



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET

MOLECULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Évaluation antibactérienne in vitro et in silico,  
analyse ADMET et amarrage moléculaire des  
dérivés ferrocénylméthylacétylaniline**

Présenté par:

- M<sup>elle</sup> Assami Feriel
- M<sup>elle</sup> Ben moussa Hanane
- M<sup>elle</sup> Chaia Wiam
- M<sup>elle</sup> Sadani Samira

Devant le jury composé de :

- Président : M<sup>r</sup> Medjour Abdelhak M.A.A, Université d'El Oued.
- Examineur : M<sup>me</sup> Boukhari Dalal M.A.A, Université d'El Oued.
- Promoteur: M<sup>r</sup> Lanez Elhafnaoui M.C.B, Université d'El Oued.
- Co-Promoteur : M<sup>me</sup> Adaika Aicha M.C.B, Université d'El Oued.

Année universitaire: 2021/2022

## *Remerciements*

*Nous remercions Allah le tout puissant pour la patience qu'il nous a donné pour réaliser ce travail et atteindre notre objectif.*

*À notre encadreur de mémoire **Lanez Elhafnaoui**, directeur de laboratoire de recherche VTRS à l'université d'El oued, merci de nous avoir guidé tout au long de ce mémoire, de nous avoir permis de mieux appréhender l'utilisation de nombreux outils et méthodes nécessaires au bon déroulement de ce mémoire.*

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

*Nous exprimons aussi nos remerciements à M<sup>r</sup> **Medjour Abdelhak** qui nous avait fait l'honneur de présider ce Jury et à Mme **Boukharí Dalal** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements à Dr **Tlili mohamed laïd**, Dr **Laïche Omar Touhami** et Mme **Houmri Nawel** et tous les enseignants de la faculté des science et de la vie. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.*

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

## إهداء

بعد بسم بالله و الصلاة على رسول الله و الحمد لله على كل النعم

الى درعي و سندي في الحياة الى من كانا عنوانا في سعادتي و تالقي والدي الكريمان **امي و ابي**  
اللذان صبرا و تحملا مشقة و مصاعب الحياة لاجلي و من اجل تعلمي و تربيتي احسن تربية و الى كل  
اخوتي و اخواتي الذين احبهم فخورة بكوني منكم **اسيا و ايمان عبد الحليم و تسنيم و الصغيران حسن و**

**حسين**

الى كل صديقاتي و قريباتي عزيزاتي خالاتي و عماتي احوالي و اعمامي جداتي و اجدادي الله يرحم

الي ماتو و يحفظ الاحياء منهم احبكم في الله

الى كل معلميني و اساتذتي السابقين و الحاضرين وفقكم الله و سدد خطاكم لن انسى جميلكم

الى زوجي المستقبلي كان الله في عونك على مشاقا لحياة

ادعو الله التوفيق و السداد لي و لكم في هذه الحياة

سميرة





*Dédicace*

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

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère **Mahmoudi Naïma** qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père **mahrez** qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A ma sœur et mes frères*

***Chahrazed, Sidali, Hamza, Mohammed Et Sadam***

*A toute ma famille, proche ou éloignée*

*A mon chat koutí et mes amis. 😊*

*FERIEL*





## *Dédicace*

*Avant tout je tiens dédier ce travail à...*

*A mes parents **Djamel** et **Sihame**: merci pour votre amour, vos encouragements et votre soutien inconditionnel durant toute ma*

*vie, je t'aime énormément mes parents*

*A ma sœur bien aimée : **khaoula***

*A toute la famille **CHAIA***

*A mes amies **Feriel, Hanane et Samira***

*A tous ceux et celles que j'ai rencontrée et qui m'ont aidée*

*durant 5 ans des études universitaires.*

*A tous mes amis de spécialités Biochimie Appliquée de la promotion 2021-2022 A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Wiam*





## *Dédicace*

*Je remercie **Dieu** Tout-Puissant qui m'a aidé dans ma vie et dans la réalisation de ce travail.*

*Je dédie ce travail à tous ceux qui mes chers.*

*En priorité, mes parent qui m'ont soutenu moralement, que chacun d'eux soit chaleureusement remercié et puisse trouver ici, l'assurance de ma gratitude.*

*Mes salutations les plus sincères à mes frères et sœur: **Hadjer, Mohamed Salah, Lamia, Cussama, Hamza Mohamed El Bachir**. Je leur souhaite toute la réussite.*

*Je passe des salutations à la grande famille: mes grandes mères, mes tante et leurs marie, mes oncles et leurs épouses.*

*Je salue mes amies: **Wiam, Ferial et Samira**.*

*Pour finir, mes salutations la plus profondes à tous les étudiants du département de la biologie spécialement biochimie appliquée la section 2021/2022.*

*Et merci...*

*HANAN F* 



## ملخص:

يعتمد النهج العلاجي للعدوى البكتيرية على استخدام المواد الصيدلانية التي قد تكون ضرورية لتثبيط البكتيريا ومكافحتها بشكل فعال. يعد تطوير مركبات جديدة ذات أهداف علاجية خطوة مهمة في حل مشكلة المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية. من بين المركبات العضوية المعدنية التي لديها القدرة على التفاعل مع البكتيريا التي تمت دراستها مؤخرًا مشتقات الفيروسين.

الهدف من دراستنا هو التقييم في المختبر (vitro) و حاسوبيا (silico) للنشاط المضاد للبكتيريا لمشتقات الفيروسان (FCA) فيروسان- ميثيل- اسيتيل- أنيلين.

تظهر النتائج في السيليكو وفي المختبر أن هناك تفاعلًا تلقائيًا بين مركبات الفيروسينية والبكتيريا التي ترتبط بواسطة روابط هيدروجينية مترجمة بواسطة معلمات التفاعل  $K$  و  $\Delta G$  ، وأظهرت النتائج أن ارتباطه مع البكتيريا يمكن أن يسبب تغييرها مما قد يؤدي إلى فشل النشاط البيولوجي للإنزيم المستهدف.

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمشتق الفيروسين بواسطة مقياس الطيف الضوئي ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المشتقات الفيروسينية لها نشاط مثبط فعال على *Escherichia Coli* (IC50).

تم إجراء دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمركبات المختبرة ضد السلالات البكتيرية الخمس : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* تبين بوضوح أن المركبات الفيروسينية المصنعة لها أنشطة ضعيفة فقط في الإشريكية القولونية بأقطار مناطق التثبيط لا تزيد عن 12 مم لتركيزات 18 مغ / مل.

أظهرت نتائج السيليكو للخصائص الفيزيوكيميائية والصيدلانية والسمية أن هذه المركبات لها خصائص جيدة وتتيح اعتبارها أدوية مستقبلية مضادة للبكتيريا.

## Résumé:

L'approche thérapeutique des infections bactériennes repose sur l'utilisation de substances pharmacologiques peut être nécessaire pour inhiber et lutter efficacement contre la bactérie. Le développement de nouveaux composés à cibles thérapeutiques est une étape importante dans la résolution du problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Parmi les composés organométalliques qui ont la capacité d'interagir avec les bactéries récemment étudiées sont les dérivés ferrocéniques.

L'objectif de notre étude est l'évaluation *in silico* et *in vitro* de l'activité antibactérienne des dérivés ferrocénméthylacétylaniline (FcA). Les résultats *in silico* et *in vitro* montrent qu'il y a une interaction spontanée entre le FcA et la bactérie qui se lie par liaisons hydrogènes traduit par les paramètres d'interaction  $K$  et  $\Delta G$ , les résultats montrent que la liaison de dérive ferrocénique avec la bactérie peut provoquer leur altération qui pourraient conduire à l'échec de l'activité biologique de l'enzyme cible. L'étude de l'activité antibactérienne de dérivé ferrocénique par spectrophotomètre, les résultats obtenus ont montré que les FcA possèdent une activité inhibitrice  $IC_{50}$  efficace.

L'étude de l'activité antibactérienne des composés testés a été effectuée vis-à-vis des cinq souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* montrent clairement que les composés ferrocéniques synthétisés ont des activités faibles seulement sur *l'Escherichia coli* avec des diamètre des zones d'inhibition ne dépassent pas 12mm pour des concentration 18mg/ml.

La prédiction *in silico* des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et toxicologiques des 3 composés FcA ont montré que tous ces composés ont des bonnes caractéristiques et permet de les considérer comme des futurs médicaments antibactériens.

**Mots clés** : ferrocène, spectromètre, activité antibactérienne

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Å:** Ångström

**ADME:** Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

**ADMET:** absorption, distribution, métabolisme, excrétion, et toxicité

**ADT:** AutoDockTools

**Ala:** Alanine

**ATB:** antibiotique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Fe:** formule de ferrocène

**CONH<sub>2</sub>:** groupement amide

**CYP:** cytochromes P450

**DFT:** La théorie de la fonctionnelle de la densité

**DHPS:** dihydroptéase synthétase

**DMF:** Diméthylformamide

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde

**EP:** espace périplasmique

**FcA:** ferrocénméthylacétylaniline

**Fc:** Ferrocène

**FeCl<sub>2</sub>:** Chlorure de fer

**GI:** gastro-intestinal

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

**IgA:** immunoglobulines

**IR:** infrarouge

**LGA:** l'algorithme génétique lamarckien

**LMS:** antibiotiques lipophiles

**LPS:** Lipopolysaccharide

**Lys:** Lysine

**ME:** membrane externe

**MgBr<sub>2</sub>:** Magnésiumbromide

**MgCl:** Magnésiumchloride

**MI:** membrane interne

**MM:** mécanique moléculaire

**P:** protéines de type porine

**PABA:** acide paraaminobenzoïque

**PDB:** Protein Data Bank

**PG:** peptidoglycane

**PLIP:** Protein-Ligand Interaction Profiler

**PLP:** protéine de liant à pénicillines

**ppm :** Parties par million

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>:** groupement soufré et aminé

**UV:** Ultraviolet

**Vis:** Visible

**VTRS:** Valorisation Technologie des Ressources Sahariennes

**ΔG :** énergie libre de liaison

## Liste des figures

Numéro	Titre	
<b>Figure 1.1</b>	Structure générale d'une bactérie	<b>8</b>
<b>Figure 1.2</b>	Morphologie microscopique des bactéries	<b>9</b>
<b>Figure 2.1</b>	Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques.	<b>16</b>
<b>Figure 2.2</b>	Représentation schématique des sites d'action de certains antibiotiques sur la biosynthèse du peptidoglycane.	<b>18</b>

<b>Figure 2.3</b>	Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b)	<b>21</b>
<b>Figure 2.4</b>	Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines	<b>23</b>
<b>Figure 2.5</b>	Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques	<b>26</b>
<b>Figure 3.1</b>	Structure de résonance proposée par (Kealy&Pauson,. 1951)	<b>30</b>
<b>Figure 3.2</b>	Structure correcte de ferrocène	<b>31</b>
<b>Figure 3.3</b>	Ferrocène sous forme de poudre orange	<b>31</b>
<b>Figure 3.4</b>	Oxydation mono électronique réversible de la ferrocène	<b>34</b>
<b>Figure 3.5</b>	Spectre IR de ferrocène	<b>35</b>
<b>Figure 3.6</b>	Structure cristalline de ferrocène	<b>36</b>
<b>Figure 3.7</b>	N-ferrocenylmethyl-4-aminoacetophenoneN-ferrocenylmethyl-3-aminoacetophenone	<b>38</b>
<b>Figure 3.8</b>	ferrocenylmethyl-2-aminoacetophenone	<b>38</b>
<b>Figure 4.1</b>	Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible.	<b>41</b>
<b>Figure 4.2</b>	Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonnitrile dans l'acétonitrile	<b>42</b>
<b>Figure 4.3</b>	Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques	<b>43</b>
<b>Figure 4.4</b>	Schéma de Structure de $\beta$ -carotène	<b>44</b>
<b>Figure 4.5</b>	Schéma du protocole général de docking	<b>46</b>
<b>Figure 4.6</b>	étapes clés du docking moléculaire	<b>48</b>
<b>Figure 4.7</b>	Page d'accueil du serveur SwissADME	<b>53</b>
<b>Figure 4.8</b>	Page d'accueil du serveur admetSAR	<b>54</b>
<b>Figure 4.9</b>	Page d'accueil du serveur Protox	<b>55</b>
<b>Figure 5.1</b>	Aminométhylation de ferrocène	<b>60</b>
<b>Figure 5.2</b>	Synthèse de la N-ferrocenylmethyl-aminoacetophenone	<b>61</b>
<b>Figure 5.3</b>	Différentes étapes d'amarrage	<b>67</b>
<b>Figure 6.1</b>	Représentation ORTEP de Fc2A (a), Fc3A (b) et Fc4A (c)	<b>72</b>
<b>Figure 6.2</b>	Structure tridimensionnelle de la Gentamicine téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès DrugBank : DB00284	<b>73</b>
<b>Figure 6.3</b>	Structure tridimensionnelle de l'enzyme transglycosylase d'Escherichia Coli(PDB ID :4U6N) téléchargé depuis Protein Data Bank ( <a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a> ).	<b>73</b>
<b>Figure 6.4</b>	Poses d'amarrage de Fc2A (a), Fc3A (b), Fc4A (c) et la gentamicine (d) avec l'Escherichia coli(PDB ID : 4U6N) illustrant l'interaction de tous les ligands.	<b>75</b>
<b>Figure 6.5</b>	Site d'interaction entre les complexe étudiée et l' <i>Escherichia Coli</i> .	<b>76</b>
<b>Figure 6.6</b>	Zones d'inhibition des différents extraits des dérivés ferrocéniques étudiés relatives à la souche bactérienne testée ( <i>Escherichia coli</i> ).	<b>77</b>
<b>Figure 6.7</b>	Droits linéaires des pourcentages d'inhibition obtenue à partir des	<b>80</b>

	données spectroscopiques en fonction des concentrations des composés étudiées.	
<b>Figure 6.8</b>	Tracés de $\frac{1}{[Fc]}$ en fonction de $\frac{A_0}{A - A_0}$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec l'Escherichia coli.	<b>82</b>

## Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>Tableau 1.1</b>	Classification des bactéries : morphologie –genre – espèces	<b>9</b>
<b>Tableau 1.2</b>	Classification des toxines	<b>13</b>
<b>Tableau 2.1</b>	Mécanismes de résistances aux antibiotiques	<b>28</b>
<b>Tableau 4.1</b>	Ordres de grandeurs de quelques chromophores	<b>44</b>
<b>Tableau 4.2</b>	Principaux programmes de docking moléculaire, le nom de leur éditeur et le site Internet	<b>52</b>
<b>Tableau 5.1</b>	Formes SMILES et les identifiants des molécules testées	<b>64</b>
<b>Tableau 5.2</b>	Informations sur les récepteurs cibles choisies pour les études d'amarrage	<b>65</b>
<b>Tableau 5.3</b>	Paramètres d'amarrage sélectionnés pour l'Escherichia coli	<b>67</b>
<b>Tableau 6.1</b>	Propriétés physicochimiques des composés étudiés et du gentamicine	<b>69</b>
<b>Tableau 6.2</b>	Propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés et du gentamicine	<b>70</b>
<b>Tableau 6.3</b>	Prédiction de la toxicité des composés étudiés et de la gentamicine	<b>71</b>
<b>Tableau 6.4</b>	Constantes de liaisons, les énergies libres de liaison set les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour les complexes étudiés par approche d'amarrage moléculaire	<b>74</b>
<b>Tableau 6.5</b>	Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents dérivés ferrocéniques relatives à la souche bactérienne testées.	<b>78</b>
<b>Tableau 6.6</b>	Valeurs de l'absorbance des milieux du développement de l'Escherichia coli obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis	<b>79</b>
<b>Tableau 6.7</b>	Pourcentage d'inhibition des composés étudiés	<b>80</b>
<b>Tableau 6.8</b>	valeurs de la IC <sub>50</sub> des composés étudiés obtenu à partir d'UV-Visible	<b>81</b>
<b>Tableau 6.9</b>	Rapports de l'absorbance $\frac{A_0}{A - A_0}$ et $\frac{1}{[Fc]}$ des complexe étudiée	<b>81</b>
<b>Tableau 6.10</b>	Valeurs des K et $\Delta G$ des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques	<b>82</b>

## SOMMAIRE

*Remerciements*

**Résumé**

**Abstract**

**Liste des figures**

**Liste des Tableaux**

**Introduction**

### Partie I: Synthèse bibliographique

#### Chapitre1: Généralités sur les Bactéries.

1.1. Introduction .....	7
1.2. Rappels de bactériologie .....	7
1.2.1: Définition .....	7
1.2.2. Structure et composition .....	8
1.2.3. Classification et morphologie des bactéries .....	8
1.2.4. Classification des principales bactéries pathogènes .....	9
1.3. Pouvoir Pathogènes des Bactéries .....	11
1.3.1 Pouvoir pathogène et estimation de la virulence .....	11
1.3.1.1. Le pouvoir invasif .....	11
1.3.1.2 Le pouvoir toxique .....	12

#### Chapitre 2 : Généralités sur l'activité antibactérienne.

2.1. Définition .....	16
2.1.1. Antibiotique .....	16
2.1.2. L'activité antibactérienne .....	16
2.2. Origine des Antibiotiques .....	16
2.2.1. Antibiotiques d'origine naturelle .....	16
2.2.2. Antibiotiques d'origine synthétique .....	16
2.2.3. Antibiotiques d'origine semi-synthétique .....	17

2.3. Mode d'action des antibiotiques .....	17
2.4. Classification des antibiotiques selon leur mode d'action.....	18
2.4.1. Antibiotiques inhibiteurs de la biosynthèse du Peptidoglycane.....	18
2.4.1.1. $\beta$ - lactamines .....	19
2.4.1.2. La fosfomycine (Phosphomycine) .....	20
2.4.1.3. La cyclosérine .....	20
2.4.1.4. Glycopeptides.....	20
2.4.1.5. Bacitracine.....	21
2.4.2. Antibiotiques agissants sur les membranes .....	21
2.4.2.1. Polymyxines .....	21
2.4.3. Antibiotiques actifs sur l'ADN .....	21
2.4.3.1. Inhibition de la réplication .....	21
2.4.3.1.1. Quinolones .....	21
2.4.3.1.2. Nitrofuranes.....	22
2.4.3.1.3. Novobiocine .....	22
2.4.3.2. Inhibition de la transcription .....	23
2.4.3.2.1. Rifampicines .....	23
2.4.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines .....	23
2.4.4.1. Aminosides.....	24
2.4.4.2. Tetracyclines .....	24
2.4.4.3. Macrolides et apparentés .....	25
2.4.4.1.4. Phénicolés .....	25
2.4.4.1.5. Acide fusidique .....	25
2.4.5. Antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire.....	25
2.4.5.1. Sulfamides.....	25
2.5. Origine de la résistance bactérienne.....	26
2.5.1. Résistance naturelle.....	26

2.5.2. La résistance acquise.....	27
2.6. Mécanismes biochimiques de la résistance.....	27
2.6.1. Imperméabilité membranaire .....	27
2.6.1.1. Diminution de perméabilité de la membrane externe .....	27
2.6.1.2. Systèmes efflux actifs .....	28
2.6.2. Modification de la cible des antibiotiques .....	28
2.6.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques .....	28

### **Chapitre 3: Chimie de ferrocène**

3.1. Historique des ferrocènes :.....	31
3.2. Définition du ferrocène .....	32
I.3.3. Liaisons et structures électroniques du ferrocène .....	33
I.3.4. Processus chimique de synthèse de ferrocène .....	33
I.3.5.1. Réaction de substitution.....	33
I.3.5.2. Acylation.....	34
I.3.6. Propriétés du ferrocène .....	34
I.3.6.1. Propriétés physicochimiques .....	34
I.3.6.2. Propriétés électrochimiques .....	34
I.3.6.3. Propriétés spectrales .....	35
I.3.6.3.1. Infrarouge.....	35
I.3.6.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire RMN .....	36
I.3.6.3.3. Structure Cristalline .....	36
I.3.7. Chimie médicinal de ferrocène .....	36
I.3.7.1. Activité anti-oxydants.....	37
I.3.7.2. Antibactériennes .....	37
I.3.7.3. Activité antifongique : .....	37
I.3.7.4. Activité anti-cancéreuse.....	37
I.3.7.5. Activité anti-Toxoplasmose.....	38

I.3.7.6. Activité antivirale .....	38
I.3.8. Dérivé ferrocénique étudié.....	38

#### **Chapitre 4:Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées**

I.4.1. Spectroscopie électronique .....	42
I.4.2. Règles de sélection .....	42
I.4.3. Principe de la spectroscopie UV – Visible .....	43
I.4.3.1.Etude spectrophotométriques en UV-Visible .....	43
I.4.3.2.Analyse de l'absorption .....	45
I.4.4. Amarrage moléculaire .....	47
I.4.4.1. Introduction .....	47
I.4.4.2.Types du Docking moléculaire .....	47
I.4.4.2.1.Principes du docking moléculaire .....	48
I.4.4.2.2.Applications du docking moléculaire .....	49
I.4.4.2.3. Étapes du docking moléculaire .....	50
I.4.4.2.4. Outils du docking moléculaire .....	50
I.4.4.3. Prédiction du paramètre bio-informatique .....	55
I.4.4.3.1. Serveurs utilisés : .....	55
I.4.4.4. Prédiction des propriétés ADMET .....	58

### **Partie II : partie pratique**

<b>Matériels et Méthodes</b> .....	62
1.1. Matériels.....	63
1.1.1. Produits chimiques et réactifs .....	63
1.1.1.1. Dérivés ferrocéniques étudiés .....	63
1.1.1.2. Souches bactériennes utilisées .....	64
1.1.1.3. Milieux de culture utilisés .....	64
1.1.1.4. Gentamicine .....	65

1.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne .....	65
1.2.1. Principe .....	65
1.2.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé .....	65
1.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien .....	65
1.2.2.2. Protocole expérimental .....	65
1.2.3. Mesure spectroscopique .....	66
1.3. Evaluation <i>in silico</i> de l'activité antibactérienne .....	67
1.3.1. Méthodes d'évaluation des propriétés ADMET .....	67
1.3.2. Amarrage moléculaire : .....	68
<b>Résultats et discussion</b> .....	72
2.1.Évaluation <i>in-silico</i> de l'activité antibactérienne .....	73
2.1.1. Prédiction des propriétés ADMET .....	73
2.1.1.1. Propriétés physico-chimiques .....	73
2.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	74
2.1.1.3. Prédiction de la toxicité.....	75
2.2. Étude de l'inhibition de l' <i>Escherichia Coli</i> par amarrage moléculaire : .....	75
2.2.1. Optimisation structurelle .....	75
2.2.2. Simulations d'amarrage .....	78
2.4. Évaluation <i>in-vitro</i> de l'activité antibactérienne .....	80
2.4.1. Evaluation du pouvoir antibactérien des composés étudiés .....	80
2.4.2. Etude Spectroscopique de l'activité antibactérien .....	82
2.4.2.1. Détermination de la concentration inhibitrice (IC50) .....	83
2.4.2.2. Détermination de la constante et l'énergie libre de liaison (K et $\Delta G$ ) .....	85
<b>Discussion</b> .....	88
<b>Conclusion générale</b> .....	92
Références bibliographiques .....	94

---

---

# *Introduction*

---

---

## Introduction

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques et les risques de toxicité liés à l'utilisation massive de médicaments et d'antibiotiques de synthèse, ont conduit les chercheurs à trouver d'autres sources naturelles fournissant de nouveaux médicaments efficaces et peu toxiques. L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne et possédant une faible toxicité (**Sagar *et al.*, 2019**). L'utilisation moderne des complexes de métaux de transition en tant que agents chimiothérapeutiques remonte à la découverte du cisplatine par Rosenberg *et al.* En 1965 (**Mohamed Nazim., 2012**). Une telle découverte a ouvert la porte du monde inexploré de agents chimiothérapeutiques à base de métaux qui ont différentes activités biologiques (**Sergio *et Sousa.*, 2006**). L'un des objectifs essentiels de la chimie organométallique est de présenter des nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux et antimicrobiens.

La chimie organométallique moderne a été fortement influencée par la découverte accidentelle du ferrocène en 1951. En fait, le ferrocène ( $Cp_2Fe$ ) a été l'espèce organométallique la plus étudiée. La stabilité thermique, le caractère inerte en solutions d'acide et de base concentrées, ainsi que les propriétés redox de ferrocène rendent ce métallocène un composé impliqué dans de nombreux domaines de recherche.

Eve I. Edwards *et al.* ont publié dans le volume 85 du Journal of Organometallic Chemistry en février 1975, les dérivés ferrocéniques de pénicilline et céphalosporine, des antibiotiques préparés par le remplacement du groupe phényle ou le groupe hétéroaromatique par un groupement ferrocène, ils ont trouvé qu'ils possèdent une activité antibiotique élevée (**Edwards *et al.*, 1975**). Par ailleurs, les ligands ferrocéniques ayant une grande sélectivité de reconnaissance devraient donner une meilleure réponse biologique et une faible toxicité, pour une dose donnée.

Le ferrocène et ses dérivés ont joué un rôle important en tant que chimio thérapeutique 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**).

En 1984, Kopf-Maier et al ont prouvé l'activité anticancéreuse de complexe de ferrocérium contre la tumeur ascitique d'Ehrlich. Depuis lors, le ferrocène a été étudié pour des applications biologiques et médicales potentielles. À l'origine, l'espèce oxydée de ferrocène, ferrocérium ( $Cp_2Fe^+$ ) était rapporté à être le responsable des propriétés cytotoxiques sur ADN méditée à sa capacité de générer des espèces radicalaires oxygénées. En conséquence, de nombreux ferrocènes fonctionnalisés ont été préparés et testés contre des cellules cancéreuses. (Benabdesselam., 2017)

En se basant sur les applications du ferrocène citées précédemment, on a proposé un sujet de recherche intitulé: «Evaluation antibactérienne in vitro et in silico, analyse ADMET et amarrage moléculaire des dérivés ferrocenylmethylacetylaniline», donc l'objectif de ce travail a été de synthétiser quelques dérivés ferrocéniques de ferrocène au laboratoire et l'étude de l'interaction de dérivés ferrocéniques synthétisés avec les bactéries par deux méthodes adoptées dans notre étude : la technique spectroscopique UV-Visible et l'amarrage moléculaire. Les calculs ont été effectués par les logiciels Gaussian9 et l'AutoDock Tools. L'interprétation des résultats est basée sur l'énergie d'interaction de dérivé ferrocénique et bactérie. Le complexe de plus basse énergie d'interaction présentera probablement une meilleure inhibition.

