hormones pour croître.

L'hormonothérapie consiste ainsi à bloquer les hormones pour qu'elles cessent de stimuler le cancer. Ce traitement peut également être prescrit en cas d'échec ou d'insuffisance d'un traitement local (prostatectomie, radiothérapie ou curiethérapie) ou en association à ces mêmes traitements. Il est généralement donné sur le long terme (à vie) ou de manière

intermittente (pour diminuer l'intensité et la fréquence des effets secondaires) ou de manière temporaire (lorsqu'il est associé à un autre traitement) (Zozaya, 2011).

I.2.8.4. L'immunothérapie

Le but de l'immunothérapie est d'amplifier une réponse immunitaire anti-tumorale et de détourner les mécanismes d'échappement de ces dernières à la réponse immunitaire. Les anticorps monoclonaux humanisés semblent constituer des pistes prometteuses. Quelques-uns sont en cours d'évaluation. Il est à souligner qu'après une guérison d'un cancer du sein, il est indispensable que la patiente soit suivie régulièrement, car il y a toujours un risque de récurrence, d'où l'intérêt de maintenir la surveillance (Dallagi, 2010).

I.2.8.5. La chimiothérapie

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des agents anticancéreux. Ceux-ci tuent les cellules cancéreuses en agissant sur l'ADN, sur l'ARN ou sur les protéines des cellules, pour bloquer certaines étapes de la division cellulaire.

Ce domaine est celui qui nous intéresse plus particulièrement car les analogues de nucléosides peuvent être incorporés dans l'ADN modifiant ainsi le métabolisme cellulaire (Guillarme, 2002).

I.2.9. L'ADN une cible biologique de choix dans le traitement de cancer

Les agents chimiques sont nécessaires pour bloquer la réplication de l'ADN dans le noyau cellulaire. Ainsi, l'étude de l'association de molécules chimiques avec la double-hélice permet de mieux comprendre le mode d'action des drogues afin d'en améliorer leur efficacité (Despax, 2014).

I.2.9.1. Interaction covalente avec l'ADN (Les agents alkylants)

Les agents alkylants sont des molécules capables de fixer un groupement alkyle sur une autre molécule. Les composants de l'ADN possèdent un fort pouvoir nucléophile du fait de son amine primaire et peut très facilement réagir avec un agent alkylant qui est une molécule très électrophile (Madonna, 2010). Parmi ces composants cellulaires, les cibles principales sont les atomes d'azote des bases purines et pyrimidines de l'ADN, c'est à dire les atomes N7 et N1 de l'adénine, N3 de la cytosine et N7 de la guanine (Bouameur & Rouabah, 2015).

Les liaisons chimiques fortes créées et les cassures du brin d'ADN vont alors empêcher une division mitotique normale, les mécanismes de réparation ne sont généralement pas capable de réparer les importants dégâts causés par les agents alkylants ce qui entraîne la mort cellulaire (**Madonna, 2010**).

I.2.9.2. Interaction non covalente

A. Liaison d'intercalation

La flexibilité conformationnelle inhérente à l'ADN est bien reflétée dans le processus d'intercalation, dont le postulat de base est qu'un système de noyau aromatique ou hétéroaromatique planaire est inséré entre des paires de bases adjacentes d'une molécule d'ADN sans perturber le schéma général d'empilement. Lors de la liaison d'un intercalaire, la séparation verticale entre les paires de bases est augmentée et la double hélice est partiellement déroulée (**Gago, 1998**). les seules forces connues qui soutiennent la stabilité du complexe ADN-intercalant sont les forces de van der Waals, de liaison hydrogène, hydrophobes et / ou de transfert de charge. ils sont utilisés dans le traitement chimiothérapeutique pour inhiber la réplication de l'ADN dans les cellules cancéreuses (**Sirajuddin et al., 2013**).

B. Groove binding

Certains petits composés se lient à la petite sillon de l'ADN. Ils possèdent plusieurs cycles aromatiques, tels que le pyrrole, le furane ou benzène en favorisant ainsi les interactions de van der Waals. De plus, ces médicaments peuvent former des liaisons hydrogène avec les bases, généralement avec N3 d'adénine et O2 de thymine. ces interactions sont spécifique des régions riche en AT (**Sirajuddin et al., 2013**).

I.2.9.3. Interactions électrostatiques

Le squelette phosphatidique de l'hélice de l'ADN chargé négativement peu interagir avec les molécules organométalliques chargées positivement par des interactions coulombiennes ou par une liaison phosphate-oxygène (**Despax, 2014**).

I.2.9.4. Les agents dégradant l'ADN

Certains agents induisent une fragmentation de l'ADN. On peut citer le cas des bléomycines, substances naturelles issues de *Streptomyces verticillus*. Ces composés sont responsables de coupures dans la séquence nucléotidique et d'une accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire (**Pottier, 2003**).

L'étude de liaison des dérivés des ferrocènes à l'ADN peuvent être détectées par des nombreuses techniques: la spectroscopie UV-vis, les méthodes voltamétriques. Aussi in silico par l'amarrage moléculaire (**Shafaqat et al., 2013**). c'est dans de ce contexte, que notre travail ce réalisera.

Chapitre 3

**Contexte théorique des différentes
techniques expérimentales utilisées**

Chapitre 03 : Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées**I.3.1. L'amarrage moléculaire**

La première problématique de la biologie structurale est le repliement 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, 2009**). l'amarrage moléculaire (ou le docking moléculaire) est l'un des outils qui confère à résolu ces problèmes.

I.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, 2011 ; Lanez, 2016**).

I.3.1.2. Les étapes de docking

Le processus du docking est itératif et chaque passe de calcul s'articule en deux étapes:

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, 2016 ; LANEZ, 2016**).

B. Le Scoring

Est un méthodes mathématiques 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, 2016 ; LANEZ, 2016**).

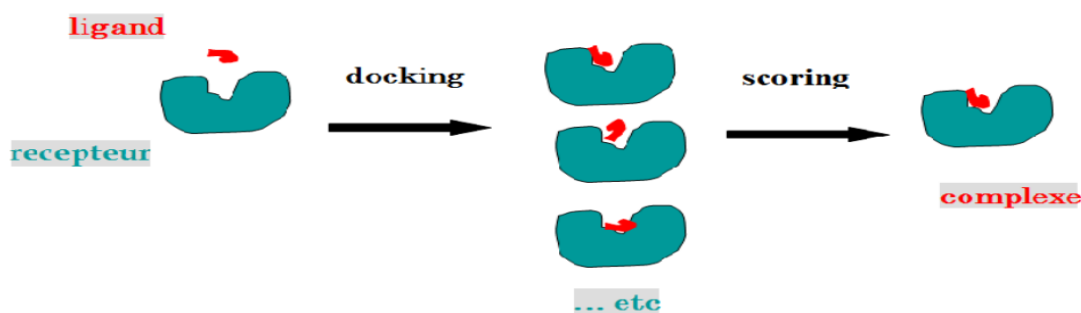


Figure 14 : Les étapes de docking moléculaire (EL Hadj, 2016).

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, 2016).

I.3.1.3. Les différents types d'amarrage moléculaire

Il existe trois grands types de docking moléculaire. Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système récepteur-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de récepteur et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible et le dernière type le docking semi-flexible . sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif du récepteur. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés (Teniou, 2011 ; Asses, 2011 ; Chaouech, 2014).

I.3.1.4. Modélisation du potentiel énergétique

Pour calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, Autodock utilise les termes d'un champ de force traditionnel auxquels sont ajoutés deux termes liés à l'entropie.

L'énergie est donnée par la relation suivante :

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

ΔG_{vdw} , représente l'énergie de dispersion / répulsion des atomes,

ΔG_{bond} , représente l'énergie des liaisons d'hydrogène,

ΔG_{elec} , représente l'énergie des interactions électrostatiques,

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

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

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

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

ou R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue (**Fortuné, 2006 ; Lanez, 2016**).

I.3.2. 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, 2012**).

I.3.2.1. Principe

L'absorption d'énergie lumineuse par des composés dans la région UV-visible correspond à des transitions des électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure (**Touri, 2012**).

I.3.2.2. 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, ϵ est appelé coefficient d'extinction spécifique. Si la concentration est exprimée en mol/l, ϵ est appelé coefficient d'extinction molaire (l'absorptivité molaire) (Mouafki, 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, 2015).

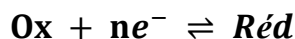
I.3.3. Le méthode d'analyse électrochimique

I.3.3.1. La voltammétrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est la technique la plus utilisée pour acquérir de l'information à propos des réactions électrochimiques. La puissance de cette technique provient du fait qu'elle permet, par exemple, d'obtenir rapidement des informations sur la thermodynamique des processus rédox et sur la cinétique des systèmes électrochimiques. Elle est basée sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant ainsi le tracé des courbes $i = f(E)$ pour l'oxydation et la réduction d'un composé (Bouaoud, 2014).

I.3.3.2. Le loi de nernst

Elle s'applique pour un couple redox unique (Ox/Red) présent dans l'électrolyte et dont l'équilibre électrochimique entre les deux espèces s'écrit :



A l'équation de Nernst relie le potentiel standard (E°) du couple redox mis en jeu avec le potentiel d'équilibre de l'électrode (E) et les activités des espèces respectives :

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{ox}}{a_{red}} \right) \text{ (Chatillon, 2013)}$$

Avec :

E° : le potentiel standard du couple Ox/Red.

R : la constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

F : constante de Faraday (9,65.104 C/mol).

T : température absolue (en K).

n : nombre d'électron.

a_{Ox} et **a_{Red}** les activités des espèces Ox et Red en solution.

Si la force ionique de la solution reste inchangée au cours de l'expérience et que les composés se comportent idéalement en solution. L'équation devient :

$$E_{eq} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{ox}}{C_{Red}} \right)$$

C_{Ox} et **C_{Red}** les concentrations des espèces Ox et Red en solution.

La relation de Nernst, à 25°C, s'écrit alors :

$$E_{eq} = E^{\circ} + \frac{0.059}{n} \log \left(\frac{[ox]}{[Red]} \right) \text{ (Madani, 2012)}$$

I.3.3.3 Le principe de voltammétrie cyclique

Le principe de la voltammétrie cyclique consiste à faire balayer le potentiel d'une façon cyclique: c'est-à-dire le balayage s'effectue vers les potentiels cathodiques en réalisant une réduction, puis on inverse le sens pour réaliser une oxydation **(Mouats, 2010)**.

La détermination expérimentale de la relation entre le courant et le potentiel d'électrode se traduit par l'obtention des figures appelées voltamogrammes **(Moulay, 2012)**.

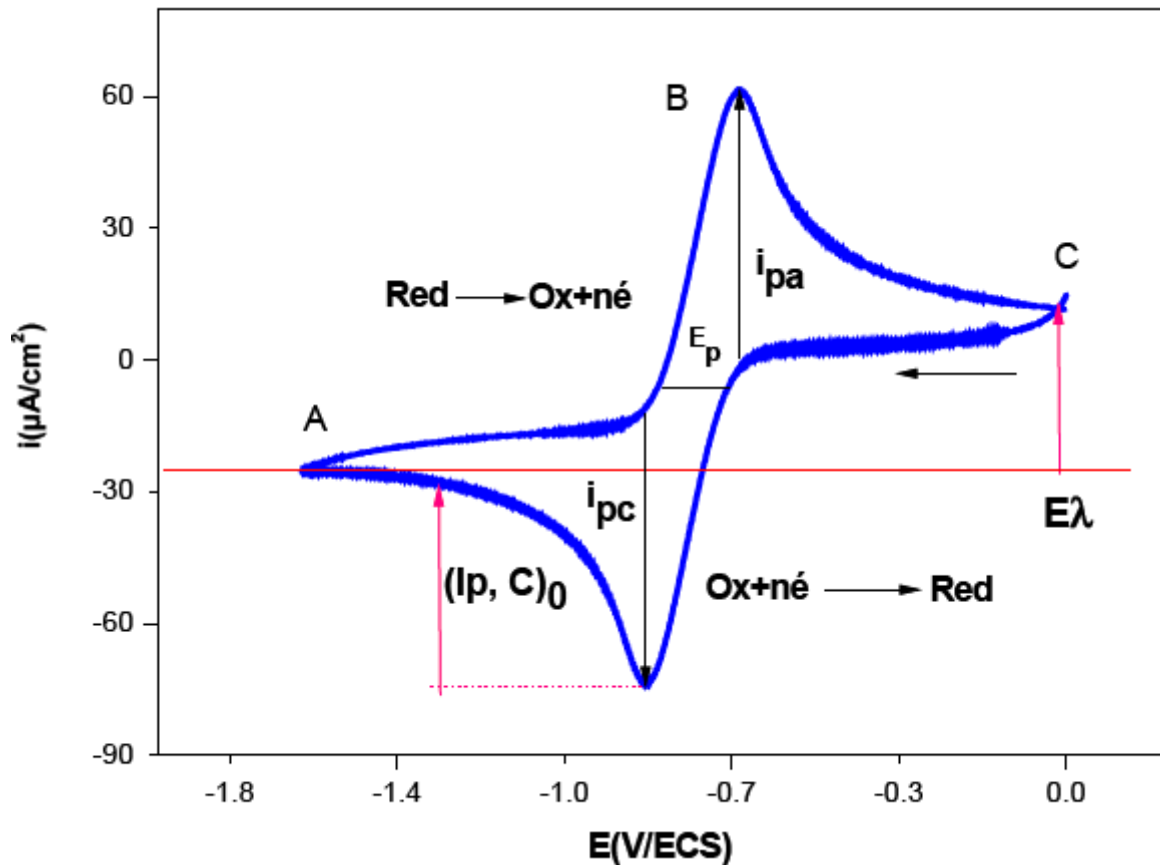


Figure 15 : L'allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques (Lanez, 2016).

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

E_{pa} , E_{pc} : potentiels de pic anodique et cathodique (Bouzidi, 2011).

Les coordonnées (E_p , i_p) du pic de voltammétrie donnent des indications sur :

- ✓ Le mécanisme de la réaction électrochimique
- ✓ La concentration des espèces

La courbe enregistrée lors d'une expérience de voltampérométrie cyclique présente l'allure d'un pic et non d'une vague. L'observation d'un maximum trouve son origine dans l'établissement d'une couche de diffusion pénétrant ensuite dans le volume de la solution. En effet, arrivée à une valeur de potentiel E_p , pour laquelle le transfert de masse est maximal, l'intensité du courant évolue selon $t_{1/2}$ car le transfert de masse ne parvient plus à compenser la consommation de substance électroactive à la surface de l'électrode (Moulay, 2012)

Deuxième partie

Partie expérimental

Chapitre 1

Matériels et méthodes

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Matériels

Dans la présente étude les paramètres ont été réalisés au niveau de laboratoire de recherche: de la Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) au faculté de science et technologie à l'université Echahid Hama Lakhdar El-oued. Et le laboratoire pédagogique de la faculté de science de la nature et de la vie de la même université. Les analyses sanguines ont été effectuées au niveau du laboratoire d'analyse médicales de l'hôpital Ben Amor Djilani et le laboratoire d'el-Madjed. L'étude histologique ont été effectué au niveau laboratoire Ben Bordi de la même wilaya.

II.1.1.1. Les matériels d'études

A. Les logiciels bioinformatiques

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

- ✓ AutoDock 4.2.6.
- ✓ Gaussian 09.

B. Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans notre travail sont regroupés dans l'annexe (Tab. 02).

C. Les matériels biologiques

-Le sang

- ✓ Pour l'extraction de l'ADN, nous avons utilisé le sang du poulet qui est conservé directement dans la glace avant le début de manipulation.
- ✓ Le sang prélever a partir des rattes est utilisé pour les analyses biochimiques.

-Les organes des rattes

Les organes des rattes sont utilisés pour les analyses histologiques et les paramètres de stress oxydative.

-Les matériels microbiologiques

L'activité antibactérienne du FMA a été testée vis-à-vis cinq souches cibles pathogènes référencier responsables de certaines maladies infectieuses graves qui nous ont été fourni par le laboratoire de biologie de l'université Echahide hamma lakhdar d'el-Oued.

- Les bactéries GRAM (+)

- ✓ *Listeria innocua* CLIP 74915

- **Les bactéries GRAM (-)**

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ *Salmonella entericassp. Arizonae* CIP 81-3
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* 27853
- ✓ *Klebsilla pneumoniae* ATCC 700603

- **Les Globules rouges**

Pour le test de cytotoxicité, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, les globules rouges humain provenant d'un donneur unique sain.

- **Les animaux**

L'étude *in vivo* a été réalisée sur vingt souris femelles, de type *Wistar albinos* dont le poids est varié entre 140 à 150 g.

Matériels de laboratoire

Les Matériels utilisés dans notre travail sont regroupés dans l'annex (Tab. 03).

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. La synthèse de la dérivé N-ferrocénylméthylaniline

On introduit une quantité de (40 g, 0.104 mol) d'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium et une solution de (55.6 g, 0.597 mol) d'aniline et 600 ml d'eau distillée dans un tricol de 1 litre muni d'un réfrigérant, d'un agitateur magnétique et adapté à un courant d'azote continu. On agite le mélange pendant 2 heures à une température de 100 à 110 °C. On extrait le produit avec le toluène, après que l'on refroidisse. On évapore la phase organique séchée sur MgSO₄ pour donner un résidu marron-orange. Puis, on recristallise ce dernier en utilisant un mélange éthanol-eau, ce qui donne (20.09 g, 69 mmole) de cristaux jaunes de ferrocénylméthylaniline, avec un rendement total de 66% (Lit : 70 %). Le point d'ébullition est de 85-86 °C (Lit : 85- 85.5 C°). La synthèse de N-ferrocénylméthyl aniline est réalisée par le traitement du sel quaternaire avec un excès d'aniline dans l'eau distillée, une température comprise entre 100 à 110°C en émergeant le réacteur dans un bain d'eau bouillante (**Khelef, 2012**).

II.1.2.2. Etude *in silico*

A. Préparation de l'ADN

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

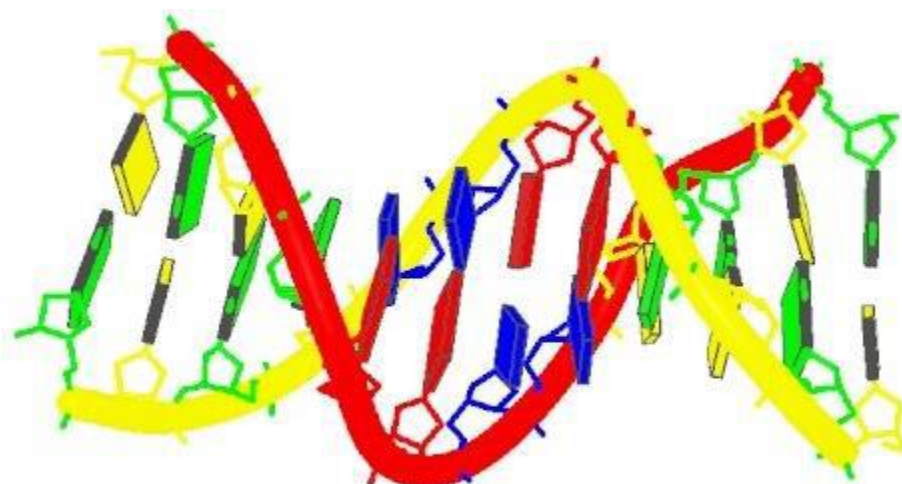


Figure 16 : Structure d'ADN d'un dodécamère (Drew et *al.*,1981).

La longueur de cette structure est de 12 nucléotides. Dont, la succession nucléotidique pour les chaînes A et B comme suivant :

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

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

B. Préparation du dérivé ferrocénique

La structure de dérivé ferrocénique a été préparée et optimisée avec le logiciel Gaussian 09, puis elle est enregistrée sous format pdb.

C. Processus le logiciel AutoDockTools

Pour utiliser ce logiciel, doit réaliser les commandes suivantes :

- ✓ File → Preferences → Set puis taper "ADT " dans le "Startup Directory" et cliquer sur "Make Default" en suite cliquer sur "Set".

En général logiciel AutoDock comprend six étapes majeures:

-Préparation de l'accepteur

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ File → Read Molecule → select 1BNA.pdb
- ✓ Edit → Delete Water
- ✓ Edit → Hydrogens → Add → polar only
- ✓ Edit → Hydrogens → Merge Non-Polar
- ✓ Edit → Charges → add Kollman charges

-Chargement de récepteur et du ligand

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ Ligand → Input → Open → ligand.pdb
- ✓ Ligand → Torsion Tree → Detect Root
- ✓ Output → Save as pdbqt

-Configuration des paramètres de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ Grid → Macromolecule → Choose → select 1BNA → écris 1BNAPre.pdbqt → enregistrer
- ✓ Grid → Set Map Types → Choose Ligand → select Ligand
- ✓ Grid-Grid Box-Set number of points in x, y and z-dimension to 90 and set Spacing (angstrom) to 0.200
- ✓ Grid → Output → Save GPF → écris grid.gpf → enregistrer

-Exécution de l'AutoGrid

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ Run → AutoGrid

-Exécution de l'AutoDock

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

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

-Analyse des résultats

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes:

- ✓ Analyse → Docking → Open → fichier dock.dlg
- ✓ Analyse → Macromolecule → Open
- ✓ Analyse → Conformation → Play, Ranked by energy → & analyze interactions.

II.1.2.3. Etude *in vitro***A. Extraction de l'ADN génomique**

L'extraction de l'ADN se fait par la technique du relargage des protéines à force ionique élevée : la technique de salting-out (Technique au chlorure de sodium saturé). Elle a été

réalisée à partir de prélèvement du sang de poulet dans des tube a EDTA puis elle est conservé directement dans la glace (Adaika, 2016).

B. Extraction des acides nucléiques à partir du sang total

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et des méthodes de biologie moléculaire et électrochimique utilisées ultérieurement (Adaika, 2016).

-Séparation des leucocytes par hémolyse

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges. Le sang prélevé est traité selon les étapes suivantes: - Ajouter 1volume de solution de lyse des globules rouges par 1 volume de sang (1:1), incubé de 20 à 30 min à 4°C.

- ✓ Centrifuger à 1500 trs pendant 15 min à 4°C.
- ✓ Enlever le surnageant.
- ✓ Ajouter 1ml de tampon de lyse des globules rouges au culot, bien agiter par vortex et incubé 20 min à 4°C.
- ✓ Centrifuger dans les mêmes conditions, que précédemment.
- ✓ Eliminer le surnageant et recueillir le culot.
- ✓ Sur ce culot, la même opération est effectuée une autre fois.
- ✓ A la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante. Au dernier lavage, le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine. Le culot obtenu des leucocytes est utilisé pour l'extraction de l'ADN (Adaika, 2016).

