



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued

كلية العلوم الدقيقة

Faculté de Sciences Exactes

قسم الكيمياء

Département de Chimie



Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en chimie

Spécialité : Pharmacochimie des substances actives d'intérêt biologique

SUJET DE LA THESE :

**Synthèse, caractérisation, étude in vitro de l'activité biologique
et analyse in silico et in vivo de quelques dérivés N-ferrocényl-
méthyltrishydroxyméthylaminométhanes et
N-ferrocénylméthyltrifluorométhylanilines**

Présentée par : Mme ADAIKA Aicha

Soutenue le : 00/00/2020

Devant le jury composé de :

M ^r OUAHRANI M.R.	Professeur	Université d'El-Oued	Président
M ^r BECHKI L.	Professeur	Université de Ouargla	Examineur
M ^r SAIDI M.	Professeur	Université de Ouargla	Examineur
M ^{me} MEDILA I.	MCA	Université d'El-Oued	Examinatrice
M ^r LANEZ T.	Professeur	Université d'El-Oued	Rapporteur

Année universitaire :2020/2021

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Remerciement	
Dédicace	
Listes des abréviations	
Résumé	
Listes des figures	
Listes des Tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur le ferrocène et ces applications	
I.Introduction	08
I.1. Chimie bioorganométallique	08
I.2. Le ferrocène, une cible thérapeutique de choix	09
I.3. La chimie de ferrocène	09
I.4. Propriété de ferrocène	10
I.5.Applications des Ferrocène	15
I.6. La Chimie médicinal de ferrocène	16
I.7. Les composés organométalliques et cancer	20
I.8. Stratégie anticancéreuse étudiée au laboratoire	21
I.9. Principe théorique des techniques expérimentales utilisées	21
I.9.1. La spectrophotometrie UV- Visible	21
I.9.2.les méthodes d'analyses électrochimiques	22
Références bibliographiques	30
Chapitre II : Synthèse et caractérisation de dérivés ferrocéniques	
II. Introduction	35
II.1. Méthode de synthèse des dérivés ferrocéniques étudiés	35
II.2. Préparation de sel quaternaire d'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium	37
II.3. Synthèse des dérivés ferrocéniques étudiés	40
II.3.1. Synthèse de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane	41
II.3.2. Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethylaniline substitué par le Fluor ou le chlore	42
II.3.2.1 Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline	42
II.3.2.2 Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 2 et 3-chloroaniline	43
II.4. Propriétés physique et analytique des dérivés ferrocéniques synthétisées	44
II.5. Caractérisation structurelle et identification des dérivés synthétisés	45
II.5.1. Caractérisation UV-VIS	45

II.5.2. Comportement électrochimique par voltamétrie cyclique	46
II.5.3. Caractérisation par la méthode spectroscopique d'identification FTIR	48
II.5.4. Caractérisation par la Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	50
II.5.4.1. RMN H1 et RMN C ¹³ de Fc-Tris	50
II.5.4.1. RMN H1 et RMN C ¹³ de FM3FM aniline	51
Références bibliographiques	52
Chapitre III : Etude de l'activité antimutagène	
III. Introduction	54
III.1. L'ADN une cible moléculaire des anticancéreux	54
III.1.2. Définition de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique)	55
III.1.3. Structure de l'ADN	55
III.1.4. La structure primaire et secondaire de l'ADN	56
III.1.5. Stabilisation de la double hélice	58
III.1.6. Les sillons de l'ADN	58
III.1.7. Fonction	59
III.1.8. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique	61
III.1.9. Les propriétés spectrales	62
III.1.10. Mutation	63
III.1.11. Interaction de petites molécules organométalliques-ADN	64
III.2. La BSA et la pharmacocinétique des anticancéreux	67
III.2.1. Introduction	67
III.2.2. Caractéristiques Générales Des Protéines	68
III.2.2.1. Structure	68
III.2.2.2. Dénaturation	69
III.2.3. L'albumine De Sérum Bovin (BSA)	69
III.3. Partie expérimentale	72
III.4. Résultats et discussion	81
III.4.1. Interaction DF-ADN	82
III.4.1.1. Etude de l'Interaction Fc-tris-ADN par méthode spectroscopique	82
III.4.1.2. Etude de l'interaction FcTris-ADN par méthode électrochimique (par la voltamétrie cyclique)	84
III.4.2. Interaction DF-BSA	92
III.4.2.1. Etude de l'interaction Fc-Tris-BSA par méthode spectroscopiques UV-Vis	93
III.4.2.2. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique de Fc-Tris- BSA	94
III.5. Discussion	98
Références bibliographiques	101
Chapitre IV: Evaluation de l'activité antioxydant des dérivés synthétisés	
IV. Introduction	105
IV.1. Les radicaux libres	105

IV.2. Activité antioxydante	109
IV.2.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro	115
IV.2.4.1. La méthode spectroscopique	115
IV.2.4.2. La méthode électrochimique	118
IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro	121
IV.3.1. Matériels et méthodes	121
IV.3.2. Résultats et discussion	122
IV.3.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante In vitro par méthode électrochimique	122
IV. 3.2.1.1. Méthode scanvaging du radical superoxyde anion par voltamétrie cyclique	122
IV. 3.2.1.2. Etude de l'interaction entre le radical superoxyde anion et l'antioxydant O₂⁻OA	122
IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante in vivo.	143
IV.4.1. Matériels et méthodes	143
IV.4.2. Résultats et Discussion	145
IV.4.2.1. Effet de traitement des rats par le FcTris et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine	145
IV.4.2.2. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les rattes exposées au métribuzine	146
IV.4.2.3. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine	151
IV.4.2.4. Etude histologique de foie	156
IV.5. Discussion	157
Références bibliographiques	160
Chapitre V : Etude de l'interaction entre DF et ADN et BSA par Amarrage moléculaire	
V. Introduction	164
V.1. Modélisation moléculaire	164
V.2. L'amarrage moléculaire (Docking)	166
V.3. Matériels et méthodes	168
V.4. Résultats et Discussion	172
V.4.1. Modélisation des interactions FC- ADN par Amarrage moléculaire	172
V.4.2. Modélisation des interactions FC- BSA par Amarrage moléculaire	179
V.4.3. Résultats des orbitales HOMO et LUMO	184
Références bibliographiques	188
Conclusion générale	190
Annexes	192
Publication scientifique	218

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le Courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse, il a été et sera toujours à côté de moi pour réussir à terminer n'importe quel travail. Ce travail de recherche a été effectué dans le Laboratoire valorisation et technologie des ressources saharienne (VTRS), situé à l'université El oued.

Je remercie le **Pr. LANEZ Touhami** directeur de ma thèse pour m'avoir encadré et accueilli dans son laboratoire. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans son aide précieuse, sa patience, sa gentillesse, ses compétences en chimie et son professionnalisme et Sa grande culture de la chimie organométallique a été une source de solutions pour tous les problèmes qui se sont présentés durant ces années. Ses encouragements, associés aux moyens matériels dont j'ai disposés, m'ont permis de mener à bien la recherche présentée dans cette thèse. Enfin, Je le remercie d'avoir été présent chaque fois que j'en avais besoin et de m'avoir proposé un sujet si intéressant et si enrichissant. C'est pourquoi je lui exprime ma plus grande gratitude.

J'ai eu l'honneur de soumettre cette thèse au jugement d'une assemblée remarquable. Je remercie Monsieur **Ouahrani mouhammed reda** Professeur à la faculté des sciences exactes de l'université El oued d'avoir présider ce Jury, Monsieur **Saidi mokhtar** et Monsieur **Bechki lazhar**, Professeurs à l'Université de Kasdi Merbah-Ouargla et Madame **Medila ifriqiya** Maître de conférences (A) à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université El Oued furent des examinateurs méticuleux et je les remercie pour leurs nombreux conseils et remarques. Je leur en suis très reconnaissante de même que pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

L'achèvement de ce travail laborieux n'aurait pu se faire sans la présence et la collaboration de plusieurs personnes. Chacune d'elles ayant été pour moi d'une grande importance tout le long de ce travail. Je tiens aujourd'hui à remercier tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire surtout **Dr HENNI Meriem et Dr ADAIKA Donia**

Dans le laboratoire, j'ai bénéficié de plusieurs techniques déjà établies et maintes fois testées par les gens qui ont été présents avant moi. J'aimerais les remercier ainsi que tous ceux qui ont croisé mon chemin durant ces trois années, entre autres: **Dr.Hemmami hadia, Dr.Hénni meriem, Dr. Zegheb nadjiba, Dr. Lanez hafnaoui, Dr. Ben amara hacen. Dr.Benaicha Hanane et Dr Mouada Hanane**

Je désire remercier tout particulièrement **M. Tliba Ali**, Ingénieur de Laboratoire VTRS de m'avoir facilité la réalisation de mes travaux de thèse. Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Dr. Torki Belgacem** pour m'avoir formée en synthèse organique des complexes ferrocéniques Merci pour votre patience, vos conseils et nos discussions scientifiques.

Finalement, Je réserve une mention particulière à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien, leur très grand cœur, leur gentillesse et tout particulièrement : Pr Legseir belkacem, Dr. Chouikhe Atef, Mr Bouali noureddine, Dr.Hamad brahim, Dr. Acila smail, M^{me} NAdji nassima, M^{me} Karoui Radja, Aouimer Meriem, DrMahboub Nasma, Zouiouiche Fatma, Boukhari Dalal, HadeF Leila, Houmeri Nawel , je les considère comme de véritables amis. Puisque chaque personne rencontrée a une influence sur nous, je suis convaincue que leur contact a fait de moi une personne meilleure.



DÉDICACES

Je dédie ce travail

A mes chers parents : Smail et Yasmina

A Mon mari : Ahmed

A mes enfants : Abdelmoez, manal et ouissam

A ma chère grande mère Zohra

A mes chers : M^r Saker Aissa et sa femme Noura

A Mes frères et sœurs

A toute ma famille et ma belle famille

A tous ceux qui me sont chers...

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine	ΔG : énergie libre de liaison
Å : Ångström	EDTA : Acide éthylène Diamine
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	Tétraacétique
ADT : AutoDockTools	EOR ou ROS : Espèces oxygénées
AFP : Alpha-FeotoProtéine	réactives
AG : Acide gallique	ESM : Ecartype moyenne
ALAT : alanine aminotransférase	E0 : Potentiel formel
ARN : Acide RiboNucléique	ECL : électrochimiluminescence
ASAT : aspartateaminotransférase	Fc : Ferrocène
AMP : Acide monophosphate	Fe : Fer
ATP : Acide triphosphate	Fe²⁺ : Fer ferreux
BHT :Butylhydroxytoluène	Fe³⁺ : fer Ferrique
BHA : butylhydroxyanisole	FcTris :ferrocénylmethymtrishydroxymeth
BSA : Sérum bovin albumine	ylaminomethane
Ca : Calcium	FM3FmA : Ferrocénylméthyl-3
CAT : Catalase	fluoromethylaniline
CDNB :1-Chloro-2,4-dinitrobenzène	FM3CIA : Ferrocénylméthyl-3
cm : centimètre	chloroaniline
CO₂ : anhydride carbonique	FM2CIA : Ferrocénylméthyl-
Cp₂Fe : bis(cyclopentadiényl)fer	2chloroaniline
CQ : chloroquine	g : gramme
D0.1 : Dose 0.1mg/Kg	G : Guanine
D0.2 : Dose 0.2mg/Kg	GB : globule blanc
°C : Degrés Celsius	GLDH : glutamate déshydrogénase
C : Cytosine	GPT : Glutamate pyruvate transaminase
CCM chromatographie sur couche mince	GGT ou γ-GT : Gamma-
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène	glutmytransférase
Cispt : Cisplatine	GR : glutathion réductase
cm : centimètre	GSH :Glutathion réduite
CO₂ : anhydride carbonique	GST : Glutathion S-transférase
CV : Voltamétrie Cyclique	H : Hydrogène
DA : deoxyadénine	H₂O : eau
dlg : AutoDock docking log	H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène
DPPH : 2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl	H₃PO₄ :Acide phosphorique
DMF : N,N-diméthylformamide	HCL :Chlorure d'hydrogène
DMSO : Dimethyl sulfoxide	
DO : Densité Optique	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
DT : deoxythymidine	HOMO : Highest Occupied Molecular
DTNB : 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque	Orbital
DFT : Density Functional Theory	Ipa : courant de pic anodique
dl : décilitre	Ipc : courant de pic cathodique
DL50 :Dose létale 50	IR : infra-rouge
	IC50 : concentration en produit nécessaire
	pour inhiber la croissance du témoin de

50%concentration en produit nécessaire pour inhiber la croissance du témoin de 50%

K : constant de liaison

K₂HPO₄ : **Hydrogénophosphate** de potassium

Kcal : **Kilocalorie**

KH₂PO₄ : **Phosphate** de potassium monobasique

KJ : Kilojoule

Kg : Kilogramme

l : Litre

LDH : **Lactate** Déshydrogénase

LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

M : molaire

MDA : Malondialdéhyde

mg : Milligramme

min : minute

mM :millimole/l

mmol : millimole

Moy : moyenne

NaCl : Chlorure de sodium

μA : micro-ampère

MDA : malondialdéhyde

MDH : Malate déshydrogénase

MgSO₄ : sulfate de magnésium anhydre

Moy : moyenne

mV/s : millivolt sur seconde

μl : microlitre

μM :micromole

μm: micromètre

N : Azote

NaCl : Chlorure de sodium

NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : **Nicotinamide** adénine dinucléotide phosphate

nm : Nanomètre

nM :nanomole

NS : Différence non significative

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

NH₃ : ammoniac

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

NS : différence Non Significative

O₂⁻ : superoxyde anion

PAL : phosphatase alcaline

PDB : Protein Data Bank

PBS : Phosphate Buffer Solution

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

pNPP : p-nitrophénylphosphate

POD : Peroxydase

ppm : Parties par million

p. f. : point de fusion

PAL :Phosphatase alcaline

pH : potentiel Hydrogène

prot : protéine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RX : Rayon X

Rf retention factor

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SOD : Superoxydesdismutases

S : Taille de site de liaison

SDS : Sodium Dodecyl Sulfat

Tm: Température de dénaturation thermique de l'ADN

T : Thymine

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

TGO : glutamate oxaloacétate-transaminase

TBS : tampon phosphate salé

TGP : glutamate-pyruvate-transaminase

Tm : Température de fusion

TNFα : Facteur de nécrose tumorale alpha

TP : Témoin Pesticide

trs : Tours

Tris : **Trishydroxyméthylaminométhane**

UI : Unité internationale

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Vis : Visible

U : Uridine

UV : Ultraviolet

Vis : Visible

VTRS : Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes

ΔEp : Différence de potentiel

μl : microlitre

Résumé

L'objectif de notre étude est l'évaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité antioxydante et antimutagénique de dérivés du ferrocène synthétisés au laboratoire. L'activité antimutagénique des composés synthétisés a été évalué par l'interaction de ces composés avec de l'acide désoxyribonucléique et le sérum albumine de vache in vitro par deux méthodes : spectroscopique et électrochimique et in silico par l'amarrage moléculaire en utilisant l'Autodock Tools. Les résultats de l'amarrage moléculaire et in vitro montrent qu'il y a une interaction spontanée entre ces dérivés et l'ADN ainsi que la BSA qui se lie par intercalation ou par liaisons hydrogènes, traduite par les paramètres d'interaction K et ΔG , les résultats montrent aussi que la forme réduite de dérivé ferrocénique réagit avec l'ADN plus que celle de la forme oxydée. En effet cette interaction est confirmée par la valeur de coefficient de diffusion D et la taille de site de liaison qui confirme davantage la formation du complexe Fc-ADN. En revanche, l'étude de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques a été évalué par la méthode électrochimique en utilisant le test de piégeage de radical superoxyde, les résultats ont montré que ces dérivés possèdent une activité inhibitrice du radical superoxyde anion comparé au standard acide gallique et la BHA. En fin, L'analyse in vivo chez les rats Wistar, montre des changements notables dans les paramètres biochimiques. Cependant, le traitement par le Fc-Tris normalise les paramètres biochimiques en diminuant l'état de stress. L'étude histologique des foies des rats montre que le Fc-Tris provoquent une protection contre la nécrose tumorale.