Notre but est de connaître : Ces composés ont-elles une activité antibactérienne? Ou bien leur liaison avec la bactérie est-elle spontanée ? Quel est le type de la liaison formée ?

L'ambition de ce travail est de réunir les différentes connaissances actuelles sur ce sujet afin d'émettre une synthèse permettant de répondre au mieux aux questions posées ci-dessus.

Ce travail est réparti en deux parties essentielles :

- ✓ La première comporte un aperçu bibliographique se divisant elle-même en quatre chapitres (Généralités sur les bactéries, Généralités sur l'activité antibactérienne, chimie de ferrocène et contexte théorique des techniques expérimentales utilisées).
- ✓ La deuxième partie contient les matériels et les méthodes quant à la dernière présente les résultats et discussion comprend la présentation des différents résultats obtenus et leurs interprétations.

Nous avons terminé ce travail par une conclusion générale et une annexe dont les résultats nous n'avons pas présentés dans les différents chapitres susvisés et que nous avons jugé utile à mentionner.

---

## *Partie I:*

# *Synthèse bibliographique*

---

---

***Chapitre 1:***

***Généralités sur les Bactéries.***

---

## 1.1. Introduction

Les micro-organismes ont un rôle indispensable dans notre vie et sont les créatures les plus précieuses de notre planète. Ils sont d'une immense importance pour l'environnement, la santé humaine et notre économie. Les microbes affectent tous les aspects de la vie sur notre planète ; sans microbes, la vie ne peut être maintenue sur terre. La majorité des microbes ont des effets bénéfiques profonds tels que la fixation des gaz atmosphériques et la conversion de matières animales et végétales mortes en substances plus simples qui peuvent être recyclées à nouveau dans l'environnement et réutilisées au début de la chaîne alimentaire (**Selim et al., 2017**).

Depuis leur apparition, les antibiotiques restent le moyen privilégié de la lutte contre les maladies d'origine bactérienne. Parmi les nombreux antibiotiques les bêta-lactamines sont à l'heure actuelle les plus utilisées du fait de leur large spectre d'action, leur innocuité, leur efficacité et surtout leurs faibles couts (**Turel et al., 2003**).

Le pouvoir d'adaptation des bactéries résistantes se manifeste par leur capacité à acquérir de nouvelles propriétés, soit par modification de leur génome, soit par gain d'information génétique.

Aujourd'hui, l'émergence et la diffusion de bactéries multi-résistantes dans les populations humaines sont devenues très préoccupants( **Boughougal., 2018**).

## 1.2. Rappels de bactériologie

### 1.2.1: Définition

Une bactérie est un être unicellulaire (procaryote) de petite taille, de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres. La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10  $\mu\text{m}$ . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (LPS) (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%)(Figure 1.1)(**Rosselló-Móra et Amann., 2015**).

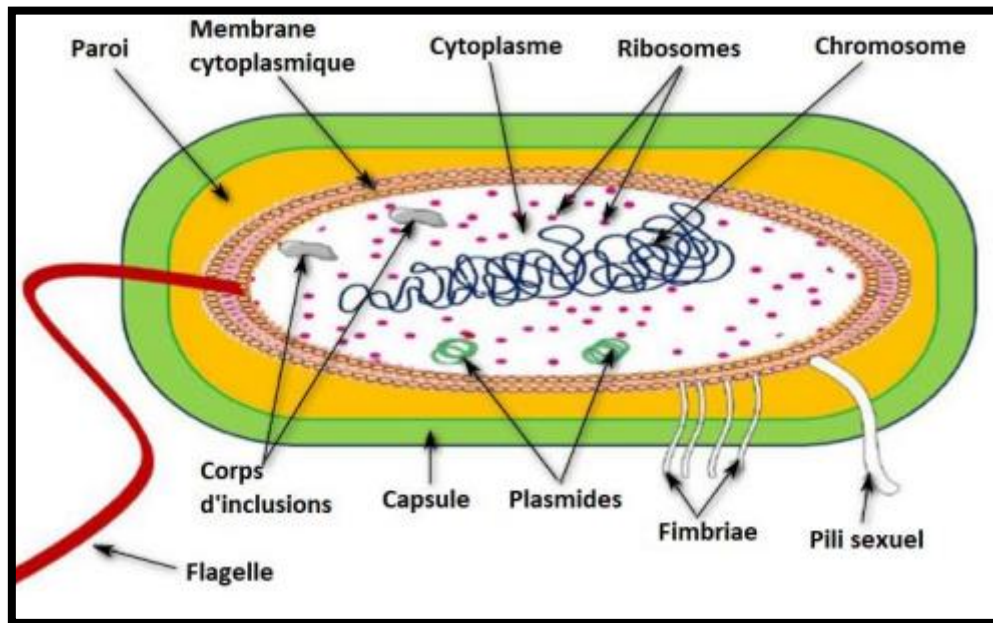


Figure 1.1 : Structure générale d'une bactérie (Ladjouzi., 2013).

### 1.2.2. Structure et composition

La bactérie possède un cytoplasme qui est entouré, comme pour n'importe quelle cellule, par une membrane plasmique. Autour de celle-ci se trouve toujours une paroi peptidique, plus ou moins épaisse. C'est l'épaisseur de cette dernière qui détermine la réaction de coloration de Gram et classifie ainsi les bactéries en deux grands groupes : les Gram positif et le Gram négatif (Kuhn., 2019) .

### 1.2.3. Classification et morphologie des bactéries

Les bactéries sont réparties en catégorie hiérarchisées : les espèces de bactéries sont regroupées en espèces, en **genre**, en **famille**, en **ordre** et en **classe** et enfin elles peuvent être classées en fonction de **leur besoin d'oxygène** pour sur vivre en bactéries aérobies ou en bactéries anaérobie. En pratique, on les désigne par leur nom **d'espèce** et de **genre**. La forme varie beaucoup d'une espèce bactérienne à l'autre. Les plus courantes sont arrondis «coquesocci», allongées «bâtonnets ou bacilles». De plus, certaines bacilles sontfusiformes « vibrions » ou s'incurvent « spiralee ». La plupart prennent la coloration de Gram : les bactéries à Gram positif en bleu-violet, les bactéries à Gram négatif en rosé(Avril *et al.*, 1962).

Les bactéries peuvent être classées et donc identifiées en fonction de plusieurs paramètres : morphologie microscopique : coque , bacille , isolés , groupés en deux , en chaînette , en amas morphologie macroscopique : taille , forme, couleur des colonies sur culture, résultat

de la coloration de gram : gram positif ,gram négatif , température de croissance , besoins respiratoire : aérobie , aéroanaérobie strict , aéroanaérobie facultatif micro aérophile mobilité, présence de spores , besoins nutritionnelles : nécessité de substances particulières . (Leclerc *et al.*, 1995, Madigan *et al.*, 1997, Marc *et al.*, 2001).

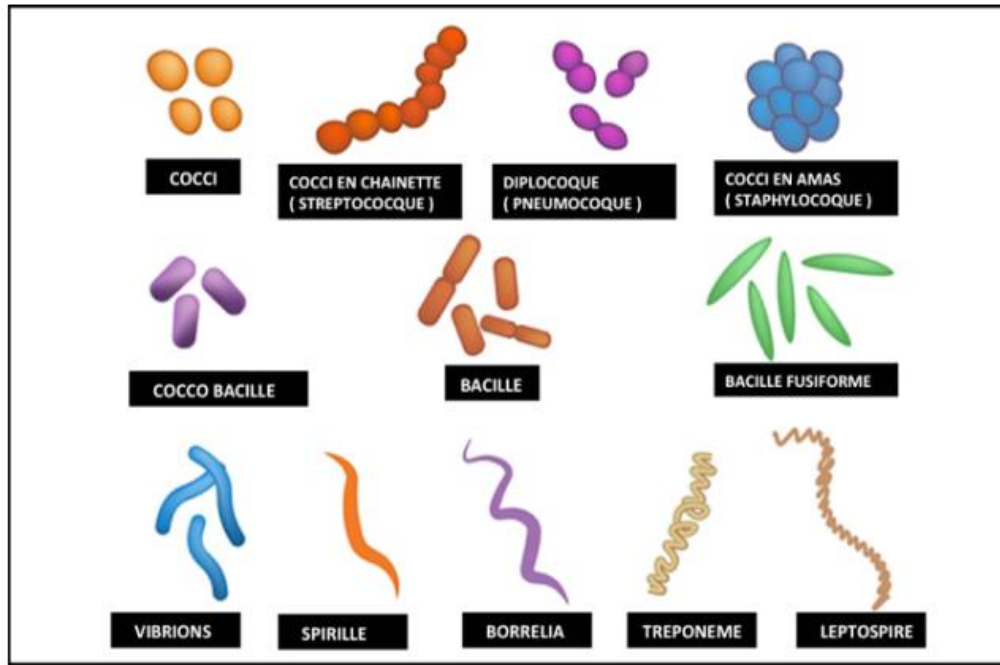


Figure 1.2 : Morphologie microscopique des bactéries (Leclerc *et al.*, 1995).

1.2.4. Classification des principales bactéries pathogènes

Tableau 1.1 : Classification des bactéries : morphologie –genre – espèces(Guide pratique des bactéries pathogènes., 2017).

Coques à Gram Positif		
Morphologie	Genre	Espèces
En amas	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylocoque à coagulase négative</i>
En chaînette	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptocoque bêta hémolytique :</i> <i>Groupe A pyogènes</i> <i>Groupe B agalactiae</i> <i>Autres groupes : C, G, F ....</i> <i>Streptocoques alpha hemolytiques :</i> <i>mutans, oralis, sanguis, salivarius, complexe milleri</i> <i>(anginosus, constellatis, intermedius)</i>
En diplocoque	<i>Streptococcus</i>	<i>Pneumoniae</i>
En courtes chaînette	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis faecium</i>
Coques à Gram Négatif		

Morphologie	Genre	Espèces
En diplocoque	Neisseria	<i>Meningitidis</i> <i>Gonorrhoeae</i>
<b>Bacille à Gram Négatif</b>		
Morphologie	Famille	Genre et Espèces
Bacille à Coloration bipolaire	<i>Enterobactériaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> (colibacille) <i>Klebsiella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Proteus</i> <i>Serratia</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i> <i>Salmonella</i> ( <i>typhimurium</i> ) <i>Shigella</i> ( <i>sonnei</i> ) <i>Yersinia</i> ( <i>enterocolitica</i> )
Cocco bacilles		<i>Brucella Melitensis</i> <i>Haemophilus</i> ( <i>influenzae</i> ) <i>Moraxella</i> ( <i>catarrhalis</i> ) <i>Pasteurella Multocida</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Legionella pneumoniae</i> <i>Kingella</i>
Bacilles aérobies stricts	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacille pyocyanique) Autres ( <i>Burkholderia</i> – <i>Stenotrophomonas</i> .) <i>Acinetobacter baumannii</i>
Vibrions	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> Autres Vibrions <i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>

<b>Bactéries de Forme spiralée</b>		
Morphologie	Genre	Espèces
	<i>Treponema</i>	<i>Pallidum</i> (agent de la syphilis)
	<i>Leptospira</i>	<i>Icterohémmorragiae</i> ( <i>Leptosirose</i> )
	<i>Borrelia</i>	<i>Recurrentis/ burgdorferi</i> (Fièvres récurrentes – <i>Maladie de Lyme</i> )
	<i>Spirillum</i>	<i>Minus</i> ( <i>Sodoku</i> )
<b>Mycoplasmes</b>		
Morphologie	Genre	Espèces
Sans paroi	<i>Mycoplasme</i>	<i>Pneumoniae hominis</i>
	<i>Ureaplasma</i>	<i>Urealyticum</i>

<b>Bactéries intracellulaires</b>		
Morphologie	Genre	Espèces
Très petite taille	<i>Chlamydia</i>	<i>TRACHOMATIS psittaci pneumoniae</i>
	<i>Rickettsia</i>	<i>Conorii</i> Autres

Bactéries Anaérobies strictes		
Morphologie	Genre	Espèces
Coques à Gram positif	<i>Peptostreptococcus</i>	
Coques à Gram négatif	<i>Veillonella</i>	
Bacilles à Gram positif	<i>Clostridium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Peptococcus</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Tetani, Perfringens, Botulinum,</i>
Bacilles à Gram négatif	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Eubacterium</i>	

### 1.3. Pouvoir Pathogènes des Bactéries

On distingue habituellement deux catégories de bactéries pathogènes :

- Les **bactéries pathogènes spécifiques** : quel que soit l'état de santé du patient. Ils provoquent des troubles.
- Les **bactéries pathogènes opportunistes** provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (Ray et Ryan., 2014).

#### 1.3.1 Pouvoir pathogène et estimation de la virulence

Le pouvoir pathogène est la capacité d'un micro-organisme de causer une maladie dont les symptômes sont d'intensité variable

- La virulence d'un micro-organisme traduit la gravité des troubles engendrés chez l'hôte.

-Le pouvoir pathogène des bactéries dépend de :

- Le **pouvoir invasif** : La capacité des bactéries à se multiplier dans l'hôte.
- Le **pouvoir toxique** : La capacité des bactéries à libérer des toxines.
- Le **terrain** : Les résistances opposées par l'organisme hôte. (Zaouia., 2020).

##### 1.3.1.1. Le pouvoir invasif

Selon (Nassif et Philippon., 2019). Une bactérie invasive pénètre dans l'organisme grâce à des adhésions et se multiplie dans les tissus de l'hôte : elle donc engendre une infection

Ces adhésions sont des molécules reconnues par des récepteurs des cellules de l'hôte :

- Polyosides de la capsule ou du glycocalyx.
- Pili (fimbriae) des bactéries Gram négatives.
- Hémagglutinines.
- Protéines de surface (couche « S »).
- Acides teichoïques et lipoteichoïques des bactéries Gram positives.

-Les bactéries invasives produisent des substances qui détruisent les tissus:

- Hémolysines
- Collagénase
- Hyaluronidase
- Lécithinase ,Dnases, leucocidines.....

Certaines bactéries possèdent également des dispositifs leur permettant de résister au système immunitaire de l'hôte, en particulier la phagocytose :

- La capsule empêchant l'opsonisation.
- Protéines M des streptocoques .
- Caillot engendré par la coagulase de Saureus.
- Protéine A de *S. aureus* fixant les immunoglobulines par leur fragment Fc.
- Destruction des Ig A par des protéases extracellulaires (méningocoque, *H. influenzae*) .
- Destruction des phagocytes par les leucocidines (*Pseudomonas*, *Streptocoques*...) .
- Inhibition de la fusion phagosome-lysosome (*M. tuberculosis*) .
- Résistance aux enzymes lysosomiales (*Salmonella typhi*).

### 1.3.1.2 Pouvoir toxique

Les bactéries toxinogènes produisent des toxines, capables de nuire à l'hôte, même en l'absence du micro-organisme producteur. On distingue deux types de toxines :

- ❖ Les exotoxines: Les exotoxines sont des protéines ayant plusieurs mécanismes d'action qui peuvent être soit locale ou à distance.
- ❖ Les endotoxines: sont les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Seul le lipide A est toxique. **(Ray et Ryan., 2014).**

Tableau 1.2 : Classification des toxines (Ray et Ryan., 2014).

Type	Localisation	Nature chimique	Exemples
Endotoxine	Paroi bactérienne	LPS	<i>Salmonella</i>
Exotoxine cytoplasmique	Cytoplasme	Protéine	<i>Yersinia pestis</i> <i>Shigella dysenteriae</i>
Exotoxine mixte	Cytoplasme	Protéine	<i>Clostridium tetani et botulinum</i>
Exotoxine vraie	Au moment de la croissance	Protéine	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>

---

***Chapitre 2:***  
***Généralités sur l'activité anti-***  
***bactérienne.***

---



## 2.1. Définition

### 2.1.1. Antibiotique

A l'origine, le mot antibiotique (ATB) désigne tout produit microbien utilisé à de très faibles concentrations qui inhibe ou tue certains micro-organismes. L'antibiotique est défini comme une substance chimique produit par des micro-organismes inférieurs (champignons ou bactéries) et qui est capable de détruire ou d'empêcher la croissance des autres microorganismes (Belkadi., 2012).

### 2.1.2. Activité antibactérienne

Correspond à activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un végétal qui a très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue.

La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérienne, face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différents selon la souche d'appartenance (Nicolas., 1998).

## 2.2. Origine des Antibiotiques

Les agents chimiothérapeutiques peuvent être synthétisés par des micro-organismes ou par méthodes chimiques indépendantes de l'activité microbienne(Prescott *et al.*, 2003;Bousseboua., 2005).

### 2.2.1. Antibiotiques d'origine naturelle

Seuls certains antibiotiques sont naturels, c'est-à-dire, en totalité ils sont synthétisés par des micro-organismes dont principalement des bactéries Actinomycétales du genre Streptomyces des moisissures des genres Penicillium et Cephalosporium(Monsallier *et al.*, 1992). Parmi ces antibiotiques on a les pénicillines G et V, la gentamicine et la tobramycine (aminosides), et les sulfazécines (monobactames naturels) (Nauciel., 2000).

### 2.2.2. Antibiotiques d'origine synthétique

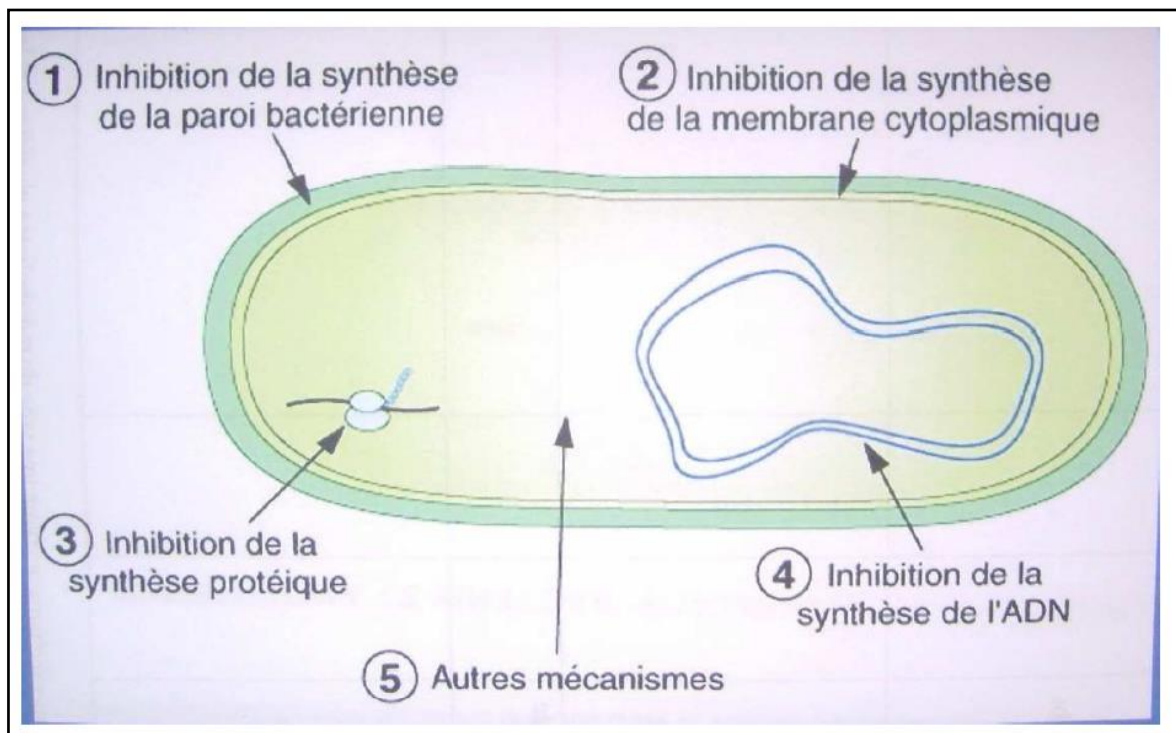
Les antibiotiques peuvent également être synthétiques, ils sont alors entièrement produits par voie chimique, tels que l'acide nalidixique( quinolones ), le chloramphénicol et les monobactames de synthèse (aztéonam) (Monsallier *et al.*, 1992;Le Minor et Viron., 1990).

### 2.2.3. Antibiotiques d'origine semi-synthétique

Ce sont des antibiotiques naturels ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires, dans le but de les rendre moins sensibles à l'inactivation par les organismes pathogènes (Prescott *et al.*, 2003). Parmi ces antibiotiques on peut citer toutes les céphalosporines, l'amikacine et la tobramycine et des kanamycines (Nauciel, 2000).

### 2.3. Mode d'action des antibiotiques

Selon le spectre d'activité des antibiotiques, certains sont bactéricides du fait qu'ils inhibent la biosynthèse de molécules vitales pour la cellule, et d'autres sont bactériostatiques. Cette activité anti-microbienne peut être large ou étroite. Cependant, deux grands lieux d'action ; la paroi et le cytoplasme avec cinq différents mécanismes sont distingués : action sur la synthèse du peptidoglycane, action sur la membrane cytoplasmique, action sur la répllication de l'ADN, action sur la synthèse des protéines et action sur le métabolisme intermédiaire (Figure 2.1) (Lavigne, 2007).



**Figure 2.1:** Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques. (Fournier et Roy, 1997).

## 2.4. Classification des antibiotiques selon leur mode d'action

### 2.4.1. Antibiotiques inhibiteurs de la biosynthèse du Peptidoglycane

Le Peptidoglycane est un polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il est composé de chaînes linéaires de N- acétyl D glucosamine et d'acide N- acétylmuramique dont le nombre de molécules va de 20 à 100. Ces chaînes polysaccharidiques sont reliées entre elles par de courtes chaînes de tétra- peptides (L – Ala – D – Glu – L – Lys – D – Ala) à l'aide des ponts peptidiques (**Vandenesch et Etienne., 1997; Cavallo et al., 2004**) (Figure 2.2). La biosynthèse du Peptidoglycane est effectuée en 3 principales étapes :

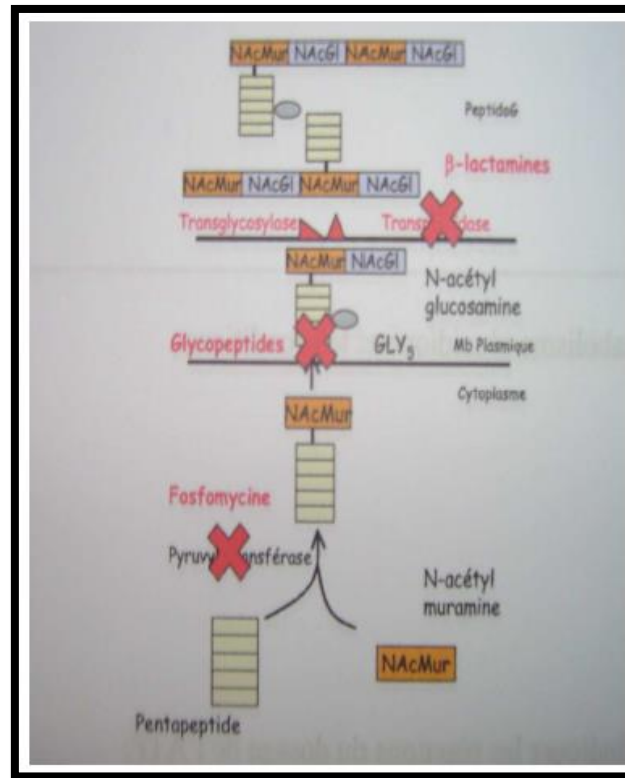
-La première étape Elle est effectuée dans le cytoplasme et correspond à la formation du précurseur du Peptidoglycane (UDP – NAMP).

-La deuxième étape C'est une étape membranaire. Elle correspond au transport de l'UDP – NAMP au travers de la membrane cytoplasmique et en même temps addition d'un autre sucre le N – acétyl glucosamine et d'une autre chaîne peptidique secondaire dont la séquence varie en fonction des espèces bactériennes. Cependant, on aura un disaccharide pentapeptide (N – acétyl glucosamine/N – acétylmuramique pentapeptide). Ces éléments constituent les unités de base du Peptidoglycane.

-La troisième étape Elle consiste à la polymérisation des disaccharides penta peptides au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique selon deux réactions différentes:

-La première réaction est réalisée en présence des trans- glycosidases dont le rôle principal est de lier les unités élémentaires du Peptidoglycane entre elles pour donner naissance à de longues chaînes polysaccharidiques linéaires.

-La deuxième réaction consiste à l'incorporation des chaînes polysaccharidiques néosynthétisées au Peptidoglycane pré existant par le biais des transpeptidases (**Cavallo et al., 2004**).



**Figure 2.2** : Représentation schématique des sites d'action de certains antibiotiques sur la biosynthèse du peptidoglycane (Lavigne ., 2007).

#### 2.4.1.1.β- lactamines

Cette famille possède en commun un cycle beta-lactame qui est leur site actif. Elle comprend plusieurs groupes d'antibiotiques dont deux sont essentiels, les pénicillines et les céphalosporines (Association Française des Enseignants de pharmacologie des Facultés de médecine., 1993; Nauciel et Vildé., 2005).

Ces antibiotiques présentent un analogue structural avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur de peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liant à pénicillines (PLP). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase finale de la synthèse du peptidoglycane, c'est-à-dire l'étape de polymérisation à partir de sous-unités d'un disaccharide peptide. L'activité enzymatique des PLP est inhibée par leur liaison avec les bêta-lactamines. Les bêta-lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance.

Pour un antibiotique donné, l'activité antibactérienne ne s'exerce que vis-à-vis de certaines espèces bactériennes, ce qui définit son spectre d'activité, par exemple le groupe de pénicillines G est actif sur les bactéries à Gram positif et les coques à Gram négatif (Duval et

**Soussy., 1990; Tortora et al., 2003**). Aussi, les céphalosporines qui sont classés en trois générations, sont tous des produits à large spectre, mais dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. Les glycopeptides, la fosfomycine et la bacitracine sont également des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (**Le Minor et Viron., 1990**).

#### 2.4.1.2. Fosfomycine (Phosphomycine)

C'est un antibiotique bactéricide, inhibe la conversion de l'UDP – N –acétyl glucosamine en acide UDP – N –acétyl muramique en se liant par une liaison covalente à un résidu cystéine de la pyruvyl transférase. Pour atteindre sa cible dans le cytoplasme, la fosfomycine doit franchir la membrane cytoplasmique en empruntant deux systèmes de transport : le système L- $\alpha$ -glycérophosphate et celui des hexoses phosphates (**Lavigne., 2007**).