-Extraction de l'ADN

Elle se fait en plusieurs étapes distincts:

- **Lyse des leucocytes**

- ✓ Ajouter au culot 2 ml de solution de lyse de GB et vortexer.
- ✓ Ajouter 150 µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20% pour détruire la membrane.
- ✓ Incuber l'extrait à 55°C pendant 1 h 30 sous agitation.

- **Précipitation des protéines**

Un volume de 3ml de NaCl à 6M a été ajouté à l'extrait après le refroidissement; La suspension obtenue est vortexée pendant 6 min. Cette dernière est par la suite centrifugée 10 min à 1300 trs/min afin de précipiter les protéines. On obtient ainsi une phase inférieure organique contenant les débris (protéines, lipides...), une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN et l'interface contient en majorité des protéines et peu l'ADN. Le surnageant, contenant l'ADN dispersé, est récupéré dans un tube de 5 ml propre.

- **Précipitation de l'ADN**

Un volume égal d'isopropanol à haute force ionique (99%) a été ajouté au surnageant récupéré précédemment. On laisse l'ADN se précipiter par agitation douce en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une méduse; on récupère l'ADN dans un tube en verre (5 ml) ; la méduse d'ADN ainsi condensée est lavée 2 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels : à chaque lavage, ajouter 1 ml l'éthanol 70%. Cependant, l'éthanol peut fausser les analyses réalisées sur l'ADN ainsi extrait. On laisse donc le tube ouvert toute la nuit à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore et la pelote séchée.

- **Dissolution de l'ADN**

Quand l'ADN est en pelote sèche, il ne peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire. On doit donc réhydrater l'ADN dans un volume d'eau bidistillée qui sera choisi en fonction de la taille de la méduse. L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. Après dissolution complète, la DO de la solution d'ADN obtenu est mesurée à 260 nm et à 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait (**Adaika, 2016**).

- **Conservation et stockage de l'ADN**

L'ADN dissout peut être conservé à +4°C pendant quelques jours ou à - 20°C pour une conservation à plus long terme. D'ailleurs, l'ADN pure se conserve à - 20 °C, plus de 10 ans (**Lassoued, 2007**).

C. Méthodes utilisés pour l'étude de l'interaction ADN-FMA

Il existe de nombreux types des méthodes décrivant l'étude in vitro de l'interaction ADN-ligand, certains permettent de déterminer les paramètres de liaison (mesure de la constante K et l'énergie libre ΔG de liaison). Nous avons deux méthodes les plus sensibles, les méthodes

spectrophotométriques dont l'UV-visible, mais les mesures les plus délicates requièrent le plus souvent les méthodes électrochimiques qui sont très utiles dans ce cas.

-Analyse spectroscopique UV-Visible

- **Appareillage**

Les mesures UV-Vis ont été effectuées grâce au spectromètre UV-Vis (SHIMADZU 1800) lié à un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel de visualisation et acquisition des données (Logiciel UV probe Spectrum). L'interaction se fait dans des cuves en quartz, l'appareil contient double emplacement des cuves en quartz, une pour le blanc (solution DMF) comme référence et le deuxième pour l'échantillon (le dérivé ferrocénique seul ou avec l'adduit d'ADN), puis les données sont traitées en utilisant le logiciel d'analyses Origin8.

- **Procédure**

Le spectre électronique de dérivé ferrocénique « FMA » (10^{-3} mol/l) solubilisé dans un solvant de DMF a été réalisé, après l'ajout des différentes concentrations de l'ADN, les spectres sont enregistrés afin de déterminer λ max et calculer les paramètres d'interactions.

-Méthode électrochimique

- **Appareillage**

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

- ✓ Une électrode en carbone vitreux surface 3 mm^2 .
- ✓ Une électrode de référence Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturée.
- ✓ Une électrode auxiliaire en platine. Diamètre 3 mm^2 .

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

- **Procédure**

La réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN se fait dans une cellule électrochimique. Le milieu réactionnel est le DMF. Un polissage de l'électrode de travail en utilisant le papier abrasif p4000 est effectué avant chaque manipulation, les électrodes sont ensuite rincées avec de l'eau ultra-pure et essuyé avec du papier absorbant. La cellule électrochimique est rempli avec 25 ml d'un solvant de DMF contenant le dérivé ferrocénique (10^{-3} M) ensuite elle est équipée avec l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire, et aussi l'électrode de travail. Le voltammogramme est tracé en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN

après un barbotage d'azote pendant 10 à 15 minutes pour chasser l'oxygène de la cellule. On impose un potentiel variable à une vitesse de balayage fixe, le voltammogramme obtenu est exploité pour accéder aux paramètres d'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN.

D. Evaluation de l'activité antioxydant de FMA

-Test de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl)

• Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β picrylhydrazyle) est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une réduction des radicaux DPPH• vers le jaune pâle correspondant de l'hydrazine, mesurable par spectrophotométrie à 515-518nm (Benabdesselam, 2017).

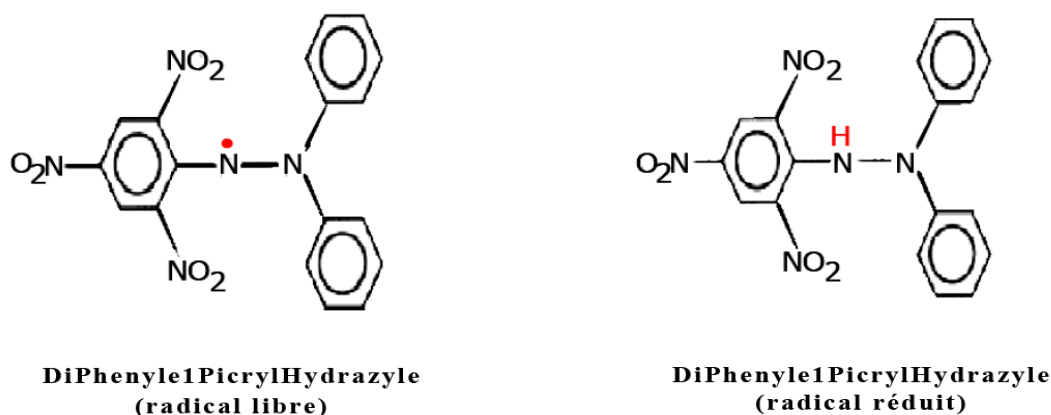


Figure 17 : Forme libre et réduite du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle DPPH• (Bentabet, 2015).

L'activité de piégeage des radicaux DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon la méthode de Ohinishi et collaborateurs (Ohinishi et al., 1994). avec quelques modifications, 0,9 ml de diverses concentrations de dérivé ferrocénique et d'étalons et 1 ml de DPPH• (0,25 mM) ont été mélangés, et après 30 min, l'absorbance était mesurée à 517 nm.

L'activité de piégeage était mesurable comme la diminution de l'absorption des échantillons par rapport à la solution standard DPPH•. Les résultats ont été exprimés en tant que balayage de radicaux.

Le pourcentage d'activité (%) d'inhibition du radical DPPH• est calculé selon la formule:

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

Où A_0 : l'absorbance du témoin, A_s : absorbance de l'échantillon (Ben Haoua & Lanez, 2018).

- Le test de piégeage de radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

- **Principe**

L'activité inhibitrice de l'anion radical superoxide est déterminée par voltammétrie cyclique, ce test est basé sur la méthode de Bourvellec et collaborateurs (Bourvellec et al., 2008). avec quelques modifications.

L'anion radical superoxyde est généré par l'oxygène moléculaire commercial dissout dans le DMF qui contient 0.02M de Bu₄NBF₄ à la température de la salle (28±1°C). La vitesse de balayage est maintenue à 100mV/s. La gamme de potentiel appliquée été de -1.6V à 0.0V.

Le dérivé ferrocénique étudiés est ajouté au radical superoxyde dissout dans le DMF et les voltammogrammes ont été enregistrés (Lanez & Henni, 2016).

La capacité de produit testé pour piéger les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Capacité inhibitrice du superoxyde (\%)} = \frac{Ip_0 - Ip_s}{Ip_0} \times 100$$

Où: Ip_0 et Ip_s sont l'intensité du courant de pic anodique de l'oxygène respectivement sans et avec le composé FMA (Khelef & Lanez, 2015).

E. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne ont été effectué par la technique de diffusion sur gélose Miller Hinton (Méthode de disque).

-Mode opératoire

- **Préparation des produits à tester**

Le dérivé ferrocénique synthétisés (FMA) est dissous dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations de 1, 3 et 6 mg/ml.

- **Préparation des disques de papier**

Pour préparer des disques de 5mm de diamètre, on utilise le papier filtre N°1 de wattman, puis on les met dans un tube à essai pour les stériliser à l'étuve pendant 45 minute à 130°C.

- **Préparation du milieu de culture**

Après la dissolution de milieu nutritif (gélose Muller Hinton) dans un autoclave, on le verse dans les boîtes de pétri, on attend le milieu jusqu'il sera solide, et on le sèche dans un étuve pendant 15 minutes.

- **Préparation des souches**

Pour la préparation des souches microbiennes testées, nous sommes passés par deux étapes essentielles :

- ✓ **Repiquage des espèces bactériennes**

Les microorganismes sont prélevés à partir de leurs géloses (agar nutritive) de conservation à l'aide d'une pipette pasteur et mis dans des tubes contenant un bouillon nutritif qui assurera leur croissance, puis incubés 24 h à 37°C.

- ✓ **Préparation des inoculums**

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans un volume d'eau physiologie.

Note: L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

- **Ensemencement**

Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.5mm, après la solidification de la gélose tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60 à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Les disques ont été placés dans les boîtes à l'aide d'une pince stérile. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm centre à centre. L'incubation dure 18h à 30°C.

- **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 contrôle négatif et les antibiotiques comme contrôle positif (Gentamicine 120µg/disc) (Khadri, 2009).

F. Evaluation de l'activité hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains

-Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang frais est collecté au-dessus du coude d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoires dans les 48h qui précèdent le prélèvement. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes héparines. Puis elle est centrifugé à 4000 tours/ minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec le tampon phosphate de sodium salé (PBS) 10 mM, pH 7,4 contenant 150mM de NaCl, puis suspendus à nouveau dans ce même tampon (**Hakmi, 2015; Lee et al., 2002**).

-Mesure de la fuite de l'hémoglobine

La suspension érythrocytaire est incubée à 37 C° sous l'agitation continue pendant 30 min des l'addition des différents doses de dérivé ferrocénique qui correspondent au temps zéro de la réaction. Des prélèvements de 500 µL à partir des solutions réactionnelles. Auxquels nous avons ajouté 2 mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM) (**Bentabet, 2015**).

Après la centrifugation à 4000 tours/ minutes pendant 5 min. nous avons récupéré le surnageant sur lequel nous avons dosé la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par la lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548 nm (**Kherbouche, 2014**).

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec le tween 80 à une concentration de 30% (V/V). Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif.

Pour chaque échantillon le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation suivants:

$$\text{Taux d'hémolyse} = \frac{\text{DO en présence de FMA}}{\text{DO en présence de Tween 80}} \times 100$$

II.1.2.4. Etude *in vivo*

Après 25 jours d'adaptation, les 20 rattes ont été divisées en quatre lots chacun contient cinq rattes, les rattes ont été traitées comme suit :

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

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

Lot 3 (D_{0.2}) : des rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par dose 0.2 mg/kg (**Görmen, 2010**) de dérivé ferrocénique pendant 7 jours.

Lot 4 (Cispt) : des ratte à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par le Cisplatine par dose 1 mg/ml pendant 7 jours.

Le métribuzine a été solubilisé dans l'eau potable à raison de 30mg/Kg de poids corporel durant 50 jours. Le dérivé ferrocénique est injecté par voie intra-péritonéal aux ratte des lots 3. Le Cisplatine est injecté de volume 0.1 ml par voie intra-péritonéal au lot 4 (**Boudebria & Boutera, 2017**).

A. Sacrifice des ratte et prélèvement du sang et des organes

Les ratte sont anesthésiés par chloroforme (94%) après 16 h de jeûne et sont sacrifiés (par décapitation). Au moment du sacrifice, le sang est collecté sur des tubes secs pour les analyses biochimiques et des tubes héparines pour l'analyse d'alphafoetoprotéine (AFP). Après centrifugation à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le sérum est récupéré et conservé à (-20C°).

Après la dissection le foie, le cœur, les poumons, les reins sont soigneusement prélevés, rincés avec l'eau physiologique, ensuite pesés. Une partie du foie est récupérée dans des flacons de formol (15%) pour faire l'étude histologique. Les homogénats des organes sont préparés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif tissulaires (les protéines: GSH, MDA et le catalase).

B. Méthodes de l'analyse sanguine

Les paramètres analysés sont : Glycémie, Urée, Créatinine, Glutamopyruvate Transférase (TGO), Glutamooxaloacétate Transférase (TGP), Phosphatase Alcaline (PAL), Gamma Glutamyl Transférase (γ GT), Lactate Deshydrogénase (LDH), l'alpha foetoprotéine (AFP).

Les mesures sont effectuées à une longueur d'onde caractéristique pour chaque dosage. Le dosage des paramètres analysés est accompli par des kits "**spinreact**" et "**biomnis**".

C. L'étude histologique

-Préparation des échantillons pour l'étude histologique

Après sacrifice des ratte les foies est immédiatement introduite pendant 12 heures dans le formol à 15% permettant l'immobilisation et la fixation des structures et constituants cellulaires puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml eau distillée) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur de 1.5 mm.

-Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide d'un appareil automatique pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 95% et 100%).

-Inclusion

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

-Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 μm . Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

-Coloration

Pour la coloration, la technique utilisée est celle à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide, eau ammoniacale et solution d'Eosine. La coloration suit les étapes suivantes:

Déparaffinage et hydratation des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée. Puis sont misent dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux). Les lames sont plongées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ensuite dans un bain d'eau du robinet avec vérification de la différenciation au microscope. Misent dans un bain d'eau ammoniacale, puis dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet (**Gérard, 2012**).

-Observation au microscope

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

D. Dosage des paramètres de stress oxydatif

-Dosage des protéines tissulaire

- **Principe**

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) permet de déterminer des concentrations tissulaires de protéines. C'est une méthode colorimétrique, qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif qui s'associe au groupement amine (-NH₂) des résidus protéiques pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). l'absorption est mesurée à 595nm. **(Bradford, 1976).**

-Dosage des malondialdéhyde (MDA) tissulaires

- **Principe**

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 532nm **(Yagi, 1976).**

-Dosage des (GSH) tissulaires

- **Principe**

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

-Méthode de dosage de l'activité enzymatique du catalase

- **Principe**

Un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat).

L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes **(Clairborne, 1985).**

E. Méthode d'analyse statistique

L'évaluation statistique des résultats est effectuée par le test T student, qui est basé sur la comparaison entre deux moyennes. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes de cinq répétitions pour chaque groupe ($\pm$ écart-types moyenne). Pour cela, on a utilisé les logiciels de *MINITAB* (version 13) et *EXCEL* (version 2007), la signification est déterminée par la valeur $\alpha=0.05$, Si $P < \alpha$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité.

Chapitre 2

Résultats et discussion

Chapitre 2 : Résultats et discussion

II.2.1. Résultats

II.2.1.1. La synthèse de la dérivé ferrocénique

Le résultat de la synthèse de la dérivé ferrocénique est représenté dans la figure 18:

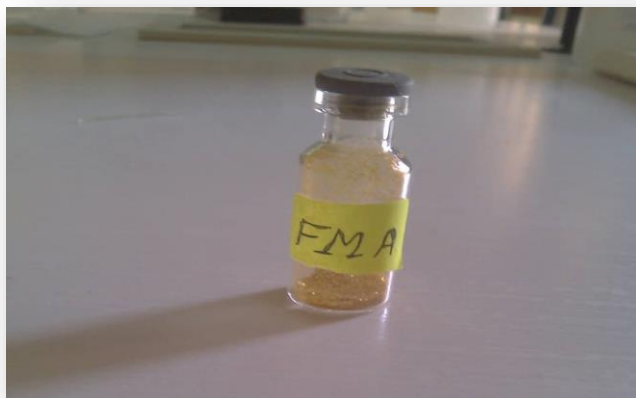


Figure 18 : Le dérivé N-ferrocénylméthylaniline synthétisé en poudre.

II.2.1.2. Etude *in silico*

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

Tableau 02 : Conformation de l'interaction FMA-ADN et leur énergie libre ΔG et constante de liaison K .

Conformation	ΔG (Kj.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
1	-27.0028	54.103×10^3

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative -27.0028 KJ.mol⁻¹, et qui a un seul liaison hydrogène est formé entre le FMA et l'ADN.

Le FMA se lie avec l'ADN en formant un seul liaison hydrogène (fig. 19, tab. 03), qu'est entre l'oxygène n°2 de désoxythymidine (DT) n°20 de la chaîne B de l'ADN et l'hydrogène de l'azote de FMA.

Tableau 03 : Distance et énergie de liaison hydrogène, et les atomes de FMA et de l'ADN impliqués dans ce liaison.

Liaison	Distance (Å)	Energie (KJ.mol ⁻¹)
ADN : chaîne B : DT20 : O2 ↔ Ligand : H(N)	1.757	-14.61328

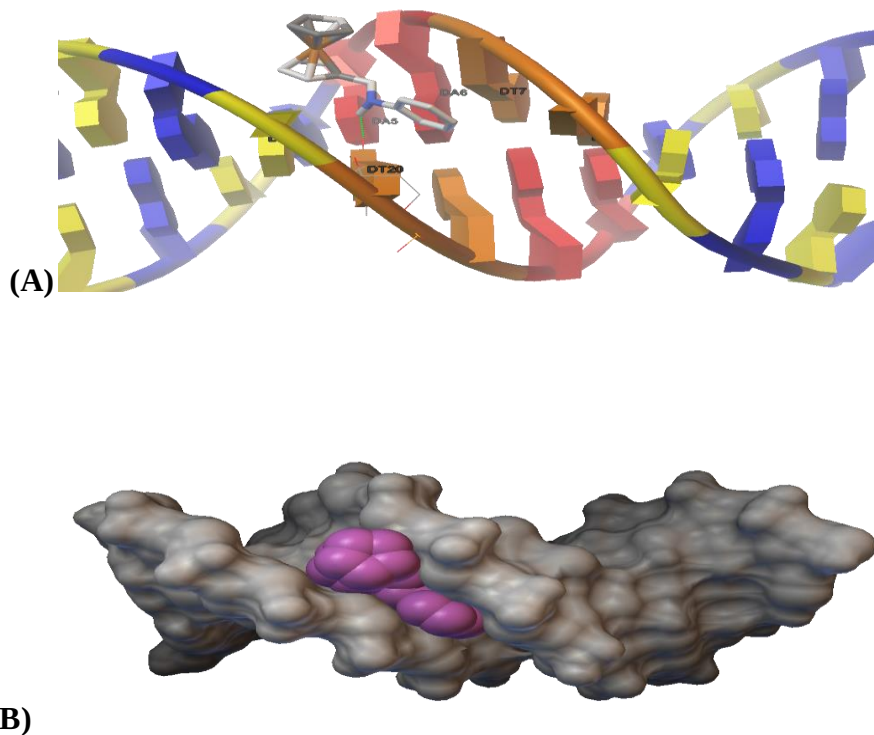


Figure 19 : Interaction de FMA avec l'ADN, **(A)** : Amarrage moléculaire de l'interaction FMA-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, **(B)** : Vue en surface de FMA amarré avec de l'ADN, Il montre que le FMA est attaché dans le petit sillon par liaison H.

II.2.1.3. Etude *in vitro*

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

- Spectre d'absorption UV-Vis de l'ADN

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

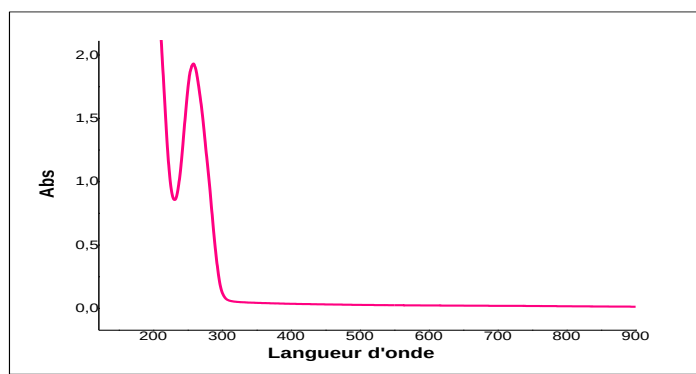


Figure 20 : Spectre d'absorption de l'ADN.

- Analyse quantitative : Mesure de la concentration

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

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

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

Le dosage de nos échantillons d'ADN à 260 nm donne de concentration 0.00008 mol/l .

- Analyse de la pureté

Le ratio DO260/DO280 est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. La pureté d'une solution d'ADN est considérée comme acceptable lorsque ce ratio est compris entre 1,6 – 2,0.

Tableau 04 : Représentation des résultats des ratios DO260/DO280 des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.

Longueur d'onde	DO d'AND	
260	1,404	1,915
280	0,793	1,064
Ratio = DO260/DO280	1,77	1,79

B. Etude de l'interaction entre la dérivé ferrocénique et ADN

-Etude spectroscopique par UV-visible de FMA (ferrocényl-methyl aniline).

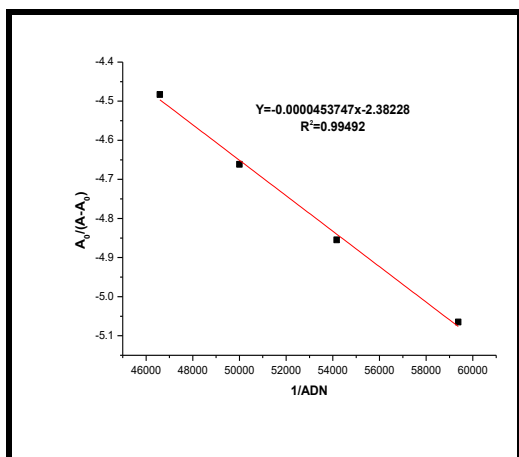


Figure 21 : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.