Mots clés : ADN, BSA, ferrocène, l'amarrage moléculaire, constante de liaison et énergie libre de liaison, paramètres biochimiques, stress oxydatif. Rats Wistar

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure I.1	La structure proposée par Pauson et Kealy 1951 à gauche et la structure corrigée par Wilkinson et Fischer à droite	09
Figure I.2	Conformation décalée (a) et éclipsée (b) du ferrocène.	10
Figure I.3	Spectre d'absorption Uv-Vis du ferrocène dissout dans le méthanol	12
Figure I.4	Spectre RMN d'hydrogène et de carbone du ferrocène	13
Figure I.5	Oxydation mono électronique réversible du ferrocène	13
Figure I.6	Voltamogrammes cyclique de ferrocène 10^{-3} mM dans ACN / 0.1 M de $(\text{Bu}_4\text{NPF}_6)$ à différentes vitesses de balayage allant de 25 à 500 mV	14
Figure I.7	Les réactions organiques de ferrocène	15
Figure I.8	synthèse de ferrocène	16
Figure I.9	Structure de pénicilline et céphalosporine et les dérivés ferrocéniques correspondants	17
Figure I.10	Structure de chloroquine et ferroquine	18
Figure I.11	Structure des dérivés ferrocéniques anti HIV	19
Figure I.12	L'hydroxyferrocifène, bioisostère de l'hydroxytamoxifène	20
Figure I.13	Représente une courbe typique d'un voltamogramme	23
Figure I. 15	Allure générale de la courbe voltampérométrique d'un système rapide et ces grandeurs caractéristiques (Original)	24
Figure I. 16	Allure d'un voltampérogramme cas d'un système quasi-rapide(a), lent (irréversible) (b), rapide (réversible) (c)	27
Figure II.1	Chemin de synthèse de sel quaternaire	37
Figure II.2	Structure chimique de N-N-Diméthylaminométhylferrocène	38
Figure II.3	Structure chimique d'Iodure du Ferrocénylméthyltriméthylamonium	39
Figure II.4	Structure chimique de N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane	41
Figure II.5	Chemin réactionnel de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane	41

Figure II.6	Chemin réactionnel de la synthèse des composés FcM3FMA et FcMCIA	42
Figure II.7	Structure chimique de N-Ferrocenylmethyl N-3-trifluorométhylaniline.	42
Figure II.8	Chemin réactionnel de synthèse de dérivé N-ferrocenylmethyl -3-trifluorométhylaniline ((1) : sel quaternaire, (2) : la base 3-trifluorométhylaniline et (3) : le dérivé ferrocénique synthétisé)	43
Figure II.9	Structure chimique de (1) N-Ferrocenylmethyl. (2) 2-chloroaniline N-Ferrocenylmethyl 3 chloroaniline	43
Figure II.10	Chemin réactionnel du synthèse N-ferrocenylmethyl 2 et 3 chloroaniline via la réaction de sel quaternaire.	44
Figure II.11	Spectroscopie électronique UV-Vis des différents dérivés synthétisés	45
Figure II.12	Voltamogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques $10^{-3}M$ enregistré en milieu organique (acétonitrile) en présence de Bu_4NBF_4 $10^{-3}M$ à différentes vitesses de balayage sur une électrode de CV.	47
Figure II.13	Spectroscopie FT-IR de dérivé Fc-Tris	49
Figure II.14	Spectroscopie FT-IR de dérivé FM3FMA	49
Figure III.1	ADN dans le noyau cellulaire.	55
Figure III.2	Les bases azotiques : pyrimidine et purine	56
Figure III.3	La structure primaire de l'ADN	57
Figure III.4	Structure des paires de base proposée par Watson and Crick .	57
Figure III.5	Structure secondaire de l'ADN	58
Figure III.6	Vue schématique de l'ADN-B double brin montrant le grand et le petit sillon. A droite : les deux paires de bases AT et GC avec leurs groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.	59
Figure III.7	Fourche de la réplication	60
Figure III. 8	Synthèse des protéines	61
Figure III.9	Dénaturation de l'ADN par la Température (Chennouf,2011).	62
Figure III.10	Résumé du mécanisme d'action des anticancéreux	65

Figure III.11	Représentation d'une chaîne d'acides aminés où sont montrés les différents types d'interaction intervenant dans le repliement de la chaîne latérale	68
Figure III.12	Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les accepteurs	71
Figure III.13	Les structures chimiques des composés étudiés	74
Figure III.14	Spectre d'absorption de l'ADN.	76
Figure III.15	Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de DF libre et celui lié à l'ADN	80
Figure III.16	Spectre d'absorption UV-Vis de FC Tris (4 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH =	82
Figure III.17	Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.	83
Figure III. 18	Voltamogrammes cycliques de FC Tris (2mM) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.	84
Figure III.19	Voltamogrammes cyclique de FC Tris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistrés sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. à l'intérieur : Droite de régression du $\log 1/[\text{ADN}]$ en fonction de $\log I_{pa}/(I_{pa0} - I_{pa})$	84
Figure III.20	Voltamogrammes cycliques de FC Tris (2mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence de 2.49 μM d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2.	86
Figure III.21	Voltamogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN.	88
Figure III.22	Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.	89
Figure III.23	Tracé de C_1/C_n en fonction de [ADN]	90

Figure III.24	Spectre d'absorption UV-Vis de Fc-tris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'BSA dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2. à l'intérieur Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de BSA.	93
Figure III.25	Voltamogrammes cyclique de Fc-tris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon à pH 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. à l'intérieur : : Droite de régression du $\log I/[BSA]$ en fonction de $\log I_{pa}/(I_{pa0} - I_{pa})$	94
Figure III.26	Voltamogrammes cycliques de Fc-tris(2mM) en absence de BSA (ligne noire) et en présence de BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon a différent pH 7,2	96
Figure III.27	Voltamogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de BSA.	96
Figure III.28	Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de BSA.	97
Figure IV.1	Les principales sources de radicaux libres	106
Figure IV.2	Les principaux radicaux libres et les mécanismes de détoxification	107
Figure IV.3	Les principales réactions des Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	110
Figure IV.4	Les principales enzymes antioxydantes.	111
Figure IV.5	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires	115
Figure IV.6	L'absorption de DPPH de couleur violet déviant jaune après la neutralisation	116
Figure IV.7	Structure de la molécule de DPPH	116
Figure IV.8	La réaction de DPPH en présence des antioxydants	116
Figure IV.9	Voltamogrammes cyclique de l'oxygène dans le DMF/0.1M(Bu_4NPF_6) à ne vitesse du balayage 100mV/s	191
Figure IV.10	formation d'anion superoxide	120
Figure IV.11	Voltamogrammes cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S	122

Figure IV. 12	Voltamogrammes cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S	123
Figure IV.13	Voltamogrammes cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S	123
Figure IV.14	Droite de régression du $\text{Log}1/\text{Fc}$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	128
Figure IV.15	Droite de régression du $\text{Log}1/\text{Fc}$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	129
Figure IV.16	Droite de régression du $\text{Log}1/\text{Fc}_{2\text{cla}}$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$	129
Figure IV.17	Voltamogrammes cycliques de O ₂ à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de Fc3cl aniline.	131
Figure IV.18	Voltamogrammes cycliques de O ₂ à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de Fc3cl aniline.	132
Figure IV.19	Courant des pics anodiques de O ₂ ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de DF.	134
Figure IV.20	Courant des pics anodiques de O ₂ ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de DF.	135
Figure IV.21	Courant des pics anodiques de O ₂ ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de standard.	135
Figure IV.22	Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concertation massique de AG, BHA	140
Figure IV.23	Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de chaque DF	140

Figure IV.24	Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de chaque DF	141
Figure IV.25	Histogramme de la variation des valeurs de IC ₅₀ des composés standard et synthétisés	142
Figure IV.26	Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.	146
Figure IV.27	Poids relatif des organes (cœur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.	146
Figure IV.28	Effet de traitement par le FC Tris et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP) et le taux de PAL chez les rattes exposées au métribuzine	148
Figure IV.29	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique) chez les rattes exposées au métribuzine.	149
Figure IV.30	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium chez les rattes exposées au métribuzine.	150
Figure IV.31	Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine "AFP") chez les rattes exposées au métribuzine.	151
Figure IV. 32	Concentrations hépatique et rénal de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.	153
Figure IV.33	Concentrations cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.	153
Figure IV.34	Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.	154
Figure IV.35	Concentrations tissulaires de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux	155
Figure IV.36	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, agrandissement x40	156
Figure IV.37	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie de ratte exposé au métribuzine et traité par cisplatine, agrandissement x40	157
Figure V.1	Interaction intramoléculaire entre atome lié et non lié	166
Figure V.2	Structure d'ADN d'un dodécamère	169
Figure V.3	Structure de la BSA téléchargé de la PDB (PDB ID : 3V03) Résolution 2.7Å°, Résidue count1166	169
Figure V.4	Energie libre standard d'association/dissociation	172
Figure V.5	3D conformation du ligand (A) FC-tris (B) FM3FMA, (C) FM2Cla, (D) FM3Cla (E)DMAMF, (F) sel quaternaire	173

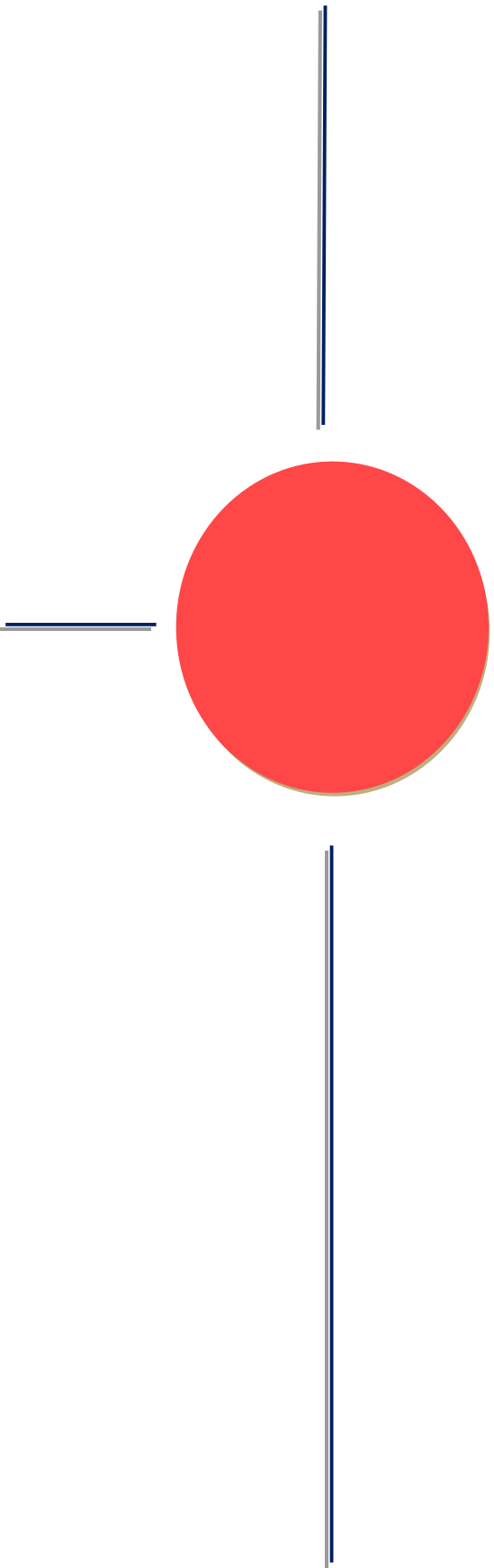
Figure V.6	Interaction de FcTris avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN	174
Figure V.7	Mode de liaison de FC avec le site actif de l'ADN	175
Figure V.8	Distances exprimées en Å des liaisons hydrogènes formées entre le dérivé ferrocénique et l'ADN	177
Figure V.9	Interaction de FcTris avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN,	180
Figure V.10	Interaction de dérivés ferrocéniques avec la BSA : Amarrage moléculaire de l'interaction Fc-BSA	181
Figure V.11	Distances exprimées en Å des liaisons hydrogènes formées entre le dérivé ferrocénique et la BSA.	183
Figure V.12	Les orbitales HOMO et LUMO et écart d'énergie (ΔE) obtenu par la Méthode DFT/B3LYP/LanL2DZ du dérivés : FM3FMA, DMAMF et Fc-Tris	185
Figure V.13	Les orbitales HOMO et LUMO et écart d'énergie (ΔE) obtenu par la méthodeDFT/B3LYP/Ln2DZ du dérivés : FM2ClA et FM3ClA	186

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau I.1	Les paramètres électrochimiques tiré de voltamogrammes de ferrocène en utilisant l'électrode de carbone vitreux	14
Tableau II.1	Caractéristiques physicochimiques des dérivés ferrocéniques synthétisé	44
Tableau II.2	Tableau de correspondance Couleur – Longueur d'onde	45
Tableau II.3	Valeurs caractéristiques des données électrochimiques tirés des voltamogrammes des produits synthétisés à une vitesse de balayage 100mV/s	47
Tableau II.4	Données spectroscopique et électrochimiques de dérivé ferrocéniques	48
Tableau III.1	Composition en acides aminés de la BSA	70
Tableau III.2	Composition atomique de la BSA	71
Tableau III.3	Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.	77
Tableau III.4	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Fc-Tris obtenu à partir des données spectroscopique UV-Vis.	83
Tableau III.5	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.III.18.	85
Tableau III.6	Constante et énergie libre de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log I_{pa}/(I_{pa0} - I_{pa})$	85
Tableau III.7	Données électrochimiques de la forme libre de FcTris et celui de l'adduit FcTris-ADN	86
Tableau III. 8	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié	87
Tableau III. 9	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	88
Tableau III. 10	Coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN	89
Tableau III. 11	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique	91
Tableau III. 12	Comparaison des constantes (mol^{-1}) et des énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique	91
Tableau III.13	Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction BSA-Fc-tris obtenu à partir des données spectroscopique UV-Vis.	93

Tableau III. 14	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.III.25.	95
Tableau III.15	Constante et énergie libre de liaison calculés à partir du tracé $\log I/[BSA]$ en fonction de $\log I_{Pa} / (I_{Pa0} - I_{Pa})$	95
Tableau III.16	Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié	96
Tableau III. 17	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de BSA, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	97
Tableau III. 18	Coefficients de diffusion de FC-tris et de l'adduit Fc-tris-BSA	98
Tableau III.19	: Comparaison des constantes (mol^{-1}) et des énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique de l'interaction Fc-BSA	98
Tableau IV.1	Quelques maladies cause par le radical libre	108
Tableau IV.2	Propriétés physicochimiques de la DPPH	117
Tableau IV.3	Données électrochimiques de voltamogrammes dioxyde seul et celui de l'adduit $\text{O}_2\text{-Fc}_3\text{cl}$ aniline	125
Tableau IV.4	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.2.	126
Tableau IV.5	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.2.	127
Tableau IV.6	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.2.	128
Tableau IV.7	Constante et énergie libre de liaison calculés à partir du la figure IV.15	130
Tableau IV.8	Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de DF, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	133
Tableau IV.9	Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de DF, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	133
Tableau IV.10	Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de standard, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel	134

Tableau IV.11	Coefficients de diffusion de O ₂ et de l'adduit O ₂ -DF	136
Tableau IV.12	Valeurs des pourcentages d'inhibition de O ₂ %correspondante à chaque addition des dérivés synthétisés	138
Tableau IV.13	Valeurs des pourcentages d'inhibition de O ₂ % correspondante à chaque addition des standards	139
Tableau IV.14	Valeurs de IC ₅₀ de chaque dérivé	141
Tableau IV.15	Poids relatif des organes (foie, reins, cœur, poumon) chez les différents groupes expérimentaux.	145
Tableau IV.16	. Concentrations des marqueurs biochimiques chez les différents groupes expérimentaux.	147
Tableau IV.17	Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA), glutathion réduit (GSH) et l'activité de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux	152
Tableau V.1	Les paramètres optimisés pour le Docking d'interaction Fc-ADN	171
Tableau V.2	Les paramètres de optimisés pour le Docking d'interaction Fc-BSA	171
Tableau V.3	Valeurs des énergies libres ΔG et constantes de liaison K de différentes interactions Fc-ADN	173
Tableau V.4	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de Fc et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.	176
Tableau V.5	Valeurs des énergies libres ΔG et constantes de liaison K de différentes interactions Fc-BSA	179
Tableau V.6	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de FcTris et de le BSA impliqués dans ces liaisons.	182
Tableau V.7	Calculs HOMO-LUMO pour les dérivés étudiés	185



INTRODUCTION



INTRODUCTION

L'utilisation moderne des complexes de métaux de transition en tant que agents chimiothérapeutique remonte à la découverte du cisplatine par Rosenberg et al. En 1965 [1]. Une telle découverte a ouvert la porte du monde inexploré de agents chimiothérapeutiques à base de métaux qui ont différentes activités biologiques [2]. En effet, le Cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine sont des anticancéreux aux platines approuvés comme médicament anticancéreux [3].

La découverte du premier composé de métal de transition cyclopentadiényle - le ferrocène [4] - et la confirmation de sa structure ont ouvert une nouvelle ère en chimie. Il montrait la relation directe de la chimie organique avec la chimie inorganique des métaux de transition et donnait l'impulsion nécessaire au développement d'un nouveau domaine : la chimie organométallique. Bien que les composés du cyclopentadiénylmétal semblaient plutôt une curiosité chimique, de nouvelles recherches ont bientôt révélé leur potentiel utile en chimie. À savoir, il a été démontré que beaucoup d'entre eux peuvent être utilisés comme catalyseurs pour faciliter la transformation dans des conditions réactionnelles délicates qui seraient sinon difficile ou même impossible à atteindre en utilisant des produits biologiques classiques [5].