#### 2.4.1.3. Cyclosérine

Elle présente une analogie de structure avec la D-alanine, inhibe la racémase transformant la L-alanine en D-alanine et la D – alanyl – D - alanine synthétase. Sous l'effet de cet agent antimicrobien très toxique, il se produit une accumulation d'UDP-N- acétyl muramyl-tripeptide (**Berch. P et al., 1991**).

#### 2.4.1.4. Glycopeptides

Ces antibiotiques sont bactéricides, avec une grande affinité vis-à-vis les précurseurs du peptidoglycane comportant le dipeptide D –alanyl – D –alanine. Leurs cibles sont donc situées soit dans le cytoplasme, soit au niveau de la paroi en formation. Chez les bactéries à Gram négatif, aucune cible n'est atteinte à cause de l'imperméabilité de leur membrane pour ces molécules, contrairement aux bactéries à Gram positif. En revanche, ces antibiotiques ne peuvent franchir la membrane cytoplasmique de ces derniers et leur action s'exerce sur la paroi en formation. Les glycopeptides forment un complexe avec les dipeptides D-alanyl-Dalanine présents dans la paroi en formation, ce qui conduit à l'inhibition des transglycosylases et des transpeptidases. Par ailleurs, l'élongation de la paroi et la croissance bactérienne est inhibée (**Lavigne., 2007**).

#### 2.4.1.5. Bacitracine

Cette molécule est inactive sur les bactéries à Gram négatif grâce au mécanisme d'imperméabilité membranaire. Chez les bactéries à Gram positif, forme un complexe irréversible avec l'un décaprényl – pyrophosphate et inhibe sa déphosphorylation (**Berche *et al.*, 1991**).

#### 2.4.2. Antibiotiques agissant sur les membranes

##### 2.4.2.1. Polymyxines

Ces agents antimicrobiens sont constitués d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Ils pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique grâce à leur extrémité hydrophobe, ce qui induit une désorganisation de la structure membranaire et entraîne la mort de la cellule. Ces molécules sont très actives sur les bactéries à Gram négatif (**Berche *et al.*, 1991**).

#### 2.4.3. Antibiotiques actifs sur l'ADN

##### 2.4.3.1. Inhibition de la réplication

###### 2.4.3.1.1. Quinolones

Ces molécules inhibent la synthèse de l'ADN par action sur les topo - isomérases bactériennes. Ils franchissent la paroi des bactéries à Gram négatif grâce aux porines et pénètrent à l'intérieur de la cellule par diffusion passive. Leurs cibles sont l'ADN- gyrase (topo - isomérase II) et la topo - isomérase IV. L'ADN gyrase est composée de deux sous-unités A (codées par le gène *gyrA*) et de deux sous unités B (codées par le gène *gyrB*). Le site catalytique de l'ADN gyrase est centré sur la tyrosine en position 122 de la sous unité A. La sous unité B comprend un site d'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à l'activité enzymatique. L'ADN gyrase intervient au moment de la réplication de la double hélice, en produisant des coupures et des ligations au niveau des brins d'ADN ce qui permet la progression de la fourche de réplication. Au moment de la coupure, l'ADN et l'enzyme (gyrase) sont transitoirement liés de manière covalente (sous forme de complexe). Les quinolones agissent sur ce dernier en formant un autre complexe irréversible (enzyme– antibiotique). Ainsi, les brèches au niveau des brins d'ADN ne peuvent être soudées et l'ADN bactérien reste sous forme de fragments. Ces antibiotiques agissent aussi sur la topo-isomérase IV qui intervient lors de la

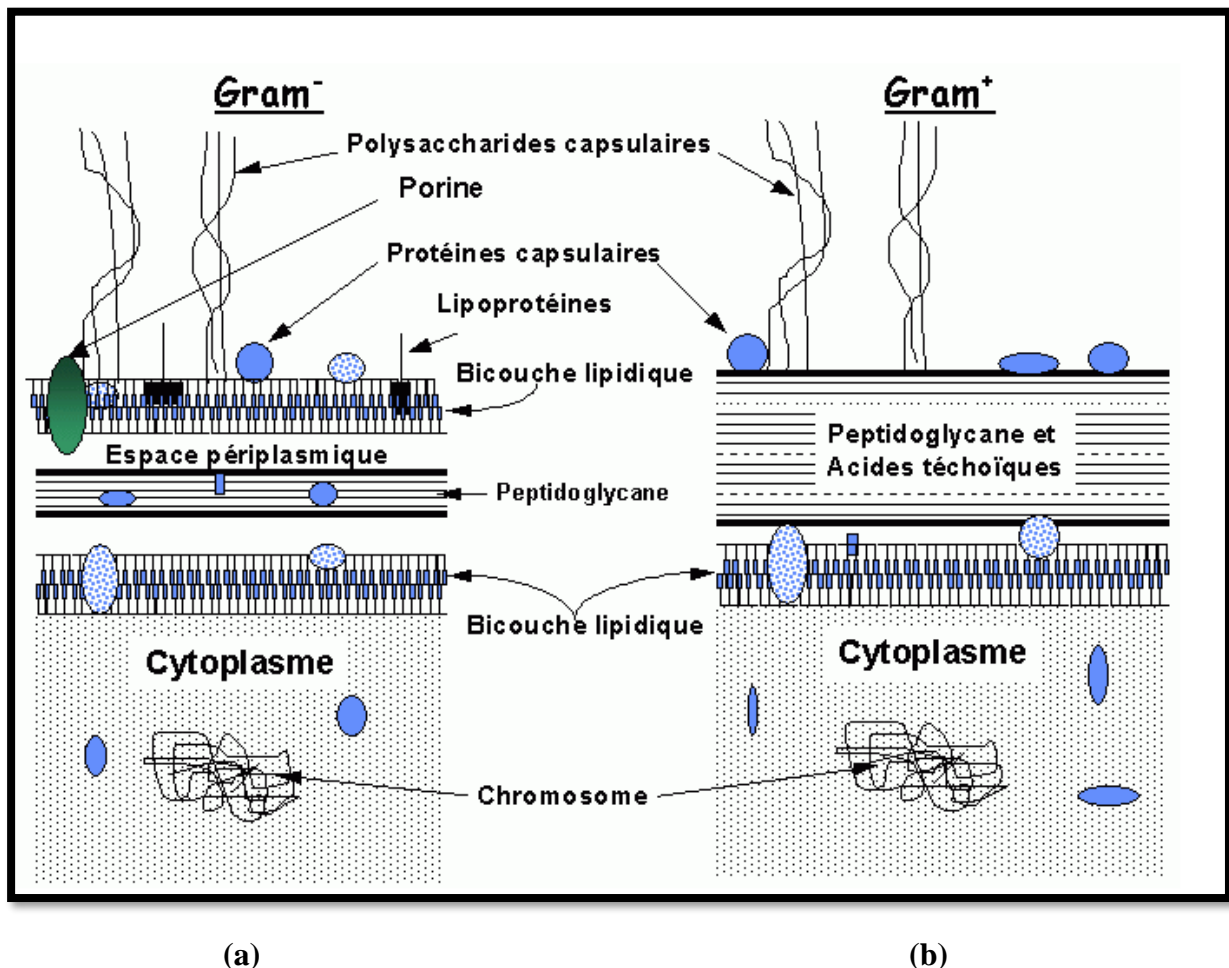
séparation des copies d'ADN circulaires présentes après répllication. Ils inhibent aussi la transcription (Berche *et al.*, 1991).

#### 2.4.3.1.2. Nitrofuranes

Ces agents antibactériens ne peuvent fonctionner correctement qu'après une réduction de leur groupement NO<sub>2</sub>. Ils induisent des coupures et des mutations dans l'ADN (Benmalek., 2008).

#### 2.4.3.1.3. Novobiocine

Cet antibiotique est actif surtout sur les bactéries à Gram positif. Elle inhibe la réplication de l'ADN en empêchant la fixation d'ATP sur la sous unité B de l'ADN-gyrase (Benmalek., 2008).



**Figure 2.3:** Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b) (Bisognano., 2001).

### 2.4.3.2. Inhibition de la transcription

#### 2.4.3.2.1. Rifampicines

Ces molécules sont bactéricides. Cet effet serait lié à l'oxydation in vivo du site quinone de la molécule ce qui formerait des ions super oxydes et des radicaux libres toxiques pour l'ADN bactérien. Elles se fixent sur la sous unité de l'ARN polymérase et empêchent l'initiation de la synthèse des ARN m (Lavigne., 2007).

### 2.4.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines

La traduction des ARN m en protéines se fait au niveau des ribosomes et peut se décomposer en trois étapes : initiation, élongation, terminaison (Lavigne., 2007).

-Première étape (initiation)

Au cours de l'initiation, la sous unité ribosomale 30S et le complexe formyl – méthionine - ARNt se fixent au site d'initiation AUG de la molécule d'ARNm. Trois protéines et des facteurs d'initiation sont nécessaires pour cette étape. Par la suite, la sous unité ribosome male 50S se lie à ce complexe d'initiation pour former le ribosome 70S. (Lavigne., 2007)

-Deuxième étapes (élongation)

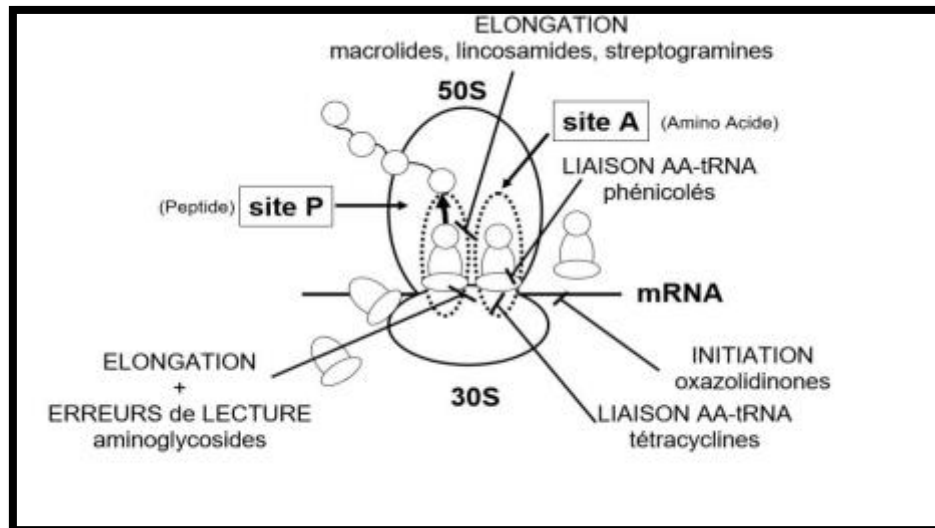
Durant l'élongation, on aura incorporation séquentielle des acides aminés spécifiques. Cette étape peut être divisée en trois phase différentes à savoir: reconnaissance, transfert peptidique et translocation. (Lavigne., 2007)

-La reconnaissance : Pendant cette phase, une molécule d'acide aminé ARNt se fixe sur le site A (aminoacyl) du ribosome.

-Le transfert peptidique : Transfert du peptide en formation du site P (peptidyl) au site A et formation d'une liaison peptidique avec l'acide aminé du site A ce qui conduit à l'élongation de la chaîne peptidique.

-La translocation : Cette phase fait intervenir trois protéines connues sous le nom de facteurs d'élongation. Son but est de transporté le peptide au site P.

L'incorporation des acides aminés se répète jusqu'à ce qu'un codon de terminaison soit reconnu sur l'ARN m. A l'aide de trois protéines accessoires spécifiques, on aura libération du peptide, séparation du ribosome et de l'ARN m et la dissociation du ribosome en ses deux sous unités. L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la synthèse des protéines est exercé surtout sur la sous unité ribosomale 30S ou 50S, parfois les deux à la fois (Figure 2.4) (Lavigne., 2007).



**Figure 2.4:** Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines (Freney *et al.*, 2007).

#### 2.4.4.1. Aminocyclitol

Ce sont des antibiotiques bactéricides. Pour atteindre leurs cibles dans le cytoplasme, ils franchissent l'enveloppe externe à l'aide des porines, puis la membrane cytoplasmique par le biais d'un système de transport d'électron et d'oxygène comme accepteur final. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces agents se fixent sur la sous unité 30S et provoquent des erreurs de reconnaissance codons – anti codons et l'incorporation d'acides aminés erronés dans la chaîne peptidique en formation. D'autre part, ils empêchent la fixation du facteur F3 qui en fin de synthèse provoque la dissociation du ribosome en ses deux sous unités. De ce fait, les ribosomes sont incapables de s'unir à de nouveaux ARN m. Certains aminocyclitols se fixent à la fois sur la sous unité 30S et 50S du ribosome (Berche *et al.*, 1991).

#### 2.4.4.2. Tétracyclines

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre. Pour exercer leur effet inhibiteur, traverse la membrane externe grâce aux porines, puis la membrane cytoplasmique

soit par diffusion passive, soit par des systèmes de transport actif. Ces molécules se fixent sur les ribosomes au niveau du site A par liaison avec les protéines de la sous unité 30S. De ce fait, l'aminoacyl-ARNt sera inhibé et la phase de reconnaissance au cours de l'étape d'élongation de la chaîne peptidique sera bloquée (**Berche et al., 1991**).

#### 2.4.4.3. Macrolides et apparentés

Les L MS sont des antibiotiques lipophiles, constitués par un noyau central lactonique composé de 12 à 16 atomes sur lesquels sont fixés des sucres. Ces molécules et d'autres sont actifs surtout sur les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif. Ils inhibent la synthèse des protéines en se fixant de façon réversible sur la sous unités 50S, notamment au niveau de l'ARN ribosome mal 23S, au voisinage du site P. Ceci, inhibe l'élongation du peptide en cours de synthèse par blocage des étapes de transfert peptidique ou de translocation. Certains agents antibactériens de ce groupe inhibent la synthèse des protéines par inhibition de la formation des liaisons peptidiques (**Berche et al., 1991**).

##### 2.4.4.1.4. Phénicolés

Ces antibiotiques s'attachent à la sous unité ribosome male 50S préférentiellement sur le site A, en empêchant l'attachement des amino - acyl A R Nt et inhibent la formation des liaisons peptidiques (peptidyl transférase) et enfin l'élongation de la chaîne. Ils sont bactériostatiques et actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Lavigne., 2007; Berche et al., 1991**).

##### 2.4.4.1.5. Acide fusidique

C'est un antibiotique de nature stéroïdique. Il est hydrophobe et actif uniquement sur les bactéries à Gram positif. Il intervient au cours de la translocation et inhibe l'élongation du peptide en immobilisant le complexe ribosome- facteur d'élongation qui doit normalement se dissocier juste après la translocation du peptide. (**Benmalek., 2008**)

#### 2.4.5. Antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire

##### 2.4.5.1. Sulfamides

Médicaments chimiques préparés par synthèse et caractérisés par un groupement soufré et aminé (SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), dénommé groupement sulfonamide, par analogie avec le groupement amide (CONH<sub>2</sub>). Les sulfonamides fournissent à la thérapeutique trois familles de médica-

ments : des antiseptiques chlorés comme par exemple le, chloramine-T, des hypoglycémiant, utilisés dans le traitement du diabète sucré et enfin, des antimicrobiens. C'est cette dernière propriété que nous allons exploiter. Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques. Ils inhibent la croissance et la reproduction des bactéries sans pour autant les tuer (Boughoual., 2018).

Ces antibiotiques présentent une structure proche de l'acide para amino benzoïque PABA Cet acide est le précurseur de l'acide folique, acide responsable de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, base indispensable à la synthèse de L'ADN des bactéries. Les sulfonamides vont inhiber la dihydroptéase synthétase (DHPS), enzyme responsable de la synthèse de l'acide folique en mimant l'action de la PABA, ce qui explique l'arrêt de la croissance bactérienne. (Boughoual., 2018)

## 2.5. Origine de la résistance bactérienne

La résistance aux antibiotiques est un phénomène général observé pour toutes les espèces bactériennes rencontrées chez l'homme et l'animal : c'est la capacité pour une souche bactérienne de croître en présence d'une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la croissance de la majorité des souches appartenant à la même espèce. Plusieurs études ont montré que l'apparition de la résistance est associée d'une part, à la surconsommation d'antibiotiques et d'autre part à des traitements trop courts ou trop longs ou parfois mal dosés (Boughoual., 2018).

La résistance des bactéries aux différents agents antimicrobiens peut être naturelle (intrinsèque) ou acquise. (Benmalek., 2008).

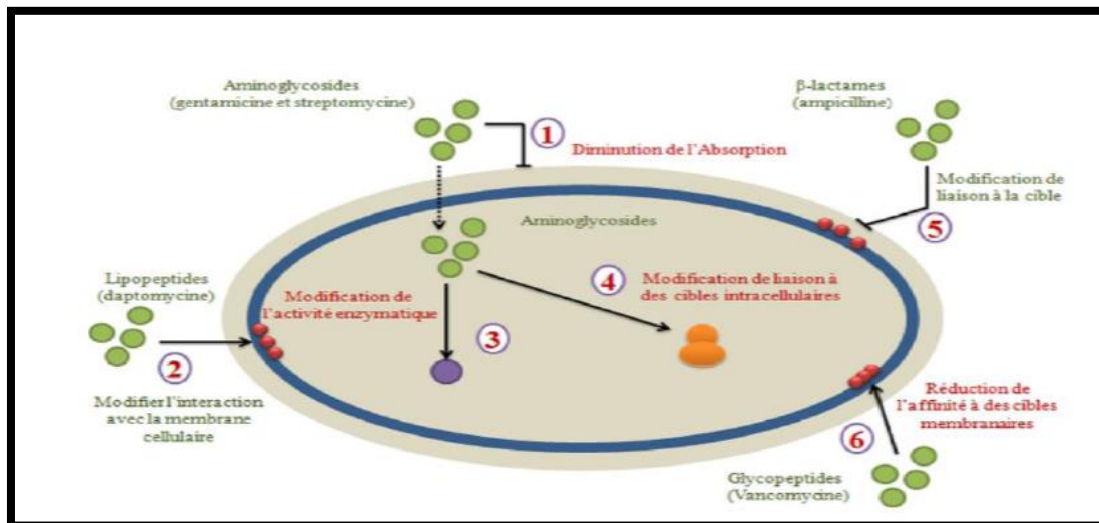
### 2.5.1. Résistance naturelle

Si les antibiotiques, molécules naturelles, sont synthétisés par la plupart des microorganismes pour supplanter d'autres micro-organismes dans un environnement donné, ces substances peuvent ne pas être actives sur tous les micro-organismes. On dira que ces micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule la résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce. Par exemple, les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber le peptidoglycane de la membrane. Les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe. (Boughoual., 2018).

### 2.5.2. Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. L'acquisition d'une résistance vis-à-vis des antibiotiques résulte de deux types de mécanismes génétiques :

- Mutation chromosomique, affectant le chromosome, elle est rare, spontanée stable, indépendante de l'antibiotique.
- Plasmidique : les plasmides naturels ont généralement un certain nombre de gènes et en particulier des gènes de résistances à des antibiotiques, ainsi que des gènes de transfert permettant le passage du plasmide d'une bactérie à une autre. Ce transfert s'effectue en général par conjugaison. (Boughoual., 2018).



**Figure 2.5:** Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyaha *et al.*, 2017).

### 2.6. Mécanismes biochimiques de la résistance

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques par imperméabilité membranaire, inactivation enzymatique ou modification de la structure de leurs cibles (Courvalin *et al.*, 1985 ; Lavigne., 2007).

#### 2.6.1. Imperméabilité membranaire

##### 2.6.1.1. Diminution de perméabilité de la membrane externe

Elle empêche la pénétration de l'antibiotique ou limite sa concentration dans l'espace périplasmique, et résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou dimi-

nuant leur synthèse. Il a été démontré que l'acquisition d'une multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif est due à un dysfonctionnement ou à la perte de l'une des majeurs porines (Omp ou Opr), qui constituent des canaux aqueux ou hydrophiles composés de trois protéines laissant diffuser diverses molécules de faibles poids moléculaires (**Lavigne., 2007**). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, elle résulte de la perte de la porine OprD qui affecte principalement l'imipénème, par contre chez *Escherichia coli* est liée à la perte des porines OmpC et OmpA (**Nikaido et Vaara., 1985 ; Mesaros et al., 2007**).

### 2.6.1.2. Systèmes efflux actifs

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportation active à l'aide des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces dernières sont énergie dépendante et interfèrent avec les mécanismes de transport de type imperméabilité (**Lavigne., 2007**). Ces deux mécanismes associés constituent les principaux mécanismes de la résistance intrinsèque élevée des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens. Les systèmes d'efflux se distinguent surtout par une structure tripartite composée d'une pompe transmembranaire, une protéine de fusion périplasmique et une porine de la membrane externe. Parmi les systèmes d'efflux actifs décrits chez les bactéries à Gram négatif, le transporteur AcrAB - OprA responsable de la résistance aux aminoglycosides et aux macrolides chez *Burkholderia pseudomallei*, MexXY qui assure l'extrusion des lactamines, des aminoglycosides, de la tétracycline et de l'érythromycine chez *Pseudomonas aeruginosa* et AcrAB/TolC d'*Escherichia coli* (**Magnet et al., 2001 ; Cattoir., 2004 ; Mesaros et al., 2007**).

### 2.6.2. Modification de la cible des antibiotiques

Ce mécanisme de résistance confère aux bactéries la résistance à un grand nombre d'antibiotique de familles différentes. La modification des PLP (protéines liant les pénicillines), fréquemment rencontrée chez les bactéries à Gram positif est due à une mutation spontanée qui survient dans les gènes chromosomiques codant les PLP normales, ce qui conduit à la modification de la structure de ces protéines (affinité diminuée) tel que le cas de la PLP2a de *Staphylococcus aureus* résistante à toutes les lactamines, et la PLP2x de *Streptococcus pneumoniae* (diminution de la sensibilité aux pénicillines) (**Lavigne., 2007**). Elle peut aussi être due à l'acquisition de gènes codant pour des variants de PLP qui présente une faible affinité pour les -lactamines par un transfert horizontal (transformation) (**Brisou et al., 2004**).

### 2.6.3. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques

L'inactivation enzymatique des antibiotiques (beta - lactamines, aminosides, pénicillins, ... ..), est le mécanisme de résistance le plus souvent observé chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces enzymes ont une localisation intracellulaire ou extracellulaire, de nature constitutive ou inducible, codés par des gènes chromosomiques ou extra chromosomique (plasmides, transposons et intégrons). L'exemple le mieux connu est celui des - lactamases responsables de l'hydrolyse du noyau lactame des antibiotiques de la famille des lactamines, ce qui confèrent la résistance bactérienne vis-à-vis ces agents antimicrobiens. Selon des études récentes, plus de 350 - lactamases ont été identifiées (**Babic *et al.*, 2006 ; Lavigne., 2007**)

**Tableau 2.1:** Mécanismes de résistances aux antibiotiques (**Carle., 2009**).

Mécanismes de résistances	Conséquences
<b>Inhibition enzymatique</b>	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; mécanisme le plus répandu.
<b>Réduction de la perméabilité cellulaire</b>	Changement de perméabilité empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
<b>Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique</b>	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
<b>Pompes à efflux</b>	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif.

---

## *Chapitre 3*

# *Chimie de ferrocène*

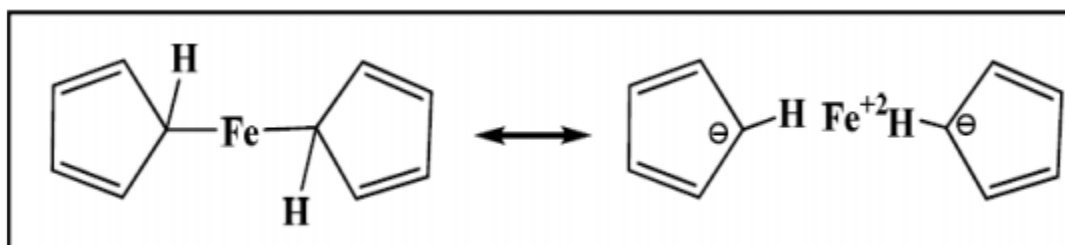
---

### 3.1. Historique des ferrocènes

Les composés organométalliques peuvent être définis comme des composés dans lesquels il existe au moins une liaison métal-carbone; Plus généralement, la chimie organométallique concerne les transformations des composés organiques par des métaux (**Bechki et al., 2013**). La chimie des organométalliques est restée pour une grande période, un champ d'investigation limité, à cause de l'instabilité des composés contenant des liaisons métal-carbone synthétisés par les premiers chimistes. Malgré cet obstacle d'instabilité des organométalliques, les recherches ont continué grâce à plusieurs savants comme Werner, Victor Grignard, Sabastier, qui ont préparé des composés organométalliques, mais la grande évolution de la chimie organométallique se produisit au troisième quart du XX<sup>ème</sup> siècle à la suite de la découverte du ferrocène(**Boukebbous., 2009**). La chimie des métaux de transition était maîtrisée par les chimistes allemands avant la deuxième guerre mondiale. Cette discipline a été transférée aux anglais et aux américains après la deuxième guerre mondiale. En 1951, Kealy et Pauson ont publié pour la première fois dans un article célèbre au journal Nature, la synthèse de bis(cyclopentadiényl)fer ou ferrocène(**Kealy et Pauson., 1951**). Ils ont essayé de préparer le dihydrofulvalène par oxydation d'un réactif de Grignard de cyclopentadiényle suivant par l'équation suivante. Le composé obtenu à partir de cette réaction était un produit orange et thermiquement très stable (**Henni., 2017**).