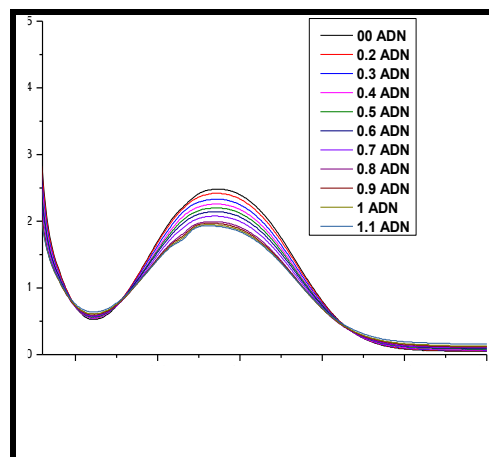


Figure 22 : Spectre d'absorption UV-Vis de FMA ($10^{-3}M$) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans Le DMF.

Différents Concentrations d'ADN ajoutées ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir de spectre d'absorption UV-Vis, Les valeurs obtenues de constant de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FMA sont regroupés dans le tableau ci-dessous avec, $A_0 = 0,24819686$.

Tableau 05 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-FMA obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.

Constante et énergie libre de l'interaction	K (mol^{-1})	ΔG (KJ.mol^{-1})
Le valeur	5.25×10^4	-26.9

- Etude électrochimique par voltamétrie cyclique de FMA

✓ Constante et énergie libre de l'interaction FMA-ADN

L'énergie libre de liaison ΔG de l'ADN avec le dérivé ferrocénique a été déterminé par l'étude du comportement anodique de ce dérivé en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN, cette étude du comportement électrochimique a été réalisé par la technique

de la voltammétrie cyclique dans une solution DMF, la fenêtre du potentiel était de 200 à 700 mV avec une vitesse de balayage égale à 100 mV/s.

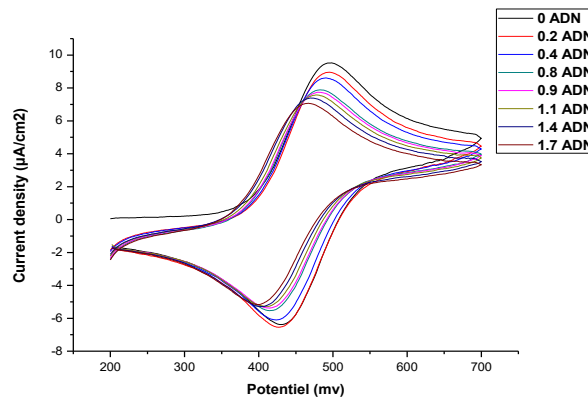


Figure 23 : Voltammogramme cyclique de dérivé ferrocénique (10^{-3}M) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

Les voltammogrammes cycliques représentés dans la fig. 23 montrent que l'addition de l'ADN provoque toujours une diminution de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques ip_a et ip_c s'accompagné d'un déplacement du potentiel des pics anodiques vers les valeurs les plus positives alors que le déplacement du potentiel des pics cathodiques vers les valeurs les plus négatives.

La diminution du courant de pic anodique de dérivé ferrocénique par l'addition de diverses concentrations d'ADN a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation (2) (Feng et al., 1997) suivante :

$$\log \frac{1}{[\text{ADN}]} = \log K + \log \frac{ip}{ip_0 - ip} \quad (2)$$

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

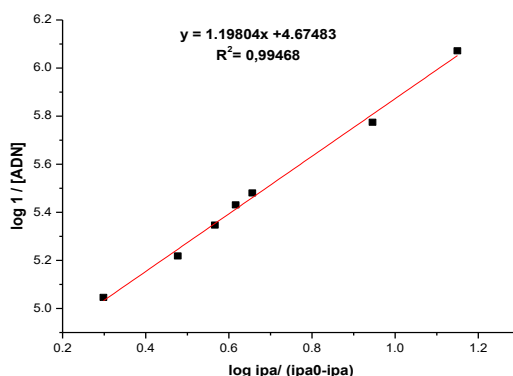


Figure 24 : Droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

Les valeurs obtenues de constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FMA sont regroupées dans le tab.06.

Tableau 06 : Constante et énergie libres de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

Equation	R ²	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
$y = 1.19804x + 4.67483$	0,9946	47296.60851	-26.68831171

✓ Détermination du rapport des constants de liaison

Le mode d'interaction FMA-ADN peut être évalué à partir de la variation du potentiel formel. En général, le décalage anodique du potentiel formel (déplacement vers les valeurs les plus positives) est causé par l'intercalation du composé étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN (**Aslanoglu, 2006**), bien que le décalage cathodique (déplacement vers les valeurs les plus négatives) a été causé par l'interaction électrostatique du composé cationique étudié avec le phosphate anionique du squelette de l'ADN (**Li et al., 2005**).

Ainsi, le déplacement de potentiel de pic vers les valeurs les plus positive indique en outre que l'anion Fe (III) du dérivé FMA est plus facile de s'oxydée en présence d'ADN parce que sa forme réduite est plus fortement lié à l'ADN que sa forme oxydée. Pour un tel système, où les deux formes de dérivé ferrocénique réagissent avec l'ADN, le figure 25 ci-dessous peut être appliqué.

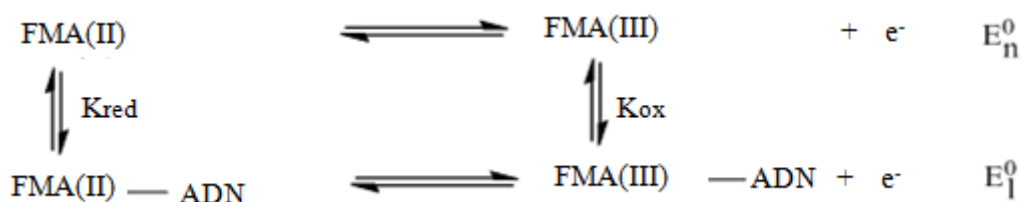


Figure 25 : Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de FMA libre et celui lié à l'ADN.

Pour déterminer le rapport $K_{\text{ox}}/K_{\text{red}}$, des voltammogrammes cycliques de dérivé ferrocénique en absence et en présence de $3.31163 \mu\text{M}$ d'ADN ont été obtenus fig. 26.

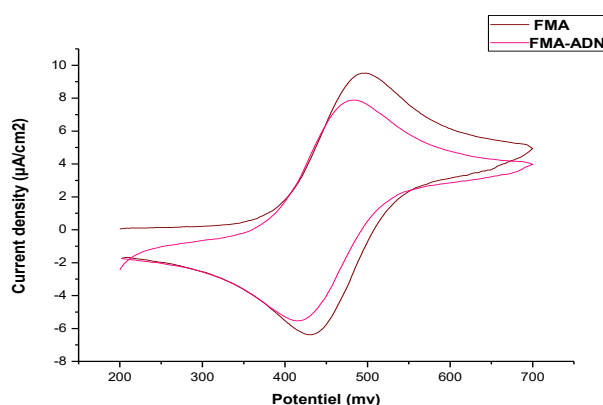


Figure 26 : Voltammogrammes cycliques de FMA (10^{-3}M) en absence d'ADN (ligne rouge) et en présence de $3.31163 \mu\text{M}$ d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux.

Les valeurs de déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques et la baisse de leurs courants, ainsi que le rapport des constantes de liaison sont tabulées dans le tab.07.

Tableau 07 : Données électrochimiques de la forme libre de FMA et celui de l'adduit FMA-ADN.

Composé	$i p_a$ (μA)	$E p_a$ (V)	$i p_c$ (μA)	$E p_c$ (V)	E_0 (V)	$\left \frac{i p_a}{i p_c} \right $
FMA	9.596	0.496	-6.351	0.429	0.462	1.016
FMA-AND	7.863	0.482	-5.521	0.414	0.448	1.424

E^0 est calculé à partir de la relation (3) suivante,

$$E^0 = \left| \frac{E p_c + E p_a}{2} \right| \quad (3)$$

Le tab.07 montre que le potentiel des pics anodiques et cathodiques des adduits est supérieur de celui de la forme non liée de dérivé ferrocénique, les constatations sont observées pour le potentiel formel E_0 . Les valeurs du rapport i_{pa}/i_{pc} traduit parfaitement la réversibilité du système ferrocénium/ferrocène.

La variation de valeur du potentiel formel ΔE^0 calculé à partir de la relation 4 ainsi que le pourcentage de la baisse de la densité du courant anodique $\% \Delta i_{pa}$ est calculé à partir de relation 5 sont représenté dans le tab.08.

$$\Delta E^0 = E^0_{n-} - E^0_1 = E^0(\text{FMA}) - E^0(\text{FMA-ADN}) \quad (4).$$

$$\Delta E^0 = 0.014169279$$

$$\% \Delta i_{pa} = 100 - \frac{i_{pa}}{i_{pa_0}} \times 100 \quad (5)$$

Tableau 08 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.

Adduit	$\Delta E^0(\text{V})$	$\% \Delta i_{pa}$	K_{ox}/K_{red}
FMA-ADN	0.014169279	18.063440087	1.738430253

La baisse de la densité du courant de pics anodiques est attribuée à la diminution de concentration en dérivé ferrocénique suite à la formation de l'adduit FMA-ADN qui se diffuse plus lentement. La diminution de la densité du courant des pics anodiques en présence d'ADN peut être utilisée pour le calcul de la constante de liaison, tandis que le déplacement de valeurs de potentiel des pics peut être exploité pour la détermination du mode d'interaction.

On remarque, d'après la valeur du rapport K_{ox} / K_{red} dans le tab.08, que la forme oxydée $Fc(III)$ réagit plus quantitativement que celle de la forme réduite $Fc(II)$.

✓ Coefficient de diffusion

Afin de calculer les coefficients de diffusion de FMA et celui de l'adduit FMA-ADN, plusieurs voltammogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400, 500 mV/s en absence et en présence de $(4.10769 \times 10^{-6} \text{ mol/l})$ d'ADN.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le tab.09.

Tableau 09 : Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.

Vitesse (mV/s)	$V^{1/2}$	0.0mol/l ADN	4.10769 x 10 ⁻⁶ mol/l ADN
		IPa (μA.cm-2)	IPa (μA.cm-2)
100	10	9,19460826	7,65683797
200	14,142	12,5560236	10,5773659
300	17,32	15,1918001	12,7071047
400	20	16,9845549	14,3066554
500	22,36	18,5532154	15,7264813

Les coefficients de diffusion de FMA et de l'adduit FMA-ADN ont été déterminés en utilisant l'équation (6) de Randles–Sevcik (**Brett et al., 1993**)

$$ip_a = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

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

Le courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence et en présence de 4.10769 x 10⁻⁶mol/l de l'ADN selon l'équation (6).

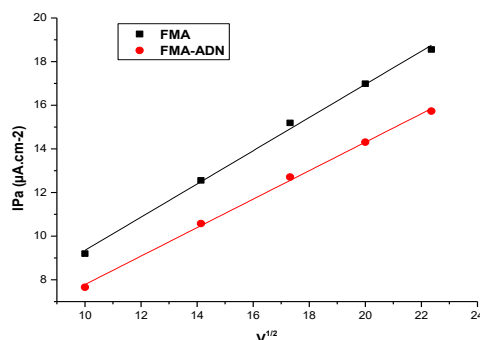


Figure 27 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (noire) et en présence (rouge) de l'ADN.

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

Tableau 10 : Coefficients de diffusion de FMA de l'adduit FMA-ADN.

Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
FMA	$y = 0,76106x + 1,73739$	0,99655	0.000082229
FMA-ADN	$y = 0,65262x + 1,25412$	0,99799	0.000060465

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

✓ Taille de site de liaison

La taille des sites de liaison S de dérivé ferrocénique avec l'ADN peut être déterminée à partir des données électrochimiques en utilisant de l'équation (7) (Aslanoglu et al.,2005) suivant :

$$\frac{C_1}{C_n} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{S} \quad (7)$$

Avec, (S) est la taille de site de liaison en termes de paires de bases, (C_n) est la concentration de l'espèce libre, (C₁) est la concentration des espèces d'ADN lié, (K) est la constante de liaison.

La concentration des paires de base peut être exprimée en tant que [ADN]/2, l'équation précédente peut être écrite comme suit :

$$\frac{C1}{Cn} = \frac{K[ADN]}{2S} \quad (8)$$

Le rapport des concentrations $C1/Cn$ est déterminé à partir de l'équation (9) (Aslanoglu et al., 2004) ci-dessous :

$$\frac{C1}{Cn} = \frac{i0-i}{i} \quad (9)$$

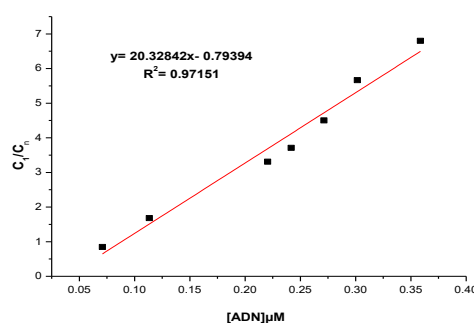


Figure 28 : Tracé de $C1/Cn$ en fonction de $[ADN]$.

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

Tableau 11 : Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique.

Pente	K	S (bp)
20.32842	47296.60851	0.00085961

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

C. Evaluation de l'activité antioxydant

- Test de piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl 1-1- picrylhydrazyl)

La mesure de l'effet anti-oxydant a été effectuée de manière spectrale à partir de la spectroscopie UV-visible pour le test de piégeage de DPPH[•].

Les courbes d'absorption et la droite de régression sont regroupées dans les figures suivantes pour le DPPH[•] dans le cas libre et lorsque elles sont liées aux différentes concentrations du

(FMA). il a été observé que la valeur la plus élevée a été enregistrée pour le DPPH[•] dans le cas libre.

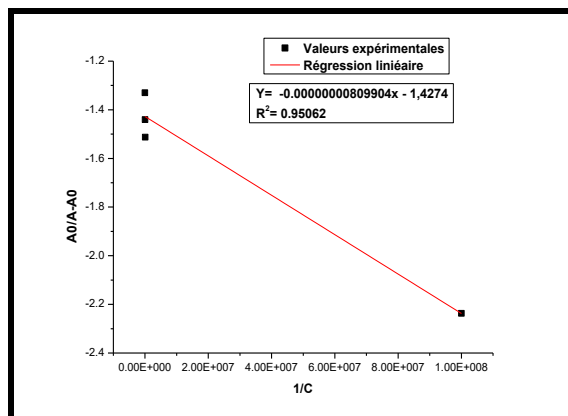


Figure 29 : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de FMA.

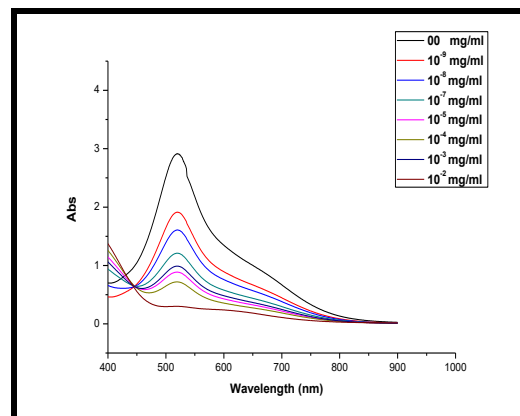


Figure 30: Spectre d'absorption UV-Vis de DPPH[•] en absence et en présence de différentes concentrations de FMA.

L'activité antioxydante de FMA a été exprimée en IC₅₀. La valeur d'IC₅₀ a été définie comme la concentration en (mg/mL) d'échantillons qui inhibe la formation de radicaux DPPH[•] de 50%.

Le tableau 12 : Le taux d'inhibition DPPH[•] % pour le composé FMA.

Le composé	C (g/l)	A	I%
FMA	0.000000001	1.91505195	34.23501617
	0.00000001	1.61036226	44.69839422
	0.000001	1.20878967	58.48883729
	0.01	0.294720584	89.87897198

Les courbes d'inhibition peut être tracée en fonction des concentrations massique des composés FMA.

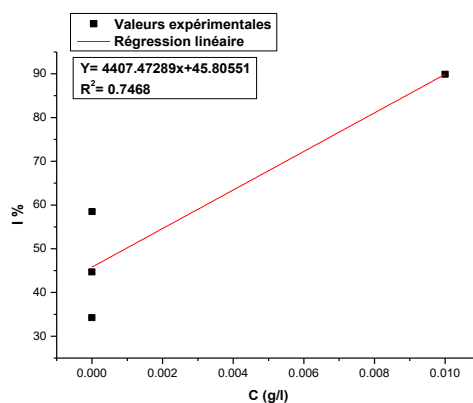


Figure 31 : Droite de régression du **I%** en fonction de concentration massique pour le composé FMA.

A partir du courbe d'inhibition de DPPH^{*} en fonction des concentrations massique des composés (FMA) on peut calculer la valeurs d' IC50.

Tableau 13 : Les valeurs d'IC50 pour les composés FMA et AG.

Le composer	L'équation	R ²	IC50
AG	$y = 8102, x + 39,93$	0,863	$1,24.10^{-3}$
FMA	$Y = 4407.47289x + 45,80551$	0,7468	$9,51676868.10^{-4}$

D'après les valeurs d'IC50, le FMA possède le valeur le plus faible ce qui se traduit par une bonne activité antioxydante en comparaison avec l'acide gallique.

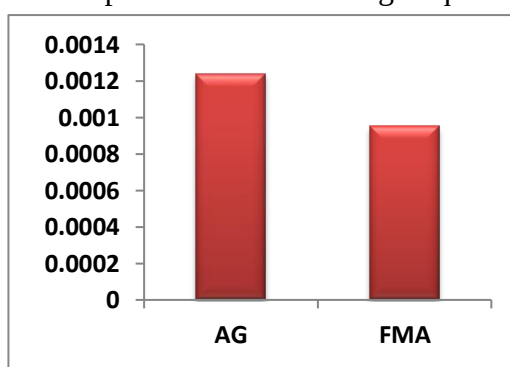


Figure 32: Histogramme de la variation des valeurs IC50 pour l'acide gallique et le dérivé FMA.

- Le test de piégeage de radical superoxyde anion ($O_2^{\cdot-}$)

Les radicaux libres d'oxygène réactif a été produite après l'obtention des conditions expérimentales préalablement déterminées à température ambiante, Le forme suivante identifie les paramètres voltammétriques de l'oxygène en absence et en présence de FMA.

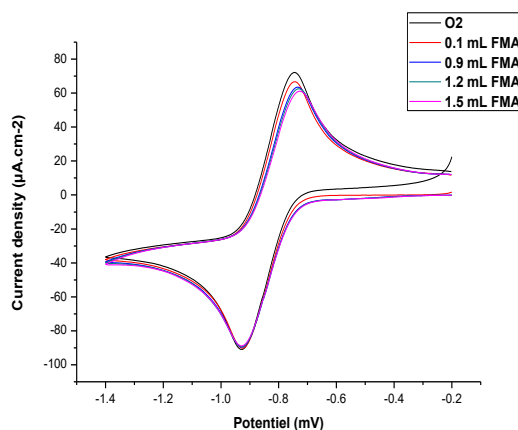


Figure 33 : Voltammogrammes cycliques de radical d' ($O_2^{\cdot-}$) en absence et en présence de concentration croissant de dérivé ferrocénique enregistré sur une électrode de carbone vitreux à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.

Le tableau 14 : Le taux d'inhibition $O_2^{\cdot-}$ % pour le FMA et AG.

Le compose	Le volume ajouter (ml)	Le concentration (g/l)	Ipa(µA)	Inhibition%
FMA	O ₂	/	71.8590284	/
	0.1	0.0000000131487	66.5009829	7.456
	0.9	0.000000114683	63.2996349	11.911
	1.2	0.00000015116	62.2858748	13.322
	1.5	0.000000186811	61.2187588	14.807

À partir des valeurs obtenus dans le tableau on peut obtenu la droite de régression de changement de pourcentage d'inhibition $O_2^{\cdot-}$ % en fonction de concentration massique de FMA.

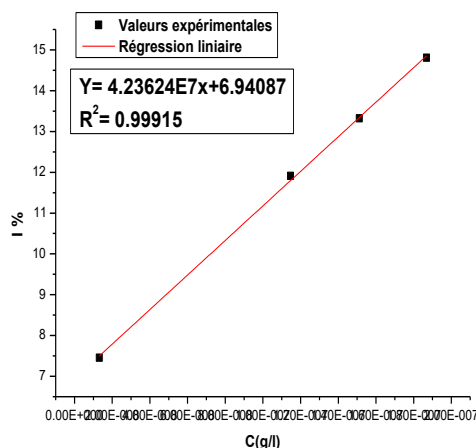


Figure 34 : Droite de régression du **I%** en fonction de la concentration massique pour le FMA.

A partir de ces droites de régression on peut calculé l'IC₅₀, illustré dans le tab (15)

Tableau 15 : Les valeurs d'IC₅₀ pour le FMA et L'AG.

Le composé	L'équation	R ²	IC ₅₀
FMA	$Y = 42,36.10^6 x + 6.94087$	0.999	0.077651391
AG	$y = 2.10^6 x - 1,603$	0,992	0.646342

D'après les valeurs d'IC₅₀, le FMA possède le valeur le plus faible ce qui se traduit par une bonne activité antioxydante en comparaison avec l'acide gallique.

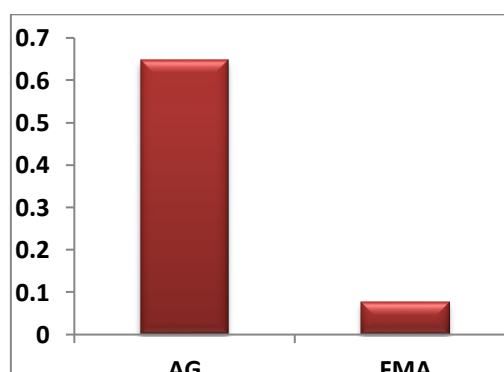


Figure 35 : Histogramme de variation des valeurs d'IC₅₀ pour l'AG et le dérivé FMA.

D. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été réalisé contre les cinq souches bactériennes, les résultats obtenu sont regroupés dans le tableau suivante:

Tableau 16 : Activité anti-bactérienne de FMA.