L'objectif majeur de la chimie bio-organométallique médicinale concerne le design de molécules synthétiques capables de mimer les différents aspects des molécules biologiques [6]. L'étude renforcée de tels modèles pourrait conduire au développement de meilleurs agents thérapeutiques [7]. Depuis le temps, des efforts importants ont été déployés afin de mieux comprendre les processus de reconnaissance moléculaire entre de petites molécules et les acides nucléiques [8]. En effet, la reconnaissance moléculaire est un phénomène fondamental dans les processus biologiques tels que l'action de plusieurs médicaments [9]. La détermination de l'origine de cette reconnaissance moléculaire est très intéressante. Par conséquent, le design de molécules ayant une spécificité de fixation sur certaines séquences de l'ADN pourrait déboucher sur la conception de molécules susceptibles d'interagir avec l'ADN de cellules tumorales [10]. 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 [9]. A l'heure actuelle, plusieurs approches sont développées pour obtenir des ligands à haute affinité et spécificité de fixation pour la double hélice d'ADN.

Notre laboratoire s'intéresse à l'utilisation de composés ferrocéniques dans le but de la recherche des approches thérapeutiques antitumorales qui s'inscrit dans l'utilisation de chimie bioorganométallique à des fins thérapeutiques. En effet, leur potentiel cytotoxique, peut être bénéfique dans la lutte contre certaines maladies [11,12]. Notre objectif est de synthétiser des molécules d'intérêt biologique comportant un groupe organométallique, le choix de la partie intercalant s'est porté sur le noyau ferrocénique. Cependant, Le ferrocène a été choisie pour son activité antitumorale reconnue et surtout pour ses propriétés d'interaction avec l'ADN [13]. En raison de l'oxydation réversible d'un électron du ferrocène, ses dérivés sont applicables en tant que, récepteurs moléculaires. D'ailleurs, les dérivés ferrocéniques ont démontré une activité antitumorale nette sur plusieurs modèles de cellule tumorale en particulier MDA-MB-231 et MCF-7[14]. Partant de cette découverte, le laboratoire s'est intéressé d'accéder par des méthodes de synthèse simple, efficace et peu coûteuse à des composés ferrocéniques. En effet, le mécanisme d'action de cette activité cytotoxique du ferrocène est probablement par l'ion ferricinium. [7,15]. Le présent travail entre dans le cadre de la continuité des axes de recherche de notre laboratoire. Donc la stratégie de ce travail sera consacrée à la synthèse de quelques dérivés de N-ferrocenylmethyltrihydroxymethylaminomethane, N-ferrocenyl methyltrifluoromethylaniline et N-ferrocenylmethyl chloroaniline, ces nouveaux composés ont été obtenus via des réactions de sel quaternaire ; Les conditions de réaction ont été optimisées pour atteindre des rendements élevés.

De nombreux travaux sur les dérivés ferrocéniques ont été réalisés au laboratoire pour exalter cette propriété. En effet, bien que les mécanismes d'action précisent de la plupart des agents anticancéreux restent partiellement et même quelquefois totalement inconnus, la double hélice d'ADN est considérée comme la cible privilégiée de leur action cytotoxique [13].

L'ADN possède une structure de double hélice. La conformation la plus fréquemment adoptée par l'ADN double brin est la forme B [16]. Deux sillons se forment entre les deux enchaînements phosphate, ce sont les canaux d'informations de la double hélice C'est été le petit et le grand sillons. D'ailleurs, La reconnaissance moléculaire de séquences particulière de l'ADN par ces molécules fait intervenir des liaisons hydrogène spécifiques, des interactions électrostatiques et des contacts de Van der Waals au sillon de l'ADN et intercalation. En outre, Les ligands du petit sillon constituent une classe importante de composés dotés de plusieurs activités biologiques. Ils présentent des propriétés antivirales, antibactériennes et

antitumorales. La plupart des ligands du petit sillon possèdent au moins une charge positive et se lient en reconnaissant de façon prédominante les séquences riches en résidus AT [17,18].

L'identification des molécules à visée thérapeutique est un domaine de recherche très active, faisant intervenir de très nombreuses connaissances scientifiques à l'interface de la chimie, la biologie moléculaire et la pharmacologie. Dans ce contexte, les ligands ferrocéniques peuvent être liés à des protéines pour stopper la progression tumorale, pour ce fait nous avons choisi d'étudier les interactions entre une protéine modèle, la BSA, et le ligand. En effet, L'albumine de sérum bovin (BSA en anglais) est une protéine qui est souvent utilisée comme protéine modèle pour étudier les interactions protéine-ligand, du fait de son faible coût et d'une bonne connaissance de ses propriétés (similaires à l'albumine de sérum humain (HSA)) [19].

L'étude de l'interaction entre des dérivés ferrocéniques synthétisés, l'ADN et les protéines présente le rôle vital dans la détermination du mécanisme d'action et la conception de l'efficacité et la spécificité de ces produits. Trois méthodes adoptées dans notre étude : la technique spectroscopique UV-Visible, la voltamétrie cyclique et confirmé par l'amarrage moléculaire,

La modélisation moléculaire de systèmes biologiques, vise à étudier la structure et la dynamique des molécules biologiques. Les méthodes retenues pour mener à bien cette étude sont la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire et le Docking 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 des complexes formés entre le dérivé ferrocénique et la macromolécule. Le complexe de plus basse énergie d'interaction présentera probablement une meilleure inhibition de la prolifération cellulaire. Les informations obtenues à partir de ces études de modélisations moléculaires peuvent être utilisées lors de l'interprétation de données physico-chimiques relatives aux interactions de dérivé ferrocénique-ADN obtenues *in vitro*, et ce type d'approche peut être source d'arguments théoriques entrant dans le cadre d'hypothèses de travail.

Notre but est de connaître : Ces composés ont-elles une activité anti tumorale ? Ou bien leur liaison avec l'ADN 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.

Il a été montré de longue date que le stress oxydant est capable d'induire des modifications au niveau du patrimoine génétique d'une cellule, et qu'il peut participer ainsi aux différents processus d'initiation de la cancérogenèse. La proposition de faire une étude *in vivo* est pour

but de connaître l'effet anti oxydant, anticancéreux de ces produits synthétisés dans l'organisme.

En fin, Notre thèse s'articule ainsi autour de 5 axes principaux qui constituent les cinq chapitres de ce manuscrit :

Le premier chapitre introduit La chimie bioorganométallique "ferrocène et dérivés ferrocéniques". En préambule de ce chapitre, une revue bibliographique expose une définition de dérive ferrocénique ainsi que leur propriété physicochimique visant à mieux comprendre le sujet. Nous ferons ainsi un rappel de l'état actuel des connaissances sur les propriétés biologiques, thérapeutiques et d'interaction avec l'ADN et le BSA des dérivés ferrocéniques, en particulier leur implication contre le stress oxydant et contre la prolifération des cellules tumorales. Les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant et antimutagène. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux techniques d'analyses utilisées pour la caractérisation des produits synthétisés, ainsi qu'aux principes et méthodes électrochimiques utilisées dans la caractérisation des complexes formés (macromolécule-ligand) au cours de ce travail.

Le deuxième chapitre, expose les techniques d'étude choisies ainsi que les conditions expérimentales adoptées, une étape première est consacrée au développement de la synthèse des dérivés ferrocéniques ensuite leurs caractérisations par UV-Vis et, Electrochimie.

Le troisième chapitre présente l'étude de l'activité anti mutagène. La première étape de cette partie consiste à extraire l'ADN à partir des cellules sanguines de poule. Ensuite nous poursuivons de faire une étude sur l'interaction de ces composés avec l'ADN et le BSA en déterminant les paramètres d'interaction, le constant de liaison K et la valeur de l'énergie libre ΔG .

Un quatrième chapitre présent l'étude de l'activité antioxydant d'une part in vitro par la méthode du radical superoxyde anion généré électrochimiquement. Puis les résultats proprement dits sont analysés et interprétés.

Toutes les données recueillies pour ces ligands ont par ailleurs été comparées à celles disponibles pour leurs homologues précédemment élaborés au laboratoire. D'autre part, l'étude de l'effet thérapeutique *In vivo* du composés synthétisés chez les rats *Wistar Albinos* exposées au métribuzine puis traiter par ces dérivés. D'ailleurs, cette étude repose sur l'évaluation de l'effet anticancéreux chez les rats, en le comparant avec ceux traités par le cisplatine, est un complexe à base de platine utilisé dans le traitement de différents cancers

Le cinquième chapitre contient l'étude de cette interaction par la méthode théorique *In silico* pour optimiser les structures des molécules obtenues in vitro et déterminer le type

d'interaction. En outre, l'amarrage moléculaire par l'Autodock Tools a été utilisé pour comparer nos résultats.

Bilan, conclusions et perspectives clôtureront cette partie afin de mettre en lumière l'apport de ce travail dans la littérature. Enfin, en annexe, des voltamogrammes et des résultats qui n'ont pas été présentés dans les différents chapitres.

Finalement, en nous basant sur les éléments dégagés lors des études antérieures, nous cherchons à confirmer que le traitement par ces composés induit des activités antiprolifératives sur le développement du cancer par la forte ou la faible interaction avec de l'ADN.

Références bibliographiques

- [1] Rosenberg B, Camp LV, Krigas T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205 :698-699.
- [2] Sansook, S. (2017). Biological Evaluation of Ferrocene Derivatives. Doctorat thesis. University of Sussex. P06-09.
- [3] Guo Z, Sadler PJ. (1999). Medicinal inorganic chemistry. *Adv Inorg Chem*, 49 :183-306.
- [4] Kealy, T. J., Pauson, P. L., (1951). *A New Type of Organo-Iron Compound*, dans *Nature*, vol. 168, 1951, p. 1039.
- [5] Chem, J. (2011). Organometallic anticancer compound. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*; 54(1): 3–25.
- [6] Pingyu Zhang, Peter J. Sadler*. (2017). Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* xxx 1e10
- [7] Köpf-Meyer, P., Köpf, H. & Neuse, W. (1984). Ferricenium complexes : a new type of water soluble antitumor agent. *J Cancer Res Clin Oncol*, 108 : 336–340
- [8] Sirajuddin, M., Saqib, Ali., Amin, Badshah. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence, spectroscopies and cyclic voltamétrie, Elseviers, *journal of photochemistry and photobiology B : Biology science direct*, 124(1-19).
- [9] LOWN J. W. (1995) Design and developement of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders. *Drug Development Res.* 34, 145-183
- [10] Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011). "Organometallic anticancer compounds," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 3–25.
- [11] Shafqat, A., Ataf A. A. L., Amin, B., Imitiaz, U. D., Bhajan, L., Saqib, K., Shafiq, U. (2013). DNA interaction, Antibacterial and Antifungal studies of 3-nitrophenylferrocene. *Journal Chemical Society of Pakistan*. 35 : 922-928.
- [12] Abdel Aziz, A. A., Elbadawy, H. A. (2014). Spectral, electrochemical, thermal, DNA binding ability, antioxidant and antibacterial studies of novel Ru(III) Schiff base complexes. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 124: 404–415.
- [13] Baguley, B.C. (1991). DNA intercalating anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Design* 6, 1-35.
- [14] Cong Lu. (2012) Analyse micro_electrochimique du stress oxydant _a l'echelle de la cellule unique: application aux cellules canc_ereuses du sein. Analytical chemistry. Universit_e Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. French. <NNT: 2012PAO66242>. <tel-00828217>
- [15] Görmén, M. (2010). Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocénophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate, Cancer. Chimie ParisTech, 2010. Français, 244p.
- [16] Hurley, L. H., Boyd, F. L. (1988). DNA as target for drug action. *Trends Pharmacol. Sei.* 9, 402-407.
- [17] DREW H. R. (1984) Les doubles hélices d'ADN et les informations génétiques. *Pour la Science* 20-37.
- [18] LOWN J. W. (1995) Design and developement of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders. *Drug Development Res.* 34, 145-183
- [19] P.B. Kandagal a, S. Ashoka a, J. Seetharamappa a, S.M.T. Shaikh a, Y. Jadegoud b, O.B. Ijare b, (2006). Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41. 393–399

Généralités sur le ferrocene et ces applications

CHAPITRE

I



I. Introduction

Depuis la découverte de l'activité antitumorale du cisplatine, les composés organométalliques suscitent un intérêt grandissant dans le développement de nouvelles thérapies pour lutter contre le cancer [1,7]. Au cours des dernières décennies, un grand nombre des composés métalliques ont été largement étudiés et évalués *in vitro* et *in vivo* [3,17]. Parmi ces composés, platine (PtII et PtIV), ruthénium (RuII et RuIII), or (AuI et AuIII) et les complexes de titane (TiIV) sont les métaux les plus étudiés. Grâce à sa grande stabilité et à sa lipophilie, le ferrocène entre dans cette nouvelle classe de composés [1]. Ses possibilités réactionnelles combinées à ses remarquables propriétés électrochimiques donnent lieu à des nouvelles molécules qui avaient des propriétés biologiques étonnantes [6,39]. Les points forts de ces études résident dans la synthèse de nouveaux complexes ferrocéniques qui pourrait potentiellement surmonter les obstacles cliniques des médicaments actuels en matière de toxicité, résistance et autres effets pharmacologiques [15].

Dans ce chapitre, nous allons brièvement retracer l'histoire de la découverte du ferrocène qui met en avant les propriétés anti-cancéreuses de certains de ses dérivés.

L'une de la stratégie adoptée par plusieurs chercheurs dans le monde est de modifier une molécule de ferrocène présentant déjà d'intéressantes propriétés thérapeutiques en y incorporant un réactif porte des fonctions qui peuvent améliorer l'activité existantes de ferrocène [48].

I.1. Chimie bioorganométallique

Le terme « chimie bioorganométallique » Située à l'interface de la chimie, la biologie et la médecine, l'étude des espèces chimiques –synthétiques ou naturelles– ayant au moins une liaison covalente carbone-métal (C-M) ou carbone-métalloïde présentant des activités biologiques, a été défini comme chimie bioorganométallique [11,12]. Les composés organométalliques en tant qu'espèces à stabilité cinétique plus élevée que les complexes inorganiques de coordination et dotés d'une vaste diversité structurale– sont de fait attractif pour le désigne des nouvelles classes de composés présentant des applications biologiques originaux [13].

La difficulté de lutter contre le cancer à l'aide de la chimiothérapie a considérablement augmenté au cours des dernières décennies [14,15]. Les effets indésirables et la résistance sont particulièrement préoccupants, car le cancer entraîne chaque année des millions de décès

dans le monde [26]. Il est donc urgent de concevoir de nouveaux médicaments dotés de nouveaux modes d'action et moins des effets indésirables. Le fragment ferrocène est particulièrement adapté à cette tâche, en raison de sa faible toxicité et de sa stabilité chimique [18,31].

I.2. Le ferrocène, une cible thérapeutique de choix

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ [9,12,15]. Il fait partie de la famille des métallocènes, un type de produit organométallique composé de deux cycles pentadiényle entourant un centre métallique. Ils sont aussi appelés composés sandwich sa structure est d'une stabilité due au caractère aromatique du cyclopentadiényle [8,18,27].

I.3. La chimie de ferrocène

La découverte du ferrocène pour la première fois accidentellement en 1951 par Kealy et Pauson firent état de la réaction du bromure de magnésium de cyclopentadiényle et du chlorure de fer dans l'objectif de coupler le diène et ainsi synthétiser le fulvalène. À la place, ils obtiendront une poudre légèrement orangée, d'une "remarquable stabilité" [9]. Cette stabilité fut accordée au caractère aromatique du cyclopentadiényle mais la structure "en sandwich" ne fut pas découverte à cet instant. La structure correcte du ferrocène a été élucidée une année après sa découverte par Geoffrey Wilkinson et Robert Burns Woodward [13]. En effet, la détermination de sa structure sandwich a été fait par Wilkinson en se basant sur sa réactivité [61]. Woodward a confirmé le caractère aromatique du composé en effectuant des réactions de substitution électrophiles aromatiques, telles que l'acylation de Friedel-Craft avec du trichlorure d'aluminium, sur le composé [29,27]. Indépendamment, Ernst Otto Fischer arriva à la même conclusion et commença à synthétiser d'autres métallocènes, comme le nickelocène et le cobaltocène [31].

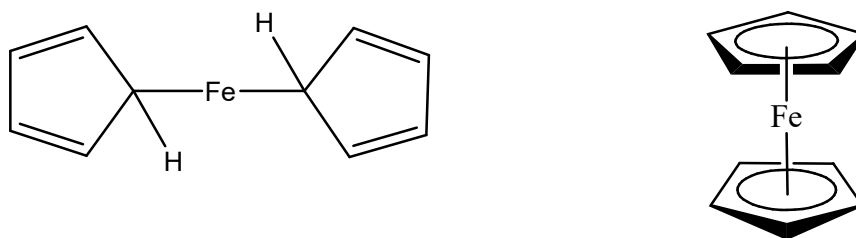


Figure I.1.: La structure proposée par Pauson et Kealy 1951 à gauche et la structure corrigée par Wilkinson et Fischer à droite

Les deux anneaux cyclopentadiényle (Cp) de ferrocène peuvent être orientés dans deux extrêmes de conformation éclipsée (D_{5h}) ou décalée (D_{5d}). L'énergie de rotation autour de l'axe Fe-Cp est très petite (~ 4 kJmol⁻¹) et les structures à l'état fondamental du ferrocène peuvent présenter l'une ou l'autre de ces conformations [11,9]. Cependant, la structure du ferrocène met en jeu un nouveau type de liaison totalement inconnu en chimie organique classique. C'est l'avènement d'une nouvelle ère de la chimie organométallique et le développement de la chimie moléculaire des métaux de transitions [13,21,2].