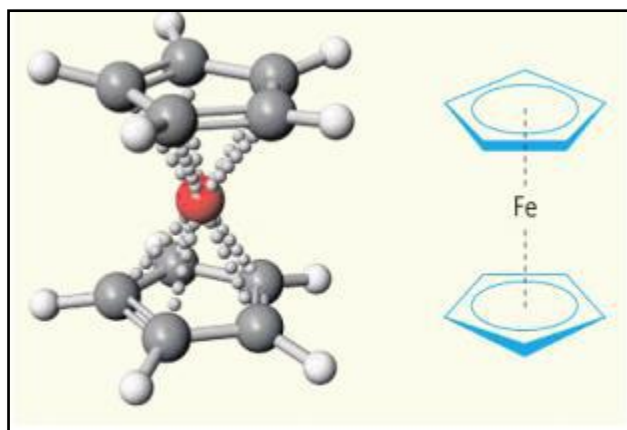


La structure proposée par Pauson pour ce composé a une forme de résonance dans laquelle le fer est lié au cyclopentadiényle par une liaison sigma avec une formule ionique canonique comme le montre le schéma suivant :



**Figure 3-1:**Structure de résonance proposée par (**Kealy et Pauson., 1951**).

Alors que la formule correcte de complexe  $\pi$  (fer lié aux cinq carbones de chaque cycle), ne fut établie que l'année suivante par Wilkinson et Woodward. Indépendamment, Ernst Otto Fischer à Munich arriva à la même conclusion. La structure du ferrocène fut ensuite confirmée par spectroscopie de RMN et cristallographie aux rayons X (Boukebbous., 2009).



**Figure 3.2:** Structure correcte de ferrocène (Woodward *et al.*, 1952).

Les recherches sur la synthèse, les structures et les propriétés des dérivés du ferrocène ont été continuellement actives au cours des dernières décennies. De nombreux dérivés ferrocéniques ont été synthétisés et leurs propriétés et applications ont été étudiées à fond, ce qui a favorisé le développement de la théorie de la liaison chimique et de la chimie structurale (Yong-Hua., 2007).

### 3.2. Définition du ferrocène

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



**Figure 3.3:** Ferrocène sous forme de poudre orange.

### I.3.3. Liaisons et structures électroniques du ferrocène

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

Le ferrocène est de loin le plus stable des 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  $\pi$  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 et Lassoued., 2015).

### I.3.4. 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<sup>-</sup> en solvatant très efficacement le contre ion Na<sup>+</sup>. Une amine suffisamment basique comme le diéthylamine peut être utilisée pour former l'ion cyclopentadiényle à partir du cyclopentadiène (Khalef., 2012).

### I.3.5. Réactivité

Les ferrocènes substitués peuvent être préparés directement ou indirectement. Dans la préparation indirecte, la molécule de ferrocène est utilisée comme un point de départ pour la synthèse des autres dérivés ferrocéniques, tandis que dans la synthèse directe, le ferrocène substitué est préparé par la réaction d'un composé dérivé de cyclopentadiène convenablement substitué avec le fer par des méthodes semblables à celles utilisées pour la préparation du ferrocène lui-même. Seulement, les bases fortes telles que le réactif de Grignard, les organolithiums, les réactifs de lithium ou de sodium, peuvent donner de bons rendements de dérivés ferrocéniques à partir de cyclopentadiène substitués (Sheldrick., 1998).

#### I.3.5.1. Réaction de substitution

L'atome de fer qui se lie avec les radicaux cyclopentadiényles, a une influence directe sur les propriétés chimiques de ferrocène et sur le mécanisme de la substitution. On suppose

que les substitutions électrophiles se produisent selon un processus réactionnel général, au cours duquel le groupement électrophile réagit d'abord avec l'atome de fer pour donner un intermédiaire cationique  $\pi$ -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 et Houas., 2013**).

### I.3.5.2. Acylation

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

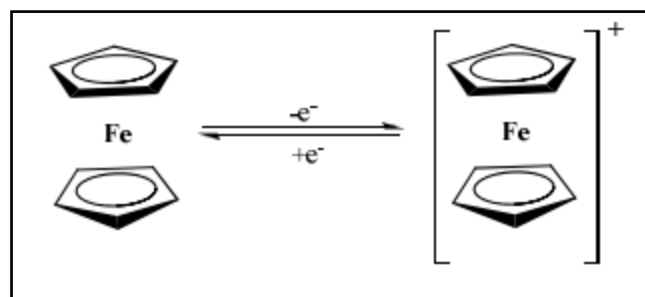
### I.3.6. Propriétés du ferrocène

#### I.3.6.1. Propriétés physicochimiques

Le ferrocène est un solide cristalin orange de masse molaire 186,04 g.mole<sup>-1</sup>, 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.3.6.2. 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 3.4 :** 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 voltamogramme de ferrocène montrent que le processus d'oxydo-réduction se fait d'une façon rapide, réversible et monoélectronique(Bechki., 2012).

### I.3.6.3. Propriétés spectrales

#### I.3.6.3.1. Infrarouge

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

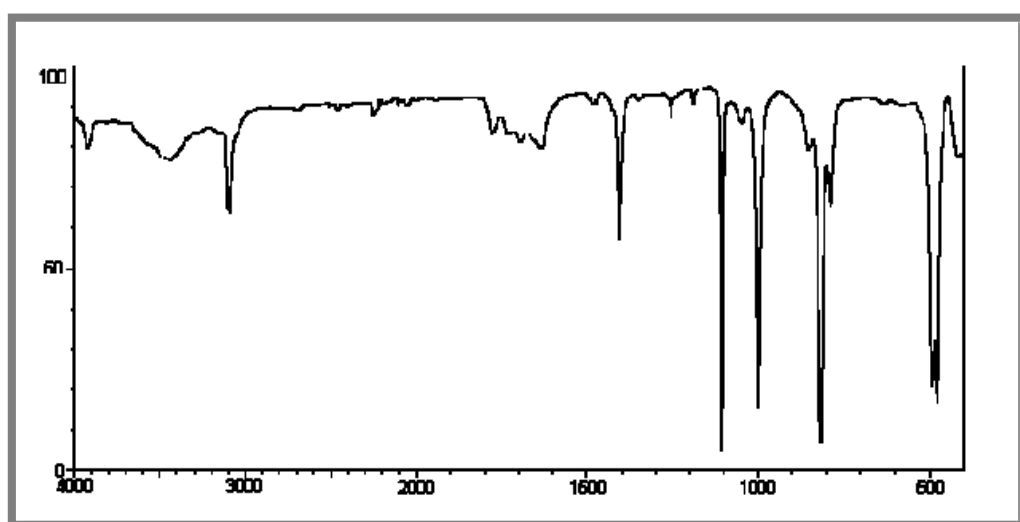


Figure 3.5: Spectre IR de ferrocène (Khalef., 2014).

### I.3.6.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire RMN

#### ❖ RMN 1H

Le spectre RMN 1H de la molécule de ferrocène est très simple, il présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4.15 ppm.

#### ❖ RMN 13C

De même le spectre RMN 13C de la ferrocène présente un seul pic à 68 ppm correspond aux dix atomes de carbone de deux cycles de cyclopentadiényles (Mahmoudi et Nemsii., 2009).

### I.3.6.3.3. Structure Cristalline

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

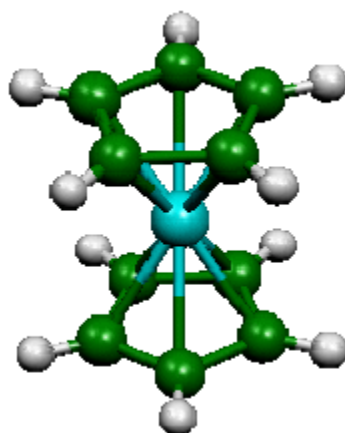


Figure 3.6: Structure cristalline de ferrocène (Kopp., 2010).

### I.3.7. 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, clivage 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.3.7.1. Activité anti-oxydants**

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 ferrocé-necarboxyamides 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 (**Khalef et Lanez., 2015**).

#### **I.3.7.2. Antibactériennes**

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

#### **I.3.7.3. 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.3.7.4. Activité anti-cancéreuse**

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

#### I.3.7.5. Activité anti-Toxoplasmose

L'atovaquone est une molécule utilisée dans le traitement de la toxoplasmose. En raison de problèmes d'intolérance, de concentrations et d'effets secondaires de l'atovaquone, des recherches sur de nouvelles molécules restent nécessaires. Des tests biologiques à partir des homologues ferrocéniques de l'atovaquone ont été réalisés. Trois de ces dérivés ferrocéniques, possédant une chaîne alkyle de 6 à 8 carbones en R<sub>2</sub>, se sont révélés actifs sur des souches Toxoplasmas. De plus, ces nouveaux composés sont particulièrement efficaces sur des souches résistantes à l'Atovaquone (Barameea *et al.*, 2006).

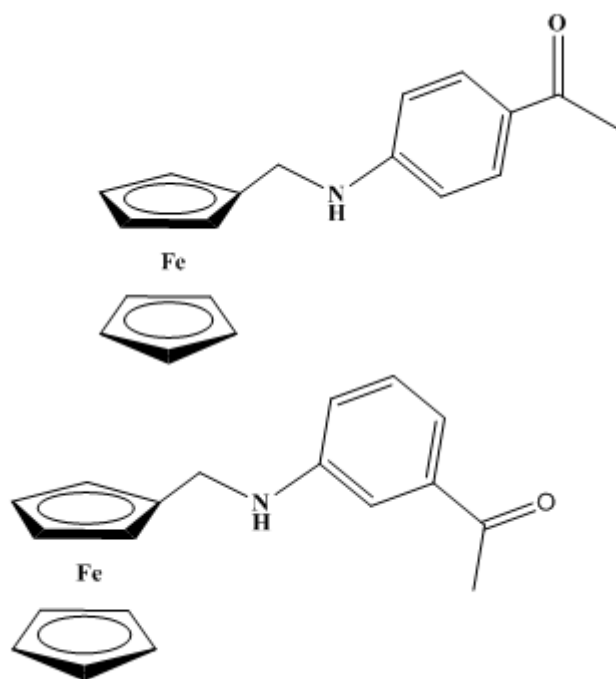
#### I.3.7.6. Activité antivirale

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

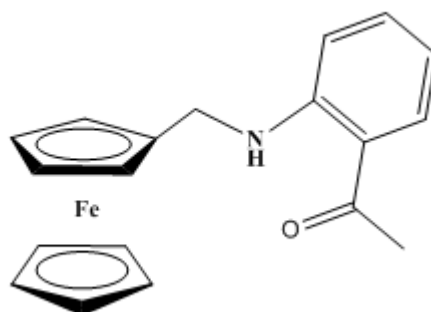
#### I.3.8. Dérivé ferrocénique étudié

N-ferrocenylmethylaminoacetophenone :

La synthèse du N-ferrocenylméthyl-2-aminoacétophénone (Fc2A), N-ferrocenylmethyl-3-aminoacétophénone (Fc3A) et N-ferrocenylmethyl-4-aminoacétophénone (Fc4A) a été obtenu à partir du sel quaternaire triméthylferrocéyliodure de méthylammonium bien connu et d'un excès de aminoacétophénone dans le rapport molaire 1/1,5 dans l'ébullition l'eau et la durée de la réaction a été de quatre heures. Le précipité jaune a été séparé par filtration, lavé avec de l'eau pour éliminer toute trace inchangée du sel d'ammonium quaternaire et finalement recristallisé dans 90% éthanol/eau pour produire 77% (LANEZ., 2016). Les structures chimiques des dérivés étudiés sont présentées dans la figure suivante :



**Figure 3.7** :N-ferrocenylmethyl-4-aminoacetophenoneN-ferrocenylmethyl-3-aminoacetophenone.



**Figure 3.8** : ferrocenylmethyl-2-aminoacetophenone.

---

## *Chapitre 4*

# *Contexte théorique des techniques expérimentales utilisées*

---



### I.4.1. Spectroscopie électronique

La spectroscopie électronique, plus communément appelée la spectroscopie d'absorption dans ultraviolet et le visible (UV-Vis), est une des méthodes spectroscopiques les plus efficaces pour caractériser les interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée (**Persons et Mulliken., 1969**).

La spectroscopie électronique présente beaucoup d'avantages, est non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en analyse quantitative (après construction d'une droite d'étalonnage et report d'une mesure expérimentale) ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. On peut citer par exemple le dosage des ions nitrates dans les eaux de piscine (après adjonction d'un additif formant un complexe colore) ou la détermination de la pureté de l'ADN et de certaines protéines après leur extraction. D'autres applications sont connues pour le contrôle qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires (**Boeyens., 1967**).

### I.4.2. Règles de sélection

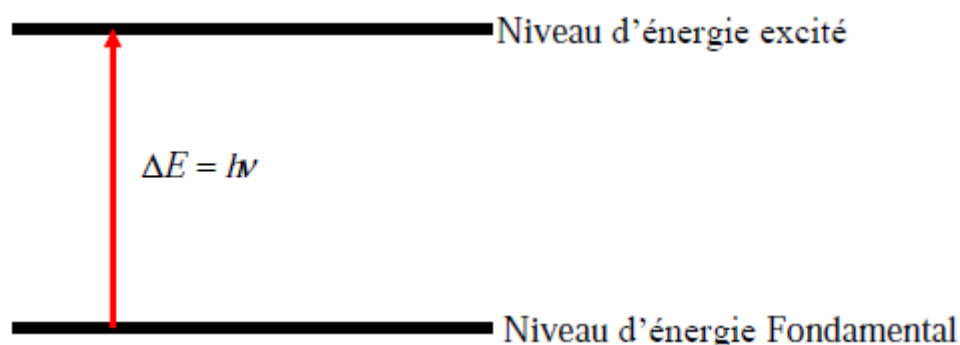
Une molécule absorbera une radiation de fréquence  $\nu$  s'il existe des transitions nécessitant une énergie  $\Delta E$  donnée par la relation suivante :

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

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

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

Lorsqu'elle a lieu, la matière absorbe un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises (**Boeyens.,1967**).



**Figure 4.1 :** Excitation d'électrons de valence suite à l'absorption d'un rayonnement dans le domaine de l'UV-Visible.

Les règles de sélection déterminent si une transition est permise (active) ou interdite (inactive). Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. De plus, une transition permise a lieu si les orbitales impliquées au cours de ce processus sont telles que  $\Delta l = \pm 1$  et  $\Delta S = 0$ . En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron (**Boeyens., 1967**).

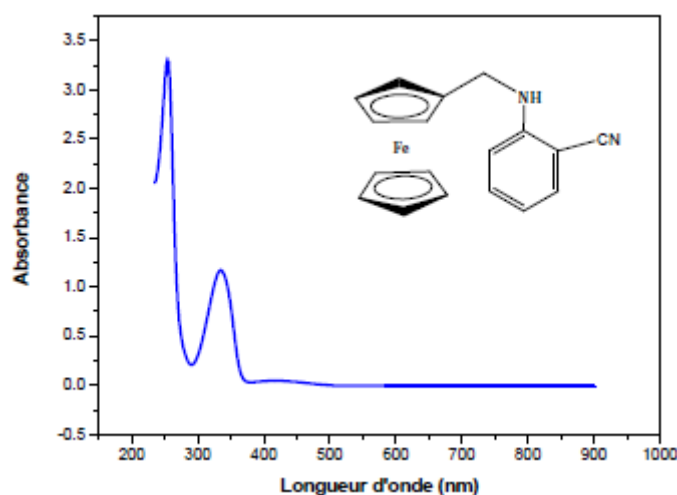
La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon (via l'ordre de grandeur de  $\lambda_{\max}$  et  $\varepsilon_{\max}$ ) et de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce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

### I.4.3. Principe de la spectroscopie UV – Visible :

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

#### I.4.3.1. Etude spectrophotométriques en UV-Visible

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



**Figure 4.2** : Spectre électronique du dérivé 2-(ferrocenylmethylamino)benzonitrile dans l'acétonitrile

On remarque que le spectre de la figure 4.2 est constitué de bandes larges, et non de pics. De nombreuses transitions énergétiquement proches sont donc réalisées. Or si les transitions électroniques sont bien responsables de ces absorptions, les sous-structures vibrationnelles et rotationnelles, au sein d'un même niveau électronique, peuvent conduire à des transitions énergétiquement du même ordre de grandeur, partant et aboutissant aux mêmes niveaux électroniques mais mettant en jeu des niveaux vibrationnels et rotationnels différents. Différents rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes légèrement différentes conduisent alors à différentes transitions énergétiquement très proches et ainsi à des bandes d'absorption.

L'analyse d'un tel spectre mène à la détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$ . Dans l'exemple précédent, celle-ci est de 334 nm. Cependant, la donnée d'une telle longueur d'onde ne renseigne pas sur l'intensité de l'absorbance. Une donnée intensive et quantitative est nécessaire. Celle-ci est fournie par la loi de Beer-Lambert : pour une solution contenant une unique solution absorbante : **(Boeyens., 1967)**.

$$A = \varepsilon l C$$

Avec la largeur de la cuve contenant l'échantillon (donc la longueur du chemin optique),  $C$  la concentration molaire de l'échantillon et  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire (exprimé usuellement en  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  si  $l$  est exprimée en cm). Cette loi est valable pour les solutions transparentes, peu concentrées et dans ces conditions elle est également additive. Ainsi, la relation de linéarité est valide tant que l'absorbance garde des valeurs faibles.

La relation de Beer-Lambert donne donc accès au coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$  qui caractérise l'absorption de l'édifice dans les conditions de l'expérience. Ainsi, il dépend de la température, de l'édifice et du solvant dans lequel est enregistré le spectre. En se plaçant à la

longueur d'onde du maximum d'absorption, les coefficients  $\epsilon_{\max}$  peut être calculé. La donnée de ces deux grandeurs ( $\lambda_{\max}$ ,  $\epsilon_{\max}$ ) est caractéristique de l'absorption d'un édifice dans des conditions expérimentales données, mais ne dépend pas de l'appareil utilisé (Boeyens., 1967).

#### I.4.3.2. Analyse de l'absorption :

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

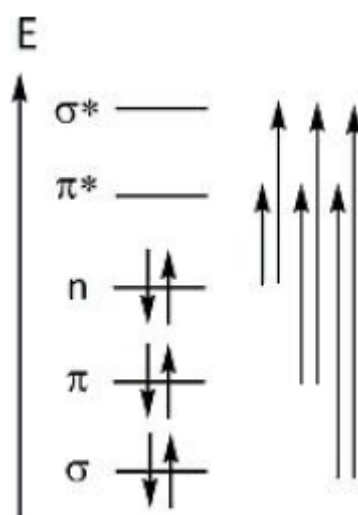


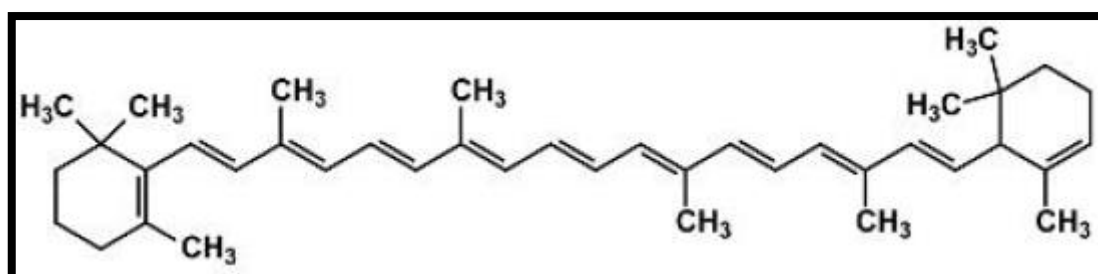
Figure 4.3: Schéma de l'ordre relatif des niveaux électroniques

De nombreuses transitions sont donc possibles mais seules celles de plus faibles énergies conduisent à une absorption dans l'UV-Visible. La nature  $\sigma$  ou  $\pi$  des niveaux implique reflètent la nature du groupe fonctionnel présent dans l'édifice. Certaines fonctions organiques provoqueront donc une absorption, ce sont des chromophores. L'enregistrement d'un spectre UV-Visible peut donc, à l'instar de la spectroscopie Infrarouge, conduire à l'identification des fonctions présentes dans une molécule organique. Les ordres de grandeurs de nombreux chromophores caractéristiques sont tabulés :

**Tableau 4.1 :** Ordres de grandeurs de quelques chromophores

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

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



**Figure4.4.:** Schéma de Structure de  $\beta$ -carotène.

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

Dans le cas des complexes des métaux de transitions, les transitions électroniques sont réalisées entre orbitales d, dont la dégénérescence a été levée par les ligands. Il s'agit alors de transitions d-d, en général peu intenses et qui conduisent souvent à des absorptions dans le visible.

### I.4.4. Amarrage moléculaire

#### I.4.4.1. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques.(**Mezhoud., 2020**). Elle permet la régulation de certains processus, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques (**Chabbi et Nabti., 2017**). Etudier les détails de ces interactions, à l'échelle moléculaire grâce au Docking moléculaire, s'avère donc d'un très grand intérêt (**Bouchagra., 2018**).

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

#### I.4.4.2.Types du Docking moléculaire :

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

Le deuxième type est le docking semi-flexible qui est souvent utilisé pour l'amarrage protéine-ligand. Le ligand étant considéré comme flexible et la protéine gardée rigide. Cependant, certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité, subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand. Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats du docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier.

En revanche, la troisième classe qui est le docking flexible traite la flexibilité des deux molécules, mais la flexibilité permise reste limitée (El Hadj Said., 2016;Lebbad., 2016 ; Bouchagra., 2018).

#### I.4.4.2.1.Principes du docking moléculaire

Le docking peut être réalisé en deux étapes complémentaires : la première consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. La deuxième étape est celle du classement (scoring). Elle consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine, et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposé (El Hadj Said ,. 2016).

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

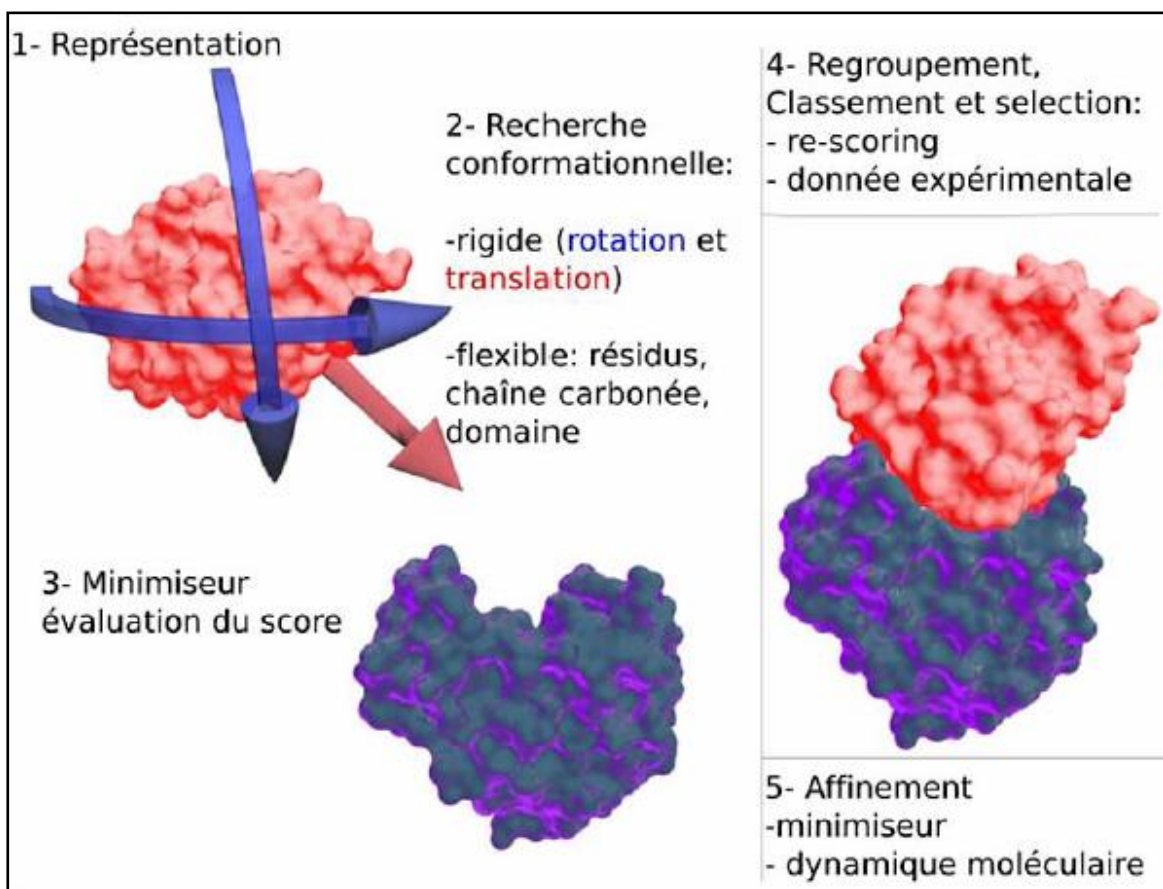


Figure 4.5:Schéma du protocole général de docking.

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

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

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

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative ( $\Delta G_{\text{complexation}} < 0$ ) (El Hadj Said., 2016).

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

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

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

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

### I.4.4.2. Applications du docking moléculaire

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

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

### I.4.4.2.3. Étapes du docking moléculaire :

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

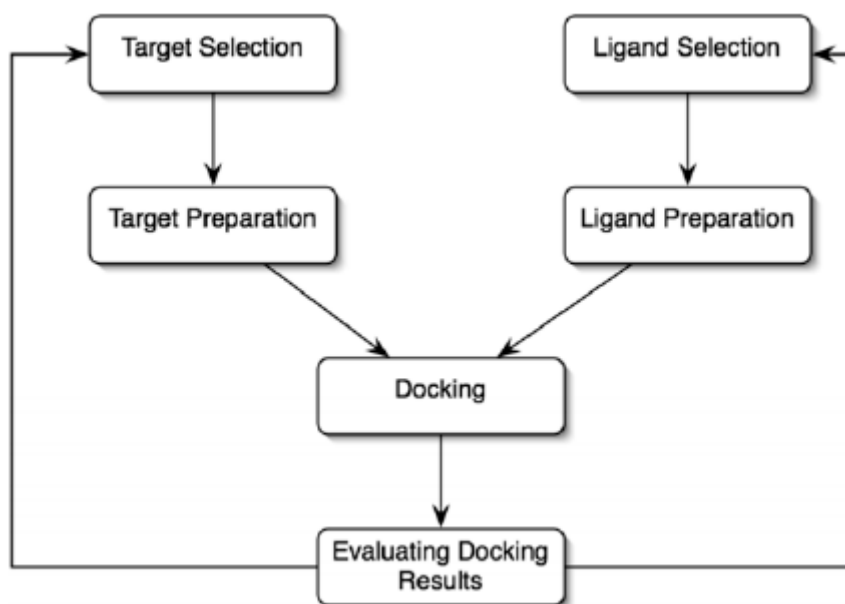


Figure 4.6. : étapes clés du docking moléculaire.