Souches testés	GRAM-				GRAM+
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella entericassp</i>	<i>Pseudomonas aéruginosa</i>	<i>Klepsilla pneumoniae</i>	<i>Listeria innocua</i>
Concentration					
01	00	00	00	00	00
03	00	06	00	00	07
06	00	07	00	00	11
Contrôle -	00	00	00	00	00
Contrôle +	32	18	39	25	36

D'après les résultats obtenus, le produit FMA semble à avoir une activité inhibitrice nul ou très faible sur les différentes classes des bactéries testées. Le diamètre d'inhibition est compris entre 6 jusqu'à 11 mm.

✓ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klepsilla pneumoniae*: FMA ne montre aucun inhibition de croissance.

✓ *Salmonella entericassp*: FMA possède une activité négligable vis-à-vis *Salmonella entericassp*. avec des diamètres de zones d'inhibition de 7 mm pour une concentration de 6 mg/ml et 6 mm pour une concentration de 3 mg/ml, pour une concentration de 1 mg/ml, pas de zones d'inhibition.

✓ *Listeria innocua*: FMA possède une activité sur *Listeria innocua* avec des diamètres de zones d'inhibition de 11 mm pour une concentration de 6 mg/ml et 7 mm pour une concentration de 3 mg/ml, pour une concentration de 1 mg/ml, pas de zones d'inhibition.

E. Evaluation de l'activité cytotoxique de dérivé ferrocénique vis-à-vis les globules rouges humains

La cytotoxicité est suivie par la fuite de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains (modèle universel de cellules animales). Le taux d'hémoglobine dans le milieu

extracellulaire additionné de différents concentrations de dérivé ferrocénique est mesuré par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548nm.

Les résultats relatifs aux taux d'hémolyse induit par les différents concentrations de FMA vis-à-vis les globules rouges sont présentés sur les figures suivantes

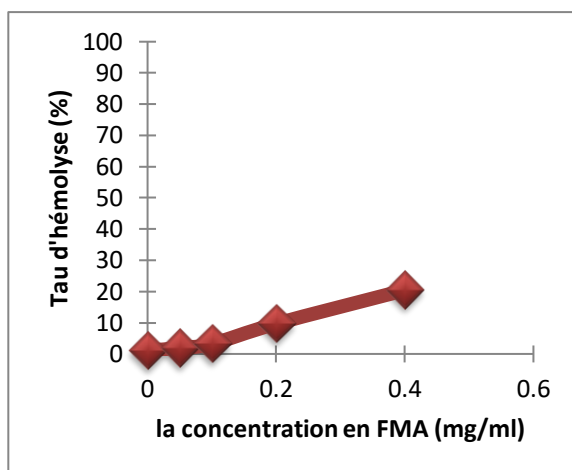


Figure 36 : Taux d'hémolyse des Globules en fonction des différents concentration de FMA.

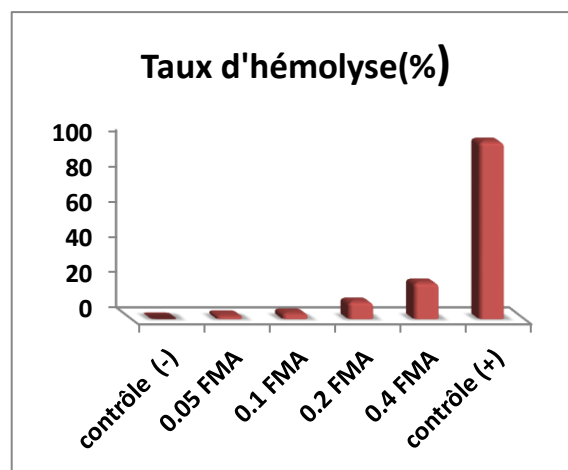


Figure 37 : Taux d'hémolyse des différents concentration de FMA et de DMSO (C-) et de Tween 80 (C+).

Nous constatons que la fuite d'hémoglobine intracellulaire dépend de la concentration de FMA, le taux d'hémolyse augmente avec l'augmentation de la concentration de FMA, à une concentration très élevée de C=0.4mg/ml la fuite d'hémoglobine est atteinte 20,43% . Il est important de signaler que le DMSO n'a aucun effet sur le globule rouge humain (contrôle-) ainsi que Tween 80 fait un hémolyse totale pour le globule rouge.

Nous remarquons que la dérivé ferrocénique a une activité faible de cytotoxique vis-à-vis les globules rouges humains on peut le considère comme un candidat de la chimiothérapie.

II.2.1.4. Etude *in vivo*

A. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine

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

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

Moy $\pm$ ESM de 5 rattes de chaque groupe.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

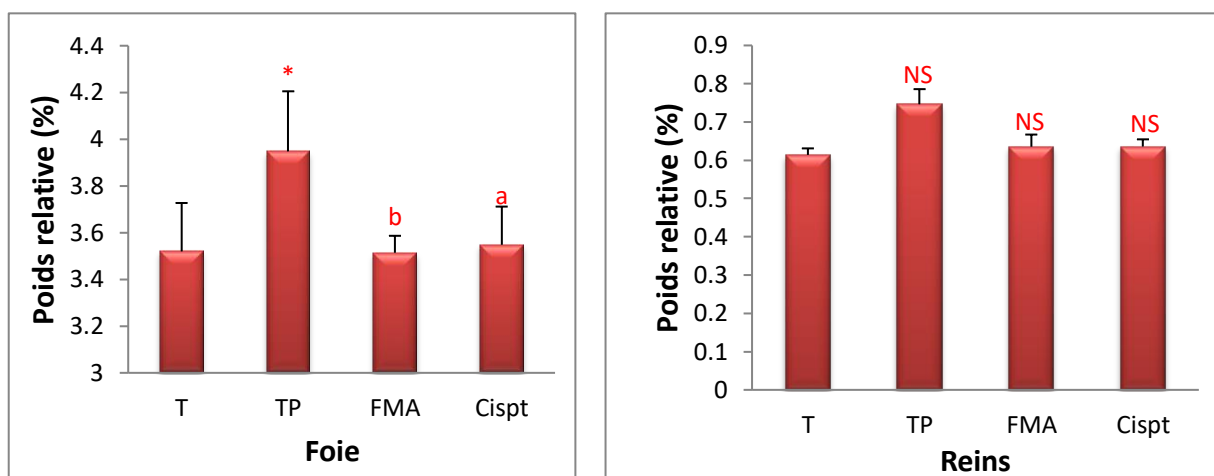


Figure 38 : Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.

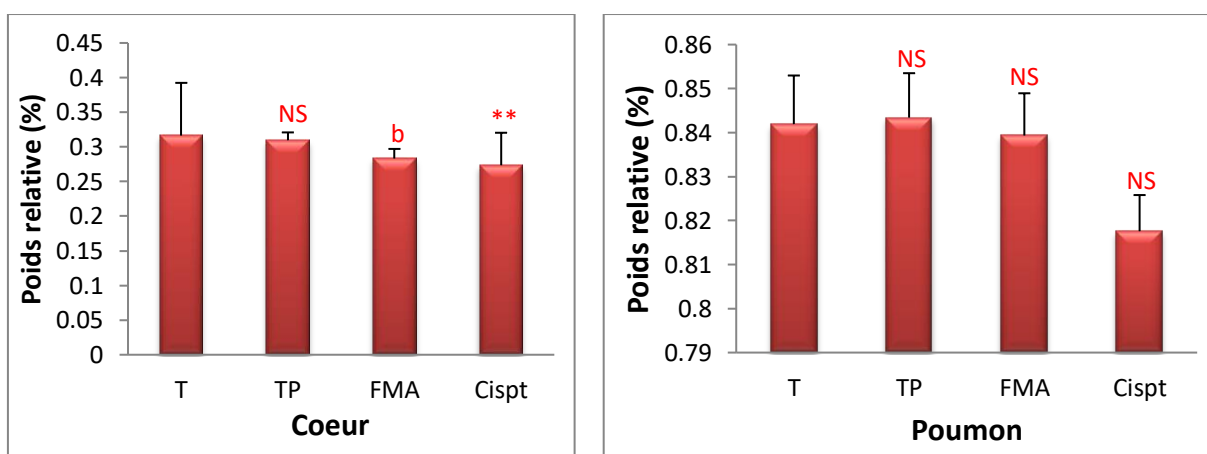


Figure 39 : Poids relatif des organes (cœur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

Les résultats (fig. 38, 39) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation significative ($p < 0.05$) de poids relatif de foie chez le groupe exposé au métribuzine (TP) et une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de poids relatif de cœur chez le groupe traité par le Cispt par rapport au groupe témoin. En revanche, une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de poids relatif de foie et de cœur chez le groupe traité par FMA par rapport à groupe TP. Aussi nous observons une diminution significative ($p < 0.05$) de poids relatif de foie chez le groupe traité par le Cispt par rapport à groupe TP.

B. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les ratte exposées au métribuzine

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

Moy $\pm$ ESM de 5 ratte de chaque groupe.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

- Effet sur les enzymes hépatique (TGO, TGP et PAL)

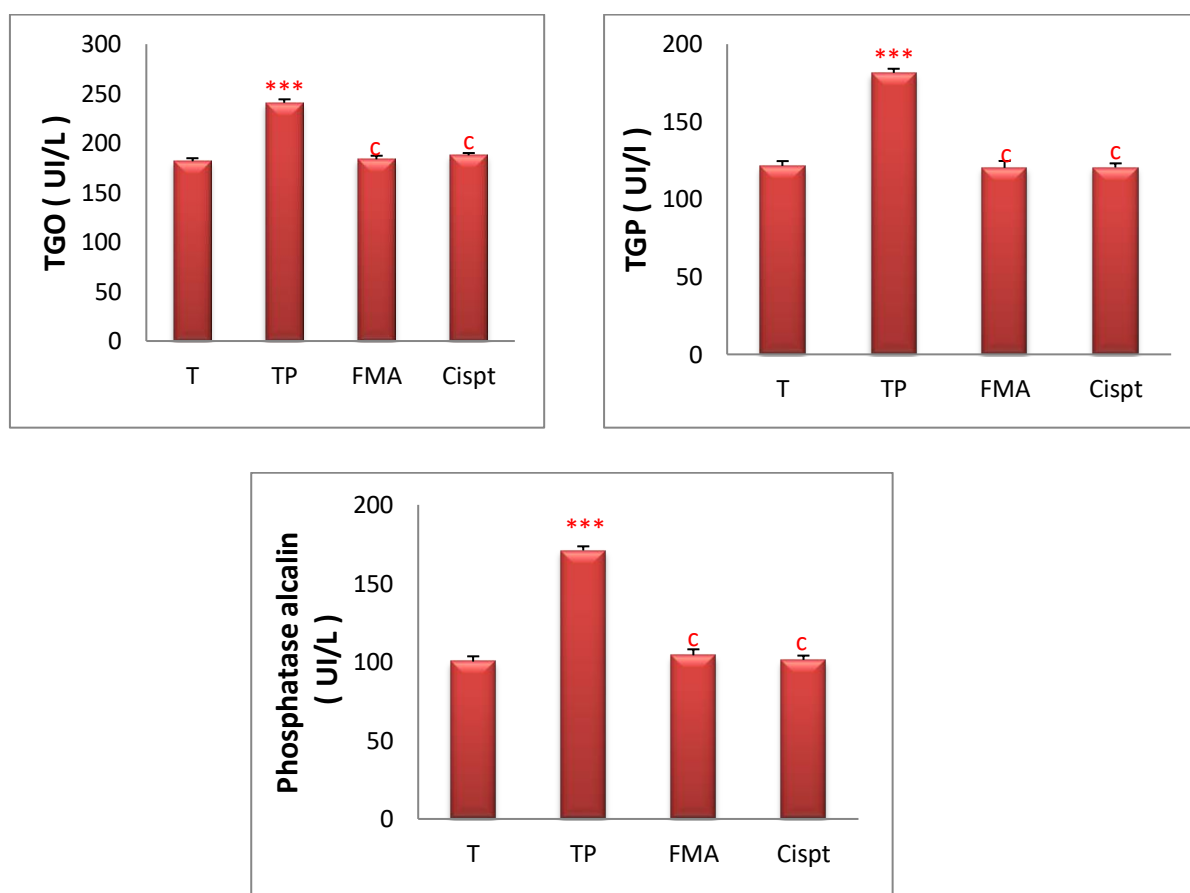


Figure 40 : Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP et le taux de PAL) chez les ratte exposées au métribuzine.

Les résultats (fig. 40) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une augmentation très hautement significatif de taux du PAL (phosphatase alcalin), TGO et TGP ($p < 0.001$) par rapport aux ratte sains témoins. En revanche, le traitement des ratte par FMA

et par le cisplatine provoque une diminution très hautement significative de taux du TGO, TGP et PAL ($p < 0.001$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

-Effet sur les concentrations sériques de glucose, urée et créatinine

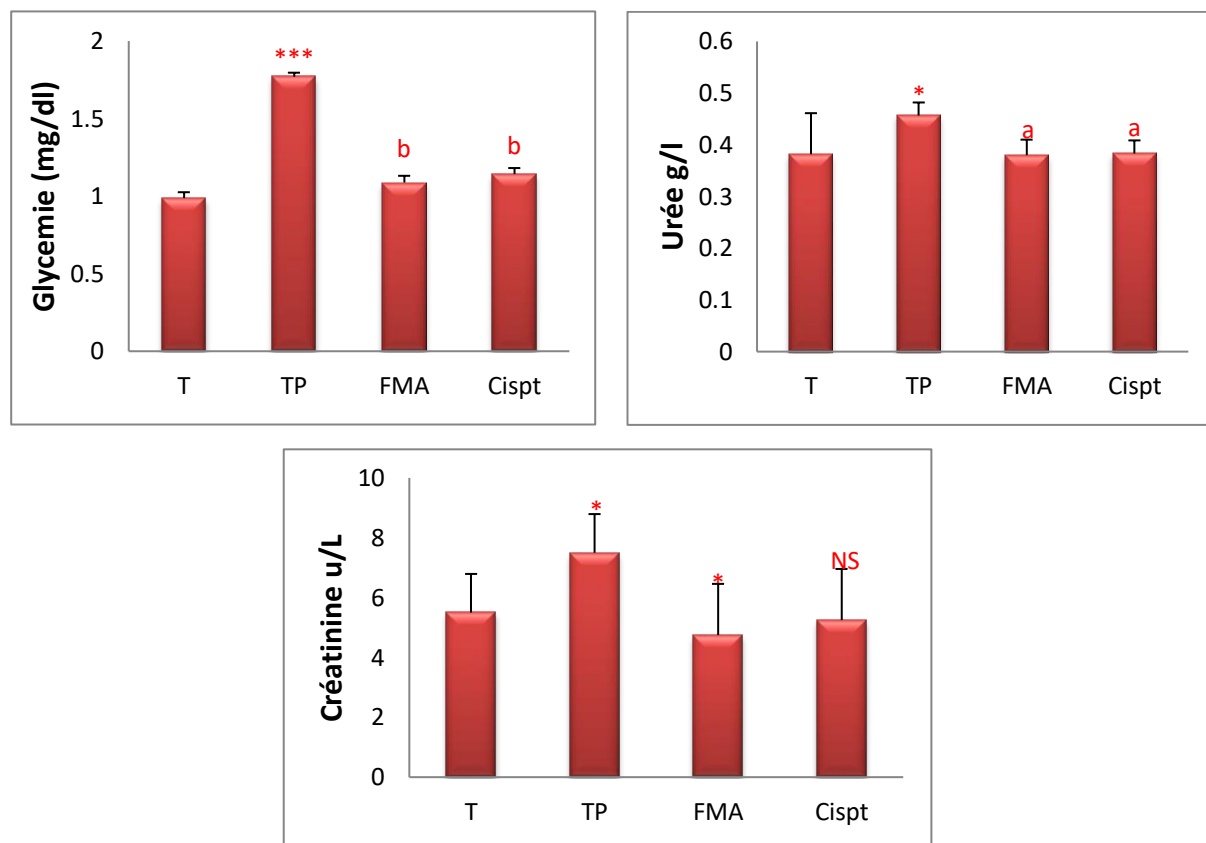


Figure 41 : Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, urée et créatinine chez les ratte exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig. 41) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une augmentation très hautement significative de concentration de la glycémie ($p < 0.001$), une augmentation significative des concentrations de l'urée et créatinine ($p < 0.05$) par rapport aux ratte saines. Cependant, le traitement des ratte par FMA provoque une diminution hautement significative de concentration de la glycémie ($p < 0.01$), diminution significative de concentration de l'urée ($p < 0.05$). En revanche, le traitement par le cisplatine provoque une diminution hautement significative de concentration de la glycémie ($p < 0.01$), diminution significative de concentration de l'urée ($p < 0.05$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

-Effet sur les concentrations sériques de LDH et GGT

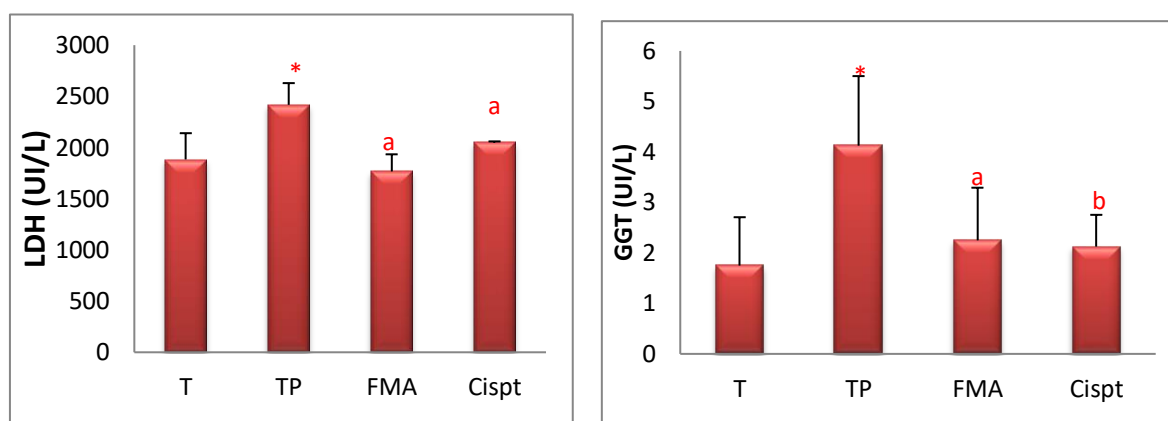


Figure 42 : Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations sériques la de LDH et GGT chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig. 42) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation significatif ($p < 0.05$) de la GGT et LDH par rapport aux rattes saines. En revanche, le traitement des rattes par FMA provoque une diminution significative de GGT et LDH ($p < 0.05$); Aussi, le traitement des rattes par cispt provoque une diminution hautement significative de GGT ($p < 0.01$), une diminution significative de LDH ($p < 0.05$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

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

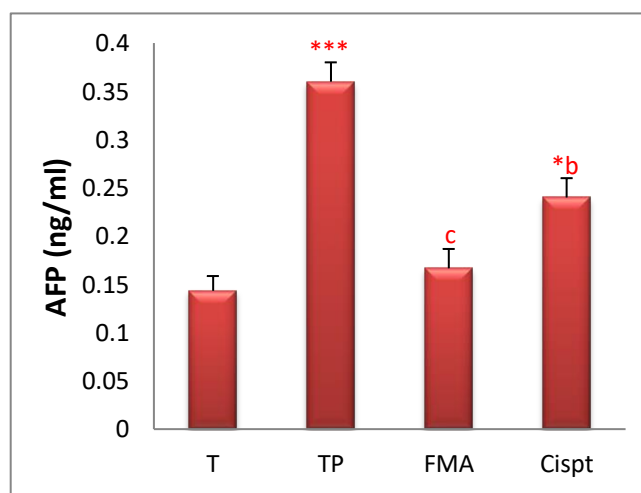


Figure 43 : Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine "AFP") chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus (fig. 43) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation très hautement significatif ($p < 0.001$) par rapport aux rattes

saines. En revanche, le traitement des ratte par FMA provoque une diminution très hautement significative ($p < 0.001$), tandis que le traitement des ratte par cisplatine provoque une diminution hautement significative ($p < 0.01$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

C. Effet de traitement par le FMA et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les ratte exposées au métribuzine

Après 50 jours d'exposition des ratte au métribuzine, ils sont traités par le FMA et le cisplatine pendant 7 jours, les organes ont été prélevés par faire les tests des stress oxydatifs tissulaires (Malondialdéhyde « MDA », glutathion réduit « GSH » et le catalase « CAT »).