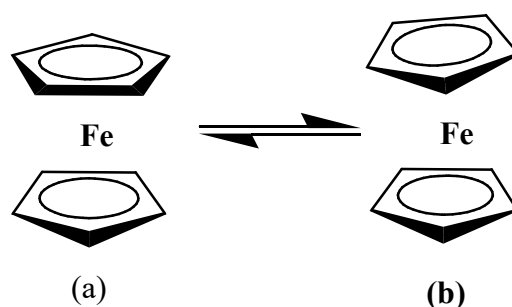
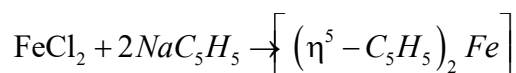


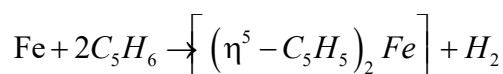
Figure I.2. : Conformation décalée (a) et éclipsée (b) du ferrocène.

I.4. Propriété du ferrocène

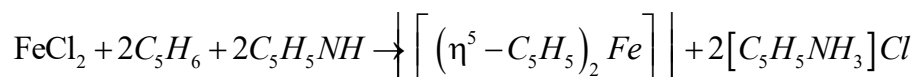
Le ferrocène (ainsi que d'autres métallocènes) sont généralement préparés par l'une des trois voies de synthèse différentes : Le premier concerne la synthèse de ferrocène par réaction du cyclopentadiénure de sodium sur le chlorure de fer anhydre, en milieu étheré [8,11,28].



La seconde méthode est connue sous le nom de synthèse de vapeur de métal ; les réactifs sont chauffés à haute température, puis rassemblés sur une surface froide :



Enfin, le ferrocène peut également être préparé via l'utilisation d'une base auxiliaire générant in situ l'anion cyclopentadiényle :

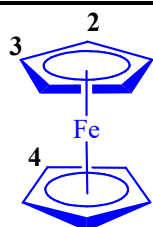


I.4.1. Sa structure moléculaire

Le ferrocène est un solide cristallisé à température ambiante de couleur orange et d'odeur de camphre très stable à l'air avec un point de fusion de 173 °C [46,25]. Il possède un moment dipolaire nul, ce qui explique sa solubilité dans une majorité de solvants organiques et non

dans l'eau. Les atomes de carbone sont équidistants du métal (2,05 Å) et également entre eux (1,43 Å) [11,15]. La barrière de rotation autour de l'axe métal-cycle est très faible (4 kJ.mol⁻¹) et résulte essentiellement des forces de Van der Waals entre les deux cyclopentadiényles.

Il se transforme en ion ferrocénium dans les solutions acides en présence d'oxygène, le ferrocène est chimiquement stable et ne réagit pas avec les acides et les bases et ne se décompose pas avant 400°C [33].



$M_w = 186.04 \text{ g/mol}$

Forme de composé : poudre orange

Point d'ébullition = 174,5 °C

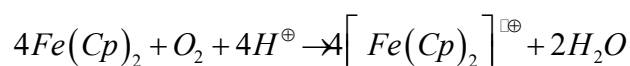
$R_f = 0,52$ dans le Méthanol

Rendement > 60% dans tout les types de réaction

Dissoudre dans tout les solvants organiques, dans le H_2SO_4 et dans le HNO_3

I.4.2. Ses propriétés redox et Son comportement vis-à-vis de l'oxygène

Bien que la chimie du ferrocène soit largement étudiée, peu d'informations sur ses réactions d'oxydation sont disponibles dans la littérature [2,46]. Comme il a été mentionné le ferrocène est connu pour être stable en présence d'oxygène à température ambiante, toutefois son oxydation reste possible en présence d'un acide fort de Brönsted (HX) selon l'équation suivante :



Un mécanisme d'oxydation a été proposé comme indiqué ci-après (Schéma 1).

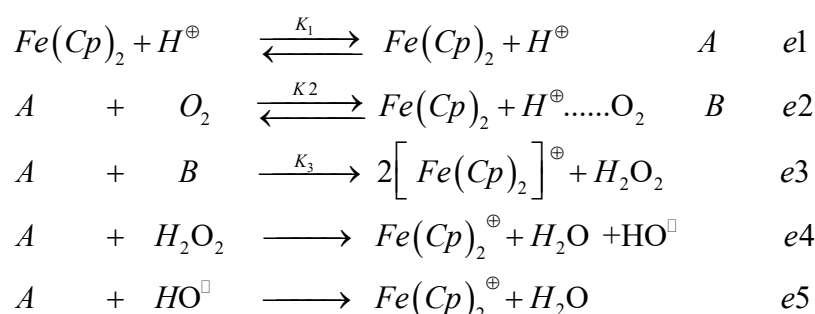


Schéma 1 : Mécanisme d'action d'oxydation du ferrocène en présence d'un acide fort de type Brönsted [45].

Cependant, La possibilité que le fer, en tant que métal de transition, puisse réagir avec l'oxygène peut être considérée comme une des propriétés fondamentales du ferrocène [2].

Celle-ci est à rapprocher du principe même du transport de l'oxygène dans le sang qui repose complètement sur la complexation de l'oxygène sur le fer de la partie hème de l'hémoglobine [20].

I.3.3. ses propriétés spectroscopiques et électrochimique

D'après le spectre d'absorption UV-Vis du ferrocène mentionné sur la figure I.3, montre qu'il y a deux pics : $\lambda_{\max 1} = 441nm$ et $\lambda_{\max 2} = 324nm$

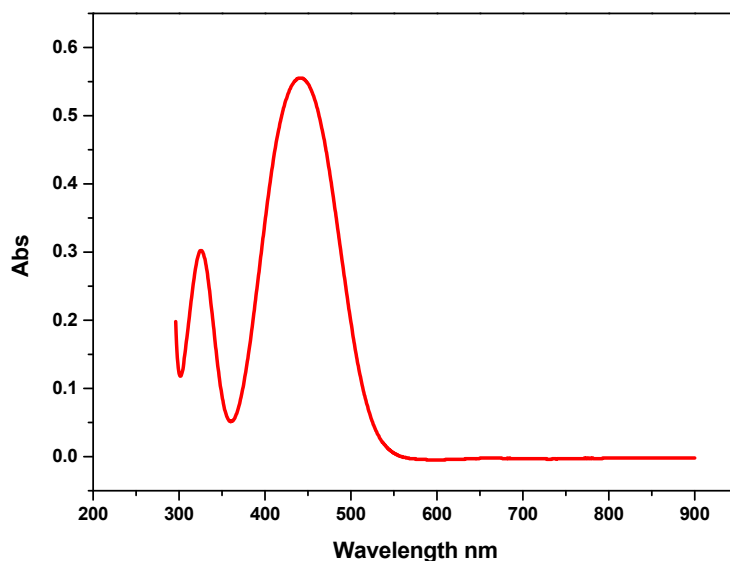


Figure I.3: Spectre d'absorption Uv-Vis du ferrocène dissout dans le méthanol [45]

La spectroscopie infrarouge du ferrocène est relativement simple à cause de sa structure symétrique. Il présente une bande d'absorption à 3075 cm^{-1} équivalente à l'élongation de la liaison C-H aromatique. Il existe uniquement quatre bandes apparentes : deux à 811 et 1002 cm^{-1} sont équivalentes à la vibration de flexion de C-H, et une à 1108 cm^{-1} équivalente à la vibration antisymétrique du cycle de pentadiényle. La bande d'absorption à 1411 cm^{-1} est équivalente à la vibration d'éloignement antisymétrique de C-C du cyclopentadiényle non substitué [4,46].

Le spectre de résonance nucléaire magnétique d'hydrogène ^1H et de carbone ^{13}C du ferrocène

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) CDCl_3 7,26; $\sigma = 4.26(\text{s}, 5\text{H}, \text{C}_4)$, $4.29(\text{s}, 2\text{H}, \text{C}_2 \text{ ou } \text{C}_3)$, $4.56(\text{s}, 2\text{H}, \text{C}_3 \text{ ou } \text{C}_2)$.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) CDCl_3 77.16; $\sigma = 68.03 (5\text{C}, \text{C}_4)$, $76.73 (2\text{C}, \text{C}_3 \text{ ou } \text{C}_2)$, $77.58 (2\text{C}, \text{C}_2 \text{ ou } \text{C}_3)$.

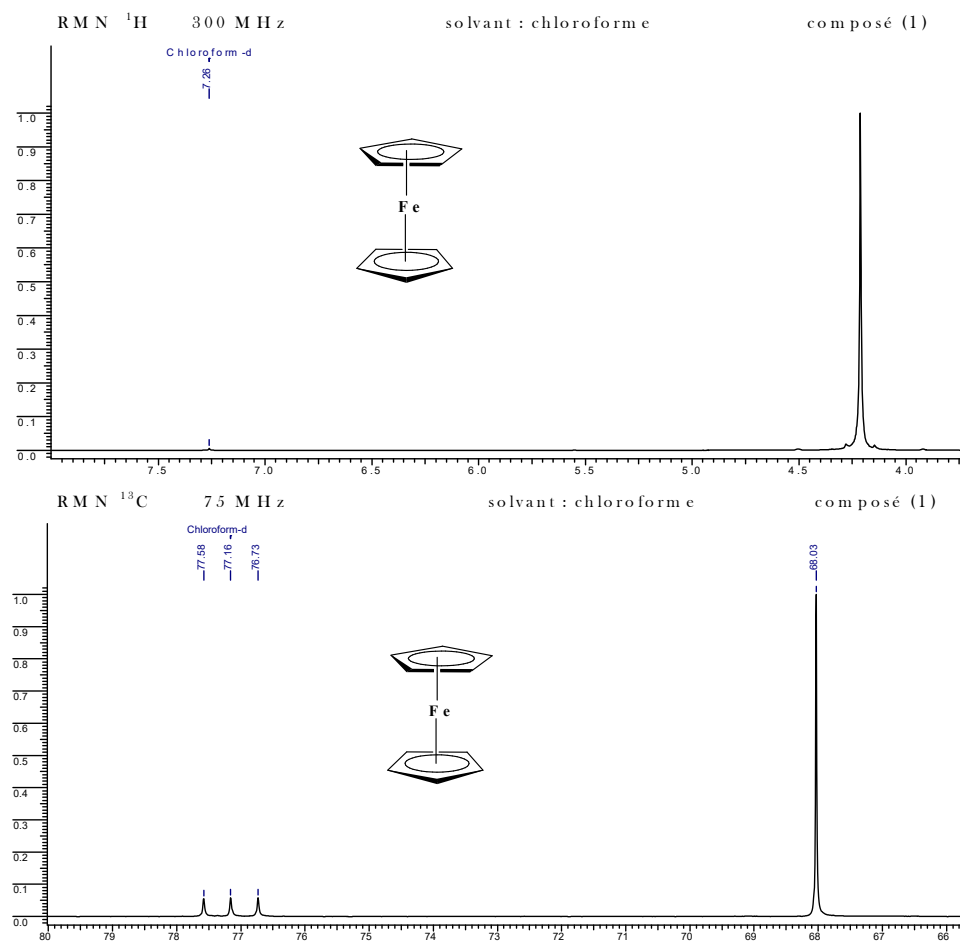


Figure I.4 : spectre RMN d'hydrogène et de carbone du ferrocène [45].

Les propriétés électrochimiques du ferrocène ont été effectuées sur les propriétés oxydo-réductrices de ferrocène, en générale comportements cathodiques du ferrocène dans le milieu organique comme : le dichlorométhane, acétonitrile et le DMF, peut être décrit par une réduction réversible monoélectronique, conduisant à l'obtention d'ion ferrocénium [31].

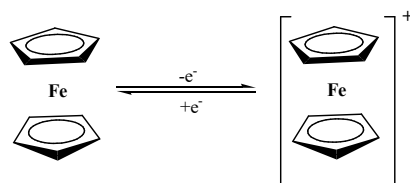


Figure I.5: Oxydation mono électronique réversible du ferrocène [33].

Les paramètres électrochimiques ont été extrait à partir de voltamogrammes de la figure I.6

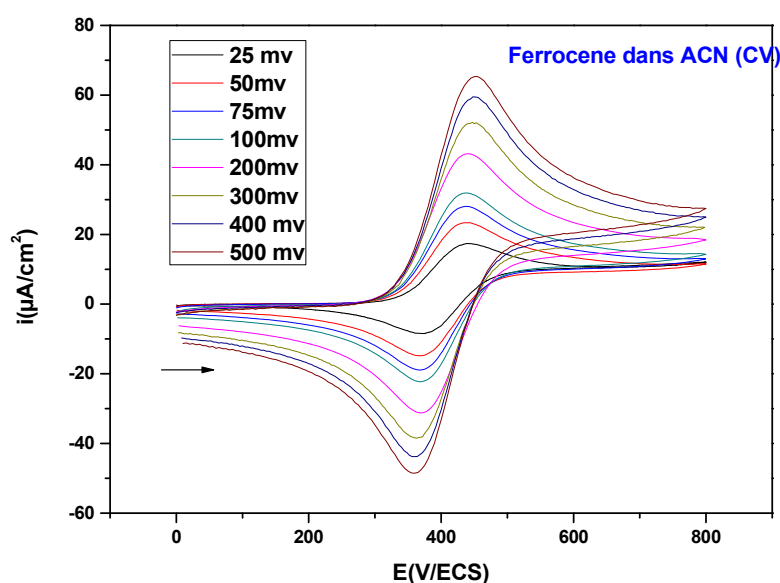


Figure I.6 : Voltammogrammes cyclique de ferrocène 10^{-3} mM dans ACN / 0.1 M de $(\text{Bu}_4\text{NPF}_6)$ à différentes vitesses de balayage allant de 25 à 500 mV/s.

Tableau I.1 : les paramètres électrochimiques tiré de Voltammogrammes de ferrocène en utilisant l'électrode de carbone vitreux

V (mV/s)	i_{pa} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	i_{pc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	$\left \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right $	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	$E_{1/2}$ (V)
25	17,32	-18,466	0,937	0,438	0,370	0,068	0,404
50	23,22	-22,96	1,011	0,436	0,366	0,070	0,401
75	27,79	-28,55	0,973	0,435	0,366	0,068	0,400
100	31,79	-44,586	0,713	0,434	0,366	0,068	0,400
200	43,14	-53,166	0,811	0,440	0,366	0,074	0,403
300	51,79	-58,26	0,888	0,461	0,367	0,094	0,414
400	59,17	-63,33	0,934	0,451	0,366	0,084	0,408
500	65,457	-67,01	0,976	0,453	0,366	0,086	0,409

Le tableau I.1 nous montre que les valeurs de courant d'oxydation et de réduction dépend de la vitesse du balayage. D'après la valeur de $\frac{i_{pa}}{i_{pc}}$ la réaction est réversible, d'autre part, les valeurs ΔE_p et $E_{1/2}$ montrent que le potentiel est indépendant de la vitesse de balayage et que la réaction est rapide et nanoélectronique

I.5. Applications des Ferrocènes

La synthèse de ligands est un domaine plus vaste et qui mérite d'être bien étudié de la chimie du ferrocène. La diversité qu'offre la synthèse de ligands, comportant un motif ferrocène, est importante [12,62]. En raison du comportement électrochimique et spectroscopique bien défini, de la stabilité chimique et de la faible toxicité du ferrocène, il a trouvé des applications dans plusieurs domaines. L'incorporation d'une fraction ferrocène dans des biomolécules est actuellement un domaine de recherche très actif [29]. En raison de la facilité avec laquelle une substitution électrophile aromatique peut se produire sur les cycles cyclopentadiényle, une vaste gamme de dérivés du ferrocène a été rapportée dans la littérature depuis sa découverte [14].