### I.4.4.2.4. Outils du docking moléculaire

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

#### a) Protéine

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

La PDB est une collection mondiale de données sur la structure 3D de macromolécules biologiques : protéines essentiellement et acides nucléiques. Ces structures sont principalement déterminées par cristallographie aux rayons X, microscopie électronique ou par la résonance magnétique nucléaire (RMN). En plus des structures 3D, on y retrouve également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée (**Ghouti et Halbigue., 2019**).

Ces données expérimentales appartiennent au domaine public et peuvent être consulté gratuitement depuis les sites internet de la banque (**Cavarelli., 2020**). Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée (**El Hadj Said., 2016**).

### *b) Ligand*

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

### *❖ Modélisation moléculaire*

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

La modélisation moléculaire est une application des méthodes théoriques et des méthodes de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisable rapidement ou au contraire elles peuvent être extrêmement complexes et demander des centaines d'heures de temps d'ordinateur, même sur un super-ordinateur. En plus, ces méthodes utilisent souvent des

moyens infographiques très sophistiqués qui facilitent grandement la transformation de quantités impressionnantes de nombres en quelques représentations graphiques facilement interprétables.

Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Si ceux de mécanique classique, économiques en termes de temps de calcul, permettent de traiter des systèmes moléculaires de grande taille, les méthodes quantiques (semi-empiriques ou théorie de la fonctionnelle de la densité) sont, quant à elles, capables de calculer les propriétés électroniques des systèmes. C'est pour cette raison que ces approches ont été employées dans le cadre de cette étude.

### ➤ Mécanique moléculaire (MM)

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

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

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

En particulier, la mécanique moléculaire permet l'étude d'une gamme étendue de propriétés en décrivant l'énergie d'un système par la somme d'une série de contributions rendant compte des interactions intra et intermoléculaire. Pour chacune des contributions, des pénalités énergétiques sont appliquées lorsqu'une variable (par exemple une longueur de liaison ou un angle

de valence) s'écarte de sa valeur de référence. L'ensemble de ces termes et des paramètres destinés à décrire chaque type d'atome rencontré constitue un champ de forces qui comporte généralement cinq contributions principales (**Bremner., 1998**).

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

Chacun de ces termes possédant une position d'équilibre préférentielle (longueur de liaison, angle de liaison...). La recherche de l'énergie minimale par optimisation de la géométrie joue un rôle primordial. L'énergie de la molécule est exprimée sous la forme d'une somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence. A cet égard, la mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type "tiges et boules", mais elle est beaucoup plus quantitative.

L'idée directrice de cette méthode est d'établir, par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique, le "champ de force", qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, il n'existe pas encore de modèle unique permettant de simuler tous les aspects du comportement moléculaire, mais un ensemble de modèles (**Magali., 2004**). Alors pour atteindre un minimum local sur la surface de potentiel dans un temps minimum, il faut représenter toutes les variations possibles de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire. Cependant, aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'obtention de la plus basse énergie : c'est-à-dire le minimum global ou absolu. Presque toutes les méthodes de minimisation ont un point en commun ; on commence à une droite donnée de l'hypersurface énergie-coordonnées et on accède au minimum local le plus proche.

### ➤ Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

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

➤ **Méthodes semi-empiriques**

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

c) **Programmes du docking :**

Les logiciels de docking moléculaire sont des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine (Mezhoud., 2020). A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (Commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont : Surflex, GOLD, FlexX, DOCK et AutoDock. Ils permettent un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques tel que : l'Algorithme génétique (GA), l'algorithme de Monte Carlo (MC) et l'Algorithme de construction incrémentale (IC)...etc, (Dias., 2008 ; Forli et al., 2016)

**Tableau 4.2 :** Principaux programmes de docking moléculaire, le nom de leur éditeur et le site Internet

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

Dans ce travail, nous avons utilisé le programme AutoDock qui est une suite de logiciels libres et gratuits utilisés pour le docking moléculaire) ( Forli et al., 2016). Dans ce logi-

ciel l'amarrage se base sur la simulation de trajectoire, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation. L'énergie d'interaction est calculée par une fonction énergétique. Les mouvements du cycle à venir sont guidés par les variations d'énergie induites par les mouvements des cycles précédents. L'algorithme s'arrête lorsqu'il a trouvé la position idéale du ligand dans le récepteur. Ces techniques prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes.

### I.4.4.3. Prédiction du paramètre bio-informatique :

#### I.4.4.3.1. Serveurs utilisés :

➤ **SwissADME :**

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



Figure 4.7: Page d'accueil du serveur SwissADME.

#### ➤ AdmetSAR

Le serveur de relations structure-activité ADMET, intitulé admetSAR, est une connaissance et un outil complets pour prédire les propriétés ADMET des médicaments candidats et des produits chimiques environnementaux. Dans notre serveur, plus de 200 000 points de données annotés ADMET pour environ 96 000 composés uniques ont été sélectionnés manuellement à partir de grandes littératures. Le serveur admetSAR fournit une interface conviviale pour rechercher facilement des profils chimiques, par CASRN, par nom commun et par recherche de similarité.

La nouvelle version d'admetSAR (version 2.0) se concentre principalement sur la prédiction in silico des propriétés chimiques d'ADMET. Plus de 40 modèles prédictifs ont été mis en œuvre dans admetSAR pour de nouvelles propriétés chimiques ADMET dans le filtrage silico (Cheng *et al.* , 2012).

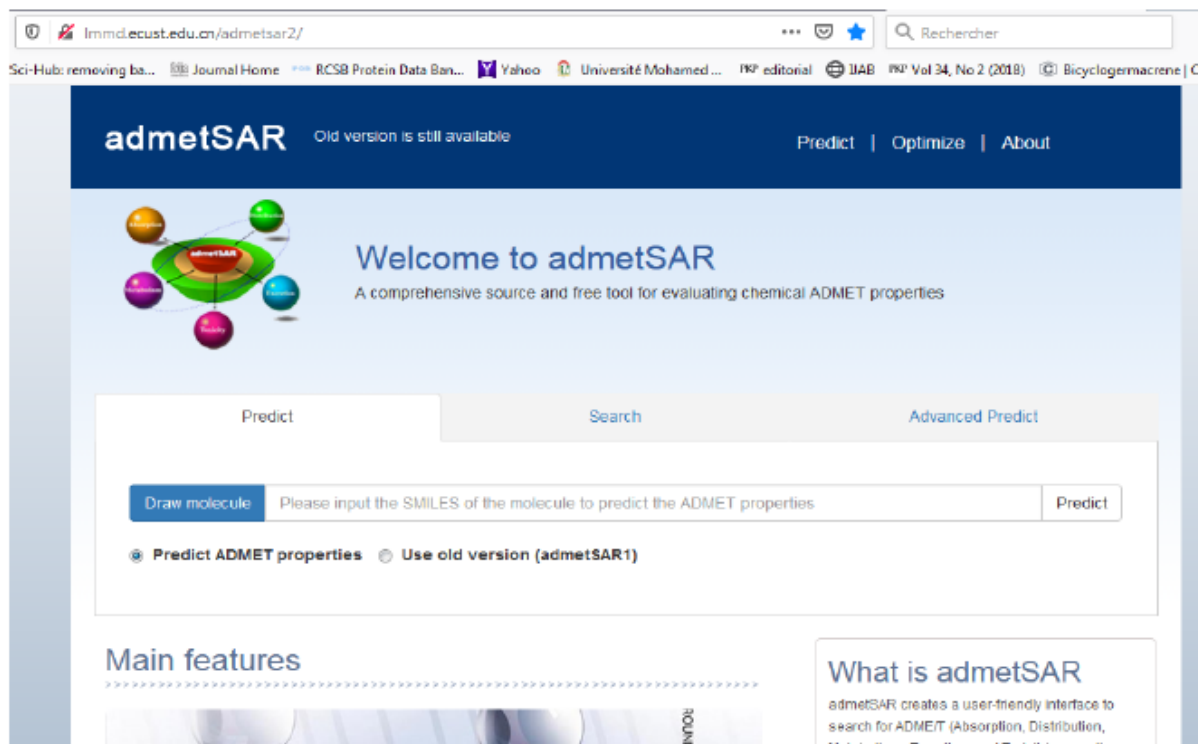


Figure 4.8: Page d'accueil du serveur admetSAR

➤ **Protox**

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

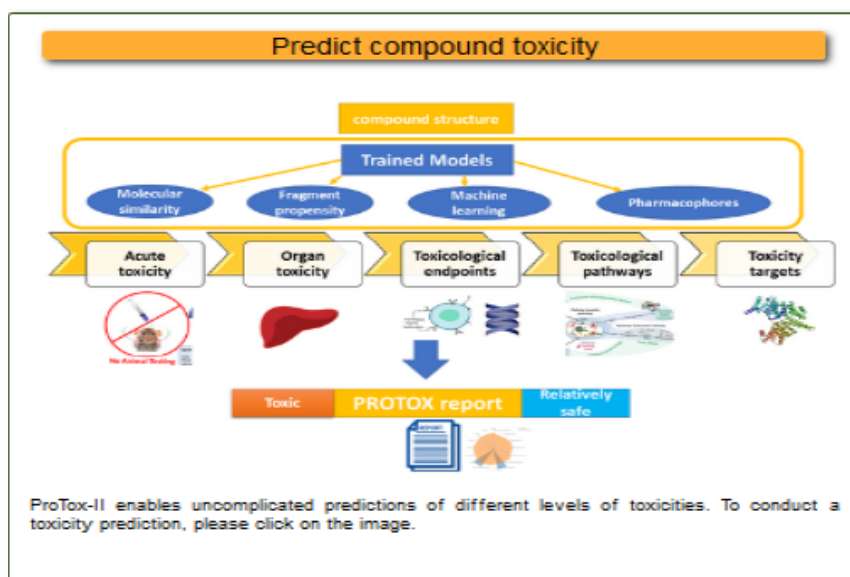


Figure 4.9 : Page d'accueil du serveur Protox

#### I.4.4.4. Prédiction des propriétés ADMET

Outre une affinité qui lui confère une activité biologique, un candidat médicament doit être facile à administrer et doit atteindre sa cible en concentration suffisante pour être efficace. C'est pourquoi la prédiction des propriétés ADMET joue un rôle crucial dans le processus de la conception des médicaments (Hazan., 2008).

ADME est une abréviation pour « Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion », elle décrit la disposition d'un composé pharmaceutique au sein d'un organisme (Gupta., 2018). Alors que le « T » représente la toxicité potentielle de ce composé.

Dans ce travail, nous avons calculé et simulé les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés issus de la substitution en utilisant le serveur SwissADME, alors que la toxicité potentielle a été prédite en utilisant le serveur Protox-II.

##### ➤ Propriété physico-chimiques :

Règle de Lipinski : (règle des 5) :

Christopher A. Lipinski a défini un ensemble de critères permettant de déterminer si un composé chimique possède des propriétés physico-chimiques qui en feraient de lui un médicament oralement actif chez l'homme. Il observe que les molécules ayant le plus de chances d'être absorbées par voie orale doivent satisfaire au moins trois des caractéristiques suivantes (Lipinski *et al.*, 1997):

1. Le poids moléculaire doit être inférieur à 500 Dalton.
2. Le coefficient de partage octanol-eau (LogP) doit être inférieur à 5.

3. Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène doit être inférieur ou égal à 10.
4. Le nombre de donateurs de liaison hydrogène doit être inférieur ou égal à 5.
5. Le nombre de liaisons flexibles doit être inférieur à 15.

### Règle de Veber :

Avec un objectif similaire, Veber et al. étendent la règle de Lipinski en ajoutant deux contraintes sur la surface polaire (TPSA) qui doit être inférieure à 140 Å<sup>2</sup>, et le nombre de liaisons de rotation qui doit être inférieur ou égal à 10 (Veber *et al.*, 2002)

### Solubilité dans l'eau :

La solubilité, le phénomène de dissolution du soluté dans un solvant pour donner un système homogène, est l'un des paramètres les plus importants pour atteindre la concentration souhaitée d'un médicament dans la circulation systémique pour avoir la réponse pharmacologique anticipée (Savjani *et al.*, 2012) La possession d'une molécule soluble facilite grandement de nombreuses activités de développement de médicaments, surtout pour les projets de découverte ciblant l'administration orale (Daina *et al.*, 2017)

### ➤ **Propriétés pharmacocinétiques :**

#### Absorption gastro-intestinal (GI) :

La voie d'administration orale impose au médicament un passage à travers de la barrière digestive. Ce passage peut se faire par simple diffusion passive ou fait intervenir des phénomènes plus complexes avec la mise en jeu d'un système de transporteurs favorisant ou au contraire limitant l'absorption (Pharmacomédicale.org., 2020).

#### BBB perméabilité :

La capacité de nos meilleurs inhibiteurs à traverser la barrière hémato-encéphalique a été simulé à l'aide du serveur SwissADME. Ce critère est important tant pour les médicaments psychotropes, qui doivent exercer leur action dans le système nerveux central, que pour les médicaments destinés aux organes périphériques, et qui ne doivent surtout pas y pénétrer (Bodor et Buchwald., 1999).

#### Inhibition des cytochromes P450 :

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes hépatiques intervenant dans le métabolisme des substrats endogènes ou exogènes, notamment médicamenteux. Les principaux CYP impliqués dans le métabolisme des médicaments sont : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19,

## Chapitre 4      Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées.

---

CYP2D6, CYP3A4. Toutefois, en fonction de leur degré d'affinité pour ces enzymes, certains médicaments peuvent inhiber le métabolisme. C'est pourquoi Il vaut mieux choisir ceux qui ne sont pas inhibiteurs des cytochromes P450(**produits de santé., 2020**).

---

## *Partie II : partie pratique*

---

---

# *Matériels et Méthodes*

---

## Matériels et Méthodes

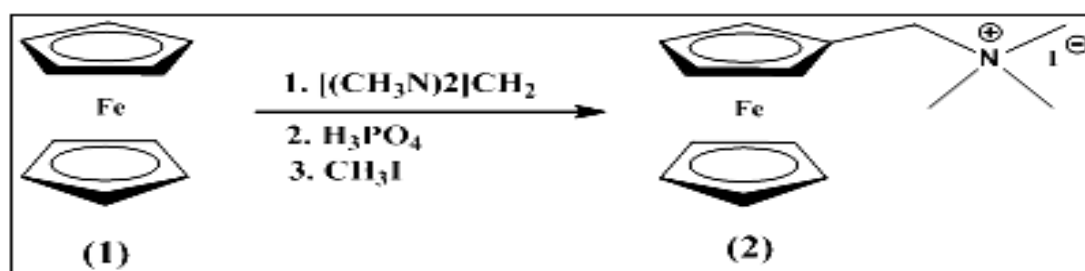
Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Valorisation et Technologie des ressources saharienne (VTRS) au niveau de la faculté des Sciences et Technologie, en collaboration avec les laboratoires pédagogiques de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université d'Echahid Hamma Lakhdar El Oued.

### 1.1. Matériels

#### 1.1.1. Produits chimiques et réactifs

##### 1.1.1.1. Dérivés ferrocéniques étudiés

La synthèse des trois dérivés ferrocéniques étudiés dans ce travail a été réalisée au niveau de laboratoire de « VTRS » en deux étapes, la première étape est la préparation du sel quaternaire iodure ferrocénylméthyltriméthyl-ammonium (2) par la réaction entre le réactif de Mannich et le ferrocène (1) dans un mélange d'acide acétique glacial et l'acide phosphorique selon la méthode de d'Osgerby et Pauson (**Osgerby *et al.*, 1958**) comme le montre le **Figure 5.1**:



**Figure 5.1:** Aminométhylation de ferrocène

Ensuite les trois dérivés :N-ferrocénylméthyl-2-aminoacetophenone (3), N-ferrocénylméthyl-3-aminoacetophenone (4) et N-ferrocénylméthyl-4-aminoacetophenone (5) sont préparé en traitant le sel quaternaire (2) avec un excès de l'aminoacetophenone dans l'eau distillée bouillant (**Lanez., 2016**) comme le montre le schéma suivant :

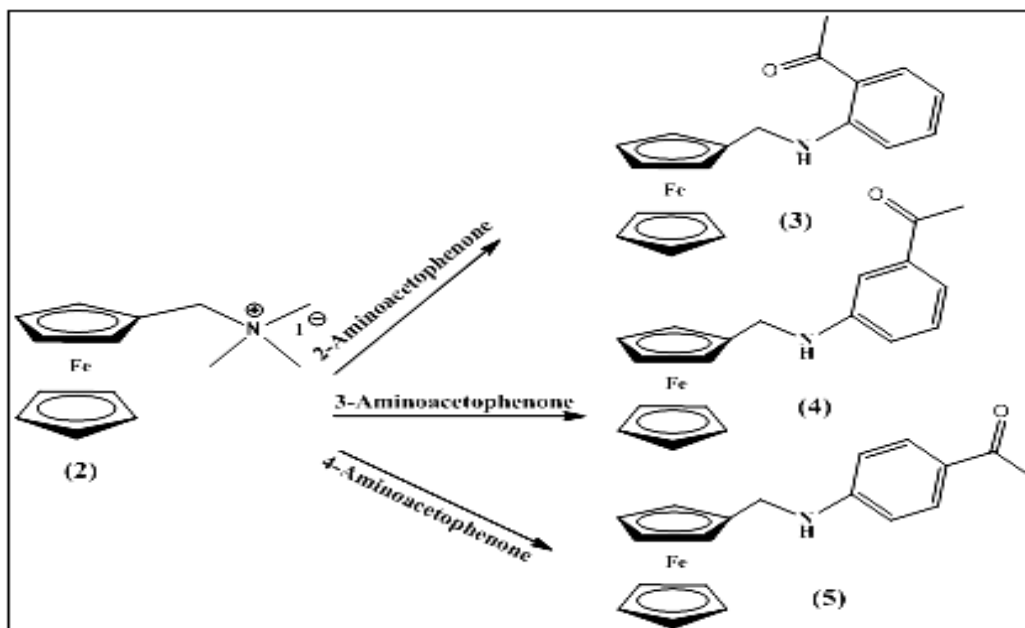


Figure 5.2: Synthèse de la N-ferrocenylmethyl-aminoacetophenone

### 1.1.1.2. Souches bactériennes utilisées

Les espèces bactériennes utilisées dans notre travail est *Escherichia coli*, *Pseudomonasaé-ruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* qui sont des souche de référence et disponibles au sein de notre laboratoire pédagogique de la faculté de Science de la Nature et de la Vie.

Ces espèces bactériennes sont été choisi parce qu'elles représentent des espèces à Gram négatif les plus communes, responsables d'infections nosocomiales et résistantes aux antibiotiques.

La revivification de la bactérie est faite par passage successif sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive.

Un contrôle de qualité a été effectué par la réalisation d'un antibiogramme des souches bactériennes testée vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques. Cette opération a pour but de contrôler l'activité des disques d'antibiotiques utilisés et de vérifier la qualité de la manipulation effectuée.

### 1.1.1.3. Milieux de culture utilisés :

Nous avons utilisé trois milieux de culture : Bouillon nutritif ; Gélose Nutritive ; Muller Hinton.

## Matériels et Méthodes

---

### 1.1.1.4. Gentamicine :

Le disque pour le test de sensibilisation antimicrobienne sont fabriqués avec un papier haute qualité selon la spécification ; c'est à dire que la concentration de chaque antibiotique est comprise entre 90 et 125% ; pour la Gentamicine la concentration est 120µg/disc par disque.

### 1.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne :

Les tests antimicrobiens ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque dérivés ferrocéniques vis-à-vis les microorganismes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *staphylococcus aureus* et *bacillus subtilis*.

#### 1.2.1. Principe :

L'activité antimicrobienne des extraits a été testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (Osato *et al.*, 2010). Cette méthode repose sur le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de patches imprégnés du composé organique sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antibactérienne, si elle est présente, se manifestera alors par des zones d'inhibition autour des disques.

#### 1.2.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé :

##### 1.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien :

La souche bactérienne a été revivifiée dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis des gouttelettes de suspension bactérienne sontensemencées en strie dans des boîtes de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive. Après incubation 24 heures d'incubation à 37°C, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10ml de Na CL 0.9%, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être dilué de telle façon que sa densité optique mesurée à 620 nm soit comprise entre 0.08-0.1. Cette densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. (Lesueur *et al.*, 2007).

##### 1.2.2.2. Protocole expérimental :

Des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imbibé de différents dérivés ferrocéniques étudiée sont été placé dans les boîtes à l'aide d'une pince stérile à la sur face de gélose Mueller Hinton sèche, inoculée au préalable par 20 microlitres de dilution de la suspension bactérienne. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm centre à centre. L'incubation dure 18h à 30°C, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition. (Le-

**sueur et al., 2007**). L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, des différentes concentrations de dérivés ferrocénique autour des disques et comparée avec celle de DMSO comme contrôle négatif et les antibiotiques comme contrôle positif (Gentamicine 120µg/disc).

### 1.2.3. Mesure spectroscopique

#### ❖ *Appareillage :*

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

#### ❖ *Procédure :*

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

$$\% \text{ Inhibition} = \left( 1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

Avec :

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

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

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

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

Où  $A_0$  est l'absorbance du composé libre,  $A$  l'absorbance de l'adduit,  $\varepsilon_0$  et  $\varepsilon$  sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire.

## Matériels et Méthodes

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

### 1.3. Evaluation in silico de l'activité antibactérienne

#### 1.3.1. Méthodes d'évaluation des propriétés ADMET :

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADMET) des médicaments candidats ou des dérivés ferrocéniques, pour cela nous avons d'abord déterminé les paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des dérivés ferrocéniques étudiés par l'outil SwissADME disponible à (<http://www.swissadme.ch>), pour ce fait les structures Canoniques SMILES de chacune de ces molécules a été copiée à partir du logiciel open Babel et introduite dans le serveur de prédiction (**Tableau 5.1**).

**Tableau 5.1** :Formes SMILES et les identifiants des molécules testées

Composés	Structure SMILES
<i>Fc4A</i>	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNc1ccc(cc1)C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
<i>Fc3A</i>	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNC1=C[C](C=C[CH]1)C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
<i>Fc2A</i>	<chem>[Fe][C@]1([CH]C=C[CH]1)CNC1=C[CH]C=C[C]1C(=O)C.[CH]1C=CC=C1</chem>
<i>Gentamicine</i>	<chem>C1(=C[C@@H]([C@H]([C@@H]([C@H]1O)O)O)N[C@H]1[C@@H]([C@H]([C@H](O[C@H]2[C@@H]([C@@H]([C@H](O[C@H]3[C@@H]([C@H]([C@H](O)[C@@H]3CO)O)O)[C@@H]2CO)O)O)[C@@H]1C)O)O)CO</chem>

La toxicité de ces dérivés a été ensuite étudiée à l'aide d'un serveur en ligne (ProTox-II16) qui donne les valeurs de la toxicité, de la cytotoxicité, de la mutagénicité, de la cancérogénicité et de l'immunotoxicité prévues. La Prédiction des propriétés de la toxicité des dérivés étudiés a été faite par le serveur en ligne admetSAR : (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar2>). Et Protox2: (<https://bioinformatics.charite.de/prottoxII>).

### 1.3.2. Amarrage moléculaire :

#### ❖ Outils utilisés :

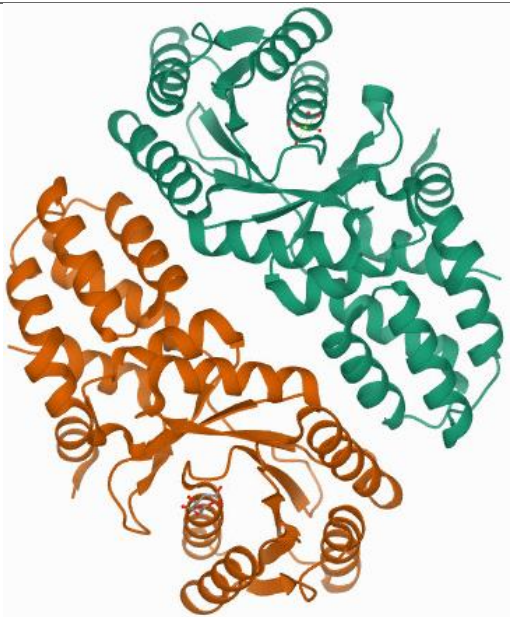
Afin de pouvoir réaliser l'amarrage moléculaire avec le logiciel AutoDock 4.2, l'ensemble d'outils suivant est nécessaire :

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

La structure chimique de Fc2A, Fc3A et Fc4A a été optimisée par le progiciel Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009), en utilisant le niveau de théorie B3LYP (Becke *et al.*, 1993) avec une bases 6-311<sup>++</sup>G(d,p). Les géométries des complexes ont été entièrement optimisées en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité, sans imposer de contraintes de symétrie.

Les expériences d'amarrage moléculaire des ligands FcA et la gentamicine ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle de la protéine d'Escherichia coli (PDB ID : 4U6N ) avec une longueur de séquence égal à 306 acide aminé (Tableau 5.2), extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) (Berman *et al.*, 2000).

**Tableau 5.2 :** Informations sur les récepteurs cibles choisies pour les études d'amarrage

	Escherichia coli	
	PDB ID	4U6N
	Résolution (Å)	1.91
	Valeur R libre	0.198
	Valeur R	0.165
	Mutation (s)	No
	Chaînes	A
	Organisme(s)	Escherichia coli K-12

#### ❖ Procédure :

## Matériels et Méthodes

---

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

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

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

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

La Figure 5.3 présente les étapes à suivre pour la procédure d'amarrage

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

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

La recherche a été effectuée dans une grille de 41 et 51 points par dimension avec des points séparés par 1.000 Å. Les centres et les tailles de la grille ont été définis pour chaque ligand comme indiqué dans le Tableau 2, et une taille d'étape de 0.375 centrée sur le site actif de protéine. La meilleure conformation a été sélectionnée avec l'énergie d'amarrage la plus faible. A la fin des exécutions d'amarrage, diverses énergies de liaison des ligands ont été obtenues avec leurs conformations respectives ; la meilleure pose amarrée énergétiquement favorable a été utilisée dans l'analyse d'amarrage à l'aide du serveur Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Salentin *et al.* , 2015).