Moy $\pm$ ESM de 5 ratte de chaque groupe.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

-Effet sur la concentration tissulaire de Malondialdéhyde (MDA)

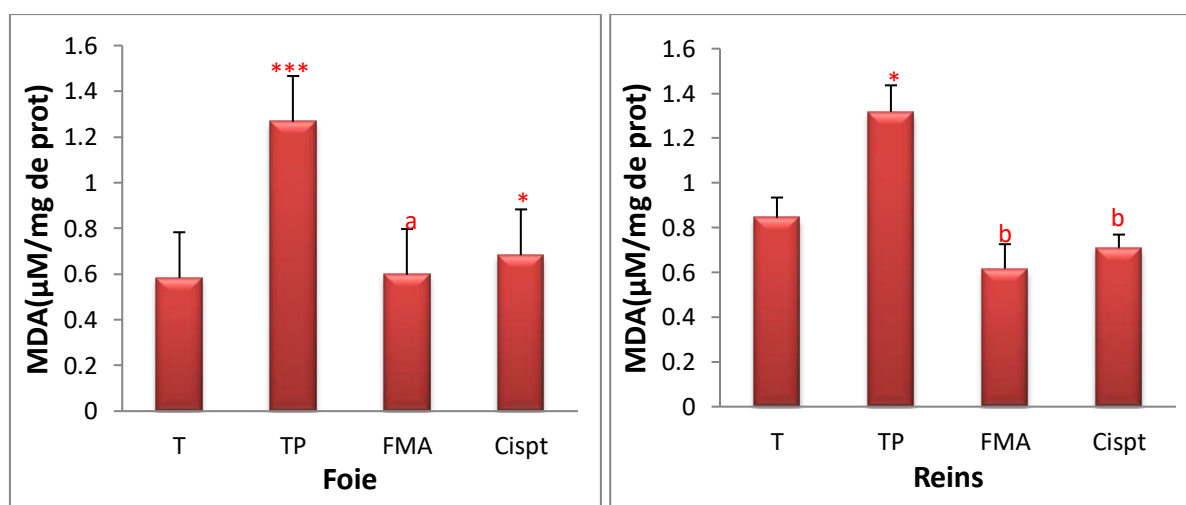


Figure 44 : Concentration hépatique et rénale de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux

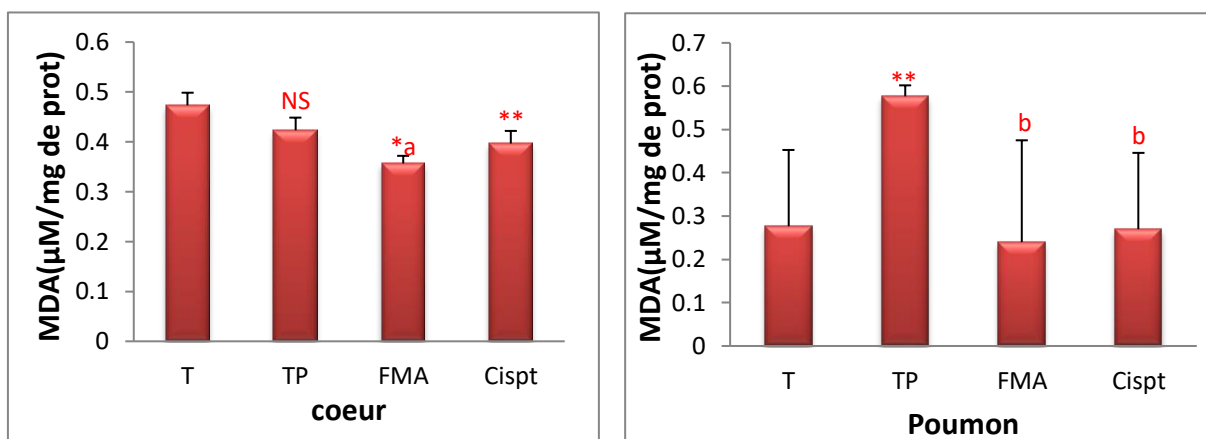


Figure 45 : Concentration cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats obtenus (fig. 44, 45) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation très hautement significative de la concentration hépatique de MDA ($p < 0.001$), une augmentation hautement significative de la concentration pulmonaire de MDA ($p < 0.01$), une augmentation significative de la concentration rénal de MDA ($p < 0.05$) une diminution non significative concentration cardiaque par rapport au groupe témoin. Les résultats montrent aussi que le traitement par FMA provoque une diminution significative de la concentration hépatique et cardiaque de MDA ($p < 0.05$), diminution hautement significative de la concentration rénal et pulmonaire de MDA ($p < 0.01$). En revanche, le traitement par cispt provoque une diminution hautement significative de la concentration rénal et pulmonaire de MDA ($p < 0.01$), diminution non significative de la concentration hépatique et cardiaque de MDA par rapport au rattes exposées au métribuzine.

-Effet sur la concentration tissulaire de glutathion réduit (GSH)

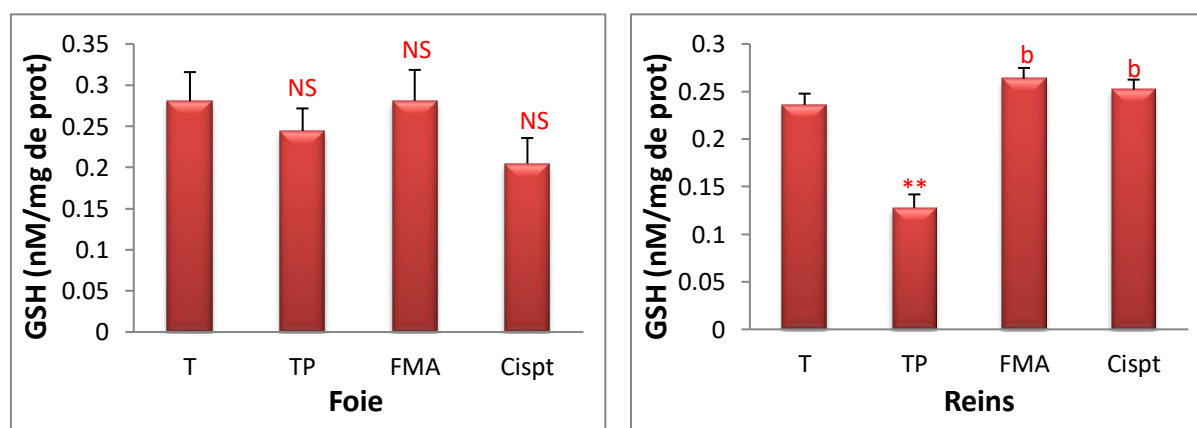


Figure 46 : Concentration hépatique et rénal de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux

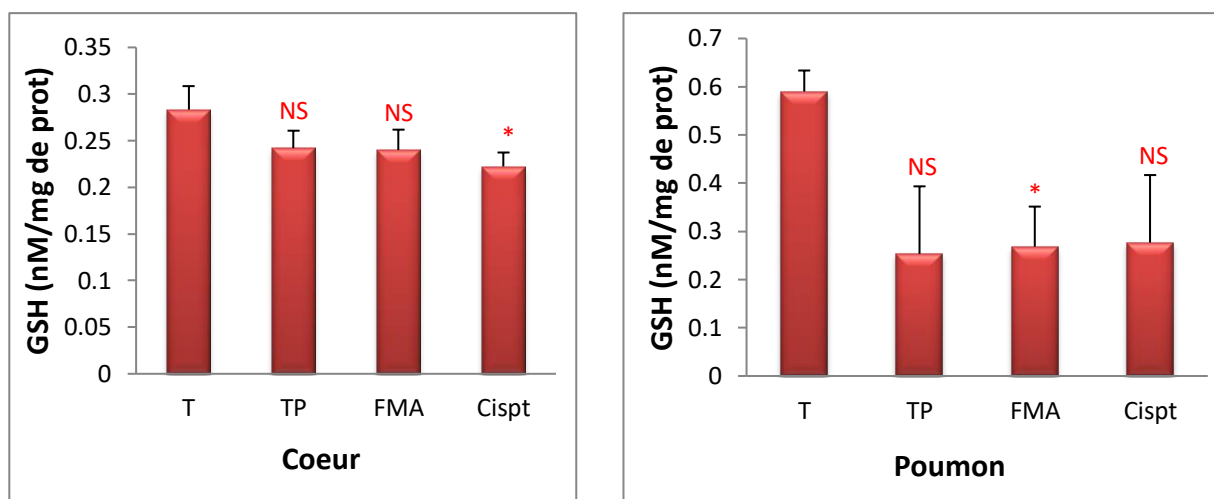


Figure 47 : Concentration cardiaque et pulmonaire de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats obtenus (fig. 46, 47) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une diminution hautement significative de la concentration rénal de GSH ($p < 0.01$), et une diminution non significative concernant les autres organes par rapport au témoin. En revanche, le traitement par FMA provoque augmentation hautement significative de la concentration rénal de GSH ($p < 0.01$), une augmentation non significative de la concentration hépatique et pulmonaire, et une diminution non significative de la concentration cardiaque. En autre coté le traitement par cispt provoque augmentation hautement significative de la concentration rénal de GSH ($p < 0.01$), une diminution non significative de la concentration hépatique et cardiaque par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide) .

-Effet sur la concentration tissulaire de catalase (CAT)

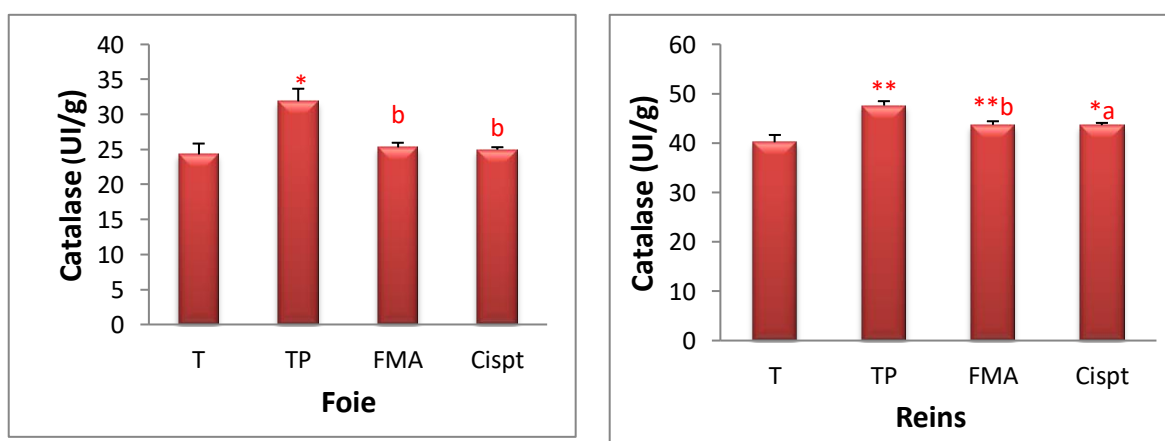


Figure 48 : Concentration hépatique et rénal de catalase (CAT) chez les différents groupes expérimentaux.

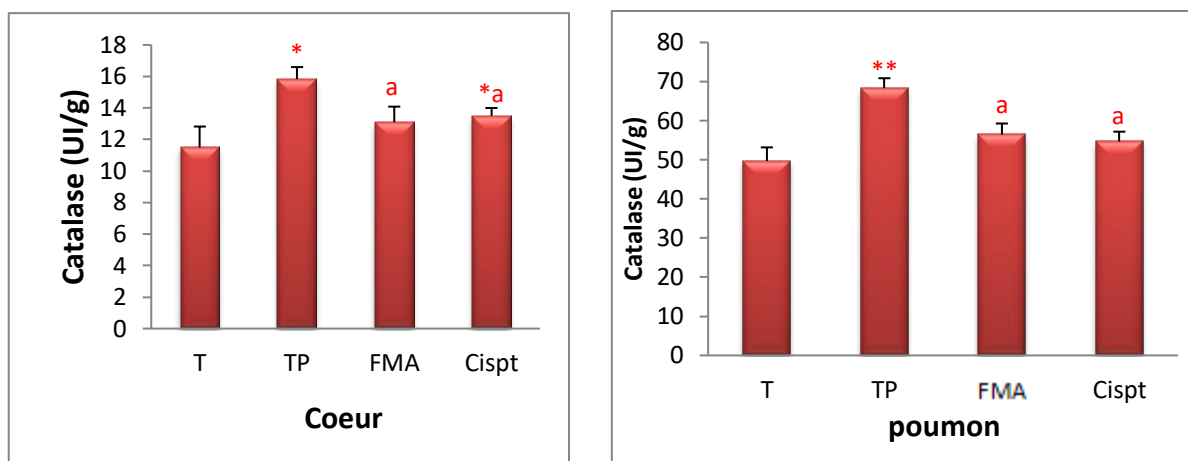


Figure 49 : Concentration hépatique et rénale de catalase (CAT) chez les différents groupes expérimentaux.

Les résultats obtenus (fig. 48, 49) montrent que l'exposition des ratte au métribuzine provoque une augmentation hautement significative de la concentration rénale et pulmonaire de CAT ($p < 0.01$), et une augmentation significative de la concentration hépatique et cardiaque de CAT ($p < 0.05$) par rapport aux ratte saines. Cependant, le traitement par FMA provoque une diminution hautement significative de la concentration hépatique et rénale de CAT ($p < 0.01$), une diminution significative de la concentration cardiaque et pulmonaire de CAT ($p < 0.05$). En revanche le traitement par cispt provoque une diminution hautement significative de la concentration hépatique de CAT ($p < 0.01$), une diminution significative de la concentration rénale et cardiaque et pulmonaire de CAT ($p < 0.05$) par rapport aux ratte exposées au métribuzine (témoin pesticide).

D. Etude histologique de foie

Dans le but de voir si l'administration de la métribuzine s'accompagne ou non d'une altération de l'architecture tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau du foie, chez tous les lots des ratte. L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents.

Les résultats de l'étude histologique du foie des différents lots sont présentés dans les figures suivantes:

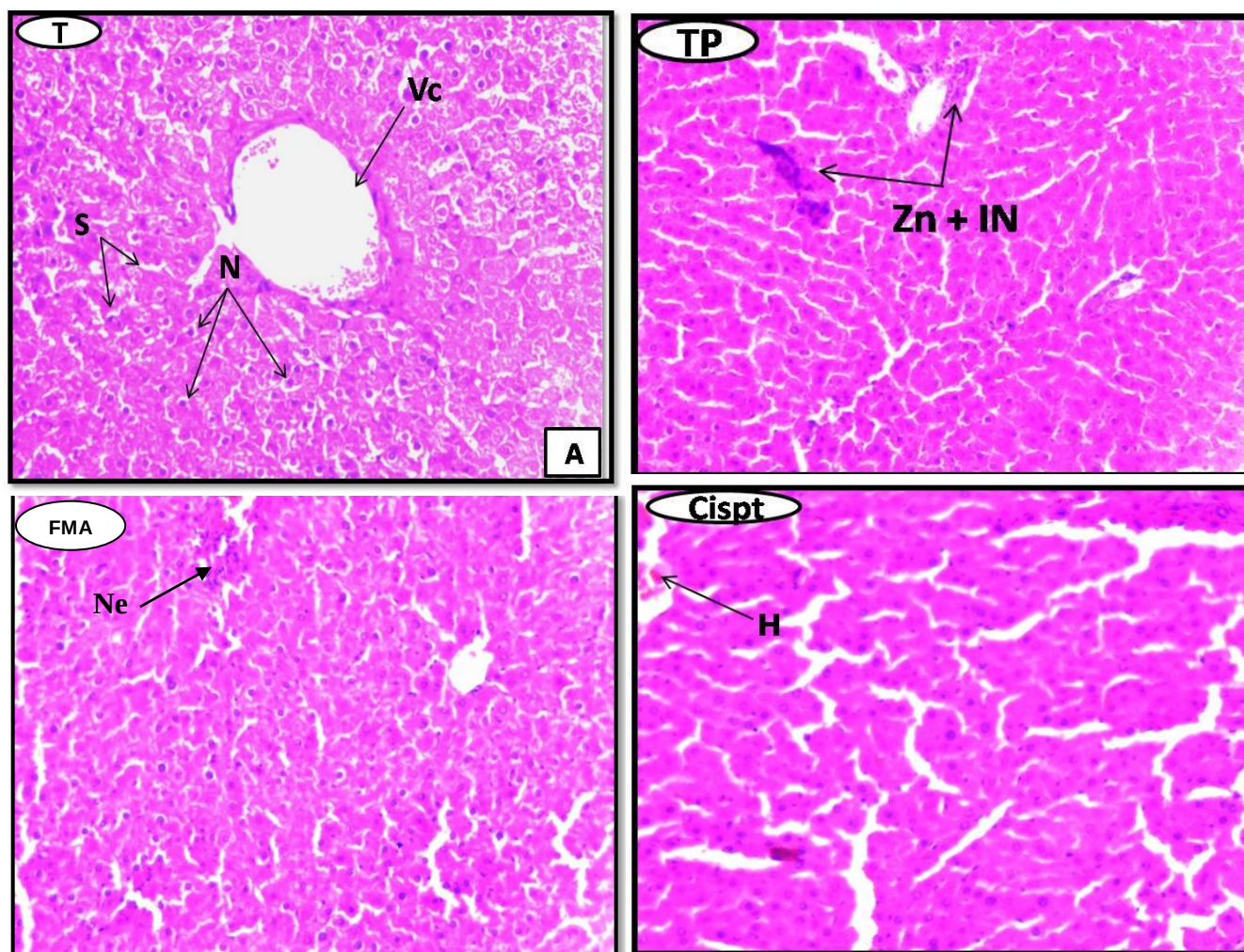


Figure 50 : Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, agrandissements ($\times 40$)(Photo originale, 2018).

T: Temoin, **TP:** Temoin Pesticide, **FMA:** ratte exposé au métribuzine et traité par dérivé ferrocénique, **C:** ratte exposé au métribuzine et traité par cisplatine.

Vc: Veine Centro-lobulaire, **N:** Noyau, **S:** Sinusoïde hépatique, **Zn+ IN:** Zone de nécrose avec inflammation, **H:** hémorragie. **Ne:** Nécrose

L'analyse histologique au niveau du foie après coloration à l'hématoxyline-Eosine, montrent:

Chez le group témoin pesticide: la présence d'un Zone de nécrose avec inflammation et hémorragie.

Chez le group traiter par FMA: très peu des nécroses cellulaires.

Chez le groupe traiter par cispt: hémorragie.

Discussion

Le but de ce travail est de synthèse et d'évaluation de l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline par trois approches. D'abord, l'étude *in silico* par la méthode de docking moléculaire. Ensuite, l'étude *in vitro* comporte l'étude de l'interaction entre ce dérivé avec l'ADN et l'évaluation de son effet antioxydant, antibactérienne et hémolytique. En fin, l'étude *in vivo* pour tester leur efficacité biologique par l'injection intra-péritonéal chez des rattes *Wistar albinos* exposé au métribuzine. Cette étude a été comparée avec l'activité biologique de cisplatine qui est un composé organométallique anticancéreux et qui interagit avec l'ADN. Dans cette étude, le choix du composé ainsi que les paramètres suivis sont des points essentiels à discutés.

La base de notre choix pour ce composé c'est pour la contribution à l'amélioration d'une traitement efficace avec moins d'effet secondaire nous avons mené à essayer de valoriser de ce dérivé ferrocénique à travers l'étude de l'aspect scientifique de l'effet thérapeutique.

La synthèse du dérivé N-ferrocénylméthylaniline est effectué par le traitement du sel quaternaire avec un excès d'aniline.

L'étude *in silico* de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN révèle que ce dérivé ferrocénique interagit avec l'ADN d'une façon spontané traduit par la valeur de l'énergie libre ($\Delta G = -27,0028$ KJ/mol) (Friedli, 2002 ; Infelta & Graetzel, 2006). En effet, le dérivé ferrocénique se lie à l'ADN et peut provoquer des changements conformationnels en formant un seul liaison hydrogène ce qui ralentit la réplication de l'acide nucléique et donc l'arrêt de la division cellulaire. Cela peut être expliqué par le fait que les cellules cancéreuses caractérisées par une prolifération anormale et anarchique dans l'organisme (Gassier & Morel-Haziza, 2003), l'attaque de ces cellules par le dérivé ferrocénique qui interagit avec l'ADN en empêchant leurs multiplications induit à la mort cellulaires, de ce fait, le dérivé N-ferrocénylméthylaniline considéré théoriquement comme un anticancéreux potentiel. Nos résultats est en accord avec l'étude de (Lanez & Lanez, 2016) qui ont montré par docking l'interaction d'autres dérivés ferrocénique avec l'ADN.

In vitro, par la méthode spectroscopique, l'étude de la variation d'absorbance de dérivé ferrocénique en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN donne une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -26,9$ KJ/mol) cela indique la spontanéité de la réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN par interaction physique (Infelta & Graetzel, 2006).

En général, quand une petite molécule interagit avec l'ADN et forme un complexe, les changements d'absorbance se produisent. Généralement, lorsque les molécules se lient à l'ADN avec une forte interaction : l'intercalation (**Can et al., 2014**).

L'étude par la méthode électrochimique de l'interaction de FMA et l'ADN montre que la valeur de l'énergie libre est négative ($\Delta G = -26,68831171$ KJ/mol) et moins de 30 KJ/mol, ce qui confirme que l'interaction de dérivé ferrocénique et l'ADN se fait spontanément par interaction physique.

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

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

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

La faible valeur de S indique la dominance de l'interaction d'intercalation ou l'interaction électrostatique entre le dérivé ferrocénique et l'ADN. Une telle interaction peut induire une perturbation dans le fonctionnement normal de l'ADN qui probablement abouti à la prévention de la réplication et la mort de la cellule (**Boudebia & Bouter, 2017**).

Concernant l'activité antioxydant de la dérivé FMA, le résultat obtenu avec le test de DPPH• par méthode spectroscopique montre que ce composé a un valeur d'IC₅₀ plus faible ce qui se traduit par une bonne activité antioxydant en comparaison avec l'acide gallique.

Gul Nabi et **Zai-Qun Liu** ont conclu lors d'évaluation des propriétés anti-radicalaires de quelques chalcones ferrocéniques que l'atome de fer dans le ferrocène et le groupe hydroxyle phénolique jouent le rôle d'inhibiteurs des radicaux. Les chalcones ferrocéniques contenant un groupement hydroxyl ou non sont capables de piéger DPPH• ce qui justifie que le couple

redox Fe(II) /Fe(II)+ dans le ferrocène. Donc, d'après la littérature, on peut conclure que l'activité de piégeage de DPPH• par nos dérivés ferrocénique est due au ferrocène lui-même.

La deuxième méthode utilisé au cours de notre travail pour évaluer l'activité anti-oxydant est le test de piégeage de radical $O_2^{\bullet-}$. A partir des voltamogrammes cycliques de d'oxygène en présence des dérivés ferrocéniques étudiés, on peut remarquer que ce dérivés montrent une activité antioxydant vis-à-vis l'anion radical superoxyde, et ça se traduit par la diminution des intensités des courants d'oxydation d'oxygène.

L'augmentation de la concentration en substrat antioxydant (dérivé ferrocénique et acide gallique) conduit à une diminution de courant de pic anodique de $O_2^{\bullet-}$ (I_{pa}), cette diminution de l'intensité du courant anodique d' $O_2^{\bullet-}$ suggère que le dérivé ferrocénique réagit de manière irréversible avec $O_2^{\bullet-}$.

D'après la valeurs d' IC_{50} obtenu de la FMA on peut constaté que ce dérivé possède une très fort activité antioxydant en comparaison avec l'activité de l'acide gallique. Nos résultats obtenus sont comparable à ceux trouvés par (Henni, 2017 ; Hemmami, 2017).

L'évaluation de l'activité anti-bactérienne a été testé vis-à-vis les cinq souches bactériennes. A partir des valeurs des diamètres des zones d'inhibition de croissance des souches bactériennes étudiées, ainsi que les concentrations correspondantes du produit FMA, on peut dire que, le FMA ne montre aucune activité significative contre les quatres souches bactériennes a GRAM (-) testées. Nos résultats obtenus sont équivaux et comparable à ceux trouvés par (Benabdesselam, 2017) qui déterminent l'activité antibactérienne des différents dérivés ferrocéniques, ils trouvent que ces composés n'exerce aucun effet significatives d'inhibition contre les souches *Escherichia coli* et le *Klebsiella* et le *pseudomonas* ce 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 de la présence d'une membrane externe principalement constituée de lipopolysacharides 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 trans-membranaires 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 (Benmohammed, 2015).