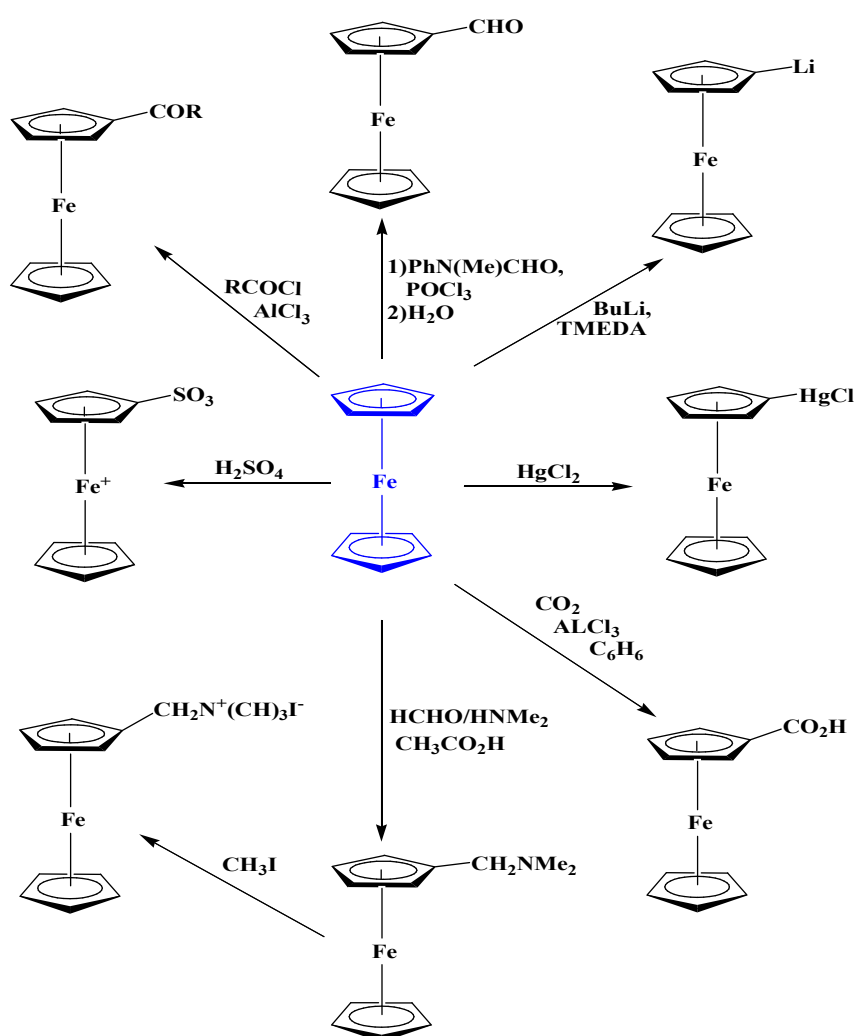


Figure I.7 : Les réactions organiques de ferrocène

I.5.1. Procédés de synthèse

Le ferrocène est synthétisé en faisant réagir le cyclopentadiène et l'hydroxyde de Sodium (KOH) dans du 1,2-dimethoxyethane (DME) afin d'obtenir le cyclopentadiényle sous forme ionique ($C_5H_5^-$), qui réagira en suite avec le dichlorure de Fer (II) tetrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) dans du diméthylesulfoxyde (DMSO), le ferrocène est ainsi obtenu, les résultats des différentes réactions est suivi et confirmé par RMN (figure I.8) [21,46]

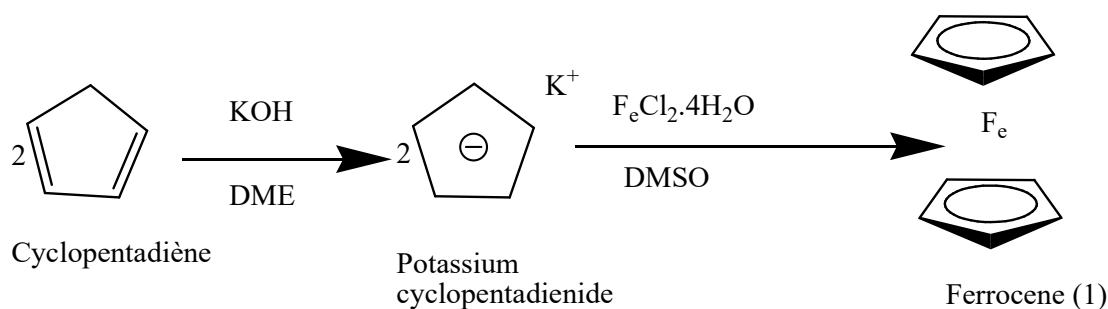


Figure I.8: synthèse du ferrocène.

I.5.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des dérivés ferrocéniques contre le cancer se fait par leur interaction avec l'ADN par divers types de liaisons selon le mode d'interaction [14,17], Puisque l'ADN offre de nombreux sites de liaisons potentielles en raison de sa taille et de sa complexité, les composés de coordination sont capables de se lier à l'ADN via deux modes d'interaction principaux : irréversible (liaison covalente ou de coordination) et réversible (association intermoléculaire). Ce dernier mode de liaison peut être divisé en interactions électrostatiques, liaison avec le petit ou le grand sillon de l'ADN et intercalation [2,39].

I.6. La Chimie médicinal 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 [25]. De nombreux composés ferrocéniques présentent une fascinante activité antibactérienne [37,39,41,46], antifongique [59], DNA cleaving [26,50], antioxydante [43,44,52], cytotoxiques et l'activité antitumorale [19,43,65]. 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 [29,47].

D'un point de vue pharmaceutique le ferrocène a prouvé ses qualités de groupement de choix : son insertion dans le squelette organique de différentes molécules bioactives s'est

traduite par une augmentation de l'activité et/ou un élargissement du spectre thérapeutique ainsi que par un contournement du phénomène de résistance aux médicaments [7]

I.6.1. Activité antibactérienne

La chimie du ferrocène a eu un impact énorme dans de nombreux applications tels que : les applications pharmaceutiques (fabrication des antibiotiques tels que : La Pénicilline, Céphalosporine, et Réfamycines) [22,23]. Une des premières applications dans ce domaine, fut le développement de dérivés ferrocéniques d'antibiotiques issus de la modification de β lactames par l'insertion d'un motif ferrocène dans sa structure comme (les ferrocényl pénicilline et ferrocényl-céphalosporine) synthétisés 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 [22].

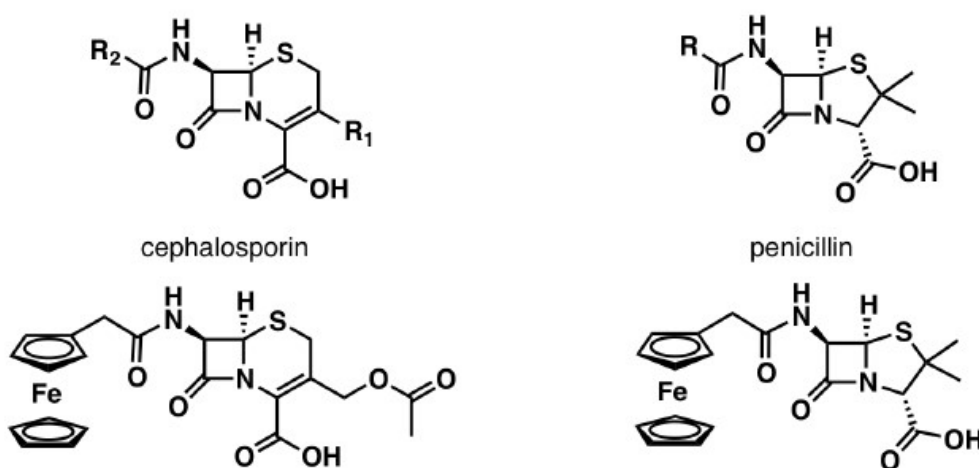


Figure I.9 : Structure de pénicilline et céphalosporine et les dérivés ferrocéniques correspondants [7].

I.6.2. Activité antifongique

Les résultats d'évaluation de l'activité antifongique du 3-nitrophénylferrocène contre deux espèces de levures pathogènes. D'après ces résultats, il a été révélé que le composé a des activités antifongiques prometteuses contre deux souches de levures (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*). Ces résultats suggèrent que le composé avait des activités sélectives contre les levures [63].

I.6.3. Activité antiparasitaire

Malaria est maladie infectieuse causée par un genre de parasite *plasmodium falciparum* transmise par un moustique dans la population vivante dans la zone tropicale, la Malaria cause annuellement des millions des décès. Il est donc important de développer du traitement efficace [20].

a. Ferroquine

Un des principaux traitements de Malaria est une molécule nommée ferroquine, dérivée ferrocénique de la chloroquine. En effet, la chloroquine est un antipaludique découvert en 1930, le *plasmodium* a développé des souches résistantes à cette molécule. La ferroquine est au contraire active sur plusieurs de ces souches, il est en fait le meilleur antipaludique chez Sanofi-Aventis. La ferroquine a été synthétisée par Brocard et Coworkers il est en phase II de tests cliniques.

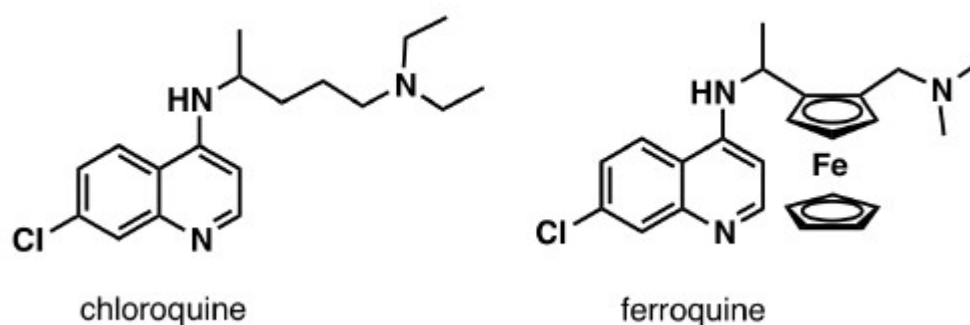


Figure I.10 : Structure de chloroquine et ferroquine [20]

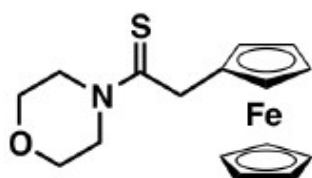
I.6.4. Activité antioxydante

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

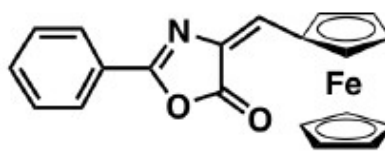
composés ferrocéniques ont été synthétisés et évalués en termes d'activités antioxydantes [43,44].

I.6.5. Activité anti HIV

Les topoisomérases sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN, elles coupent un (topoisomérase) ou deux (topoisomérase II) bras d'ADN. Elles jouent un rôle central dans la division cellulaire et la transcription. Cependant l'inhibition de la topoisomérase est une cible importante dans la découverte des nouveaux médicaments anticancéreux aussi bien que dans la thérapie anti-HIV. En effet il a été montré que l'activité de la topoisomérase est requise pour la réplication de HIV-1. La thiomorpholine amido méthyl ferrocène et azalactone ferrocène sont l'inhibiteurs sélectifs de la topoisomérase II [46].



thiomorpholine amido methyl ferrocene



azalactone ferrocene

Figure I.11 : structure des dérivés ferrocéniques anti HIV [7.26]

I.6.6. Activité anti-cancéreuse

Au cours de la dernière décennie, une révolution dans le traitement du cancer a été réalisée par des chimistes organométalliques [57]. De nombreux dérivés ferrocéniques donnent de bons résultats en tant qu'agents antitumoraux, et certains d'entre eux font actuellement l'objet d'essais cliniques [37.62].

Un exemple le plus cité dans la littérature de dérivé ferrocénique active biologiquement et montrant des effets antitumoraux est les ferrocène et le tamoxifène. Le tamoxifène est un antagoniste de certains récepteurs à oestrogenes situés dans le sein il freine la prolifération du cancer du sein hormono-dépendant [16]. La source de l'activité de ces dérivés ferrocéniques semble être les propriétés redox du ferrocène qui permettent une oxydation intramoléculaire produisant ainsi un métabolite toxique. Le simple remplacement du groupe

phényle β par le ferrocényle et l'homologation de la chaîne alkyle de la molécule du tamoxifène TAM ou de son métabolite actif l'hydroxy tamoxifène OHTAM, a produit les dérivés ferrocifène FcTAM et hydroxyferrocifène FcOHTAM, respectivement (Figure I.12) [64,65].

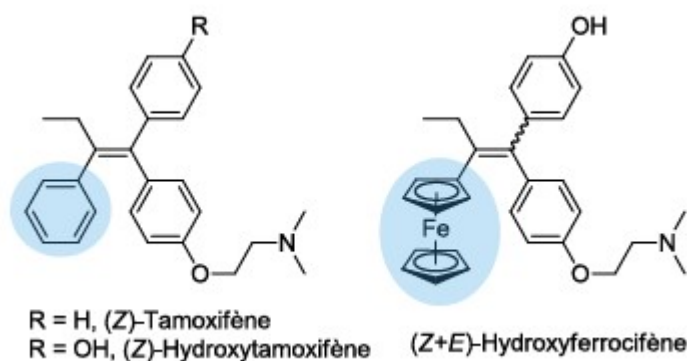


Figure I.12 : L'hydroxyferrocifène, bioisostère de l'hydroxytamoxifène [10]

I.7. Les composés organométalliques et cancer

Les systèmes biologiques montrent une richesse et une complexité qui ne sont pas toujours évidentes à comprendre sans une analyse précise à différentes échelles de grandeur. L'exemple qui sera traité dans ce manuscrit est le cas du cancer qui devient un défi pour les chimistes médicaux. En effet, le ferrocène a été utilisé pour de nombreuses applications, comme, la chimie médicinale [47,68]. Cependant, Les composés organométalliques sont de bons candidats pour devenir des médicaments anticancéreux [4,66]. L'intérêt du ferrocène pour la chimie médicinale débute vers les années 80's [67], quand certains sels du ferrocénium ont révélé des effets antitumoraux [48]. A partir de cette observation, il a été proposé que les composés ferrocéniques puissent être oxydés à l'intérieur de la cellule et qu'une telle oxydation puisse être à l'origine de ces effets cytotoxiques. Il est important de mentionner que le ferrocène n'est pas toxique par lui-même.

Par ailleurs, il a été proposé que l'activité des dérivés de l'ion ferrocénium ne puisse pas être liée à l'intercalation directe à l'ADN. En revanche, il a été observé que ces espèces étaient capables d'engendrer des radicaux HO• dans les cellules cancéreuses et d'endommager rapidement leur ADN [66]. Des études ultérieures ont confirmé la capacité des sels de ferrocénium de produire des espèces réactives d'oxygène (ROS) comme conséquence de leur dégradation dans l'eau en présence d'oxygène. De cette manière, la toxicité de ce type

d'espèces a été attribuée à leur lipophilie élevée qui permet leur passage transmembranaire pour conduire à l'endommagement oxydatif de l'ADN par la production de ROS simultanée à leur dégradation [67].

L'application des dérivés du ferrocène dans la thérapeutique du cancer, est un domaine de recherche actif, et de nombreux rapports ont démontré que certains composés ferrocényles sont hautement cytotoxiques *in vitro* contre plusieurs lignées de cellules de cancer, notamment du sein, de la prostate, du poumon, du colon et des cellules cancéreuses de la leucémie. Cependant, seuls quelques-uns ont été testés *in vivo*. Ajouter à cela, qu'une importante inhibition de la croissance tumorale *in vivo*, a été obtenue pour les sels de ferricénium (inhibition de la croissance jusqu'à 83%) [10].

Plusieurs études ayant montrées que les dérivés ferrocénique peuvent se lier à l'ADN par modes d'interaction covalents et non covalent. L'activité anticancéreuse des dérivés du ferrocène dépend de l'état d'oxydation du fer dans le fragment ferrocène, certains résultats indiquant que le composé ferrocényle Fe (II) est plus actif que le fer (III) [7,20,38].

I.8. Stratégie anticancéreuse étudiée au laboratoire

Les objectifs de la thérapie anticancéreuse consistent à cibler le plus spécifiquement possible, La réplication de l'ADN. Récemment de nouveaux protocoles de thérapies ciblant spécifiquement l'ADN ont été intégrés aux chimiothérapies conventionnelles. Ces thérapies s'accompagnent d'effets secondaires sévères : hypertension artérielle, saignements, réaction cutanée et, dans certains cas, perforation gastro-intestinale [32].

Dans le but d'améliorer le potentiel antitumoral, une stratégie de synthèse des molécules consisterait à associer certains réactifs à d'autres molécules telles que le ferrocène.

I.9. Principe théorique des techniques expérimentales utilisées

I.9.1. La spectrophotométrie UV-Visible

La spectroscopie d'absorption ultra-violette visible est à la fois une méthode d'analyse quantitative et qualitative. Elle est essentiellement fondée sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance dans la région UV-visible correspond à des transitions des électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure. Les spectres U.V visible provenant des excitations électroniques sont obtenus à partir des composés qui contiennent des liaisons multiples et conjuguées, ils correspondent à des spectres d'émission ou d'absorption [35,49].

✓ **Loi de BEER-LAMBERT :**

A une longueur d'onde spécifique pour substance donnée, il y a un rapport entre L'absorbance A, le nombre de molécules (la concentration) c , la longueur du chemin traversé (l'épaisseur de l'échantillon) exprimée en cm, et une constante appelée le coefficient d'extinction molaire spécifique qui indique l'intensité de l'absorption (l'absorptivité molaire). Cependant cette loi est définie par l'équation suivante (Zhong et *al.*2001) : $\text{Log}(I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot c = A$

D'où :

A : l'absorbance.

ϵ : le coefficient d'extinction molaire.

l : largeur de cuve de spectrophotométrie en (cm).

C : concentration de produit.

D'après cette loi la diminution de l'intensité lumineuse est proportionnelle au nombre de particules qui s'absorbent [54].