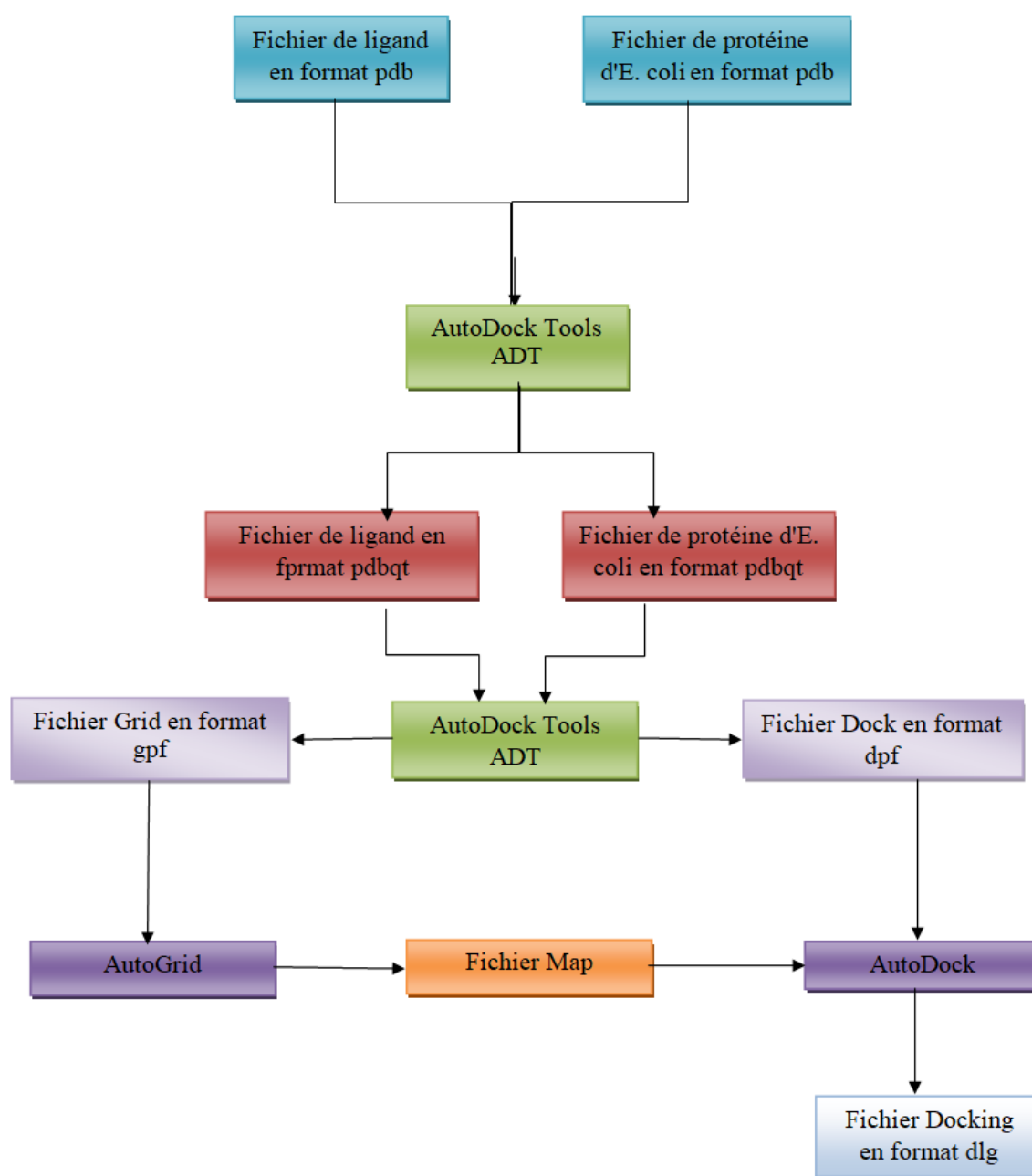


Figure 5.3: Différentes étapes d'amarrage

Tableau 5.3. Paramètres d'amarrage sélectionnés pour l'Escherichia coli

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



---

---

## *Résultats et discussion*

---

---

## Résultats et discussion

### 2.1.Évaluation *in-silico* de l'activité antibactérienne

#### 2.1.1. Prédiction des propriétés ADMET :

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

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

##### 2.1.1.1. Propriétés physico-chimiques :

Nous avons prédit les paramètres physicochimiques des inhibiteurs de Escherichia coli étudiés en utilisant le serveur online SwissADME, les valeurs des propriétés observées sont montrées dans le tableau qui suivent.

**Tableau 6.1.** Propriétés physicochimiques des composés étudiés et du gentamicine

Propriétés	<i>Gentamicine</i>	<i>Fc4A</i>	<i>Fc3A</i>	<i>Fc2A</i>
Formule	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> FeNO	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> FeNO	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> FeNO
Poidsmoléculaire(g/mol)	477.60	333.21	333.21	333.21
Nom. Atomeslourds	33	22	22	22
Fraction Csp <sup>3</sup>	1.00	0.32	0.42	0.42
Nom. Liaison Flexibles	7	4	4	4
Nom. Accepteurs de liaison H	12	1	1	1
Nom. Donneurs de liaison H	8	1	1	1
Log P	-2.15	2.82	2.43	2.54
Log S	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Réfractivitémolaire	118.31	86.25	86.06	86.06
TPSA (Å <sup>2</sup> )	199.73	29.10	29.10	29.10

Les 4 composés ont des poids moléculaires  $\leq 500$  g/mol. D'autre part, nous n'observons que les valeurs de lipophilie (LogP) de tous nos composés inférieurs à 5. Cependant tous les composés ont un nombre de donneurs de liaisons hydrogène  $\leq 5$ , un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène :  $\leq 10$ .

## Résultats et discussion

Concernant la règle de Veber, la surface polaire topologique de ces composés est moins de 140 Å<sup>2</sup>. Ainsi que, un nombre inférieur ou égale à 10 de liaisons flexibles.

### 2.1.1.2. Propriétés pharmacocinétiques :

Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastro-intestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages. Nous avons prédit les paramètres pharmacocinétiques afin d'affirmer notre sélection et d'aller vers le composé ayant le plus de chance d'être un candidat médicament. Les résultats de l'évaluation des propriétés pharmacocinétiques des dérivés ferrocéniques étudiés à l'aide du serveur SwissADME sont présentés dans le tableau 6.2.

**Tableau 6.2:** Propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés et du gentamicine

Propriétés	<i>Gentamicine</i>	<i>Fc4A</i>	<i>Fc3A</i>	<i>Fc2A</i>
GI Absorption	Faible	Élevée	Élevée	Élevée
BBB perméabilité	No	Yes	Yes	Yes
CYP1A2 inhibition	Négative	Négative	Négative	Négative
CYP2C19 inhibition	Négative	Négative	Négative	Positive
CYP2C9 inhibition	Négative	Négative	Négative	Positive
CYP2D6 inhibition	Négative	Négative	Négative	Négative
CYP3A4 inhibition	Négative	Positive	Négative	Négative

L'absorption de la molécule dans l'intestin s'explique par le paramètre gastro-intestinal (GI), elle est rapportée comme élevée ce qui signifie que toutes les molécules sont fortement absorbées dans l'intestin HIA.

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

Les résultats montrent également et contrairement au médicament de référence que le composé Fc4A possède un effet inhibiteur du CYP2C19. De même, Fc2Aa a un effet inhibiteur sur les deux Cytochrome CYP2C19 et CYP2C9. Cependant, nous n'avons remarqué aucune inhibition ou modification sur les différents isoformes de Cytochrome P450 pour le Fc3A.

## Résultats et discussion

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

### 2.1.1.3. Prédiction de la toxicité :

Les résultats de la prédiction de la toxicité des dérivés ferrocéniques et de gentamicine établie à partir du serveur online Pro-Tox-II sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 6.3:** Prédiction de la toxicité des composés étudiés et de la gentamicine

Toxicités	<i>Gentamicine</i>	<i>Fc4A</i>	<i>Fc3A</i>	<i>Fc2A</i>
<b>Hépatotoxicité</b>	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
<b>Cancérogénicité</b>	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
<b>Immunotoxicité</b>	Active	Inactif	Inactif	Inactif
<b>Mutagénicité</b>	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
<b>Cytotoxicité</b>	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif

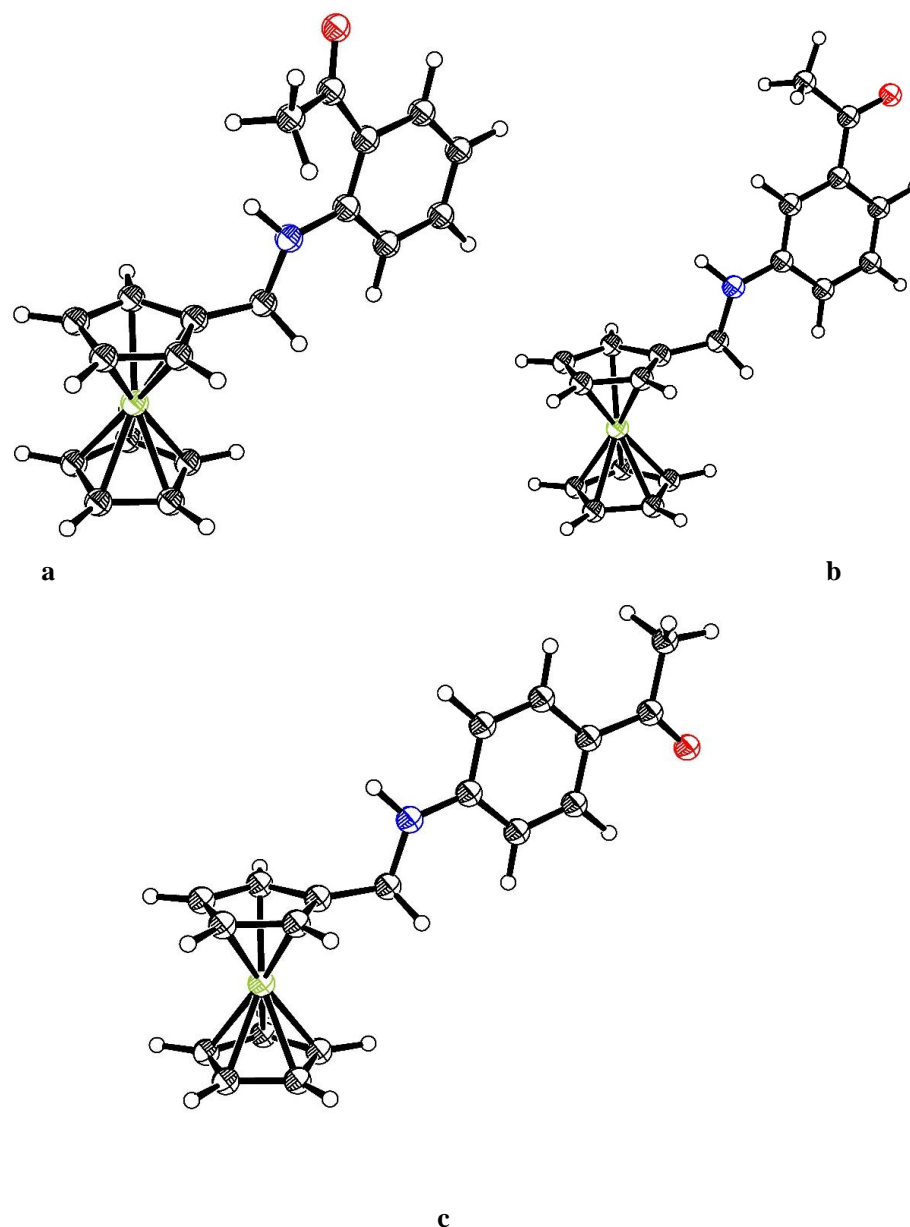
La toxicité est l'un des paramètres les plus importants pour établir le ADME des molécules étudiées. Les résultats obtenus montrent une absence des activités toxiques de D FcA étudié pour les 5 types de toxicités présentés, par contre en marque la gentamicine a activité Immunotoxicité.

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

L'étude de l'amarrage moléculaire des complexes synthétisés FcA ont été ancrés dans l'enzyme Transglycosylase de l'*Escherichia Coli* afin de prédire le mode de liaison possible des complexes avec la protéine et de mieux visualiser les interactions. Les études de simulation moléculaire prédisent également le site de liaison sélectionné ainsi que la meilleure configuration des ligands étudiés à l'intérieur de protéine.

### 2.2.1. Optimisation structurelle :

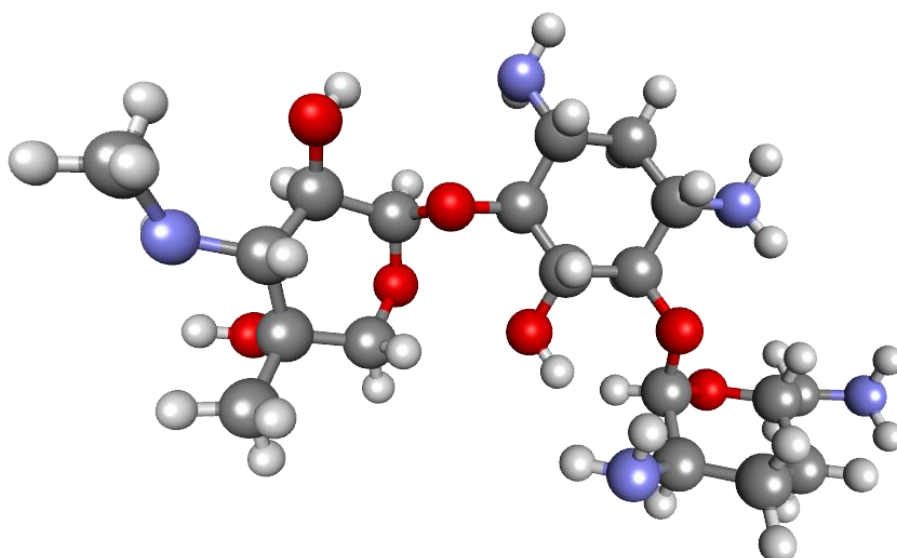
Les structures de conformation 3D entièrement optimisées de Fc2A, Fc3A et Fc4A sont présentées à la (Figure 6.1).



**Figure 6.1 :** Représentation ORTEP de Fc2A (a), Fc3A (b) et Fc4A (c)

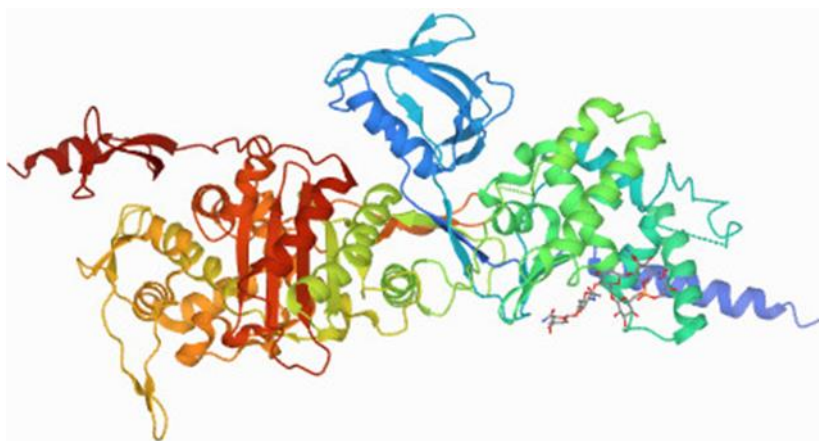
Les ellipsoïdes de déplacement sont dessinés au niveau de probabilité de 30 % et les atomes H sont représentés sous forme de petites sphères de rayons arbitraires. Les codes de couleur sont : le carbone gris, l'hydrogène blanc, l'azote bleu, l'oxygène rouge et le fer vert.

La structure tridimensionnelle de la Gentamicine (Numéro d'accès DrugBank : DB00798) provient du Bank du médicament (<https://go.drugbank.com/>) est présentée dans la (Figure 6.2) (George *et al.*, 1975).



**Figure 6.2 :** Structure tridimensionnelle de la Gentamicine téléchargé depuis la Bank du médicament avec le Numéro d'accès DrugBank : DB00284.

Les études d'amarrage moléculaire des ligands Fc2A, Fc3A et Fc4A ainsi que la Gentamicine ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle (Figure 6.3) de l'enzyme transglycosylase PBP1b de longueur complète et d'*Escherichia Coli*(PDB ID :4U6N) avec une longueur de séquence égal à 768 acide aminé, extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>)([Huang et al., 2012](#)).



**Figure 6.3:** Structure tridimensionnelle de l'enzyme transglycosylase d'*Escherichia Coli*(PDB ID :4U6N) téléchargé depuis Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

## Résultats et discussion

### 2.2.2. Simulations d'amarrage :

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

Les énergies libres de liaison, les constantes de liaisons et les valeurs de l'IC50 résultante des adduits ancrés *Escherichia Coli*-FcA et *Escherichia Coli*-gentamicine est résumée dans le Tableau 6.4

**Tableau 6.4:** Constantes de liaisons, les énergies libres de liaisons et les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour les complexes étudiés par approche d'amarrage moléculaire

Adduits	K ( $M^{-1}$ )	$-\Delta G$ ( $KJ.mol^{-1}$ )	IC50 ( $mol/l$ )
<b>Fc2A- Escherichia Coli</b>	$5.84 \times 10^4$	27.21	0.1147
<b>Fc3A- Escherichia Coli</b>	$1.6 \times 10^4$	24.01	0.2258
<b>Fc4A- Escherichia Coli</b>	$7.80 \times 10^3$	22.22	0.3369
<b>Gentamicine-Escherichia Coli</b>	$1.36 \times 10^5$	29.33	0.0125

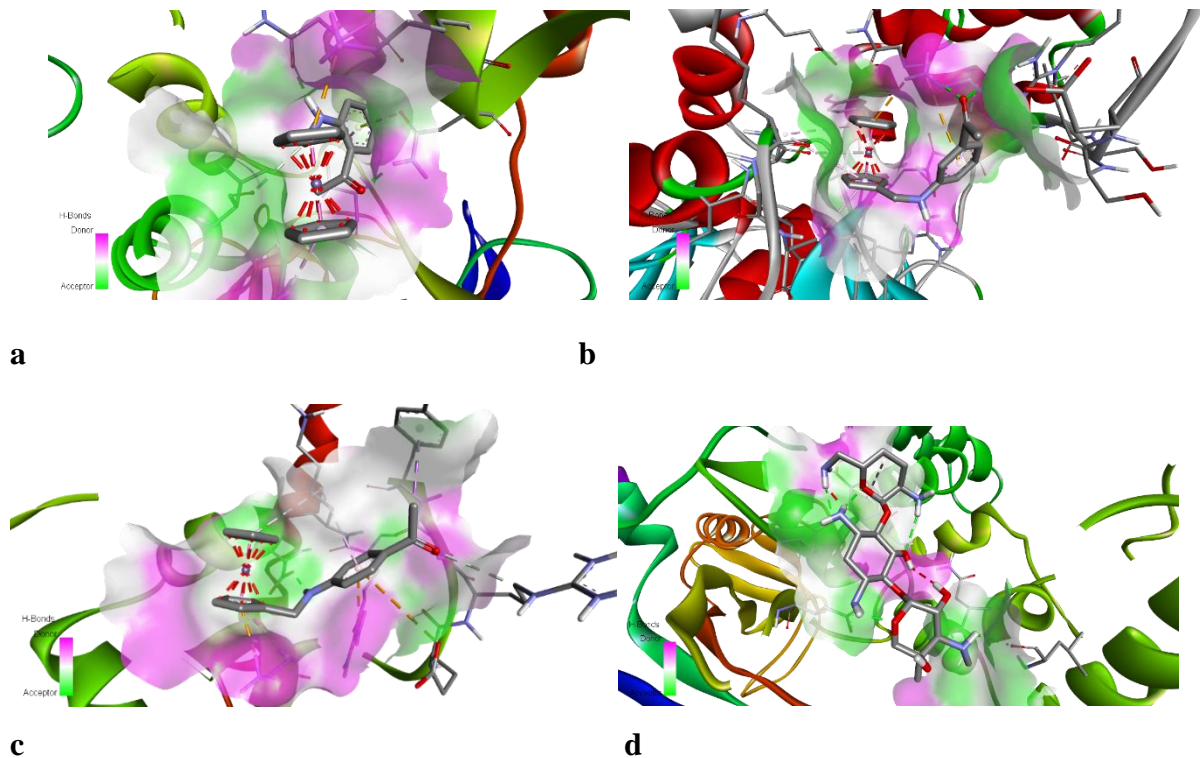
L'amplitude des énergies libres de liaison calculées indique une affinité de liaison élevée entre l'*Escherichia coli* et les ligands étudiés. Les constantes de liaison ont été conclues à partir des valeurs d'énergie de liaison à l'aide de l'équation suivante :

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

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

Les valeurs d'énergie libre de liaison obtenues ainsi l'IC50 sont très proches de celles obtenues in-vitro. Ainsi, nous pouvons voir qu'il y avait un complément mutuel entre les études expérimentales et la technique d'amarrage moléculaire, ce qui peut valider nos tests expérimentaux et fournit une preuve supplémentaire de l'interaction d'inhibition.

La vue de l'interaction présentée dans la (Figure 6.4) indique le positionnement des complexes étudiés dans le site actif de la protéine.



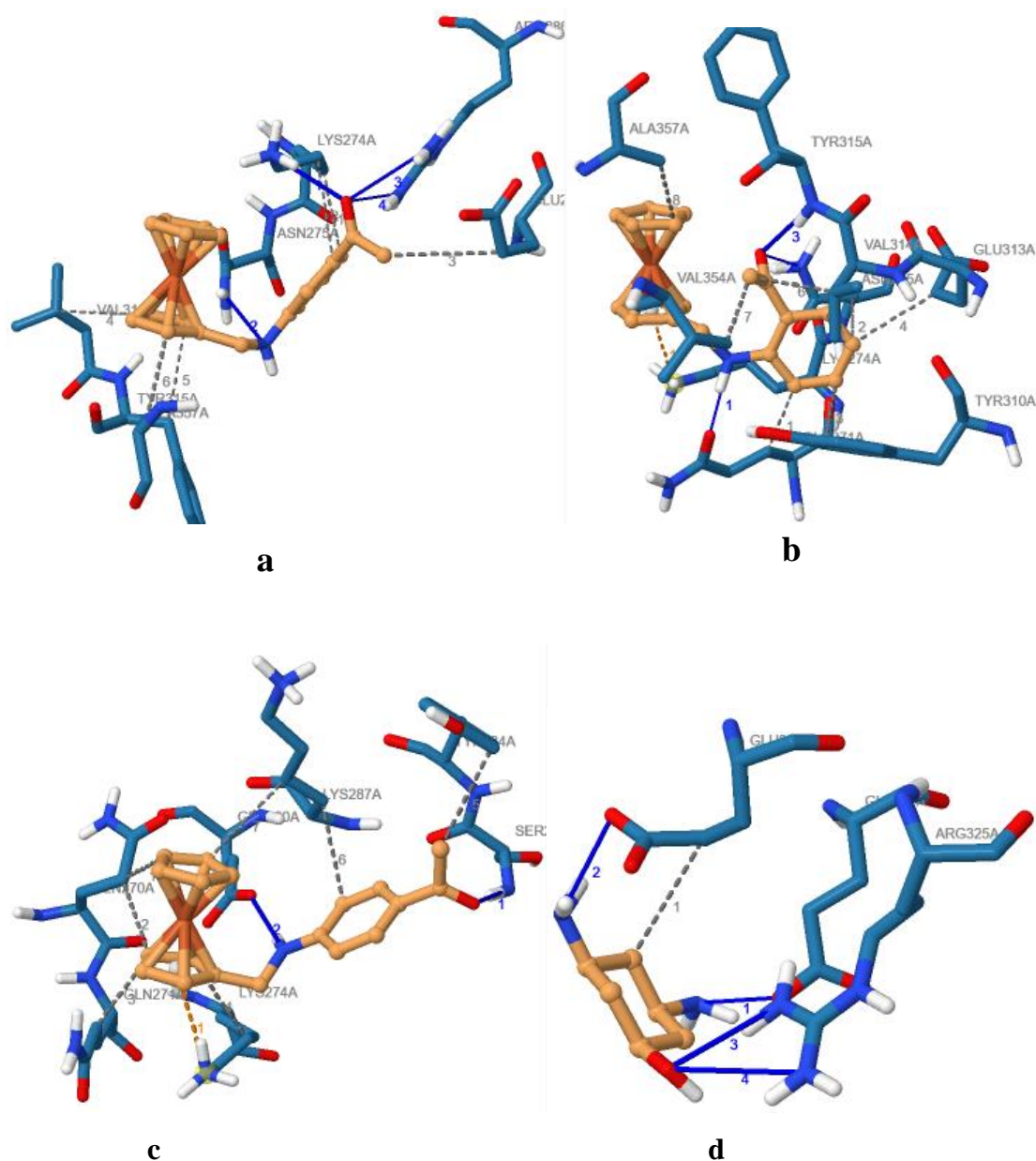
**Figure 6.4:** Poses d'amarrage de Fc2A (a), Fc3A (b), Fc4A (c) et la gentamicine (d) avec l'*Escherichia coli* (PDB ID :4U6N) illustrant l'interaction de tous les ligands.

Le ligand Fc2A forme trois liaisons hydrogène, deux sont entre l'atome d'oxygène de la fonction acétyle et les ASN275 et TYR315, l'autre liaison hydrogène est entre la glutamine (GLN271) et l'atome d'azote (NH<sub>2</sub>) de Fc2A. (**Figure 6.5 a**).

Fc3A forme 4 liaisons hydrogène, la première entre l'atome d'azote de Fc3A et le numéro 275 acide asparagine (ASN275) de la chaîne A, les restes des liaisons hydrogène sont formé entre l'atome d'oxygène de Fc3A et les acides aminés : LYS274, ARG286 et ARG286 de la même chaîne A de l'*Escherichia coli* (**Figure 6.5b**).

Fc4A forme uniquement deux liaisons hydrogène, l'une est entre l'atomes d'oxygène de Fc4A et l'acides aminé (SER283) dans la chaîne A, l'autre liaison hydrogène est entre l'atome d'hydrogène de NH<sub>2</sub> dans Fc4A et l'acide glutamique numéro 290 (**Figure 6.5c**).

Dans le cas de la gentamicine il y a 7 liaisons hydrogènes formé le tous sont illustrés dans la (**Figure 6.5d**).