Le composé testé a montré une activité contre la souche bactérienne à GRAM (+) testées *Listeria innocua* mais n'est pas comparable à l'activité qui tester contre le GENTAMICINE.

Cet résultat est en désaccord avec les résultats trouvés par (**Shafaqat *al.*, 2013 ; Njogu, et *al.*, 2016**) qui montrent une activité d'inhibition significative contre les bactéries à GRAM+ en utilisant un autre dérivé ferrocénique. Cela peut être attribué au faible caractère de lipophilie des composés, qui ne favorise pas leur perméation à travers la couche lipidique de membrane bactérienne (**Zaheer *et al.*, 2011**).

Ces résultats obtenus peuvent aider davantage à comprendre et à développer des composés antibactériens et antioxydants, les études de la cytotoxicité confirment l'intérêt biologique probable de ce dérivé.

L'accomplissement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives (**Kherbouche, 2014**). En considérant l'utilisation de ce composé en médecine, l'étude de leur propriété hémolytique doit être réalisée, compte tenu de la sensibilité de l'être humain à l'hémolyse induite par certaines substances (**Devecioglu *et al.*, 2001**). Dans ce sens, la FDA (Food and Drug Administration) recommande d'évaluer les seuils hémolytiques potentiels des composés administrés dans le corps humains (FDA, 2005). L'étude de l'activité cytotoxique nous a clairement montré que le dérivé ferrocénique a un faible taux d'hémolyse. ce résultat peut être un avantage pour la poursuite du développement pharmaceutique de ce composé. cette étude est comparable avec l'étude de (**Li, et *al.*, 2013**) qui prouvant *in vitro* le faible niveau de cytotoxicité et d'hémolyse d'un autre dérivé ferrocénique.

In vivo, Parmi les paramètres étudiés, l'augmentation remarquable du poids relatif de foie nous indique une hépatomégalie provoquée par le produit phytosanitaire (le pesticide). Cette anomalie du foie est un phénomène signalé par de nombreux auteurs à la suite de l'agression par des substances chimiques (**Hung *et al.*, 2012**). Une autre étude chez les souris mâles est comparable avec nos résultats, car celles-ci montrent que l'augmentation du poids du foie aboutit à l'apparition d'une tumeur du foie (**Quest *et al.*, 1990**).

En revanche, le traitement par le FMA et le cisplatine par voie intra-péritonéale aux ratte intoxiquées par métribuzine a entraîné une amélioration de poids relatif des organes spécifiquement le foie. En effet, le FMA diminue l'effet néfaste de pesticide sur ce organe et donc diminue leur poids relatifs. Nous pourrions dire que l'effet protecteur de ces molécules pourrait être due à leurs propriétés antiproliférative et antioxydante (**Miguel, 2010**).

Ainsi que l'administration de la métribuzine induit plusieurs changements métaboliques. Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative des teneurs sériques en glucose chez les ratte exposées à la métribuzine ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamohypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à

l'activation du système orthosympathique, la réaction dans le système limbique actif l'hypothalamus pour produire la corticolibérine (CRH). Ce dernier stimule l'hypophyse pour libérer l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui est un activateur de glandes surrénales pour la production et la sécrétion de cortisol dans le sang (**Pourramzanzidesaraei et al., 2013**). Le cortisol a de nombreuses actions (**Jacotot & Campillo, 2003**), dont certaines conduisent à du grand catabolisme du glycogène hépatique. Ces résultats sont en accord avec d'autres auteurs utilisant d'autres pesticides (**Kumar & Rajini, 2009 ; Ksheerasagar & Kaliwal, 2006 ; Yousef et al., 2006**).

L'urée et la créatinine sont des produits finals du catabolisme des protéines dans le foie et les muscles, ils sont filtrés par les reins et ensuite sont éliminés par les urines, donc ils sont considérés comme des indicateurs de la dysfonction rénale (**Boubchir, 2002 cité par Chiali, 2014**). Nous avons constaté une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée et la créatinine chez les ratte des lots pesticides en comparaison avec le témoin. Ces résultat sont semblable à les résultats de (**Saafi-Ben Salah et al., 2012**) qui montrent que l'administration du diméthoate pendant deux mois chez les ratte provoque une nette insuffisance rénale caractérisée par une augmentation significative du taux de créatinine et de l'urée sérique.

D'autre part, nous avons constaté que le traitement par le FMA et le cisplatine a pu jouer un rôle crucial dans la baisse de la concentration sérique de glucose et peut aussi restauré la fonction rénale en diminuant les concentrations sériques en urée et en créatinine chez les ratte concerner par rapport aux ratte exposées au métribuzine. Cela explique la capacité de ces molécules à protéger contre les dommages rénaux induits par le pesticides ces résultat peut comparer avec celle trouver par (**Boudebia & Bouter, 2017**).

L'administration journalière de la métribuzine pendant 50 jours provoque une augmentation très hautement significative de TGO et TGP chez les ratte exposées au pesticide. Les enzymes transaminases sont considérées comme des indicateurs des dommages des tissus qui sont expliqués par le degré d'exposition et la sévérité des symptômes toxiques. L'augmentation significative des activités sériques de TGO et TGP chez les ratte exposé au pesticide peut être expliquée par les changements destructifs des cellules hépatiques induites par la métribuzine, entraînant par la suite des changements de perméabilité, et la fuite des enzymes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres travaux utilisant différents pesticides (**Bhattie et al., 2011 ; Singh et al., 2011 ; Choudhary et al., 2003**) et qui confirment l'augmentation des transaminases par certains pesticides.

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate en plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire. Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le plasma des ratte recevant le métribuzine et une diminution des activités de la PAL dans différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmatique ou à la nécrose cellulaire. L'augmentation de l'activité de PAL chez les ratte provoqué par le métribuzine est en accord avec les conclusions rapportées par (El Missiry & Othman, 1993 ; Patil *et al.*, 2008 ; Garg *et al.*, 2009 ; El-Fakharany *et al.*, 2011 ; El-Demerdash *et al.*, 2012).

La γ -glutamyl transférase joue un rôle essentiel dans le métabolisme du glutathion et dans la résorption des acides aminés du filtrat glomérulaire. La GGT est présente principalement dans le foie, le pancréas, les reins. La GGT sérique constitue un indicateur sensible des affections hépatobiliaires notamment dans le diagnostic d'une hépatotoxicité (Pompella *et al.*, 2006). L'évolution des concentrations sériques de GGT montre elle aussi une élévation importante chez les animaux exposé au métribuzine que chez les animaux témoin. Ce résultat traduit également une certaine atteinte du foie causé par le pesticide utilisé en particulier des voies biliaires; en effet, selon (Kammeraat cité par Rousseau, 1978) l'augmentation de la concentration sérique de la GGT est un bon indicateur de l'atteinte des cellules épithéliales des canaux biliaires.

En comparaison avec le lot témoin, les résultats du taux sérique de LDH montrent une augmentation remarquable chez les ratte exposés au pesticide. LDH joue un rôle important dans le corps humain représenté par la conversion anaérobie de l'acide pyruvique en acide lactique. Pour les valeurs cliniques, la LDH est utile pour le diagnostic ou comme indicateur pour de nombreuses maladies du foie ainsi que pour les cancers. Il y a beaucoup d'explications pour augmenter le niveau de LDH dans le sang des patients qui souffrent de maladies cancéreuses. Tout d'abord, l'augmentation du nombre de cellules qui consomme une grande quantité de glucose pour obtenir de l'énergie, ce qui augmente le niveau de LDH lorsque la condition est anaérobie. Deuxièmement, la croissance des cellules cancéreuses va détruire d'autres tissus et provoquer la libération d'enzymes intracellulaires comme LDH dans la circulation sanguine. Troisièmement, l'activation de sa production s'effectuer par un mécanisme de phosphorylation de la tyrosine dans les cellules cancéreuses (AL-Janabi *et al.*, 2015).

En effet, le traitement des ratte par le FMA et par le Cisplatine a restaurée significativement l'activité enzymatique des transaminases, PAL, GGT et LDH par rapport

aux ratte exposées au pesticide, ce qui signifie que ces molécules inhibent les dommages hépatiques causés par le métribuzine. Ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydant. Puisque d'après nos résultats in vitro qui montre le bon activité antioxydant de FMA elle est bien claire que ce composé joue un rôle très important dans l'activité hépato-protectrice.

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de taux de l'Alpha-fetoprotéine (AFP) chez les lots qui exposé au métribuzine par rapport au lot témoin, AFP est une glycoprotéine foetale. Elle est sécrétée par le sac vitellin puis essentiellement par le foie. En effet, la concentration sérique est corrélée à la masse tumorale. Il est considéré comme presque spécifique du carcinome hépatocellulaire (**Mahcene & Boudiar, 2015**).

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

Le stress oxydatif a été suggéré comme un des principaux mécanismes de toxicité provoquer par le pesticide. il a été observé à la fois une augmentation de la production des radicaux. Dans la présente étude on a montré un état de stress oxydatif chez les rates exposées aux métribuzine exprimé par des marqueurs spécifiques.

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit principal d'oxydation des acides gras polyinsaturés peroxydés et représente un index important de peroxydation des lipides. Dans notre étude, une augmentation de la concentration de MDA tissulaires dans tous les organes étudiés à l'exception du cœur. Ces résultats sont en accord avec l'étude de (**Chiali, 2014**).

Divers chercheurs ont rapporté que le GSH joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages induits par les substances toxiques (**Wu et al., 2004 ; Reed & Fariss, 1984**). Les niveaux réduits de GSH chez les ratte traités par le métribuzine a été observé dans les reins. Cela pourraient être le résultat de la plus grande utilisation de GSH pour la conjugaison et/ou de la participation du GSH en tant qu'un antioxydant dans la neutralisation des radicaux libres produits en raison de la toxicité des pesticides. Le résultat de notre travail de la diminution de la glutathion induite par la métribuzine dans les reins rejoint aux résultats d'autres auteurs à titre d'exemple (**Battaglia, 2009**) qui confirme in vivo la diminution du taux de GSH rénal chez les rates allaitantes traités par du cobalt.

Un autre paramètre antioxydant déterminé dans notre étude est la catalase, l'enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée. Le peroxyde d'hydrogène est un sous produit de nombreuses réactions métaboliques. La cellule doit absolument l'éliminer au fur et à mesure

qu'il se forme. Ce produit deviendrait rapidement mortel s'il s'accumulait dans la cellule. La catalase permet de le transformer rapidement en composés inoffensifs, de l'eau et l'oxygène . L'activité de cette enzyme catalase est augmenté chez tous les organes des lots exposer à la métribuzine. Ces résultats en accord avec plusieurs auteurs qui ont testé l'effet de certains types de pesticides entraînant l'augmentation de l'activité de la catalase chez les animaux **(Sankar et al., 2012 ; Srivastava et al., 2012 ; Aboul-Soud et al., 2011 ; Campos-Pereira et al., 2012 ; Datta et al., 2010)**.

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

Afin de confirmer l'effet thérapeutique de notre dérivé ferrocénique au niveau tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques des foies chez tous les lots. La métribuzine a causé des dommages importants aux tissus du foie sous la forme des zones d'inflammations. Ces résultats sont en accord avec le travail de **(Khaldoun-Oularbi et al., 2013)** qui déterminent au niveau tissulaire l'effet de l'Abamectine sur le dommage du foie.

Les coupes histologiques du foie des rattes traités par FMA montrent très peu des nécroses cellulaires. Cela pourrait signifier que le dérivé ferrocénique a un effet protecteur de la structure et la fonction des cellules du foie due à l'activité antioxydant le très important.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au terme de ce travail visant à étudier l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline, et la contribution pour l'amélioration des traitement efficace. Il ressort que ce composé possède des vertus pouvant justifier l'utilisation des ferrocènes et ces dérivés ferrocéniques en chimie médicinale.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'interaction ADN-FMA in silico et in vitro, les résultats montrent que le FMA possède une activité antimutagène en se lie à l'ADN par intercalation ou par liaison électrostatique.

Par ailleurs, le FMA possède une activité antioxydant très importante in vitro. Il a été montré une inhibition très importante du radical DPPH[•] et le radical superoxyde. L'activité antibactériennes est testée vis-à-vis cinq souches de références par la méthode d'antibiogramme qui nous a permis de conclure que ce composé ne peut pas utilisé comme un antibiotique contre ces souches. Le teste hémolitique montre que ce composé possède un faible cytotoxicité contre les globule rouge humain.

Enfin, l'étude in vivo de la FMA sur les rattes wistar de type albinose nous a permis de conclu que la dérivé étudié protège le foie contre la nécrose tumorale, régule leur poids relatif et les paramètres biochimiques en diminuant l'état de stress provoqué par le pesticide utilisé.

Perspective

Une des principales limites de nos étude est lié pour beaucoup au temps qui nous était imparti: 6 mois, pour mettre en place au laboratoire, la démarche conceptuelle ainsi que les approches techniques pour la développer. Nous avons encore besoin de temps pour explorer différentes pistes de recherche qui nous permettront de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés pendant cette période. Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives afin de pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets de l'utilisation des dérivés ferrocénique. Ces perspective sont donc nombreuses et concernent les points suivants:

- ✓ Evaluation de son effets antibactériennes vis-à-vis des autres souches à GRAM+.
- ✓ Application in vitro et in vivo des autres testes de toxicité pour l'exploration de ses effets secondaires possibles.
- ✓ Il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux aux pesticides afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires observées pourraient aboutir à l'apparition des pathologies et de conclure ainsi sur la possibilité de notre composé de lutter contre le cancer.
- ✓ Une étude *ex vivo* sur une culture des cellules tumorales vient compléter nos études.
- ✓ Précisé le type de cancer qui peut être traiter par notre composé.
- ✓ Effectuer des études sur l'interaction de FMA-protéines pour mieux comprendre ses modes et sites d'action spécifiques.

Références bibliographique

Références bibliographiques

1. **Abbas, K. & 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.
2. **Abdel Aziz, A. A., Elbadawy, H. A. (2014).** Spectral, electrochemical, thermal, DNA binding ability, antioxidant and antibacterial studies of novel Ru(III) Schiff base complexes. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124: 404–415.
3. **Abia, S. (2013).** Fabrication et purification de certains composés férrocéniques aminés. Mémoire master. Université Kasdi Marbah Ouargla. P7.
4. **Adaika A. (2016).** Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN., Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED., Algérie, 90p.
5. **Ahluwalia, K. B. (2009).** *GENETICS*. second edition. *New age*. P 148-151.
6. **Alavi, S. (2013).** Synthèse et évaluation biologique de dérivés de l'amino-benzosubérone, inhibiteurs puissants et sélectifs de l'Aminopeptidase N ou CD13. Thèse de doctorat. Université de Haute-Alsace. P104.
7. **AL-Janabi, A. (2015).** Lactate dehydrogenase as an indicator of liver, muscular and cancer diseases. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(7): 543-546.
8. **Amarani, F. (2017).** Cours de Génétique moléculaire. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. p11.
9. **Anonyme (2010).** Comparaison de méthodes d'extraction de l'ADN de lapin à partir du sang : Fiabilité et Coût. Mémoire de master. Université de 7 Novembre à Carthage. P07.
10. **Asses, Y. (2011).** Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c-Met. Thèse de doctorat. - Université Henri Poincaré – Nancy I.
11. **Ataf, A. A., Bhajan, L., Khan, N., Badshah, A., Shafiq, U. and Kamran A. (2016).** Spectroscopic, Electrochemical, and *In Silico* Characterization of Complex Formed between 2-Ferrocenylbenzoic Acid and DNA. *Journal of Chemistry*, 1-8. doi:org/10.1155/2016/7468951.
12. **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.
13. **Battaglia V (2009).** Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocytes primary cultures. *Int J Biochem Cell B*, 41:586–94.

14. **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.
15. **Bechki, M. K. (2012).** Etude de comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanole et nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Kasdi Marbah Ouargla.
16. **Behera, N. (2005).** Synthesis and characterization of ferrocene containing organometallic compounds. *National institute of technology*. P06.
17. **Ben Haoua, K., and Lanez, T. (2018).** Evaluation of the antioxydant activity of potatoes by radical scavenging activity using $O_2^{\bullet-}$ and DPPH. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 10(1)168-180.
18. **Benabdesselam, S. (2017).** Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par l'arylation de ferrocène. Thèse de doctorat. Université Kasdi Marbah Ouargla. P12-13.
19. **Benlatreche, T. (2013).** Synthèse et Étude Structurale des Complexes à base de ligands azotés : Dérivés de la pyridine. Mémoire magister. Université Constantine 1. P03.
20. **Benmohammed, A. (2015).** Synthèse et évaluation biologique de quelques heterocycles soufres etv azotes: thiazolidinones, 1,3,4-thiadiazoles dérivés des 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1. P94.
21. **Bennamia, Z. (2015).** Modification chimique de poly(Chlorure de vinyle) 4000M d'ENIP SKIKDA. Mémoire de master. Université Kasdi Marbah Ouargla. P27.
22. **Bentabet, L. N. (2015).** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* de l'ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen. P32.
23. **Bhatti, J. S., Sidhu, I. P. S., Bhatti, G. K., (2011).** Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem*, 353 : 139–149.
24. **Bihan, Y. V. (2009).** Étude structurale et fonctionnelle de la reconnaissance et de la métabolisation de lésions puriques et pyrimidiques dans l'ADN par la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase. Thèse de doctorat. Université d'ORLÉANS. P12.
25. **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.

26. **Bouameur, S. et Rouabah, L. (2015).** L'effet neuroprotecteur de la vitamine E dans la toxicité induite par le cisplatine chez les souris. Mémoire master. Université Mentouri CONSTANTINE. P22-23.
27. **Bouaoud, M. (2014).** Tenue à la corrosion en milieu acide d'un dépôt de Zn Sn sur acier inoxydable. Mémoire magister. Université Ferhat ABBAS-Sétif 1. P26.
28. **Boudebja, O. et Bouteria, S. (2017).** Evaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane. Mémoire de master. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED. 97p.
29. **Bourdat, A. G. (2000).** Lésions tandem radio-induites de l'ADN : formation, insertion dans des oligonucléotides et réparation. Thèse de doctorat. Université de JOSEPH FOURIER I. P11.
30. **Bourvellec. C., Hauchard. D., Darchen. A., Burgot. J. L., Abasq. M. L. (2008).** Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, (75)1098–1103.
31. **Bouzidi, B. (2011).** Dépôt par électrodéposition et caractérisation des matériaux destinés à la fabrication de cellules photovoltaïques à base de couches minces. Mémoire magister. Université Ferhat ABBAS-Sétif 1. P15.
32. **Bradford ,M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Academic Press*,72 (57): 248-254.
33. **Brennan, N. (2010).** The Synthesis, Characterisation, and Application of Novel N-Ferrocenoyl Peptide Derivatives. P02.
34. **Brut, M. (2009).** Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier. P90.
35. **Burnstock, G., Verkhratsky, A. (2012).** Purinergic Signalling and the Nervous System. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. P07.
36. **Can, Ozluer., Hayriye, Eda., Satana, Kara. (2014).** Approche Electrochemical peut-il fournir un nouvel aperçu de la conception rationnelle de médicaments et conduirait à une meilleure compréhension de la mécanisme d'interaction entre les médicaments anti-cancéreux et de l'ADN. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 138 (36–42).

37. **Catherine, L. (2008).** Etude des mécanismes de toxicité induite par l'adriamycine et sensibilisation des cellules cancéreuses par la choc thermique. Mémoire magister. Université du Québec à MONTREAL. P02.
38. **Chaouech, M. L. A. (2014).** Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des l'alcaloïdes dans l'inhibition de la tolémérase par docking moléculaire. Mémoire master. Université de Frères Mentouri Constantine 1. p18.
39. **Chatillon, Y. (2013).** Méthodes électrochimiques pour la caractérisation des piles à combustible de type PEM en empilement. Thèse de doctorat. L'université de lorraine. P24.
40. **Chavain, N. (2008).** Conception, synthèse, analyse structurelle et activité antipaludique de dérivés de ferroquine. Thèse de doctorat. Université de Lille I. P11-12.
41. **Chennouf, F. (2011).** L'influence de la chaleur sur l'AND. Mémoire de magister. Université Mentouri CONSTANTINE. P11-15.
42. **Chiali, F. Z. (2014).** Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez les rats. Thèse de doctorat. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN. 138 P.
43. **Chollat, N. A. (2006).** Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier - GRENOBLE I. **P18.**
44. **Choudhary, N., Sharma, M., Verma, P. and Joshi, S. C. (2003).** Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J. Environ. Biol.* 24: 305-308.
45. **Claiborne, A. (1985).** Catalase activity. Green Wald, R.A. (Ed.) (1985). *CRC Hand book of methods for oxygen radical research.*
46. **Cohen, J. S., Franklin, H. 1974.** The Search for the Chemical Structure of DNA. *Connecticut Medicine*, 38: IO(551-557).
47. **Dahm, R. (2007).** Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet* . DOI: 10.1007/s00439-007-0433-0. 122:565–581.
48. **Dallagi, T. (2010).** Conception, caractérisation et évaluation de nouveaux radiotraceurs pour le diagnostic et le traitement du Cancer du Sein et de la Prostate. Thèse de doctorat. Université de Tunis El Manar. P42-43.
49. **Despax, S. (2014).** Complexation de l'ADN par des composés organoruthénés et étude de l'adhésion cellulaire sur des substrats mous. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. P15-23.

50. **Devecioglu, C., Katar, S., Dogru, O. and Tab, M. A. (2001).** Henna-induced hemolytic anemia and acute renal failure. *Turk. J. Pediatr*, 43: 65-66.
51. **Drew, H.R., Wing, R.M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura. (1981).** structure of a b-dnadodecamer. conformation and dynamics, DOI: 10.2210/pdb1bna/pdb
52. **EL Hadj, S. K. (2016).** Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de master. Université de telemcen. P19-20.
53. **Elkin, L. O. (2003).** Rosalind Franklin and the Double Helix. *Physics Today*, (1-6).
54. **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, (108-115).
55. **Fortuné, A. (2006).** Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'étude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Thèse de doctorat. . Université de Joseph Fourier-Grenoble I. p23-24.
56. **Fouda, M. F. R., Abd-ElZaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007) .** On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*, 21: 613–625
57. **Gago, F. (1998).** Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Academic Press*, (14) 277–292.
58. **Gassier, J., Morel-Haziza, C. (2003).** Biologie-Microbiologie-Nutrition-Alimentation BEP Carrières sanitaires et sociales/CAP Petite enfance. Elsevier Masson, 310p.
59. **Gérard, A. (2012).** Histologie en Pratique, Faculté de Médecine .p :14.
60. **Ghaffour, H. (2015).** Synthèse de quelques hybrids antioxydants-peptidomimétiques. Mémoire de master. Université Abou Baker Belkaid- TLEMCEM. P05.
61. **Gharbi, S. et Zeghib, K., (2016).** L'effet de l'*Aquilaria malaccensis* et l'*Aristolochia longa* sur la toxicité de plomb chez les rattes Wistar. Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-OUED. P10.
62. **Görmen, M., Pigeon, P., Top, S., Hillard, E. A., Huché, M., Hartinger, G. C., Montigny, F. D., Plamont, M. A., Vessièrès, 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/c mdc.201000286.
63. **Guillarme, S. (2002).** Synthèse de nouveaux nucléotides acycliques Etude de la réaction de la réaction de substitution allylique sur des dérivés cyclobuténiques: approche vers la synthèse de nucléosides cyclobuténiques. Thèse de doctorat. Université du Main. P05.