I.9.2. Les méthodes d'analyse électrochimiques

L'électrochimie est une bonne méthode pour étudier des réactions comportant des transferts d'électrons entre l'oxydant et le réducteur [55]. Car elle traite des réactions où interviennent un ou plusieurs électrons, en particulier les réactions d'oxydo-réduction et permet d'obtenir les espèces oxydées ou réduites sans ajout d'agent oxydant ou réducteur. Cette discipline à diverses applications dans le domaine de la chimie organique, physique et inorganique, elle repose sur plusieurs techniques, qui sont essentiellement : La polarographie, la voltamétrie, l'électrolyse et la colométrie.

L'utilisation de techniques électrochimiques est pour avoir plus d'information sur les molécules et leur mécanisme d'action [2,56]. Les mécanismes Electrochimiques sont importants pour toute la chimie des réactions redox y compris les systèmes biologiques. Ces techniques sont parmi les moyens les plus sensibles pour l'évaluation direct des concentrations ; ils peuvent être largement utilisés pour l'analyse des très faibles concentrations, en particulier sur les composés pharmaceutiques [60,69].

- La voltampérométrie :

La voltamétrie est une méthode d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de réduction ou d'oxydation des espèces présentes en solution. La voltamétrie cyclique est la technique voltamétrique la plus utilisée actuellement, c'est un type particulier de mesure électrochimique [31].

a. Principe de la Voltampérométrie cyclique :

La voltampérométrie cyclique, communément appelée voltamétrie cyclique (CV) elle permet de connaître le comportement d'un système redox, est une méthode potentiodynamique très utilisée en électrochimie [53,55,64] et plus efficaces pour caractériser les réactions de transfert de charges. Le principe général de cette méthode est l'obtention d'une réponse (le courant) à l'excitation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant un balayage des potentiels de façon cyclique à vitesse constante (répétitif avec une vitesse (0.1v à plusieurs volts), celui-ci se fait vers les potentiels cathodiques en réalisant une réduction, puis on inverse le sens pour réaliser une oxydation [33,34].

La détermination expérimentale de la relation entre le courant et le potentiel d'électrode se traduit par l'obtention des courbes de polarisations anodique et cathodique (dites Voltamogrammes cycliques) [31,46]. La bonne résolution et la reproductibilité des résultats due au fait que l'aller et le retour nettoient la surface de l'électrode de travail. La Figure (I.15) représente (1) une courbe typique de processus réversible (système rapide), observés par voltamétrie cyclique ainsi (2) la rampe linéaire en de potentiel imposé [45,55].

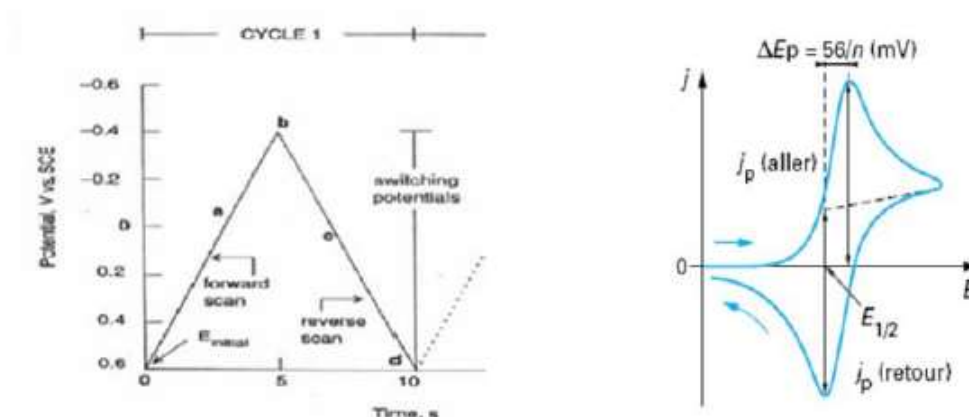


Figure I.13: (1) représente un courbe typique d'un voltamogramme.

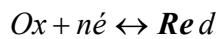
(2) La rampe linéaire en potentiel imposé (signal électrique symétrique -dents de scie-).

La comparaison de l'allure des courbes cathodique et anodique permet de déterminer si l'échange électronique à l'électrode correspond à un processus réversible ou non.

Afin d'analyser les caractéristiques expérimentales obtenues sur nos systèmes, nous rappellerons simplement les expressions donnant les courants en régime de diffusion pure dans les trois cas possibles que nous pouvons rencontrer suivant les conditions adoptées : systèmes rapide, lent et quasi-rapide [7].

1. Système rapide

D'après le voltamogramme obtenu dans le cas d'un système réversible, on déduit les paramètres i_{pa} et i_{pc} correspondant respectivement au courant de pic cathodique et anodique ainsi que les deux potentiels associés E_{pc} et E_{pa} . Le rapport $[Ox]/[Red]$ à la surface de l'électrode obéit à tout moment à l'équation de Nernst [40,53,51] :



$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)}$$

Avec R constante des gaz parfaits, F le Faraday (96485 Coulomb), T la température absolue et E^0 le potentiel standard, (Ox) et (Red) sont respectivement les activités relatives des espèces oxydante et réductrice. L'espèce stable Red produite durant le balayage aller est présente à la surface de l'électrode et dans la couche de diffusion. Elle subit au cours du balayage retour la transformation inverse [26].

L'allure des voltampérogrammes cycliques selon le système rapide est représentée par la Figure (I.16).

Les grandeurs caractéristiques de telles courbes sont d'une part le rapport i_{pa}/i_{pc} , D'autre part l'intervalle de potentiel $E_{pa}-E_{pc}$

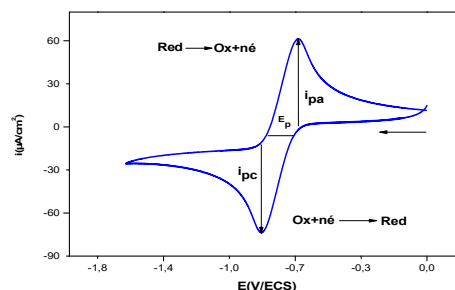


Figure I.14 : Allure générale de la courbe voltampérométrique d'un système rapide et ces grandeurs caractéristiques (Original)

I_{pa} , I_{pc} : Courants de pic anodique et cathodique.

E_{pa} , E_{pc} : Potentiels de pic anodique cathodique.

$E_{pa}/2$, $E_{pc}/2$: Les potentiels à mi- hauteur des pic anodique et cathodique.

ΔE_p : Différence de potentiel entre E_{pa} et E_{pc} .

Au départ, seule l'espèce R_{ed} est en solution, le potentiel initial est choisi pour qu'aucune conversion électrochimique n'ait lieu. Lorsque le potentiel augmente, l'équation de Nernst impose l'augmentation de la concentration en espèce Ox et on observe donc une augmentation du courant anodique au fur et à mesure que la conversion R_{ed} - Ox est faite. Le courant augmente jusqu'à ce que le potentiel devienne suffisamment positif pour que la concentration en R_{ed} soit négligeable à la surface de l'électrode à ce moment, l'intensité diminue car la concentration en R_{ed} est uniquement maintenue par la diffusion depuis la solution [34].

Lorsque l'échange électronique à l'électrode de travail est suffisamment rapide et que les coefficients de diffusion des formes oxydante et réductrice sont voisins, le couple est électrochimiquement réversible. Dans ce cas, le potentiel standard apparent E'_0 est égal à $(E_{pa}+E_{pc})/2$. La séparation entre les deux pics permet de déterminer le nombre n d'électrons échangé au cours de la réaction. En effet, lors de balayage en potentiels successifs, i_{pc} décroît et i_{pa} croît jusqu'à l'obtention d'un régime stationnaire [26]. De plus, si les produits et réactifs sont stables, on doit avoir $i_{pa}/i_{pc} = 1$.

Dans ces conditions, à 25°C, nous avons :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{0.058}{n} \quad \text{à} \quad 298K$$

Ainsi, la loi de Nernst simplifiée dans le cas d'un système rapide Ox/Red suffit à expliquer les différents phénomènes à la surface de l'électrode, en tenant compte de la variation linéaire de potentiel, on peut exprimer la variation de concentration de l'espèce Ox à la surface de l'électrode en fonction du temps :

$$C_{Ox}^{el} = C_{Red}^{el} \cdot \exp\left[\frac{n.F}{RT}(E_t - v.t - E^0)\right] \quad \text{Avec } E_t = E_i \pm v.t$$

La résolution des équations de FICK dans ces conditions conduit à l'expression du Courant sous la forme :

$$I = -n \cdot F \cdot S \cdot C_{ox} (\pi \cdot D_{ox})^{1/2} \left(\frac{n \cdot F}{R \cdot T} v \right)^{1/2} \cdot X(\delta, t)$$

Où

$X(\delta, t)$ Est une variable sans dimension, Fonction de E, calcule numériquement pour certaines valeurs de $(E - E_{1/2})$ et $\delta \left(\frac{n \cdot F}{R \cdot T} v \right)$ le traitement mathématique a été abordé successivement par RANDLES-SEVCIK

$$I_{pc} = -0.4463 \cdot n \cdot F \cdot \left(\frac{n \cdot F}{R \cdot T} \right)^{1/2} \cdot S \cdot C_{ox} \cdot D_{ox}^{1/2} \cdot v^{1/2}$$

Cette équation peut se mettre sous la forme à 25 °C.

$$I_{pc} = -0.269 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot S \cdot C_{ox} \cdot D_{ox}^{1/2} \cdot v^{1/2}$$

Où I_{pc} : intensité cathodique de pic s'exprime en A à 25°C

n : nombre d'électrons mis en jeux

S : surface de l'électrode en cm²

C_{ox} : Concentration de substance électroactive dans la solution en mol.cm⁻³

D_{ox} : Coefficient de diffusion de l'oxydant est exprimé en cm².s⁻¹

v : vitesse de balayage de potentiel (en Vs⁻¹)

Le domaine de concentration utilisable est de 10⁻² à 10⁻⁵ M. pour un système réversible, le potentiel de pic E_{pc} (potentiel de pic cathodique) peut être calculé par la relation :

$$E_{pc} = E_{1/2} - 1,1 \cdot \frac{RT}{nF} = E_{1/2} - 28 / n \text{ (mV à 25°C)}$$

$E_{1/2}$: Potentiel standard (potentiel de demi-vague polarographique).

n : Nombre d'électrons.

2-Système lent (Irréversible)

Dans le cas d'un système lent, la vitesse de transfert électronique est inférieure ou comparable à la vitesse de diffusion. Elle est insuffisante pour maintenir l'équilibre à l'électrode, la loi de NERNST ne s'applique donc plus, on utilise la relation de Butler-Volmer en introduisant dans la formule les expressions des concentrations à la surface de l'électrode et des variations linéaires de potentiel. Cet état va modifier la morphologie des voltampérogrammes enregistrés, après intégration nous obtenons l'équation suivante :

$$j = -n.F.C_{Ox}^{sol} . (\pi . D_{Ox})^{1/2} \left(\frac{\alpha . n . F}{R.T} . v \right)^{1/2} . X \left(\frac{\alpha . n . F}{R.T} \sigma . t \right)$$

3-Système quasi-rapide

Dans le cas d'un système quasi-rapide, il est nécessaire de prendre en compte la relation de Butler-Volmer complète. Les développements théoriques ont été développés par plusieurs auteurs [45,46]. Rappelons que le courant est donné par la relation :

$$j = -n.F.C_{Ox}^{sol} . D_{Ox}^{1/2} . \left(\frac{n.F}{R.T} . v \right)^{1/2} . \Psi(E)$$

Où j est une fonction tabulée pour différentes valeurs de $(E - E_{1/2})$

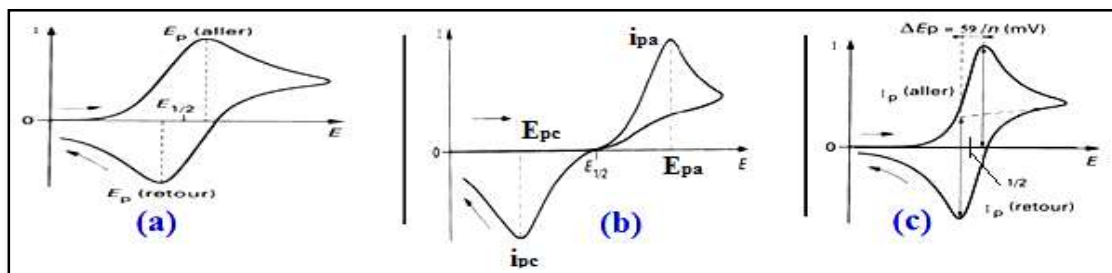


Figure I.15 : Allure d'un voltampérogramme cas d'un système quasi-rapide(a), lent (irréversible) (b), rapide (réversible) (c)

b. Composants des techniques voltammétriques :

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont :

✓ Cellules électrochimiques :

La cellule électrochimique est composée de l'association d'un conducteur ionique et basée sur un système à trois électrodes immergées dans la solution à analyser : une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant. Le courant passe entre l'électrode de travail et la contre-électrode, la référence servant à contrôler du potentiel. L'électrode de travail est l'électrode contenant le composé à caractériser. L'électrode de référence est l'ECS saturé [31].

✓ Les électrodes

-L'électrode de travail : Est une microélectrode de petite surface d'ordre de mm² dont la surface sert de site pour la réaction de transfert d'électrons il est donc le cœur de tous systèmes voltamétrique. Les électrodes de travail les plus utilisées en voltampérométrie sont :

Les électrodes solides (fixe ou tournante), formées pour la plupart de métaux nobles tels qu'Au, Pt, Ir et Cv (carbone vitreux).

L'électrode tournante : animée d'un mouvement de rotation, dans le but de se placer dans les conditions expérimentales d'un régime de diffusion., lavé avant chaque enregistrement avec de l'acétone et nettoyé par un papier abrasif [36,45]

-L'électrode de référence :

Est le deuxième composant-clé de toute cellule voltamétrique. Cette électrode possède un potentiel spécifique et constant, ce qui permet d'imposer un potentiel précisément défini à l'électrode de travail. Ceci est important, étant donné que le potentiostat ne permet de contrôler que la différence de potentiel imposé entre deux électrodes. Notons également que de ce fait il est indispensable de mentionner la nature de l'électrode de référence utilisée pour toutes mesures voltamétriques. Les électrodes de référence les plus utilisées, et leurs potentiels standards par rapport à l'électrode standard à hydrogène ($E = 0$ choisi arbitrairement), sont :

- L'électrode au calomel saturée (ECS) : $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{\text{sat}}$, $E_{\text{ECS}} = 241\text{mV}$.
- L'électrode au chlorure d'argent saturée : $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$, $E_{\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}} = 199\text{ mV}$ [11.28].

-L'électrode auxiliaire (contre électrode) :

Assure le passage du courant dans la solution (la pile) et sa mesure. Elle est usuellement en platine ou en carbone (graphite) et possède une large surface par rapport à l'électrode de travail.

✓ La solution.

La solution contient le solvant (eau), *un électrolyte inerte en grande concentration (Par ex. : 0.1M NaNO_3) pour assurer le flux de courant dans la solution par transport de ses ions, et le (ou les) composé(s) à analyser (aussi appelé dépolariseur) qui subit la réaction redox à la surface de l'électrode de travail.

(*) L'électrolyte est un système renfermant des ions. Il est obtenu par dissolution d'un soluté ionique dans un solvant. Le pouvoir dissociant des solvants varie selon la valeur de leur constant diélectrique ϵ . Les solvants tels que $\epsilon > 40$ sont dissociant (eau) et entraînant une dissociation totale des solutés ioniques [45,69].

c.Détection électrochimique :

Les techniques électrochimiques reposent sur la possibilité d'oxyder/réduire la molécule d'intérêt, convertissant ainsi une information chimique (nature de l'espèce et concentration)

en information électrique (courant à un potentiel donné). Ainsi, elles offrent la possibilité d'une détection extracellulaire sans contact et avec une résolution spatiale et cinétique en temps réel, comme dans le cas de la synapse artificielle [39,60].

d. Conditionnement de la détection électrochimique de ferrocène et Leur dérivés :

Nous avons étudié le comportement électrochimique des dérivés ferrocéniques à une concentration (10^{-3} M) par la voltamétrie cyclique dans un milieu organique (ACN) en présence de sel de fond. Le système utilisé est un dispositif qui comporte une cellule électrochimique en verre à trois électrodes, munie d'une double paroi permettant une circulation d'eau, reliée à un Potentiostat/Galvanostat de type voltalab40 PGZ301 piloté par un logiciel de travail voltamaster4 du Radiomètre analytique, connecté à une cellule en verre modèle pyrex de 50cm³, sa couvercle contient des fentes qui permettent d'entrer les électrodes. L'acquisition des données est assurée grâce au logiciel Voltamaster4. Les électrodes utilisées sont reliées au potentiostat par l'intermédiaire d'un électromètre [31,46].