**Figure 6.5:** Site d'interaction entre le complexe étudié et l'*Escherichia Coli*.

## 2.4. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne :

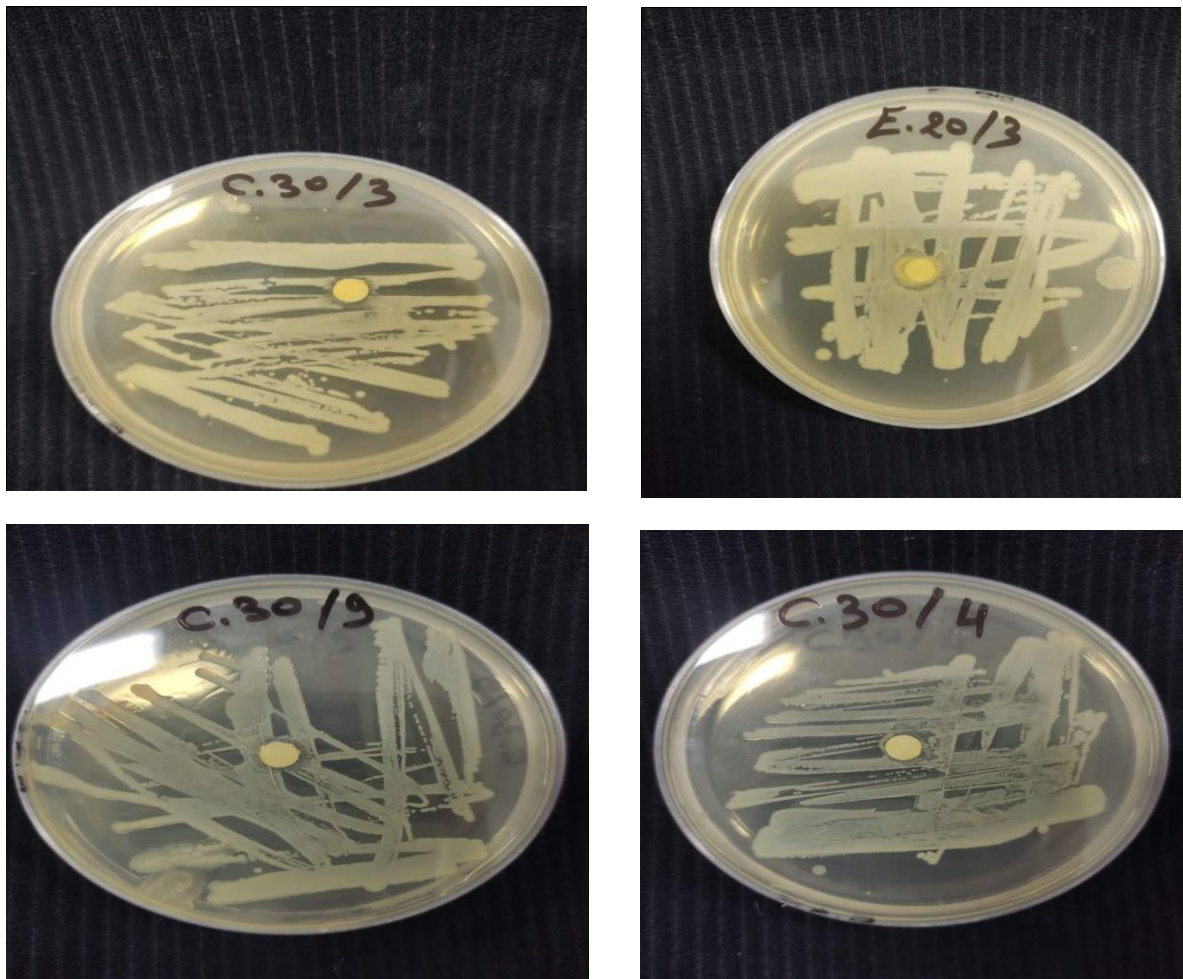
Dans ce qui suit nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des dérivés ferrocéniques étudiés par deux techniques expérimentales. L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité des dérivés ferrocéniques à produire des composés bioactifs, pouvant présenter un effet thérapeutique antibactérien.

### 2.4.1. Evaluation du pouvoir antibactérien des composés étudiés :

## Résultats et discussion

Pour l'évaluation du pouvoir antibactérien des dérivés ferrocéniques étudiés, nous avons utilisé la technique des disques de diffusion, qui est une méthode simple à mettre en œuvre, comme elle fournit seulement les informations qualitatives et semi qualitatives sur la sensibilité d'un microorganisme donné à un antibiotique donné (Madi., 2010).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés des différents dérivés ferrocéniques étudiés ont été mesurées. Les résultats obtenus sont présentés sur la (Figure 6.6).



**Figure 6.6:** Zones d'inhibition des différents extraits des dérivés ferrocéniques étudiés relatives à la souche bactérienne testée (*Escherichia coli*).

Les résultats présentés sur la Figure 6.6 montre que tous les dérivés ferrocéniques étudiés présente une zone d'inhibition contre l'*Escherichia coli*.

Le Tableau 6.5 regroupe les valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents composés étudiés. Tous les dérivés étudiés montrent un diamètre d'inhibition de

## Résultats et discussion

*Escherichia coli* croissent en fonction de la concentration massique du composé, les diamètres d'inhibition passe de 7 mm pour attendre le 12 mm pour la concentration maximale des dérivés étudiés.

**Tableau 6.5:** Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents dérivés ferrocéniques relatives à la souche bactérienne testées

Concentration (mg/ml)	D (mm)		
	Fc2A	Fc3A	Fc4A
<b>0 (DMSO)</b>	0		
<b>2</b>	7	7	7
<b>4</b>	7	8	8
<b>6</b>	9	7	7
<b>8</b>	10	10	7
<b>10</b>	9	10	9
<b>12</b>	0	11	10
<b>14</b>	12	11	10
<b>16</b>	11	10	10
<b>18</b>	12	12	11

Les résultats obtenus ont montré que les composés organométalliques étudiée ont inhibé la croissance de *Escherichia coli* avec des zones d'inhibitions allant de 7 à 12 mm, La zone d'inhibition la plus large (12mm) est obtenue pour les deux dérivés Fc2A et Fc3A à des concentrations de 18mg/ml, sachant que le DMSO (témoin) n'a montré aucune activité.

### 2.4.2. Etude Spectroscopique de l'activité antibactérien :

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec une bactérie l'absorbance et la longueur d'onde du la suspension d'étude subit une variation au changement de la concentration de ce composé, la variation d'absorbance peut être utilisée pour la détermination de la concentration inhibitrice 50 et des paramètres de liaison.

Dans ce qui suit les résultats de mesure des paramètres de liaisons et de IC50 des dérivés ferrocénique étudiés obtenus par la spectroscopie électronique des composés Fc2A, Fc3A et Fc4A contre *Escherichia coli*.

Ces deux paramètres ont été déterminés par l'étude de la variation de l'absorbance du la suspension de *Escherichia coli* en absence et en présence des concentrations croissantes des dérivés ferrocéniques. Cette étude du comportement spectroscopique été réalisée par la tech-

## Résultats et discussion

nique de la spectroscopie UV-Visible dans une solution de NaCl 0.9% mesuré à 620 nm. Le (Tableau 6.6) ci-dessous présente la variation de l'absorbance de la réaction d'inhibition de développement de la bactérie en fonction de la concentration des dérivés ferrocénique ajouté. Les valeurs de l'absorbance représenté dans le (Tableau 6.6) révèlent que quel que soit la concentration de ferrocène ajouter il y a toujours une diminution de l'absorbance moléculaire. La diminution d'absorbance est plus remarquable pour les dérivés Fc2A et Fc3A que celle du dérivé Fc4A.

**Tableau 6.6:** Valeurs de l'absorbance des milieux du développement de *l'Escherichia coli* obtenus à partir des données spectroscopique UV-Vis

Concentration (mg/ml)	Absorbance		
	Fc2A	Fc3A	Fc4A
<b>0 (DMSO)</b>	2.023		
<b>2</b>	1.75	1.557	1.774
<b>4</b>	1.668	1.529	1.737
<b>6</b>	1.41	1.399	1.691
<b>8</b>	0.961	1.315	1.674
<b>10</b>	0.72	1.312	1.515
<b>12</b>	0.719	0.92	1.279
<b>14</b>	0.62	0.868	1.245
<b>16</b>	0.484	0.848	0.942
<b>18</b>	0.483	0.621	0.722

En se basant sur la diminution d'absorbance de la suspension bactérienne en fonction des différentes concentrations du dérivé ferrocénique (Tableau 6.6), les paramètres de liaison et l'IC50 de l'interaction entre ces dérivés et *l'Escherichia coli* a été calculé à partir des données spectroscopiques.

### 2.4.2.1. Détermination de la concentration inhibitrice (IC50) :

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

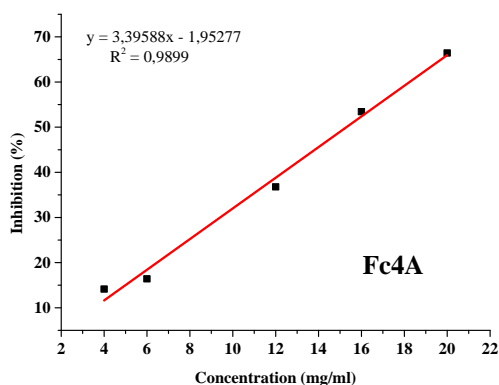
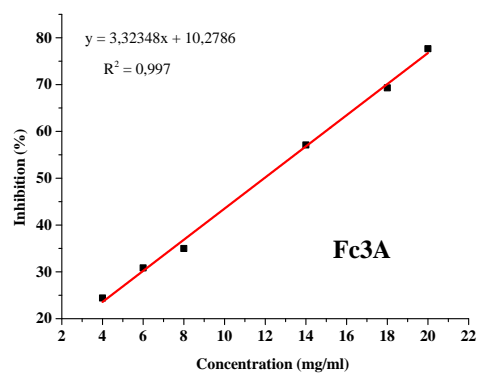
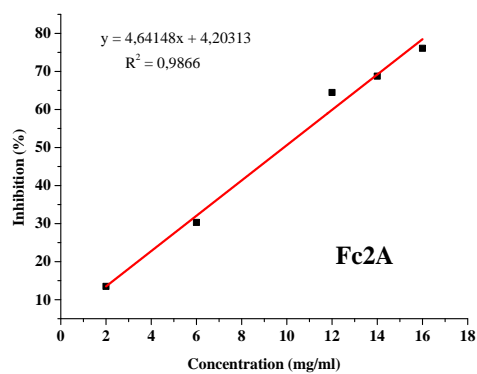
$$\% \text{ Inhibition} = \left( 1 - \frac{A}{B} \right) \times 100$$

Les valeurs des pourcentages d'inhibition sont regroupées dans le tableau suivant :

**Tableau 6.7:** Pourcentage d'inhibition des composés étudiés

[Concentration] (mg/ml)	Inhibition%		
	Fc2A	Fc3A	Fc4A
2	13.49480969	23.03509639	12.30845279
4	17.54819575	24.41917944	14.13741967
6	30.30153238	30.84527929	16.41127039
8	52.49629263	34.99752842	17.25160652
10	64.40929313	35.14582304	25.11122096
12	64.45872467	54.52298566	36.77706377
14	68.75926841	57.09342561	38.45773604
16	76.07513594	58.08205635	53.43549184
18	76.12456747	69.30301532	64.31043005

Le tracé des résultats des pourcentages d'inhibition obtenu on fonction des concentrations des dérivés ferrocéniques étudiés.



## Résultats et discussion

**Figure 6.7:** Droits régression des pourcentages d'inhibition obtenue à partir des données spectroscopiques en fonction des concentrations des composés étudiées.

D'après la Figure 6.7, nous pouvons constater une fonction linéaire entre le pourcentage d'inhibition de *Escherichia coli* et la concentration utilisé des dérivés ferrocéniques étudiées.

Cette inhibition dépasse les 50% pour 12 mg/ml pour tous les dérivés ferrocéniques pour atteint le 80% pour 20mg/ml de Fc2A et Fc3A et le 67% pour le Fc4A. Les valeurs obtenues de la concentration inhibitrice 50 de l'interaction des composés étudiées avec de *Escherichia coli* sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6.8:** Valeurs IC<sub>50</sub> des composés étudiés obtenu à partir d'UV-Visible

Composés	IC <sub>50</sub> (mol/l)
Fc2A	0.0296
Fc3A	0.0359
Fc4A	0.0460

D'après les résultats obtenus on peut classer les IC 50 des dérivés ferrocénique étudiés comme suit : Fc2A > Fc3A > Fc4A ; ce qui montre que le Fc2A est le dérivé qui a une IC 50 plus efficace.

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

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

D'après les résultats de l'absorbance il est possible de calculer l'énergie libre de liaison ΔG par la formule citée précédemment ; les rapports de l'absorbance  $\frac{A_0}{A - A_0}$  ainsi que les valeurs

de  $\frac{1}{[Fc]}$  sont présenté dans le tableau suivant :

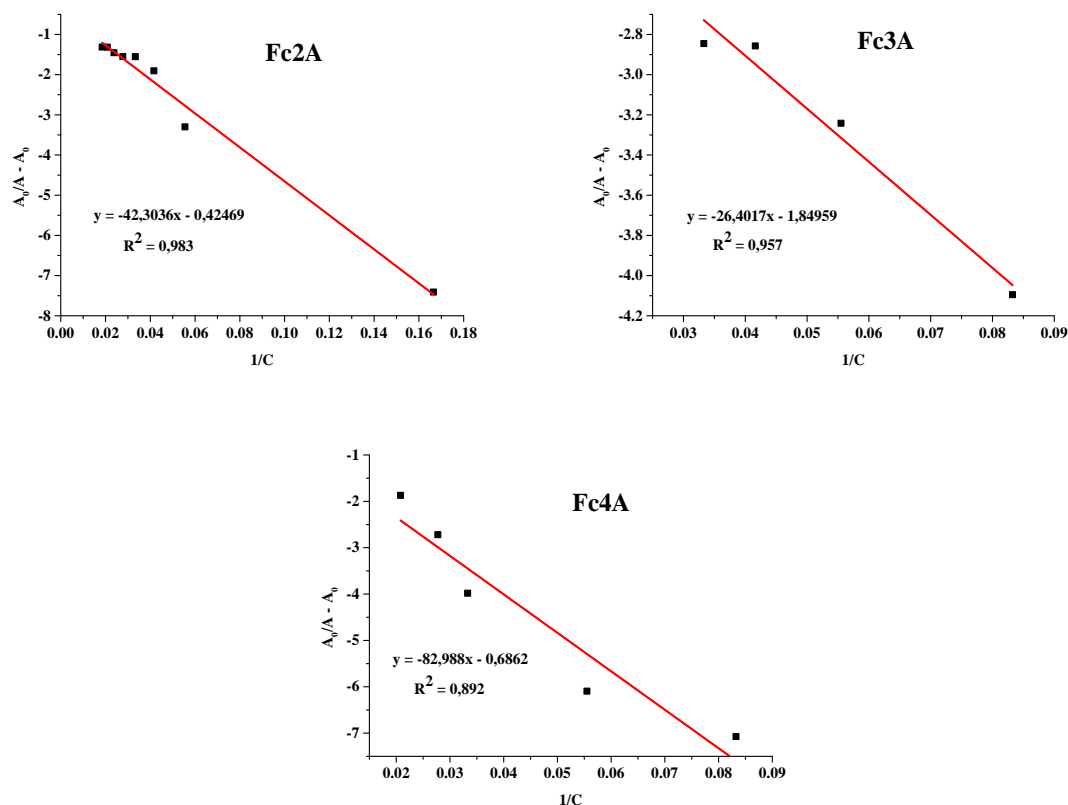
**Tableau 6.9:** Rapports de l'absorbance  $\frac{A_0}{A - A_0}$  et  $\frac{1}{[Fc]}$  des complexe étudiée

	$\frac{A_0}{A - A_0}$			1 \ Fc		
[Concentration] (mg/ml)	FC2A	FC3A	FC4A	FC2A	FC3A	FC4A
2	-7.41025641	-4.34120171	-8.12449799	0.1665	0.1665	0.1665
4	-5.69859154	-4.0951417	-7.07342657	0.0832	0.0832	0.0832
6	-3.30016313	-3.24198717	-6.09337349	0.0555	0.0555	0.0555
8	-1.90489642	-2.85734463	-5.79656160	0.0416	0.0416	0.0416
10	-1.55257099	-2.84528832	-3.98228346	0.0333	0.0333	0.0333

## Résultats et discussion

12	-1.55138036	-1.83408884	-2.71908602	0.0277	0.0277	0.0277
14	-1.45434938	-1.75151515	-2.60025706	0.0237	0.0237	0.0237
16	-1.31448992	-1.72170212	-1.87141535	0.0208	0.0208	0.0208
18	-1.31363636	-1.44293865	-1.55495772	0.0185	0.0185	0.0185

(Figure 6.8) Le rapport pente/intersection peut nous permettre de calculer la constante de liaison.



**Figure 6.8:** Tracés de  $1/[Fc]$  en fonction de  $A_0/A - A_0$  utilisés pour calculer les constantes de liaison des dérivés ferrocénique étudiés avec *Escherichia coli*.

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

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

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

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

**Tableau 6.10:** Valeurs des K et  $\Delta G$  des composés étudiés obtenues par des données spectroscopiques.

## Résultats et discussion

---

Composés	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
<b>Fc2A</b>	<b><math>7.00 \times 10^4</math></b>	<b>27.66</b>
Fc3A	$9.93 \times 10^3$	22.82
Fc4A	$8.27 \times 10^3$	22.36

La plus stable conformation est celle de Fc2A avec une valeur de  $\Delta G$  plus négative : -27.66 KJ/mol, ce qui traduit la bonne interaction entre le Fc2A et *l'Escherichia coli*.

---

# *Discussion*

---

### Discussion

Le but de ce travail est de synthèse et d'évaluation de l'activité biologique des dérivés ferrocenylmethylacetylaniline par deux 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'Escherichia Coli* et l'évaluation de son effet antibactérienne.

L'étude *in silico*, par les serveurs admetSAR, Protox et SwissADME, les résultats des Propriétés physicochimiques indiquent que les 3 composés ferrocéniques répondent à la règle de Lipinski et celle de Veber, les paramètres : poids moléculaire  $\leq 500$  g/mol, nombre de H-bond donneurs et accepteurs d'hydrogène  $\leq 5$ , le Log P ( $0 < \text{Log P} < 3$ ) et le nombre de liaisons flexibles sont respectés pour tous les composés il sont donc montré des très bons résultats. En plus nous avons noté que tous les composés sont solubles dans les milieux aqueux ce qui exprime qu'ils ont des bonnes caractéristiques pour devenir des candidats médicaments

us réussites. En effet, Les résultats de la prédiction des propriétés pharmacocinétiques montrent que tous les dérivés ferrocéniques présentent une forte absorption par la membrane intestinale ce qui rend possible leur accès au sang, alors que le médicament de référence (gentamicine) est caractérisé par une faible absorption intestinale.

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). Il est révélé ainsi par la prédiction de toxicité que nos composés ne peuvent pas induire des effets néfastes pour l'organisme qui sont mieux même par rapport au médicament témoins. cette étude est comparable avec l'étude de (Li *et al.*, 2013) qui prouvant *in vitro* le faible niveau de cytotoxicité d'un autre dérivé ferrocénique.

Dans l'ensemble, les prévisions d'ADMET ont confirmé les propriétés pharmacocinétiques et de ressemblance aux médicaments des trois candidats principaux sélectionnés.

L'amarrage moléculaire permettant la génération des multiples conformations d'un ligand. La sélection d'orientation de ce ligand est basée sur la position de la conformation la plus appropriée dans la cible moléculaire pour former un complexe stable. D'autre part, L'interaction entre le dérivé ferrocénique et la bactérie révèle que ce dérivé ferrocénique interagit avec *l'Escherichia Coli* d'une façon spontanée traduit par le signe négative de la valeur de l'énergie libre (Friedli., 2002 et Infelta *et al.*, 2017). En générale, le dérivé ferrocénique se lie à *l'Escherichia Coli* et peut provoquer des changements conformationnels en formant des liai-

## Discussion

---

sons électrostatiques de type hydrogénique (**Figure 6.5**) entre les acides aminés de la protéine et les ligands étudiés ce qui freine l'activité biologique de l'enzyme cible.

In vitro, L'évaluation de l'activité antibactérienne a été testé vis-à-vis les cinq souches bactériennes. A partir des valeurs des diamètres des zones d'inhibition de croissance de souches bactérienne étudié, ainsi que les concentrations correspondantes du produit FcA, on peut dire que, Le composé testé montre une faible activité contre l'*Escherichia Coli* et l'activité antimicrobienne, contre les bactéries, *Pseudomonas aéruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *bacillus subtilis* est nulle. 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 *pseudemenace* et l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne des dérivés ferrocéniques étudiées a montré un effet antibactérien plus ou moins négligeable par rapport aux antibiotiques standards utilisés. 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 (**Ben mohammed., 2015**). Ces résultats obtenus peuvent aider davantage à comprendre et à développer des composés antibactériens. les études de la cytotoxicité confirment l'intérêt biologique probable de ce dérivé.

Notre travail est complété par l'étude par la méthode spectroscopique UV-Visible, l'étude de la variation d'absorbance en absence et en présence d'une concentration croissante de DFcA donne des valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) : (Fc2A) = -27.66 KJ/mol ;  $\Delta G$  (Fc3A) = -22.82 KJ/mol ;  $\Delta G$  (Fc4A) = -22.36 KJ/mol) cela indique la spontanéité de la réaction entre les DFcA et la bactérie par interaction physique (**Infelta et Graetzel., 2006**). Cette étude a permis aussi de révéler l'activité inhibitrice de ces dérivés pour l'*Escherichia Coli* montre que ce composé a une valeur d'IC<sub>50</sub> plus faible (Fc2A=0.0296 mol/l) ce qui se traduit par une activité antibactérienne.

Selon les valeurs des énergies libres de liaison  $\Delta G$  obtenu par spectroscopie électronique il est remarquable que toutes les valeurs ayant le même ordre que les valeurs de IC<sub>50</sub>

## Discussion

---

obtenues par la même technique expérimentale, le chose qui confirme le bonne accorde entre les deux résultats in-vitro.

---

## *Conclusion générale*

---

## Conclusion générale

les résultats de nos expériences sur l'évaluation antibactérienne in vitro et in silico, analyse ADMET et amarrage moléculaire des dérivés ferrocénylméthylacétylaniline et en plus de quelques autres recherches ont prouvé que la ferrocénylméthylacétylaniline est une substance active qui est utilisée médicalement dans plusieurs domaines, et nous avons limité notre discussion uniquement à son effet contre le bactérie de *l'Escherichia coli* à voir s'il peut être utilisé comme antibactérien grâce à l'application de l'évaluation in silico de l'activité antibactérienne (prédiction des propriétés ADMET , étude de l'inhibition de *l'Escherichia Coli* par amarrage moléculaire) et l'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne (évaluation du pouvoir antibactériennes composés étudiés, étude spectroscopique de l'activité antibactérien) .

Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastro-intestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages.

Les résultats de cette étude révèlent aussi les dérivés ferrocéniques que peuvent être un antibiotique efficace, car leur efficacité varie selon le type de dérivé Ferrocénique.

Finalement, à l'avenir, on s'attend à ce que les dérivés Ferrocéniques aient une large portée dans la conception et le développement de traitements pour diverses maladies et risques pour la santé.

---

# Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

- **Alavi, S. (2013).** Synthèse et évaluation biologique de dérivés de l' amino-benzosubérone, inhibiteurs puissants et sélectifs de l'Amino peptidase N ou CD13. Thèse de doctorat. Université de Haute-Alsace. P104.
- **Amesse, C., Lacroix, S., Lupien, G., & Bissonnette, D. (2001).** Canadian Hemophilia Society. Factor XIII Deficiency: An Inherited Bleeding Disorder.
- **Andrews, D.H.(1930)** Physical Review., 36, 544.
- **ANSM (agence nationale de sécurité du médicament et de produits de santé).** [En-ligne]. (25/05/2020). Interactions médicamenteuses et cytochromes [https://ansm.sante.fr/Dossiers/Interactions-medicamenteuses/Interactions-medicamenteuses-et-cytochromes/\(offset\)/1](https://ansm.sante.fr/Dossiers/Interactions-medicamenteuses/Interactions-medicamenteuses-et-cytochromes/(offset)/1).
- **Arrault A. (2007).** Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données : Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat en Modélisation Moléculaire Et Chemoinformatique. Université d'orléans. France.190 p.
- **Association Française des Enseignants de pharmacologie des Facultés de médecine. (1993).** Cours de pharmacologie. 3ème Edition Ellipses, Paris, 292- 300.
- **Avril J.L., Daberinat H., Dernis F., Monteil H., (1992).** Bactériologie clinique.1ère édition. éd. Marketing, Paris.
- **Avril J.L., Daberinat H., Dernis F., Monteil H.,(1992)** Bactériologie clinique. 2ème édition, ellipses, Parix.P375.,
- **Avril JL. (1991)** Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. ime Edition Ellipses, Paris, 11- 56.
- **Babic, M.A., Hujer, A. &Bonomo, R.A. (2006).** What's new in antibiotic resistance?Focus on-lactamases. Drug Resist. Uptat 9, 142-156.
- **Barameea, A. Coppinc, A. Mortuairec, M. Pelinskia, L. Tomavoc, S. & Brocarda, J. (2006).** Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones

## Références bibliographiques

---

- against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 1294-1302. *Bacteriologie*, 1-3.
- **Becke A (1993)**. *J. Chem. Phys.*, , 98, 5648. <https://doi.org/10.1063/1.464913>
  - **BELKADI, B. (2012)** La résistance bactérienne aux antibiotiques., p 60.
  - **Benesi, H. A. Hildebrand, J H. (1949)**. *Journal of the American Chemical Society*, ,(71), 2703-2707. doi: 10.1021/ja01176a030.
  - **Benmalek, Y. (2008)**. Etude de la résistance aux agents antimicrobiens (métaux lourds et antibiotiques) et évaluation du pouvoir dépolluant chez un nouveau taxon de la famille des flavobactériaceae (Doctoral dissertation).
  - **Berche P., Gaillard J.L., Simonet M., (1989)**. *Bactériologie: les bactéries des infections humaines*. 1ère édition. ed. Flammarion. Paris.
  - **Berche. P., Gaillard, J.L. & Simonet, M. (1991)**. *Bactériologie. Les bactéries des infections humaines*. Médecine-Sciences. Ed- Flammarion 660P.
  - **Berman H., Westbrook J., Feng Z. et al. (2000)**. *Nucl. Acids Res.*, , 28, 235.
  - **Benabdesselam, S. (2017)**. Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par l'arylation de ferrocène. Doctoratès sciences, Université KasdiMerbah, Ouargla, p61.
  - **Bechki, D Sellami, M. H., Bouguettaia, H., Zeroual, M., Kachi, S., Boughali, S., ... & Mahcene, H. (2013)**. Effect of absorber coating on the performance of a solar still in the region of Ouargla (Algeria). *Desalination and Water Treatment*, 51(34-36), 6490-6497.
  - **Bioud, M et Lassoued, N. (2015)**. Schéma D'élaboration d'une Molécule à Visée Thérapeutique et Application Biologique .Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine. P10.
  - **Bodor N., Buchwald P. (1999)** Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ; 36 (2-3) : 229–254. doi: 10.1016/s0169-409x(98)00090-8.
  - **Boeyens. J.C.A. J (1967)** .*Phy. Chem. Hhaca.*, 71, 2969.