64. **Gulam, F. M., Manohar, V. L. (2014).** Synthesis of ferrocene based organometallic compounds and antimicrobial activity. *Journal of applied chemistry*. 7: 27-32.
65. **Haiyan, Zhu., Hui, Luo., Wenwen, Zhang., Zhaojun, Shen., Xiaoli, Hu., Xueqiong, Zhu. (2016).** Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 10: 1885–1895.
66. **Hakmi, A. (2015).** Etude de l'effet de l'action combinée du pH et des sels sur la toxicité de l'amphotéricine B. Mémoire de master. Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen. P13.
67. **Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, (144) 646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
68. **Hanzab, N., Houas, M. (2013).** Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de férrocenyl-2- nitrobenzène mono et bis-substitué. mémoire M. UNIVERSITE KASDI MARBAH OUARGLA. P01.
69. **Hartl, D. L. and Elizabeth W. Jones, E. W. (1998).** Genetics principles and analysis. Fourth edition. *Jones and Bartlett Publishers INC*. P15.
70. **Hechifa, D. et Merad, K. (2016).** Caractérisation phénolique et mesure des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes médicinales dans le Sahara Septentrional Algérien. Mémoire de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar D'EL-OUED. P28.
71. **Hemmami, H. (2017).** Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité
72. **Henni, M. (2017).** Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl) amino-benzonitrile. Thèse de doctorat. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED. 185p.
73. **Henni, M. (2017).** Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl) aminobenzonitrile. Thèse de doctorat. Université Echahid Hamma Lakhdar El-oued. P.
74. **Hershey, A. D., Chase, M. (1952).** Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 39-56.
75. **Hontaas, A. (2014).** Prise en charge des patients cancéreux à l'officine. Thèse de doctorat . Université Toulouse III PAUL SABATIER. P46-48.
76. **Houali, K. et , Lahcene, S. (2014).** *Génétique* Tome I. OPU. P 119.
77. **HUANG, Q. F., ZHANG S.J., ZHENG L., HE M., HUANG R.B., LIN X. (2012).** Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, (50): 713-718.

78. **Hussain, R. A., Badshash, A., Sohail, M., Lal, B., Altaf, A. A. (2013).** Synthesis, chemical characterization, DNA interaction and antioxidant studies of ortho, meta and para fluoro-substituted ferrocene incorporated sel noureas, *Inorganica Chimica Acta*, S0020-1693(13)00184-9. doi: [org/10.1016/j.ica.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.04.003).
79. **Infelta, P et Graetzel, M. (2006).** Thermodynamique : principes et applications, Universal-Publishers, 488p.
80. **JACOTOT, B. et CAMPILLO, B. (2003).** Nutrition humaine. Ed. Elsevier Masson, Paris. 311p.
81. **Jadot, G. (1994).** Antioxydant et vieillissement. Ed, John Libbey Eurotext: Paris. P34.
82. **Kästner, A. (2011).** Détermination du point de fusion de l'ADN et de l'ARN avec la série SPECORD. *Research institute for chromatography*; 168(24-25).
83. **Kauffman, G. B. (1983).** The discovery of ferrocene, the first sandwich compound. *Journal of chemical education*, (60) 185-186.
84. **KHADRI, S. (2009).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de magister. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-Anaba. P75.
85. **Khaldoun-Oularbi, H., Richeval, C., Djenas, N., Lhermitte, M., Humbert, L. and Baz, A. (2013).** Effect of sub-acute exposure to abamectin (insecticide) on liver rats (*Rattus norvegicus*). *Ann Toxicol Anal*, 25(2): 63-70.
86. **Khalef, A. (2012).** Etude du comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanol et nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Mohamed Khider – Biskra. P8-10.
87. **Khalef, A. (2014).** Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N-phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N'-phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider-Biskra. P6-12.
88. **Khelef, A et Lanez, T. (2015).** In vitro assays of the antioxidant activities of ferrocene derivatives bearing amine, amide or hydrazine groups. *Der Pharma Chemica*, 7(6):318-323.
89. **Khelef, A.; Lanez, T. et Terki, B. (2012).** Etude structurale d'amide N-phényl-N-éthanoyle ferrocénylméthylamine. *Organometallic Chemistry and Catalysis JICOC*, (24-31).

90. **Kherbouche, H. (2014).** Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits de plantes: *Fredolia aretioides* et *d'Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouges humain. Mémoire de master. Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen. P17.
91. **Kirschvink, N. Moffarts, B. Lekeux, P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, (177):178–191.
92. **Klajner, M. J. (2011).** Organomethalic compounds as a anti-cancer agents: interaction with DNA and migration in cell. Thèse de doctorat. Université de STRASBOURG. P05-06.
93. **Ksheerasagar, R. L., Kaliwal, B. B. (2006).** Histological and Biochemical Changes in the Liver of Albino Mice on Exposure to Insecticide, Carbosulfan. *Caspian J. Env. Sci.* 4 : 67-70.
94. **Kumar, J. and Rajini, P. S. (2009).** Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: Role of gluconeogenesis. *Toxicology*, 257: 40-45.
95. **Laisné, A. (2011).** Caractérisation et modélisation de structures nucléiques auto-assemblées fonctionnalisables. Thèse de doctorat. Université de BOURGOGNE. P63-64.
96. **Lanez, E. (2016).** Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de master. Université Mohamed Khider – Biskra.
97. **Lanez, T. et Lanez, E. (2016).** A molecular docking study of N-ferrocenylmethyl-nitroanilines as potential anticancer drug. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 2(5-12).
98. **Lanez. T., Henni. M., (2016).** Antioxidant activity and superoxide anion radical interaction with 2-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile and 3-(ferrocenyl-methylamino) benzonitrile. *J IRAN CHEM SOC*, DOI 10.1007/s13738-016-0891-1.
99. **Lassoued. M. (2007).** Polymorphisme des antigènes plaquettaires humains dans la population Tunisienne. Mémoire de master. Université de Tunis EL-MANAR. P52.
100. **Laszlo, P., et Hoffmann, R. (2000).** Ferrocene: Ironclad History or Rashomon Tale . *Angewandte chemistry*, (39) 123-124.
101. **Le Borgne, M. (2009) .** Initiation à la connaissance du médicament. Chapitre 1. Identification de molécules synthétiques à visée thérapeutique.
102. **Lecerf, S. F. (2015).** Conception et développement de nouveaux ligands des transporteurs ABCG2 et MRP1 dans le cadre de la résistance à de multiples drogues anticancéreuses. Thèse de Doctorat. Université de GENEVE. P26.

103. **Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y., Song K.Y., et Hong S.J. (2002).** Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, *clonorin*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 296: 1238-1 244.
104. **Li, S., Wang, Z., Wei, Y., Wu, C., Gao, S., Hui, J., Zhao, X., Yan, H., and Wang, X. (2013).** Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. *Biomaterials*, 34 (902-911).
105. **Madani, Z. (2012).** Influence des groupements hydroxyéthyl et l'iodure de méthyltriméthylammonium sur la diffusion du ferrocène et ferrocénium. Mémoire de magister. Université Kasdi Marbah Ouargla. P32-33.
106. **Madani, Z. (2012).** Influence des groupements hydroxyéthyl et l'iodure de méthyltriméthylammonium sur la diffusion du ferrocène et ferrocénium. Mémoire de magister. Université Kasdi Marbah Ouargla. P42-43.
107. **Madonna, S. (2010).** Innovation moléculaire à visée thérapeutique : conception, synthèse et évaluation des propriétés anticancéreuses des nouveaux dérivés du : (N-(5-méthyl)-quinolién-8-ol)amine N-substitués. thèse doctora. université de la mediterrannée . P19-52.
108. **MAHCENE, A., BOUDIAR, C. (2015).** Etude de quelques marqueurs tumoraux des cancers digestifs (pancréas, foie, voie biliaires). Mémoire de master. Univercité Mentouri-Constantine. 54p.
109. **Mahmoudi, N et Nemsj, A. (2009).** Etude de comportement anodique de N-phényl-N-benzoylferrocénylméthylamine. Mémoire de Licence. Université Echahid Hamma Lakhdar El-oued.
110. **Maillet, N. (2013).** Comparaison de novo de données de séquençage issues de très grands échantillons métagénomiques. Thèse doctorat. Université de RENNES 1. P02.
111. **Majumder, K., Butcher, R, J., Bhattacharya, S. (2002).** Chemistry of Some Amino Acid Complexes of Ruthenium. Synthesis, Characterization, and DNA Binding Properties. *Inorgqniaue Chemistry*. *Inorgqniaue Chemistry*, 41 (17), 4605–4609. DOI: 10.1021/ic010775o.
112. **Mathey, F. et Sevin, A. (2000).** Chimie moléculaire des molécules de transition. *Edition de l'école de polytechnique*. P06-08.
113. **Miguel, M.G. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils:A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287. doi:10.3390/molecules15129252.
114. **Mohamed, S. I., Hossieny, S. M. I., Moustafa, M. K., Yassin M. T. (2014).** Electrochemical Comparison of the Interaction of 5-Nitrouracil with Single-or Double-

- Stranded DNA at mercury and glassy carbon electrodes. 01-08 Doi: 10.5505/apjes.2014.46855.
115. **Molina, Á., González, J. (2015).** Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis: Theory and Applications, Springer, 671p.
 116. **Monserat, J. P. (2012).** Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocénique des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). P
 117. **Mouafki, F. (2015).** Synthèse de quelques bases de Schiff Et leurs dérivées. Mémoire master. Université Ziane Achour de Djelfa. P 13.
 118. **Mouats, N. (2010).** Etude électrochimique des dérivés de l'acide 2-nitrophenyl sulfonyl acétique. Mémoire magistère. Université du 20 AOÛT 1955–SKIKDA. P20.
 119. **Moulay, Y. (2012).** Investigation Phytochimique de l'Acacia arabica Aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. Mémoire de Magister. Université Kasdi Marbah Ouargla. P86-87.
 120. **Muller, E. (2002).** Synthèse d'oligonucléotide modifiés pour l'étude de la réparation et de la réplication de lésions radio-induites simples et doubles de l'ADN. Thèse doctorat. L'université JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I . Page 10-11.
 121. **Nabi, G. and Liu, Z. Q. (2011).** Radical-scavenging properties of ferrocenyl chalcones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: (944–946).
 122. **Neghmouche, NS., Khelef, A. et Lanez, T. (2010).** Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 01(76-82)
 123. **Njogu, E. M., Omondi, B. et Nyamori, V. O. (2016).** Synthesis, Physical and Antimicrobial Studies of Ferrocenyl-*N*-(pyridinylmethylene)anilines and Ferrocenyl-*N*-(pyridinylmethyl)anilines. *S. Afr. J. Chem*, **69**, 51–66.
 124. **Ohinishi, M. Morishita, H. Iwahashi, H. Shizuo, T. Yoshiaki, S. Kimura, M. and Kido, R. (1994).** Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*, 36, 579–583.
 125. **Pompella, A., Tata, D. V., Paolicchi, A. and Zunino, F. (2006).** Expression of g-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *biochemical pharmacology*, 71 (231–238).
 126. **Pottier, A. (2003).** Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de Pyrrolo[3,4-b]Quinoleines condensées, ligands potentiels de l'ADN. Thèse de doctorat. Université de LILLE I. P19.

127. **POURRAMZANZIDESARAEI, M., MOHAMMADLIKHANI, M., SAHELI, M., FAROKHROUZ, M., ZAMANI, A. and ABBASIAN, F. (2013).** Determination of the Acute Toxicity of Pretilachlor on Liver and Gill Issues as well as Glucose and Cortisol Levels in Fingerling Grass Carps (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, (8): 721-726.
128. **Prado, E. (2011).** Détection de l'ADN par spectrométrie de diffusion Raman exaltée de surface couplée à la microfluidique. Thèse de doctorat. L'Université de Bordeaux I. P11.
129. **Quest, J. A., Copley, M. P., Hamernik, K.L., Rinde, E., Fisher, B., Engier, R., Burnam, W. L. and Fenner-Crisp, P. A. (1990).** Evaluation of carcinogenic potential of pesticides. *Reg. Toxicol*, 12:117-126.
130. **Rapin, D. (2006).** Utilisation d'une puce OLISA pour la caractérisation d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN dans des lysats cellulaires : mise au point de la technique de révélation par colorimétrie. . Thèse de doctorat. Université de JOSEPH FOURIER. P09.
131. **Reed, D. J., Fariss, M. W. (1984).** Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*, 36: 33.
132. **ROUSSEAU, P., 1978.** Intérêt diagnostique du dosage de certains enzymes plasmatiques en pathologie hépatique bovine : Étude bibliographique expérimentale. doc . Université Paris-Est Créteil. P 89.
133. **Saafi-Ben Salah, E. B., El Arem, A., Louedi, M., Saoudi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., Achour, L. (2012).** Antioxidant-rich date palm fruit extract inhibits oxidative stress and nephrotoxicity induced by dimethoate in rat. *J Physiol Biochem*, 68: 47-58.
134. **Sansook, S. (2017).** Biological Evaluation of Ferrocene Derivatives. Doctorat thesis. University of Sussex. P06-09.
135. **SHAFQAT, A. (2013).** DNA interaction, Antibacterial and Antifungal studies of 3-nitrophenylferrocene. *J. Chem*, 35:3.
136. **Shafqat, A., Ataf A. A. L., Amin, B., Imtiaz , U. D., Bhajan, L., Saqib, K ., Shafiq, U. (2013).** DNA interaction, Antibacterial and Antifungal studies of 3-nitrophenylferrocene. *Journal Chemical Society of Pakistan*, 35: 922-928.
137. **Shafqat, A., Ghulam, Y., Zareen, Z., Zhanpeng, W., Ian, S. B., Badshah, A., Imtiaz, U. D. (2015).** Ferrocene-Based Bioactive Bimetallic Thiourea Complexes:

- Synthesis and Spectroscopic Studies. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Doi: org/10.1155/2015/386587.
138. **Shah, A. (2010).** Redox behavior and DNA binding studies of some electro active compounds. Quaid-i-Azam University, Istanbul.
 139. **Shah, A., Zaheer, M., Qureshi, R., Akhter, Z., Nazar, F. M. (2010).** Voltammetric and spectroscopic investigations of 4-nitrophenylferrocene interacting with DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (75) 1082–1087. doi:10.1016/j.saa.2009.12.061.
 140. **Singh, M., Rajat, S. and Ravi, K. (2011).** Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63 : 269–276.
 141. **Sirajuddin, M. Ali, S. Amin Badshah, A. (2013).** Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (124) 1–19.
 142. **Swynghedauw, B. (2008).** *Aide-mémoire biologie et génétique moléculaire*. 3ème édition. DUNOD. P 21-23.
 143. **Teniou, S. (2012).** Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire magistère. Université de Université Frères Mentouri Constantine 1. p37-38.
 144. **Terki, B. (2007).** Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl-N'alkylferrocenyl méthyle hydrazide. Thèse de doctorat. Université de Hadj Lakhdar-Batna. P06.
 145. **Touri, F. (2012).** Synthèse de nouveaux matériaux moléculaires par phosphorylation des dérivés aminés et étude de leurs propriétés électrochimiques et complexantes. Mémoire magister. Université Ferhat Abbas-Setif. p30-31.
 146. **Weaver, R. F. (1942).** *Molecular Biology*. fifth edition. P 23 -24.
 147. **Weckbercker, G., & Cory, J.G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*, 40(3),257-264.
 148. **Werner, H. (2012).** At Least 60 Years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angewandte chemistry*, 51, 2–9. DOI: 10.1002/anie.201201598.
 149. **William, S., Klug, W. S., Michael, R., Cummings, M. R. et Spencer, C. A. (2006).** *Génétique* 8ème édition . *nouveaux horizons*. P255.

150. **Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N. D. (2004).** Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134: 489–492.
151. **Yousef, M. I., Awad, T. I. et Mohamed, E. H. (2006).** La deltaméthrine induite par les dommages oxydatifs et des altérations biochimiques chez le rat et son atténuation par la vitamine E. *Toxicologie*, 227: 240-247.
152. **Zaheer, M., Shah, A., Akhter, Z., Qureshi, R., Mirza, B., Tauseef, M. and Bolte, M. (2011).** Synthesis, characterization, electrochemistry and evaluation of biological activities of some ferrocenyl Schiff bases, *Appl. Organometal. Chem*, 25:(61–69).
153. **Zayya, I. A.; Jonathan Singh, J. and Spencer, J. L. (2013).** Synthesis and Reactions of Ferrocene. Chemical and Physical Sciences.
154. **Zerari, A. (2013).** Synthèse, séparation et identification de M-Nitrophenylferrocène mono et bis-substitué. Mémoire master. Université Kasdi Marbah Ouargla. P02.
155. **Zozaya, C. (2011).** Déterminants des trajectoires de détresse pendant la première année qui suit l'annonce cancer primitif ou récidivant. Thèse de doctorat. Université Bordeaux Segalen P40.

Annexes

Annexes 01

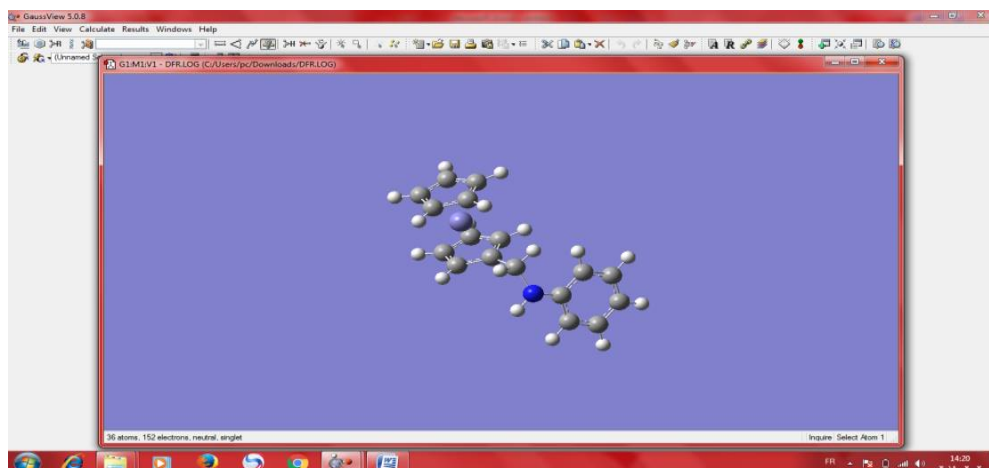


Figure 01: Le logiciel Gaussian 09.

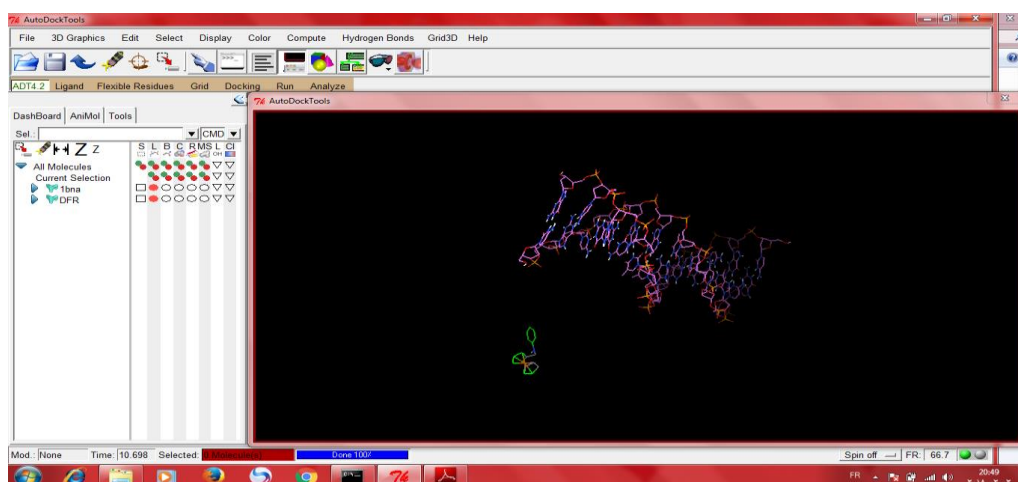


Figure 02: Le Logiciel AutodockTools.

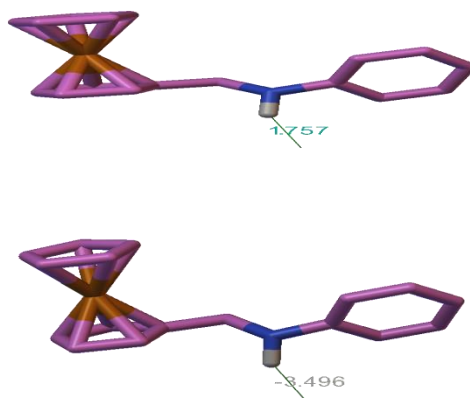


Figure 03: Distance exprimée en Å (A) et énergie exprimée par Kcal.mol⁻¹ (B) la liaison hydrogène formée entre le FMA et de l'ADN.

Tableau 01 : Conformation de l'interaction FMA-ADN et leur énergie libre ΔG et constante de liaison K.