Avant d'effectuer une mesure voltamétrique, la solution à étudier est purgée au moyen d'un gaz inerte (N₂) afin d'éliminer l'oxygène dissous. Ceci est nécessaire car l'oxygène, qui est présent en concentration relativement grande (environ 3×10^{-4} M en solution saturée avec l'air), est également électroactif. L'électroréduction de l'O₂ donne un pic de réduction qui peut masquer les signaux des composés à analyser.

L'électrode de travail est nettoyée par polissage à l'aide de papier émeri de faible granulométrie. Elle est ensuite rincée avec de l'eau distillée puis avec l'acétone et enfin séchée avec du papier Josef, avant chaque manipulation.

Références bibliographiques

- [1] Nafees Muhammad and Zijian Guo (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents *Chemical Biology* 2014, 19:144–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.003>
- [2] Laszlo, P., et Hoffmann, R. (2000). Ferrocene: Ironclad History or Rashomon Tale. *Angewandte chemistry*. (39) 123-124.
- [3] Zahra Afrasiabia, Ekk Sinna, Shreelekha Padhyeb, Sabari Duttab, Subhash (2003). Transition metal complexes of phenanthrenequinone thiosemicarbazone as potential anticancer agents: synthesis, structure, spectroscopy, electrochemistry and in vitro anticancer activity against human breast cancer cell-line, T47D *Journal of Inorganic Biochemistry* 95, 306–314.
- [4] Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011). “Organometallic anticancer compounds,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 3–25.
- [5] Hurley, L. H., Boyd, F. L. (1988). DNA as target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 402-407.
- [6] Molina, Á., González, J. (2015). Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis: Theory and Applications, Springer, 671p.
- [7] Monserrat, J. P. (2012). Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocénique des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). P
- [8] Kauffman, G. B. (1983). The discovery of ferrocene, the first sandwich compound. *Journal of chemical education*. (60) 185-186.
- [9] Kealy, T. J., Pauson, P. L., (1951). *A New Type of Organo-Iron Compound*, dans *Nature*, vol. 168, 1951, p. 1039.
- [10] Köpf-Meyer, P., Köpf, H. & Neuse, W. (1984). Ferricenium complexes: a new type of water-soluble antitumor agent. *J Cancer Res Clin Oncol*, 108: 336–340.
- [11] Ron, D. (2001). Fifty years of ferrocene chemistry. *Chemical and Engineering News*.vol 79. n° 49. p 37–38. DOI: 10.1021/cen-v079n049.p037
- [12] Siden, T. et al. (1997). *Journal of Organometallic Chemistry*, 541, 355-361.
- [13] Wilkinson G. (1975). The iron sandwich a recollection of the first four months. *Journal of Organometallic Chemistry*. 100 (1975) 273-278.
- [14] Klajner, M. J. (2011). Organometallic compounds as anti-cancer agents: interaction with DNA and migration in cell. Thèse de doctorat. Université de STRASBOURG. P05-06.
- [15] Zayya, I. A.; Jonathan Singh, J. and Spencer, J. L. (2013). Synthesis and Reactions of Ferrocene. *Chemical and Physical Sciences*.
- [16] Sansook, S. (2017). Biological Evaluation of Ferrocene Derivatives. Doctorat thesis. University of Sussex. P06-09.
- [17] Juan Carlos García-Ramos¹, Rodrigo Galindo-Murillo², Fernando Cortés-Guzmán^{3,4}, and Lena Ruiz-Azuara (2013) Metal-Based Drug-DNA Interactions *J. Mex. Chem. Soc.* 2013, 57(3), 245-259.
- [18] Gabriela Mojžišová, Ján Mojžiš and Janka Vašková (2014) Organometallic iron complexes as potential cancer therapeutics, Vol. 61, No 4/2014 651–654 *ACTA Biochimica analytica*
- [19] Acevedo-Morantes, C. Y. Meléndez, E. Singh, S. P & E Ramírez-Vick, J. (2012). Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferricenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines, *J Cancer Sci Ther*, 4.9.
- [20] Chavain, N. (2008). Conception, Synthèse, Analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de la ferroquine. Thèse de doctorat, Université des sciences et technologies de lille.pp9-10-253.
- [21] Chem, J. (2011). Organometallic anticancer compound. *Journal of Medicinal*

Chemistry; 54(1): 3–25

[22] Edwards, E. I. Epton R. & Marr, G. (1976). A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenyl-penicillins and-cephalosporins, *journal of organometallic chemistry*, 107: 351-357.

[23] Edwards, E. I. Epton, R. & Marr, G. (1975). Organometallic derivatives of penicillins and cephalosporins a new class of semi- synthetic antibiotics, *journal of organometallic chemistry*, 85: 23-25.

[24] Gulam, F. M., Manohar, V. L. (2014). Synthesis of ferrocene based organometallic compounds and antimicrobial activity. *Journal of applied chemistry*. 7: 27-32

[25] Didier Astruc. (2016). Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, 6–29 DOI: 10.1002/ejic.201600983.

[26] Afzal S. (2010). Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electroactive Compounds., Quaid-i-Azam University Islamabad., these du doctorat., p 60-61.

[27] Werner, H. (2012). At Least 60 Years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angewandte chemistry*. 51, 2–9. DOI : 10.1002/anie.201201598.

[28] Mouas Toma Nardjes (2013). Synthèse, Caractérisation Structurale Et Propriétés Catalytiques De Nouveaux Composés Ferrocéniques. These de docotrat université constantine

[29] Görmén, M. (2010). Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocénophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate, *Cancer. Chimie ParisTech*, 2010. Français, 244p.

[30] Gratien, E. (2008). Spectroscopie ultraviole_visible et infrarouge des molécules clés atmosphérique., Thèse du doctorat., université du Paris 12_Val de Marne, 27p.

[31] Khelef, A. (2014). Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N-phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N'phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines, Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider – Biskra. Algerie, 156p.

[32] Lacave, R., Larsen, Ch-J., Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale*, John LibbeyEurotext, Paris, 437p.

[33] Neghmouche, Ns., Khelef, A., Lanez T. (2010). Investigation of diffusion of ferrocene and ferricenium in aqueous and organic medium using voltammetry techniques, vol 1, 76p.

[34] Olivier. M.-G. (2009). *Electrochimie et applications*. EDITION 2009. p11.

[35] Skoog, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (2003). *Principes d'analyse instrumentale*, De Boeck Supérieur, 956p.

[36] Terki, B. (2007). Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelque N-acyl-N'alkylferrocenyl méthyle hydrazide. Thèse de doctorat, Université de HADJ LAKHDAR, Batna. p4-5.

[37] Shafqat, A., Ataf A. A. L., Amin, B., Imitiaz, U. D., Bhajan, L., Saqib, K., Shafiq, U. (2013). DNA interaction, Antibacterial and Antifungal studies of 3-nitrophenylferrocene. *Journal Chemical Society of Pakistan*. 35: 922-928.

[38] Sirajuddin, M. Ali, S. Amin Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. (124) 1–19.

[39] Njogu, E. M., Omondi, B. et Nyamori, V. O. (2016). Synthesis, Physical and Antimicrobial Studies of Ferrocenyl-N-(pyridinylmethylene)anilines and Ferrocenyl-N-(pyridinylmethyl)anilines. *S. Afr. J. Chem.* 69, 51–66.

[40] Mouats, N. (2010). Etude électrochimique des dérives de l'acide 2-nitrophenyl sulfonyl acétique. Mémoire magistère. Université du 20 AOÛT 1955–SNIKDA. P20.

[41] Li, S., Wang, Z., Wei, Y., Wu, C., Gao, S., Hui, J., Zhao, X., Yan, H., and Wang, X. (2013). Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. *Biomaterials*. 34 (902-911).

- [42] Lanez. T., Henni. M., (2016). Antioxidant activity and superoxide anion radical interaction with 2-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile and 3-(ferrocenyl-methylamino) benzonitrile. *J IRAN CHEM SOC*. DOI 10.1007/s13738-016-0891-1
- [43] 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.
- [44] 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. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED. 169p.
- [45] 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.
- [46] Gulam, F. M., Manohar, V. L. (2014). Synthesis of ferrocene based organometallic compounds and antimicrobial activity. *Journal of applied chemistry*. 7: 27-32. mdc.201000286.
- [47] Fouda, M. F. R., Abd-ElZaher, M. M., Abdelsamaia, R. A., Labib, A. A. (2007). On the medicinal chemistry of ferrocene. *Applied Organometallic Chemistry*. 21: 613–625
- [48] Batu Dirersa, W. (2014). Contribution of Cis and Trans-platinum (II) Complexes in Synthetic Drug and Medicinal Chemistry from the view of Coordination Chemistry. *International journal of chemical and pharmaceutical*. 2: 40-47.
- [49] Abdel Aziz, A. A., Elbadawy, H. A. (2014). Spectral, electrochemical, thermal, DNA binding ability, antioxidant and antibacterial studies of novel Ru (III) Schiff base complexes. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 124: 404–415.
- [50] Raufa, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A. Khalid, A.M. (2005). *Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 205–217
- [51] Atkins PW. (1986). *Physical Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK. 1986; 263-265
- [52] Brett, C.M.A., Brett. A.M.O. (1993). *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, *Oxford Science University Publications*, Oxford
- [53] Aslanoglu, M., Oge, N. (2005). Voltammetric, UV Absorption and Viscometric Studies of the Interaction of Norepinephrine with DNA, *Turk. J. Chem*. 29, 477-485.
- [54] Burgot, G., Burgot, J-L. (2011). *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications* (3e ed.), Lavoisier 75008 Paris, 369p.
- [55] Can, Ozluer., Hayriye, Eda., Satana, Kara. (2014). Approche Electrochemical peut-il fournir un nouvel aperçu de la conception rationnelle de médicaments et conduirait à une meilleure compréhension du mécanisme d'interaction entre les médicaments anti-cancéreux et de l'ADN, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Elsevier* 138 (2014) 36–42.
- [56] Molina, Á., González, J. (2015). Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis: Theory and Applications, Springer, 671p.
- [57] Pingyu Zhang, Peter J. Sadler*. (2017) Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* xxx 1e10
- [58] Sara Realista, Susana Quintal, Paulo N. Martinho, Ana I. Melato, Adrià Gil, Teresa Esteves, Maria De Deus Carvalho, Liliana P. Ferreira, Pedro D. Vaz & Maria José Calhorda (2016): Electrochemical studies and potential anticancer activity in ferrocene derivatives, *Journal of Coordination Chemistry*, DOI: 10.1080/00958972.2016.1257125
- [59] S. V, K. Ayyavoo and P. Rajakumar. (2017) Synthesis, characterization, optical, electrochemical properties and antifungal, anticancer activities of ferrocenyl conjugated novel dendrimers. *New J. Chem.*, 2017, DOI: 10.1039/C6NJ01120A

- [60] Abd-Elgawad Radi, Alsayed Eissa, Hossam M. Nassef. (2014). Voltammetric and spectroscopic studies on the binding of the antitumor drug dacarbazine with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 717–718 (2014) 24–28
- [62] Raja Azadar Hussain a, Amin Badshah a, Manzar Sohail b, Bhajan Lal a, c, Kamran Akbar a. (2013). Synthesis, chemical characterization, DNA binding and antioxidant studies of ferrocene incorporated selenourea. *Journal of Molecular Structure* 1048 (2013) 367–374
- [66] D Osella, M Ferrali, P Zanella, F Laschi, M Fontani, C Nervi, G Cavigliolo (2000). On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivative. *Inorg Chim Acta* 2000, 306, 42–48.
- [63] G Tabbi, C Cassino, G Cavigliolo, D Colangelo, A Ghiglia, I Vivano, D Osella. (2002). Water stability and cytotoxic activity relationship of a series of ferrocenium derivatives. ESR insights on the radical production during the degradation process. *J Med Chem* 2002, 45, 5786–5796.
- [64] S Top, J Tang, A Vessièrès, D Carrez, C Provote, G Jaouen (1996). Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem Commun* 1996, 955–956.
- [65] S Top, A Vessièrès, G Leclercq, J Quivy, J Tang, J Vaissermann, M Huché, G Jaouen. (2003). Synthesis, biochemical properties and molecular modeling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: Evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chem Eur J* 2003, 9, 5223–5236.
- [66] N Metzler-Nolte, M Salmann. (2008) In: *Ferrocenes Ligands Materials and Biomolecules*; Stepnicka, P., Ed.; Wiley, 2008; pp 499– 639.
- [67] Hartinger CG, Metzler-Nolte N, Dyson PJ. (2012). Challenges and opportunities in the development of organometallic anticancer drugs. *Organometallics* 2012, 31, 5677–5685
- [68] G Wilkinson, R Rosenblum, MC Whiting, RB Woodward (1952). The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc* 1952, 74, 2125–2126.
- [69] Lu X, Zhu K, Zhang M, Liu H, Kang J. (2002). Voltammetry studies of the interaction of transition-metal complex with DNA: *J. Biochem.Biophys. Met*,2002;52(3):189-200.

Synthèse et caractérisation de dérivés ferrocéniques

CHAPITRE

II



II. Introduction

Suite à la découverte du ferrocène il y a plus de cinquante ans, une vaste gamme de dérivés organométalliques ont été préparés et caractérisés. Le choix du complexe organométallique s'est porté sur le ferrocène car il possède des propriétés cytotoxiques et est beaucoup moins coûteux que d'autres complexes, tels que les complexes de rhénium, de manganèse ou de rhodium. En effet, Le couplage du ferrocène avec des biomolécules pourrait être intéressant pour de nombreuses raisons. En raison de l'oxydation réversible d'un électron du ferrocène, ses dérivés sont applicables en tant que biocapteurs, récepteurs moléculaires et ioniques. Ainsi, la chimie organique bien établie du ferrocène a permis son incorporation dans de nombreux composés organiques [1.3], parmi lesquels des biomolécules telles que le tampon biologique le TRIS et certain composé chimique des dérivés d'aniline connus pour leur potentiel activités catalytiques. Dans ce travail, Le but fondamental de mes travaux était la synthèse de dérivés ferrocéniques à partir d'un groupement organométallique : le ferrocène, possédant des propriétés cytotoxiques portant un réactif biologiquement important qui présentent une grande affinité de liaison envers l'ADN et des effets antiprolifératifs importants envers certaines cellules tumorales. Les nouveaux composés ont été obtenus via la réaction de sels quaternaire. Dans notre groupe de recherche, le couplage sel quaternaire avec composé à aniline a été étudié. Il a été prouvé que les produits à base des réactifs comportant une aniline avaient des activités biologiques très importantes [2].

II.1. Méthode de synthèse des dérivés ferrocéniques étudiés

Le chemin réactionnel consiste à utiliser le sel quaternaire de l'iodure de ferrocénylméthyltriméthylamonium comme produit de départ. Le dérivés ferrocéniques sont synthétisés par la réaction du sel quaternaire avec un excès de réactif appropriés pour chaque produit, dans l'eau bidistillé, le tout est mis dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant dans un bain d'huile chauffé selon la température de la réaction de synthèse choisi pour chaque produit et sous un flux d'azote [3].

II.1.1. Solvants et réactifs

- Les diluants organiques (l'éthanol, l'acétonitrile, le diéthyler, l'acétate d'éthyle, l'hexane, chloroforme, hydroxyde de potassium, et le dichlorométhane,) sont commercialisés par Sigma-Aldrich, de pureté de 95 à 98%, utilisés sans purification.
- Les produits : sulfate de magnésium,
- L'eau bidistiller pour la synthèse et l'huile de silicone pour le bain.

-Les réactifs utilisés : Ferrocène (Fluka), Diméthylamine, trishydroxyméthylaminométhane (TRIS), 2 et 3-chloroaniline et 3-trifluorométhyl aniline commercialisés par ALFA AESAR.

II.1.2. Techniques d'analyses utilisées :

- **Température de fusion** : Les températures de fusion des différents composés synthétisés ont été mesurées par le modèle thermique à l'aide d'un appareil de type **Gallenkamp**.
- **Spectroscopie infrarouge** : Les spectres infrarouges ont été enregistrés sous forme de pastilles de KBr dans un spectrophotomètre de type SHIMADZU FTIR-830, entre 400 et 4000 cm^{-1} . Les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).
- **Spectroscopie ultra-violette** : Les spectres UV de nos composés ont été réalisés dans un spectrophotomètre de type SHIMADZU UV mini 1800 à une température ambiante, en utilisant des cuves de quartz de 1 cm d'épaisseur entre 900 et 200 nm avec une concentration de 10^{-3}M .
- **Chromatographie sur colonne** : Les chromatographies sur colonne sont réalisées avec le gel de silice (Merck 230-400 mesh), Aldrich. Solvant d'élution utilisé : Rapport hexane/acétate d'éthyle 2/1 et Dichlorométhane.
- **Chromatographie sur couche mince (CCM)** : La pureté des produits est vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince dans les conditions suivantes :
 - Support : gel de silice Merck 60 F254 mesh).
 - Révélation : Lampe Ultraviolet et iode.
 - Systèmes de solvants de migration utilisés : Le Dichlorométhane, le chloroforme et diéthylether

✓ Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur des appareils Bruker AC 300. Les spectres sont enregistrés à température ambiante et les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (δ en ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

Nous avons utilisé pour l'interprétation des spectres les abréviations suivantes :

(s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (dd) doublet de doublets, (m) multiplet, (bs) singulet élargi et (smr) signal mal résolu. Les constantes de couplage sont notées J et sont exprimées en Hertz (Hz).