## Références bibliographiques

---

- **Boukebbous K.(2009).**étude de complexes métalliques des ligands soufrés, Azotés et d'autres molécules halogénés . Mémoire de magister, Université mentouri ,constantine.p14.
- **Bouchagra S. (2018).** Modélisation des interactions protéine-petites molécules : Etude de la relation structure-fonction dans le cas des lipases. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Bioorganique : Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie. 145 p.
- **Boughoual, A. (2018).** Synthèse et caractérisation de composés de coordination antimicrobiens (Doctoral dissertation, Université de Lyon; Université AbbèsLaghrouKhenche-la (Algérie)).
- **Bouskraoui Mohamed Zouhair SaidSora Nabila Benaouda Amina Zerouali Khalid Mahmoud Mustapha,(2017).** Guide pratique des bactéries pathogènes. Société marocaine d'infectiologie et de vaccinologie Edition.
- **Bousseboua H. (2005).** Eléments de microbiologie. 2è•rn: Editions Campus club, Alger, 209- 213.
- **Bisognano, C. (2001).** Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de" Staphylococcus aureus": étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires (Doctoral dissertation, University of Geneva).
- **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, Food. Sci. Technol., 28, 25-30.
- **Bremner, I. (1998)** The American journal of clinical nutrition., 67, 1069S.
- **Brissou, P., Chamouilli, J.M., Gaillard, T. &Muzellec, Y. (2004).** Infections à pneumocoques. Encyclopédie Médico-chirurgicale 4- 260- 10, 1-13
- **Broadhead GD, Osgerby JM, and Pauson PL. (1958)** Ferrocene Aldehyde. *J. Chem. Soc.*, 0 : 650-655. <https://doi.org/10.1039/JR9580000650>.
- **Cattoir, V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. PathologieBiologie.Vol. 52, 607-616.
- **Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C &Garrabe, E. (2004).** Lactamines. E M Cmaladies infectieuses 1, 129 – 202.
- **Cavarelli, J.(12/05/2020).**Biocristallographie : De la détermination des phases à la structure cristallographique. Technique de l'ingénieur. [En ligne] [97](https://www.techniques-</a></li></ul></div><div data-bbox=)

## Références bibliographiques

---

- ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/chimie-pharmaceutique-42609210/biocristallographie-p1111/base-de-donnees-pdb-p1111v2niv10008.html.
- **Chabbi A., Nabti K. (2017).** Etude in silico de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la chitinase fongique. Mémoire de Master en Phytopathologie et phytopharmacie : Université 8 Mai 1945 Guelma. Algérie.. 49 p.
  - **Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Tang Y. 2012.** admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling.*, 52, 3099–3105.
  - **Clewell, D.B. (1993).** Bacterial conjugation. Plenum Press, New York.
  - **Courvalin, P.F., Goldstein, A.P. & Sirot, J. (1985).** L'antibiogramme. Ed. MPCVigot, Paris-Bruxelle.
  - **Craig, N.L. (1996).** Transposition, in: Neidhart FC, ed, *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> ed, Washington DC: American Society for Microbiology, 2339–2362.
  - **Cyril, K. (2010).** Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électroactifs basés sur le couple ferrocène/ferrocenium. Thèse pour l'obtention du titre de docteur en Science. Université de Neuchâtel. France.
  - **Daina A., Michielin O., Zoete V. (2017).** SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*; 7 : 42717. doi : 10.1038/srep42717.
  - **Dar A. M., Mir S. (2017).** Molecular Docking : Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques.* ;8 (2) : 356. doi : 10.4172/2155-9872.1000356.
  - **Davison, J. (1999).** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42 (2), 73-91.
  - **Dias R. (2008).** Filgueira de Azevedo Jr W. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, 9 (12): 1040-1047. doi: 10.2174/138945008786949432.
  - **Doss C. G. P., Chakraborty C., Narayan V., Kumar D. T. (2014).** Computational Approaches and Resources in single Amino Acid Substitutions Analysis Toward Clinical

## Références bibliographiques

---

- Research. *Avances in Protein Chemistry and Structural biology*.94: 1876-1623. doi : 10.1016/B978-0-12-800168-4.00010-X.
- **Douadi, I. (2014)** Etude de l'anti bio-résistances des souches bactériennes à l'origine des infections urinaires à l'EPH de Ouargla. [En ligne] mémoire de master. Université de OUARGLA, p 60.
  - **Duval J, Soussy C J. (1990)**. Les antibiotiques. 4ème Edition Masson, 4-48.
  - **Edwards, E. I. Epton, R. and G. Marr (1975)**. Organometallic derivatives of penicillins and cephalosporins a new class of semi- synthetic antibiotics, *journal of organometallic chemistry*, 85: 23-25
  - **El Hadj Said K. (2016)**. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de Master en Chimie Organique : Université de Tlemcen. Algérie.50 p.
  - **Ferron A., (1976)**. Bactériologie (à l'usage des étudiants en médecine). 8 émeédition.edGouan et Roques. ed. Politerchica. Paris.
  - **Fiher et Arnoldj R., (2001)**. L'essentiel en chimie pour biologiste. Bertiédition.
  - **Forli S., Huey R., Pique M. E., Sanner M. F., Goodsell D. S., Olson A. J. 2016** Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*. ;**11** (5) : 905-919 · doi : 10.1038/nprot.2016.051.
  - **Fournier, B., & Roy, P. H. (1997)**.Variability of chromosomally encoded beta-lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(8), 1641-1648.
  - **FrischM., Trucks G., Schlegel H. et al.(2009)**.Gaussian 09. GaussianInc., Wallingford CT.
  - **Freney J et al.(2007)** Précis de Bactériologie clinique. 2ème édition.
  - **Görmen, M. (2010)**. Synthèse de composèsorganomètalliques de la série du ferrocéno-phane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate, *Cancer. Chimie ParisTech*, 2010. Français, 244p.

## Références bibliographiques

---

- **Ghouti M., Halbigue H. (2019)** Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites. Mémoire de Master en Génie Pharmaceutique : Université de Djilali Bounaama. Khemis Miliana. Algérie.. 46 p.
- **Guedes I. A., de Magalhães C. S., Dardenne L. E. (2014)**. Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical reviews.*;6 (1) : 75–87. doi : 10.1007/s12551-013-0130-2.
- **Gupta P. K. 2018** Illustrated Toxicology: With Study Questions. Elsevier, 1st Edition.: 67-106. doi: 10.1016/B978-0-12-813213-5.00002-X.
- **Gut mann, L. & Williamson, R. (1987)**. Paroi bactérienne et  $\beta$ -lactamines. *Med Sci* 3,75-81.
- **Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon. R., W., gihman, A. G. (1996)** : les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9<sup>ème</sup> édition.
- **Hayes, W. (1968)**. The genetics of bacteria and their viruses, 2<sup>end</sup> ed.
- **Hazan C. 2008** Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase Beta par criblage virtuel et RMN. Thèse de doctorat d'université : biologie structurale. Université de Toulouse III - Paul Sabatier. France.. 249 p.
- **Hanzab, N., Houas, M. (2013)**. Synthèse, séparation et identification de quelques propriétés physico-chimiques de ferrocenyl-2- nitrobenzène mono et bis-substitué., mémoire du master académique, Université de KasdiMarbah Ouargla., Algérie, 24p.
- **Hetényi, C. U. Maran.M. (2003)**Karelson, *Journal of chemical information and computer sciences.*, 43, 1576.
- **Hemmami, H.(2017)**. Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocenylmethyl) nitroaniline. Thèse de doctorat en chimie, Université Echahid Hamma Lakhdar, ELOUED, p13.
- **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.
- **Houlton A, Isaac CJ, Gibson AE, Horrocks BR, Clegg W, Elsegood MRJ.(1999)**. Synthesis, structure and redox properties of ferrocenylmethyl nucleobases. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* 1999,18: 3229-3234. <https://doi.org/10.1039/A905168F> .
- **Hohenberg, P and Kohn, W., 1964**. *Phys. Rev.*, 136, B846.

## Références bibliographiques

---

- **Holm, R.H. P. Kennepohl.E.I. (1996).** Solomon, Chemical Reviews., 96, 2239. <https://wiki.ubuntu.com/kmezhoud/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=docking.pdf>
- **Jade D. D., Gupta D. (2016)** Introduction to methods for molecular docking and HT virtual screening..doi : 10.13140/RG.2.2.12322.84167.
- **Keseru. G.M. Menyhárd, D.K (1999).** Biochemistry, 38, 6614.
- **Kealy, T. J., Pauson, P. L., (1951).** A New Type of Organo-Iron Compound, dans Nature, vol.168, 1951, p. 1039.
- **Kopp, C.(2010).**Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électro actifs basés sur le couple « ferrocèneferrocénium ». Thèse de doctorat, Université de Neuchatel, Faculté des sciences.
- **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.
- **Khalef, A. (2012).** Etude du comportement électrochimique de 1-(ferrocenyl)ethanol et nitrophenyleferrocenes. Mémoire de magister. Université Mohamed Khider , Biskra. P8
- **Khalef, A. (2014).** Synthèse et étude du comportement anodique de quelques Nferrocenyl-Nphenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N'-phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider Biskra. P6-12.
- **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 MOKHTARAnaba. P75
- **Kuhn, A. (2019).** Bacterial Cell Walls and Membranes. 92. Springer.
- **Ladjouzi R. (2013).** Notions de base de la bactériologie générale. Cours pédagogique au profit des étudiants de deuxième année SNV. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Bejaia, Algérie.
- **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.
- **Lavigne, J.P. (2007).** Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. M B7

## Références bibliographiques

---

- **Le Minor, L. & Veron, M. (1990).** Bactériologie médicale. Ed. Médecine Science, Flammarion. 1107P.
- **Lebbad F. (2016).** Etude par modélisation moléculaire des mécanismes de complexation. Thèse de doctorat en Chimie Théorique et Modélisation moléculaire. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 96 p.
- **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
- **Lesueur D., Serra D. de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J. ; (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 317-321.
- **Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Chu FY, Wu MY, Huang YT, Hsueh PR. (2010).** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35 (5): 457-60.
- **Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. 1997** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Advanced Drug Delivery Reviews.*; **23**: 3-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- **Madi A., (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Magister, Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, 5 ; 17 ; 51 ; 55p.
- **Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. [Eds] ., (1997).** *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London. 8th Ed 986 pp.
- **Magali, T. (2004).** thèse de doctorat, Université de Montpellier I, U.F.R. DE Médecine, France.
- **Mahmoudi, N. & Nems, A. (2009).** Etude du comportement anodique de N-phényl-N-benzoylferrocénylméthylamine. Mémoire de licence académique. Centre Universitaire d'ELOUED, Algérie. p48.

## Références bibliographiques

---

- **Magnet, S., Courvalain, P. & Lambert, T. (2001).** Resistance-nodulation cell division type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain B M 4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol.45, N°.12: 3375-3380.
- **Majumder, K., Butcher, R. J., Bhattacharya, S. (2002).** Chemistry of Some Amino Acid Complexes of Ruthenium. Synthesis, Characterization, and DNA Binding Properties. *Inorganic Chemistry*. *Inorganic Chemistry*. 41 (17), 4605–4609. DOI: 10.1021/ic010775o.
- **Marc T.; Gerard W.; Denis L., (2001).** Classification des anti-inflammatoires in *Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux*. 4ème Edition. P 426.
- **Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Gluczynski, Y., Jacobs, F., Malfroot, A., Tulkens, P. M. & Van Bambeke, F. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. In press 126, 8, 305-316.
- **Mezhoud K. (10/05/2020).** Doking Principes et Méthode. Ubuntu wiki [Enlinge] .
- **Mohamed Nazim BENAOUA (2012).** Etude Théorique des complexes organométalliques à base de ruthénium par des calculs de chimie quantique université d'Oran mémoire de magistère en chimie organique
- **Monsallier JF, Carli A, Dhainant J F. (1992).** Précis de thérapeutique, volume I. office des publications universitaire, 112-309.
- **Morris G. M., Lim-Wilby M. (2008).** Molecular Docking. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* ; 443 : 365–382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2\_19.
- **Mulliken, R.S. (1952).** *J. Phys. Chem.*, 56 (801), 53.
- **Nassif X. & Philippon A. (2019).** Relations Hôte-Pathogène. Faculté de Médecine Necker-Enfants-Malades, Paris V
- **Nauciel C, Vildé JL. (2005).** *Bactériologie médicale*. Edition Masson, Paris, 68- 69.
- **Nauciel C. (2000).** *Bactériologie médicale*. Edition Masson, Paris, 52-70.
- **Neghmouche, NS., Khelef, A. et Lanez, T. (2010).** Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 01(76-82).

## Références bibliographiques

---

- **Nikaido, H. & Vaara, M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial Rev* 49, 1-32.
- **Osato M. (2009)** Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17 (1): 39-44.
- **Parr. R. G. and Yang. W. (1989).** « Density Functional Theory », Oxford University Pressm.
- **Persons, W.B., Mulliken, R.S (1969).** Molecular CT complexes; a lecture and reprint volume, , Wiley, New York.
- **Pharmacomédicale.org (25/05/2020).** Pharmacocinétique ABSORPTION –. [Enligne]. <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament/74-absorption>.
- **Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D. & Denis, F. (2005).** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immunologie et Biologie spécialisée*. Vol. 20, N°. 6, 343-352.
- **Prescott LM, Harley J P, Klein D A. (2003).** Microbiologie. 2<sup>e</sup> Edition De Boeck & Larcier, 808- 817.
- **Priyanka Banerjee, Andreas O Eckert, Anna K Schrey and Robert Preissner (2018 Jul 2).** ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.*; 46(WebServer issue): W257–W263. (Doi: 10.1093/nar/gky318).
- **Rao, C.N.R. (1967).** Ultraviolet and Visible Spectroscopy, , Butterworths, London.
- **Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2014).** *Sherris medical microbiology*. McGraw-Hill Education.
- **Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015).** Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.
- **Rowe - Magnus, D.A. & Mazel, D. (2001).** Integrons : natural tools for bacterial genome evolution. *Gen Opin Microbiol* 4, 565-769.

## Références bibliographiques

---

- **Roy, R.H. (1997).**Dissemination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/Sciences* 13, 927-933.
- **Sagar, S., Kaistha, S., Das, A. J., & Kumar, R. (2019).** Antibiotic Resistant Bacteria: A Challenge to Modern Medicine. Springer.
- **Savjani K. T., Gajjar A. K., Savjani J. K. (2012)** Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *International scholarly research notices (ISRN) pharmaceuticals*. 2012;: 195727. doi: 10.5402/2012/195727.
- **Sergio Filipe Sousa, P. A. (2006).**Protein–Ligand Docking : Current Status and Future Challenges. *PROTEINS : Structure, Function, and Bioinformatics*, 15–26.
- **Sheldrick, G & M. Herbst-Irmer, R., (1998).** Refinement of twinned structures with SHELXL97. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 54(4), 443-449.
- **SouyelB.(2015).** Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Mémoire de Master en Chimie Organique Analytique : Université d'EL-Oued. Algérie. 94 p.
- **Terki, B. (2007).** Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl- N'alkyl férrocenyl méthyle hydrazide, 144p.
- **Tortora G J, Funke BR, Case CL. 2003.** Introduction à la microbiologie. Edition Renouveau Pédagogique, Canada, 605-624.
- **Towner, K.J. (2002).**Intégrons: their role spread of antibiotic resistance and therapeutic impact. *Antibiotiques*. Vol. 4, N°. 1, 45-49.
- **Turel, I.,Golobic,A. Klavzar,A. Pihlar,B. Buglyo,P .Tolis,E . Rehder,D .Sepcic, K J. (2003)**Inorg. Biochem, 35,199.
- **Vandenesh, F., Etienne, J. (1997).** Protéines liant la pénicilline: cibles des  $\beta$ -lactamines. *MédecineThérapeutique3* : 61-65.
- **Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D. 2002;**Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of medicinalchemistry*. 45:2615-2623. doi: 10.1021/jm020017n.
- **Woodward, R. B., Rosenblum, M., & Whiting, M. C.(1952).** A new aromatic system, *journal of the American chemical society*, Vol 74(13),p3458–3459.DOI: 10.1021/ja01133a543.

## Références bibliographiques

---

- **Yves Landry Jean-Pierre Gies. (2014).** Pharmacologie des cibles à la thérapeutique Cours et fiches thérapeutiques.3 ème édition. Paris. P :8.
- **Yong-hua, G. (2007).** Etudes de synthèse électrochimiques et de fluorescence de nouveaux dérivés de la 1,2,4,5-tétrazines en tant que sondes moléculaires pour des anions et des composés riches en électrons et étude de synthèses électrochimiques de sels de ferrocène à base de pyridinium. Thèse du doctorat, Ecole normale supérieure de Cachan- ENS, Cachan .p183.
- **Zerari, A (2013).** Synthèse, Séparation et Identification de mnitrophenyl ferrocene mono et bissubstitue. Mémoire master, Université KASDI MARBAH, Ouargla.p3-4.
- **ZAOUIA, Y. (2020).** Diagnostic biologique des infections bactériennes.

---

# *Annexes*

---

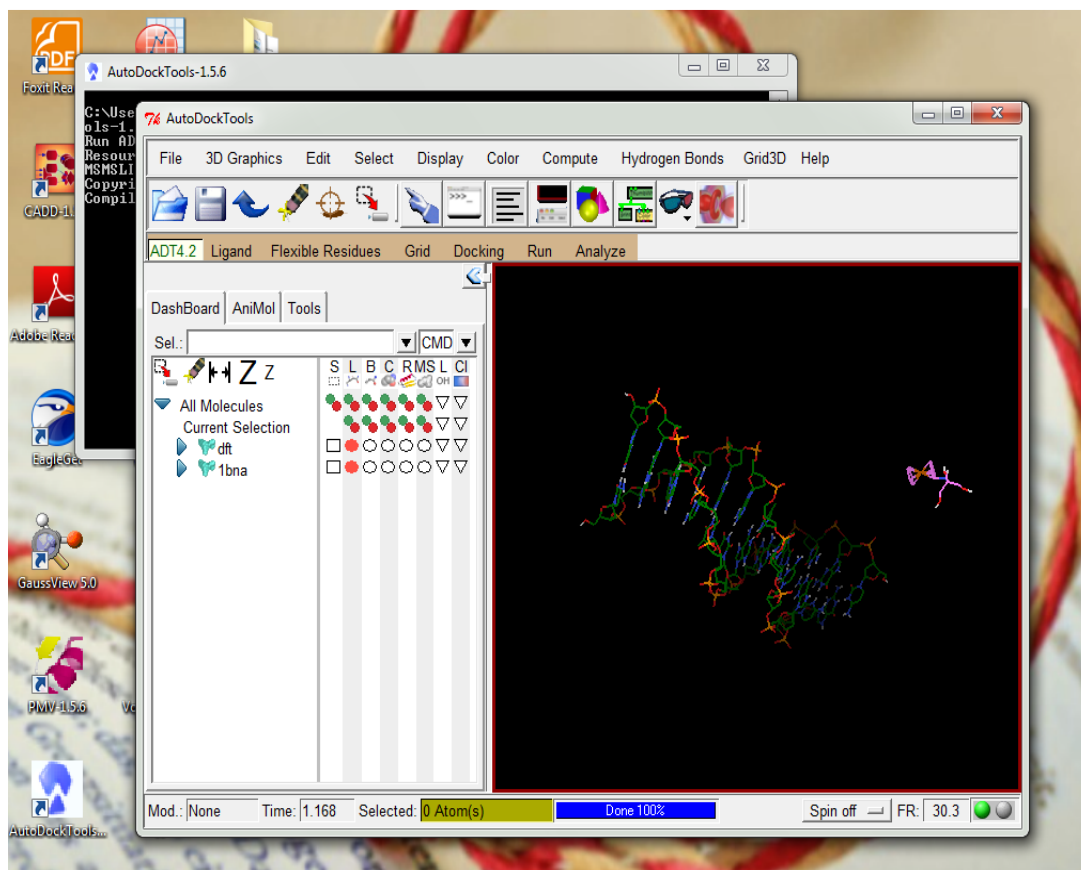


Figure 01 :LogicielAutodockTools.

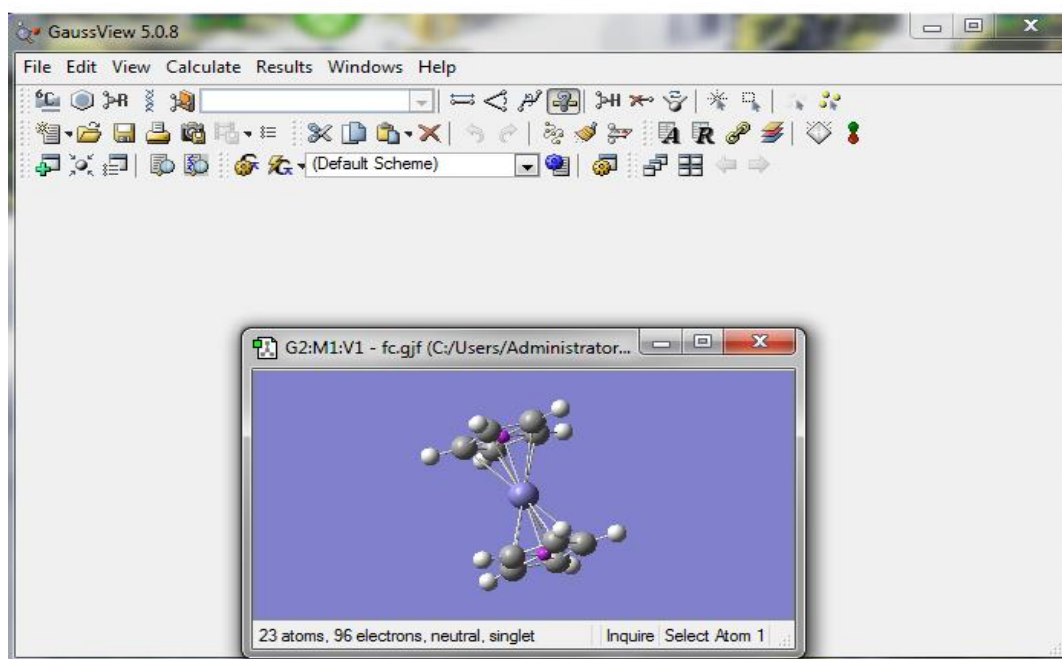


Figure 02 :Logiciel Gaussian 09.

## Annexes

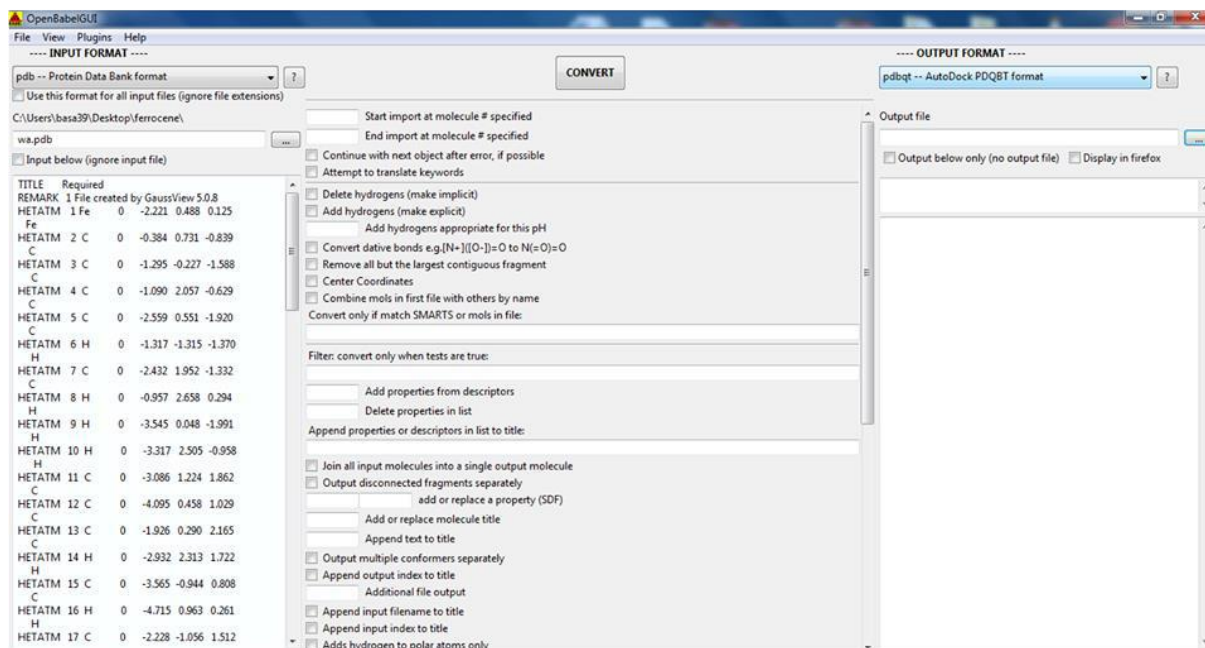


Figure 03 :LogicielOpenBabel



Figure 4:spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800).



**Figure 5: Autoclave(Photo originale, 2022)**



**Figure 6: bouillons nutritive (Photo originale, 2022)**



**Figure 7:** Concentration des dérivés ferrocène étudiées (Photo originale, 2022).

**Tableau :** Informations sur les bactéries

	<b>Strains</b>	<b>Code</b>	<b>Gram</b>
S1	Escherichia coli	ATCC 25922	-
S2	Bacillus subtilis	ATCC 6633	+
S3	Listeria innocua	CLIP 74915	+
S4	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 6538	-
S5	Staphylococcus aureus	ATCC 14028	+