Conformation	ΔG (Kj.mol ⁻¹)	K(mol ⁻¹)
1	-27.0028	54.103×10 ³
2	-25.9996	36.089×10 ³
3	-24.4948	19.661×10 ³
4	-23.826	15.009×10 ³
5	-22.4466	8.601×10 ³
6	-21.527	5.934×10 ³
7	-21.109	5.013×10 ³
8	-16.0521	0.651×10 ³
9	-15.9676	0.629×10 ³
10	-15.9676	0.629×10 ³
11	-15.9676	0.629×10 ³
12	-15.9676	0.629×10 ³
13	-15.884	0.608×10 ³
14	-15.8422	0.598×10 ³
15	-15.8004	0.588×10 ³
16	-15.048	0.434×10 ³
17	-14.1284	0.299×10 ³
18	-14.0866	0.294×10 ³
19	-13.9612	0.280×10 ³
20	-13.9612	0.280×10 ³
21	-13.9676	0.280×10 ³
22	-13.3342	0.217×10 ³
23	-13.2924	0.213×10 ³
24	-13.2924	0.213×10 ³
25	-13.167	0.203×10 ³

ANNEXES 02

Tableau 02 : Les produits chimiques.

Les produits chimiques	
Milieu miler Hinton	Milieu gélose
DMSO	DMF
Acétonitrile	Sel de fond
Métribuzine	Cisplatine
Sodium DodecylSulfat (SDS)	Ethanol
Méthanol	NaHCO ₃
Chlorure de sodium (NaCl)	Chlorure de potacium (KCl)
MgCl ₂	le tween 80
Formol	Gentamicine
Isopropanol	KH ₂ PO ₄
2,2-diphényl 1-1- picrylhydrazyl (DPPH)	Acide éthylène Diamine Tétra-acétique (EDTA)
NH ₄ Cl	1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB)
Glutathion réduite (GSH)	5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB)
Bleu de Coomassie	Acide salicylique
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Butylhydroxytoluène (BHT)
Acide thiobarbiturique (TBA)	Acide trichloroacétique (TCA)
Eau Ultra pure et eau bi-distillé.	

Tableau 03 : Les matériels d'étude.

Les matériels	
Agitateur thermo-programmable	Bain de glace.
portoir pour tubes spéciaux de centrifugation.	Micropipettes ajustables avec des embouts stériles.
Vortex.	Centrifugeuse Sigma.
Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0. 1mg).	Balance électrique de type KERN EMB 2200-O.
Un Potentiostat / Galvanostat Model PGZ 301(radiomètre analytical SAS).	UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU) cuves de Quartz.
Papier abrasif p 4000.	pHmètre 210 MeterLAB.
Une cellule électrochimique à trois électrodes.	Analyseur clinique automatisé de type BIOLIS 24I.
Bain marie de type MEMMERT	Boite de pétrie
Autoclave	Bec benzène
Barreau Magnétique.	Etuve
Verreries (bucher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).	balance électronique de type KERN EMB 2200-O.
Agitateurs magnétiques à plaque chauffante.	

ANNEXES 03

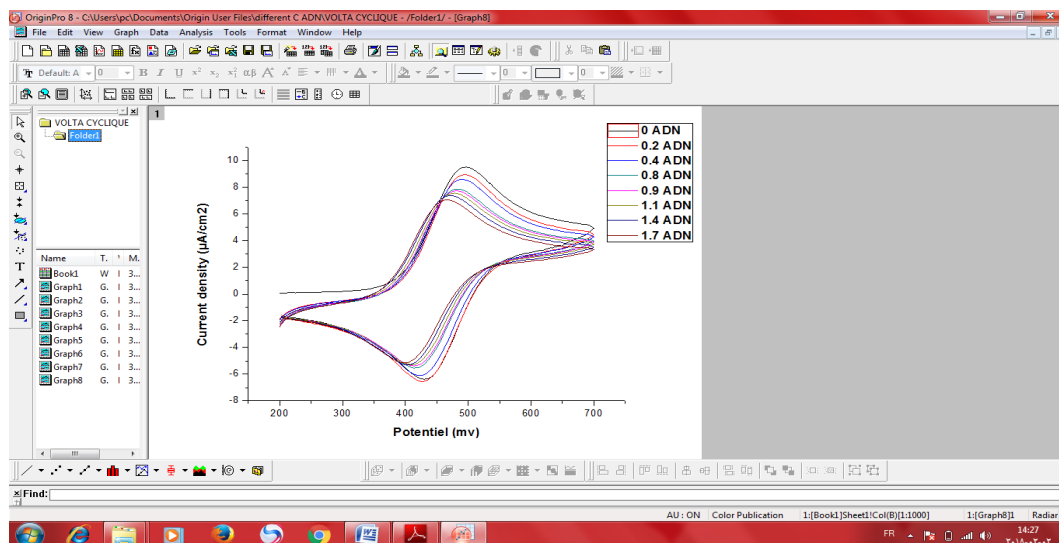


Figure 04: Le logiciel OriginPro.

Tableau 04: Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de l'interaction ADN-FMA.

[ADN] mol/l	E_{p_a} (mV)	i_{p_a} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	E_{p_c} (mV)	i_{p_c} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
8.47619×10^{-7}	494.952978	8.96180848	425.736677	-6.55939343
1.68189×10^{-6}	490.062696	8.62005055	423.22884	-6.08930076
3.31163×10^{-6}	482.664577	7.86324066	414.576803	-5.52176355
3.7112×10^{-6}	482.664577	7.72844707	413.322884	-5.38696995
4.50115×10^{-6}	477.648903	7.54872227	409.561129	-5.25666947
5.66364×10^{-6}	471.504702	7.37349059	403.416928	-5.30160067
$6,8 \times 10^{-6}$	466.489028	7.06346532	399.780564	-5.16680708

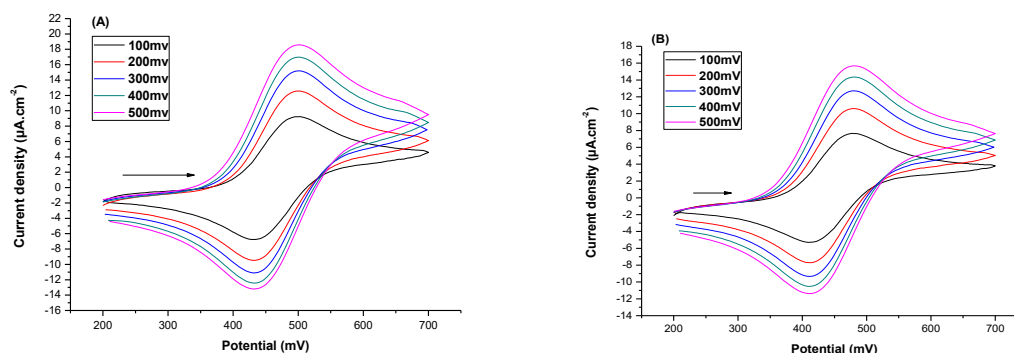


Figure 05 : Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN.

ANNEXES 04

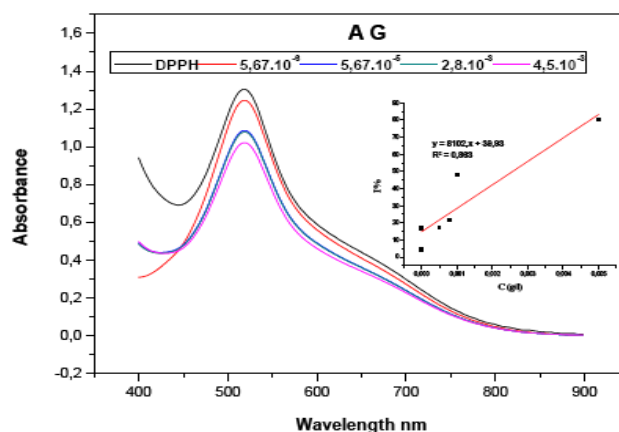


Figure 06: Spectre d'absorption de DPPH* et du I% en fonction de concentration massique pour AG.

Le tableau 05 : Le taux d'inhibition DPPH* % pour le composé AG.

Le composer	C (g/l)	A	I%
AG	0,000001	1,24	4,542
	0,00001	1,081	16,782
	0,0005	1,073	17,398
	0,0008	1,017	21,709
	0,001	0,675	48,037
	0,005	0,254	80,446

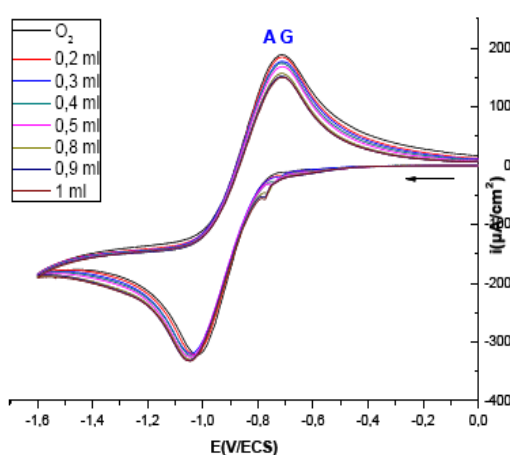


Figure 07 : Voltammogrammes cycliques de radical d' ($O_2^{\bullet-}$) en absence et en présence de concentration croissant de dérivés ferrocénique au gauche et de l'acide gallique au droite enregistré sur une électrode de carbone vitreux à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.

Le tableau 06 : Le taux d'inhibition O_2^- % pour AG.

Le composer	C (g/l)	A	I%	C (g/l)
AG	0,2	$1,17 \cdot 10^{-6}$	306,251	0,812
	0,3	$1,76 \cdot 10^{-6}$	300,224	2,764
	0,4	$2,35 \cdot 10^{-6}$	297,302	3,711
	0,5	$2,94 \cdot 10^{-6}$	292,91	5,133
	0,8	$4,70 \cdot 10^{-6}$	278,167	9,908
	0,9	$5,29 \cdot 10^{-6}$	276,144	10,563
	1	$5,88 \cdot 10^{-6}$	273,152	11,532

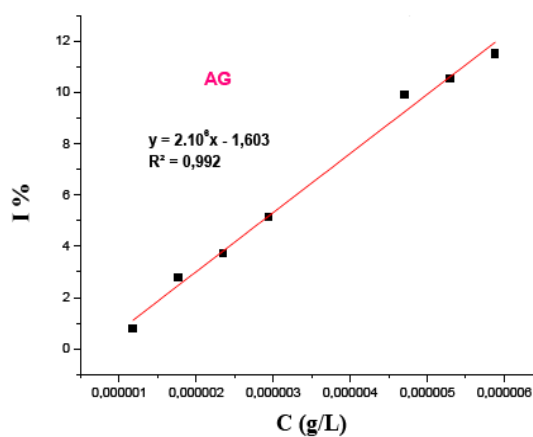
**Figure 08 :** Droite de régression du I% en fonction de concentration massique de AG.**Figure 09:** Préparation de milieu du culture.



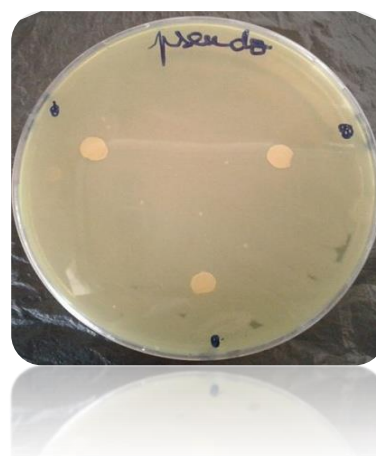
Figure 10: Activation des souches bactériennes.



Listeria innocua



Salmonella entericassp



Pseudomonas aéuginosa



Escherichia coli



Klepsilla pneumoniae

Figure 11: Test de FMA sur les souches bactériennes étudiées.



Figure 12: Le teste d'hémolyse.



Figure 13: Les différents concentrations de FMA, le contrôle (+) et le contrôle (–) utilisés dans le teste d'hémolyse.

ANNEXES 05



Figure 14: Les cages des différents Lots des rattes.



Figure 15: Le pesticide : Métribuzine.

Tableau 07: Poids relatif des organes (foie, reins, coeur, poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres		T	TP	Cispt	D _{0.2}
Poids Relative (%)	Foie	3.52±0.207	3.948±0.257*	3.5482±0.1633 ^a	3.514±0.0725 ^b
	Reins	0.6140±0.0169	0.7464±0.0394 ^{NS}	0.6358±0.0187 ^{NS}	0.6354±0.0317 ^{NS}
	Cœur	0.3164±0.076	0.3096±0.0112 ^{NS}	0,2736±0.0468**	0.2832±0.01381 ^b
	Poumon	0.8419±0.0110	0.8434±0.0101 ^{NS}	0.8176±0.0082 ^{NS}	0.8393±0.0095 ^{NS}

Tableau 08 : Concentrations des marqueurs biochimiques chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres	T	TP	Cispt	FMA
Glycémie	0,9875± 0.0377	1,77±0,0258***	1,1425±0,0386 ^b	1,0875±0,0435 ^b
Urée	0,382±0,0792	0,4567±0,0252*	0,3833±0,0252 ^a	0,38±0,03 ^a
Créatinine	5,5±1.291	7.5±1.291*	5.25±1.708*	4.45±1.708 ^{NS}
TGO	181,75±2,99	240,75±3,5***	187,75±2,22 ^c	183,75±3,5* ^c
TGP	121,5±3,11	181,5±2,65***	120,5±2,65 ^c	120,25±4,43 ^c
LDH	1884±256	2417±212*	2048.51±11.18 ^a	1766.9±166.8 ^a
PAL	100,25±3,3	171±2,58***	101,25±2,75 ^c	104,25±3,77 ^c
GGT	11.75±0.957	14.125±1.377*	12.125±0.629 ^a	12.25±1.041 ^b
AFP	0.14333±0.01528	0.36±0.02***	0.24±0.02 ^b	0.1666±0.02* ^b

Tableau 09: Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA), glutathion réduit (GSH) et catalase (CAT) chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres		T	TP	FMA	Cispt
MDA (μM/mg prot)	Foie	0,583±0,176	1,2667±0,0252***	0,597±0,235 ^a	0,683±0,176*
	Reins	0,8437±0.091	1.318±0.1182*	0.617±0.1092 ^b	0.7083±0.0608 ^b
	Cœur	0,4733±0,0252	0,4233±0,0252 ^{NS}	0,3566±0,0152* ^a	0,3967±0,0252**
	poumon	0,2767±0,025	0,5767±0,0252**	0,24±0,02 ^b	0,27±0,02 ^b
GSH (nM/mg prot)	Foie	0,2803±0,0355	0,2443±0,0274 ^{NS}	0,281±0,0375 ^{NS}	0,2047±0,031 ^{NS}
	Reins	0,236±0,0117	0,1276±0,0141**	0,2633±0,0115 ^b	0,252±0,0105 ^b
	Cœur	0,2833±0,025	0,242±0,0187 ^{NS}	0,24±0,0218 ^{NS}	0,2223±0,0149*
	poumon	0,59±0.0436	0.2533±0,140 ^{NS}	0.2683±0.083*	0.2767±0,140 ^{NS}
CAT (UI/g)	Foie	24.3±1.539	31.87±1.8*	25.3±0.656 ^b	24.967±0.351 ^b
	Reins	40.167±1.474	47.6±0.889**	43.7±0.721** ^b	43.633±0.451* ^a
	Cœur	11.5±1.323	15.833±0.764*	13.1±0.985 ^a	13.5±0.5* ^a
	poumon	49,67±3.51	68.33±2.52*	56.5±2.78 ^a	54.67±2.52 ^a

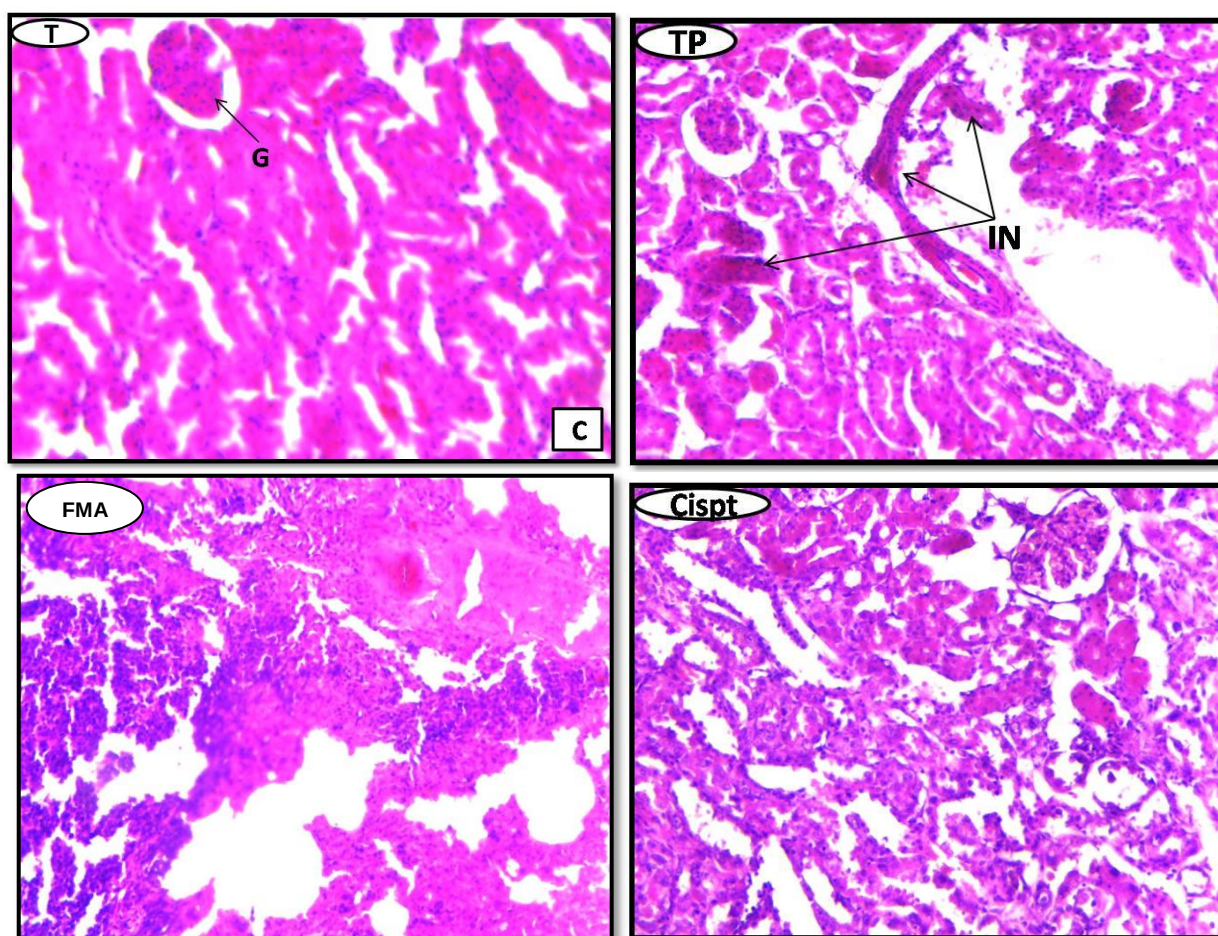


Figure 16: Observation microscopique d'une coupe histologique des reins chez les rattes de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)

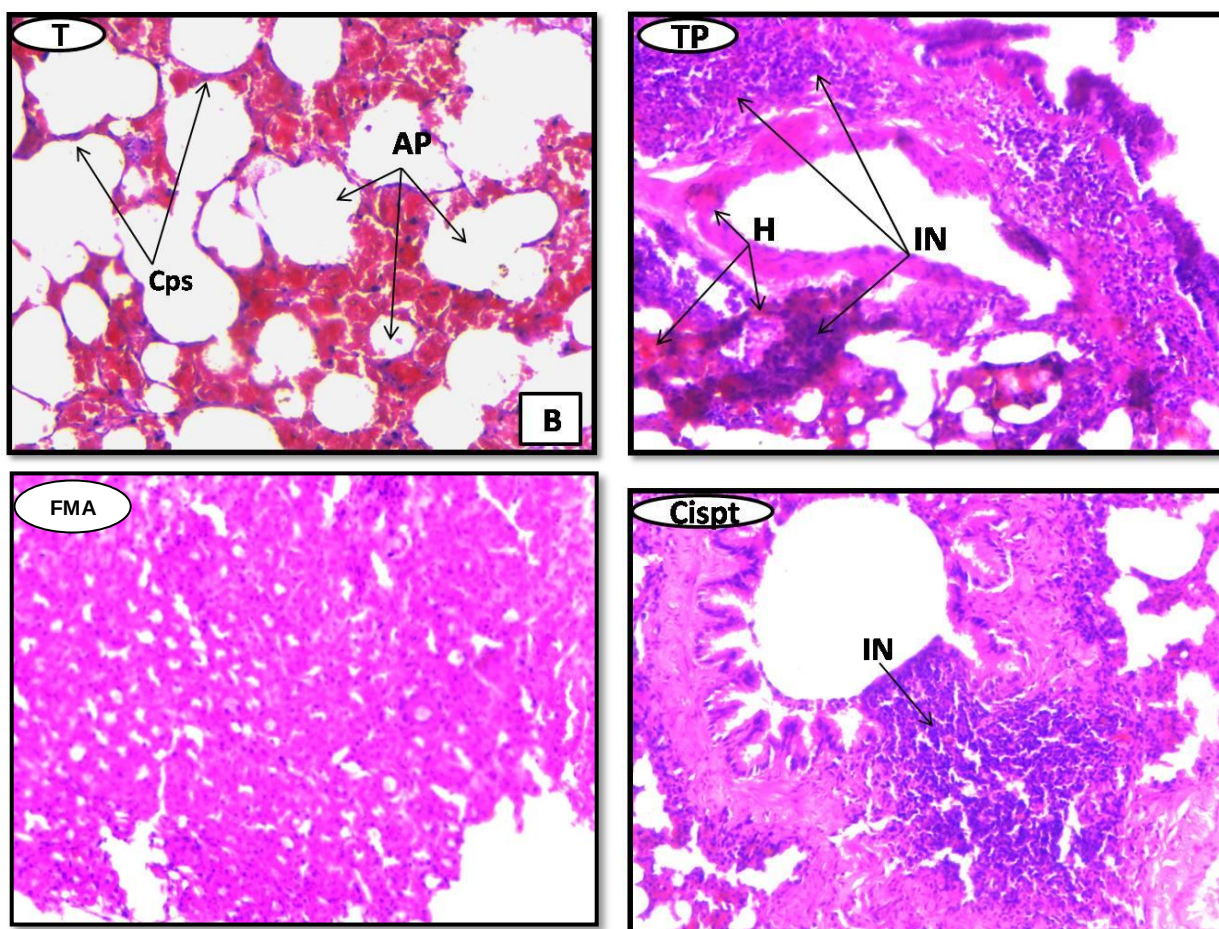


Figure 17: Observation microscopique d'une coupe histologique du poumon chez les rattes de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)