✓ L'électrochimie

Les essais électrochimiques ont été réalisés au laboratoire de recherche VTRS de l'université d'El- Oued. Le dispositif expérimental pour réaliser des mesures électrochimiques est un potentiostat Radiomètre PGZ 301, relié à un micro-ordinateur piloté par le logiciel **Voltamaster 4**. Les courbes de Voltamogrammes ont été réalisées en utilisant un montage à 3 électrodes, à 25°C. L'électrode de travail est un de carbone vitreux (5 mm de diamètre). L'électrode de référence est une électrode au calomel à KCl saturé, et l'électrode auxiliaire est constituée d'un disque de platine.

Nous avons choisi l'acétonitrile CH₃CN comme solvants pour la caractérisation de nos produits synthétisés. Les électrolytes supports utilisés dans notre étude sont le tétrabutylammonium tétrafluoroborate (Bu₄NBF₄).

II.2. Préparation de sel quaternaire d'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium

Pour synthétiser nos dérivés ferrocéniques, il faut préparer le produit de départ : le sel quaternaire à partir du lequel que nous allons préparer les dérivés ferrocéniques selon le chemin réactionnel suivant :

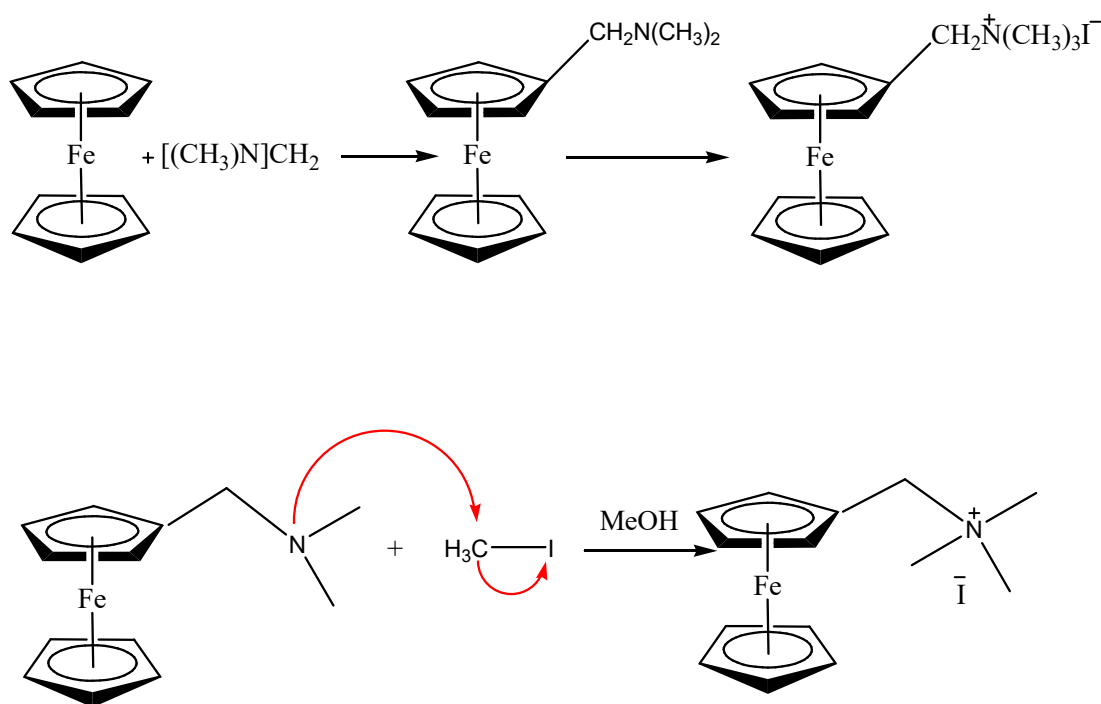


Figure II.1 : Chemin de synthèse de sel quaternaire

La préparation de sel quaternaire se fait en trois étapes comme suit :

II.2.1. Synthèse de Méthylène-bis-diméthylamine (Réactif de Manish)

Un masse 60.8 g d'une solution aqueuse de formaldéhyde à 37% (22.5 g, 0.75 mole) est placée dans un ballon de 500 ml, équipé d'un agitateur magnétique et d'un thermomètre, puis refroidie dans un bain de glace. A l'aide d'une ampoule à decanter, nous ajoutons lentement une masse 168.8 g d'une solution aqueuse de diméthylamine 40% (67.5 g, 1.5 mole), de telle manière que la température du milieu réactionnel n'excède pas 15 °C. Après l'addition complète de diméthylamine et l'agitation du mélange pendant 60 minutes, nous ajoutons des granules d'hydroxyde de potassium jusqu'à la formation de deux couches distinctes. La phase organique supérieure est séparée et traitée par une autre quantité de granules d'hydroxyde de potassium. Cette opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus formation de deux phases (après ajout de 150g d'hydroxyde de potassium).

La couche organique récupérée est séchée par une quantité supplémentaire de pastille d'hydroxyde de potassium (environ 10g). Le mélange est laissé reposer pendant une nuit, filtré, puis distillé pour donner 61.9 g (81%) de Méthylène -bis-diméthylamine de point d'ébullition 83-84 °C.

II.2.2. Synthèse de diméthylaminométhylferrocène

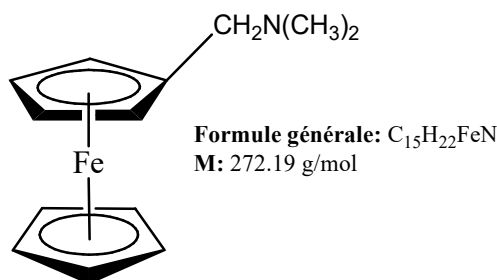


Figure II.2 : Structure chimique de N-N-Diméthylaminométhylferrocène

Dans un tricol de 1 litre équipé d'un réfrigérant, d'un agitateur magnétique et adapté à un courant d'azote continu, on y introduit (58 g, 0.31 mole) de ferrocène, (53 g, 0.52 mole) de méthylène-bisdiméthylamine, (53.9 g, 0.55 mole) d'acide orthophosphorique et 490 ml d'acide acétique. Le mélange est chauffé dans un bain d'eau bouillante sous forte agitation magnétique et sous un flux d'azote pendant 5 heures. La solution obtenue, de coloration marron foncé, est refroidie à température ambiante et diluée avec 650 ml d'eau distillée. Le ferrocène non réagi est extrait par 3 x 325 ml d'éther, et la couche aqueuse obtenue est refroidie dans un bain de glace et rendue fortement alcaline par l'addition des pastilles d'hydroxyde de potassium. Une couche huileuse noire de l'amine ferrocénique tertiaire est apparue à la surface de la solution alcaline. Cette couche est redissoute par l'addition d'une quantité supplémentaire d'eau. Le mélange obtenu est extrait par 3 x 500 ml d'éther. La solution organique obtenue est lavée à l'eau et

séchée sur le sulfate de sodium. Après l'évaporation de l'éther, on obtient un liquide visqueux de diméthylaminométhylferrocène, de couleur rouge foncé et de masse 67 g, avec un rendement de 90% [3].

IR (KCl, disque) 1238.2 ; 1473.5 ; 2399.3 ; 3012.6 et à 3618.2 cm⁻¹

RMN H1 (300MHz, CDCl₃)

2.13 (s, 6 H, (CH₃)₂), 3.24 (s, 2H, CH₂), 4.14 (s, 4H, CpC₅H₄), 4.07 (s, 5H, CpC₅H₅)

RMN 13C (75 MHz, CDCl₃)

71.578C, (CH₃)₂), 83.15 (2C, (CH₂)₂), 68.026 (5C, CpC₅H₅),

II.2.3. Synthèse d'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium

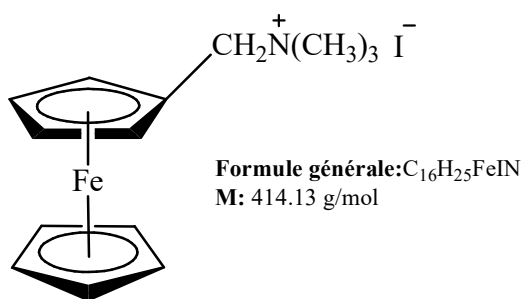


Figure II.3 : Structure chimique d'Iodure du Ferrocénylméthyltriméthylamonium

Une quantité de (67 g, 0.28 mole) de N-diméthylaminométhylferrocène est dissoute dans 70 ml de méthanol et chauffée sur un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes. Une quantité de 70 ml (151 g 1.06 mole) d'iodométhane est ajoutée à la solution goutte à goutte (la réaction est exothermique et l'addition rapide peut causer des ébullitions brutales). L'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium obtenue et refroidie à température ambiante et versé dans un bêcher d'un litre, devient solide par l'addition d'éther. Le solide obtenu est filtré, lavé avec de l'éther et séché à température ambiante. On obtient un précipité jaune d'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium 100 g correspondant à un rendement de 94%.

sa température d'ébullition est de 218° C

IR (KCl, disque) 1238.2 ; 1473.5 ; 2399.3 ; 3012.6 et à 3618.2 cm⁻¹

RMN H1 (300MHz, CDCl₃) 3.26 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.26 (s, 5H, CpC₅H₅), 4.29, 4.56 (s, 4H, CpC₅H₄), 4.87 (s, 2H, CH₂)

RMN 13C (75 MHz, CDCl₃) 52.68 (3C, (CH₃)₃), 67.16 (1C, CH₂), 69.63 (5C, CpC₅H₅), 70.71 ,72.29 (4C, CpC₅H₄) [1.3]

II.3. Synthèse des dérivés ferrocéniques étudiés

Plusieurs conditions (solvants, température, rapport de réactifs et durée de synthèse) ont été utilisées lors de la préparation des dérivés ferrocéniques, afin d'optimiser les conditions les mieux adaptées à leur synthèse et à leur bon rendement.

Protocole générale de la synthèse

Le montage réactionnel est composé d'un réacteur (ballon tricol) de 250 mL équipé d'un thermomètre et d'un réfrigérant à reflux, d'un agitateur magnétique et adapté à un flux d'azote continu. La température de réaction est choisie entre 80°C et 120°C. La réaction de synthèse se fait par un traitement de sel quaternaire d'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium par un excès de réactif soit (le TRIS ou 3-trifluorométhylaniline ou 2 et 3-chloroaniline), la réaction se fait en milieu aqueux (50 ml d'eau distillée). Le mélange est agité jusqu'à la dissolution complète de la suspension solide. Puis, le mélange est chauffé dans un bain d'huile de silicone à la température appropriée de chaque synthèse sous flux d'azote durant entre 4 à 6 heures, en fin la réaction est contrôlée à chaque fois par la chromatographie sur couche mince

Une fois la réaction arrêtée :

Le ballon tricol contenant le produit de synthèse obtenu est refroidi, un volume de dichlorométhane est ajouté au produit de synthèse dans une ampoule à décanter. Le mélange biphasique est agité vigoureusement, la phase organique (inférieure) et la phase aqueuse (supérieure)

Extraction

Le contenu du ballon transvasé dans une ampoule à décanter. Trois extractions au dichlorométhane ou diéther sont réalisées. Les phases organiques sont réunies puis lavées plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne claire. La phase organique est séchée par du MgSO_4 puis filtrée pour éliminer le précipité de MgSO_4 . Ensuite, nous avons procédé à une évaporation du mélange par l'évaporateur rotatif.

Purification

Le produit obtenu est chromatographié sur une plaque de CCM. L'éluant étant le dichlorométhane ou un rapport hexane/acétate 2/1. La bande du produit synthétisé ayant un rapport frontal (R_f) spécifique pour chaque échantillon. La pureté du produit est confirmée par une colonne de chromatographie pour séparer l'échantillon des autres impuretés. Puis une CCM a été faite pour confirmer la purification de notre produit.

✚ Cristallisation

Le produit est ensuite cristallisé et recristallisé par un mélange d'éthanol-Eau pour donner des cristaux solide et stable à la température ambiante sans condition spécifiques de stockage ayant de couleurs différents avec un point de fusion précises pour chaque produit.

II.3.1. Synthèse de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane

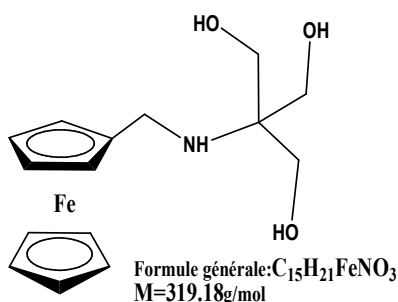


Figure II.4 : Structure chimique de N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane

Nous introduisons une quantité de (0,1 g, 0.25 mmol) d'iodure de ferrocénylméthyltriméthylammonium et de Tris (0,062 g, 0.51 mmol) dans le ballon tricol selon le schémas de synthèse ci-dessous, le mélange est agité pendant 4 heures sous une température de 80°C à 100°C, après le refroidissement, le produit est séparé par le dichlorométhane puis lavé avec de l'eau distillé, le produits ensuite et cristallisé et recristallisé avec un rapport Ethanol/Eau 7/3, nous obtiendrons en fin des cristaux sous forme d'aiguille doré avec une RF :0.54 , un rendement de 31% et une point de fusion de 77°C

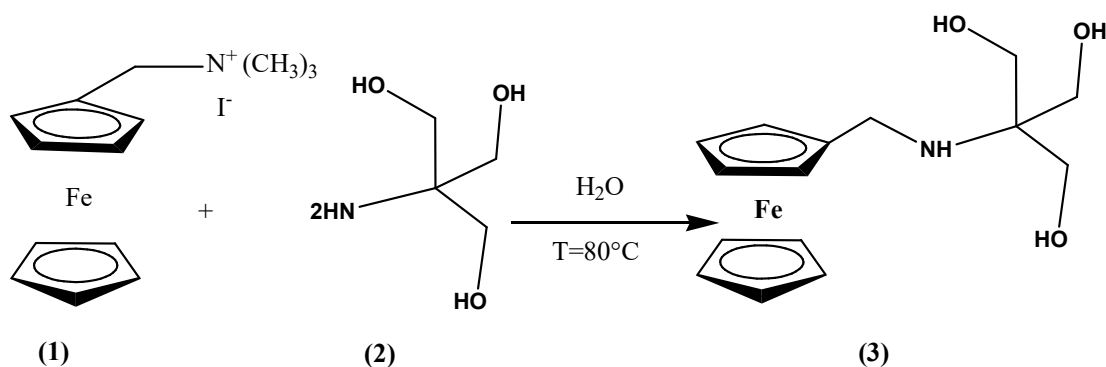


Figure II.5 : Chemin réactionnel de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxyméthylaminométhane

II.3.2. Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethylaniline substitué par le Fluor ou le chlore

La synthèse de N'-ferrocénylméthyl-N'-trifluorométhylaniline et N'-ferrocénylméthyl-N'-chloroaniline est réalisée via la réaction de sel d'iodure du ferrocénylméthyltriméthylamonium avec un excès de réactifs appropriés (trifluorométhylaniline et chloroaniline). La synthèse est réalisée dans l'eau bidistillée sous un flux d'azote à une température entre 110°C et 120°C. Les réactifs sont peu solubles dans l'eau, la suspension doit être alors bien agitée.

La synthèse de FcM3FMA et FcM ClA est représentée selon le schéma réactionnel suivant :

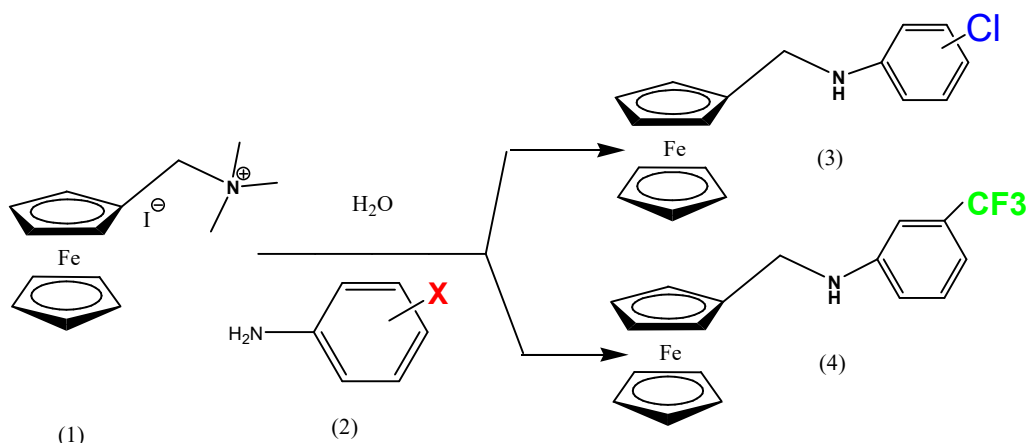


Figure II.6 : chemin réactionnel de la synthèse des composés FcM3FMA et FcM ClA

II.3.2.1 Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 3-trifluorométhylaniline

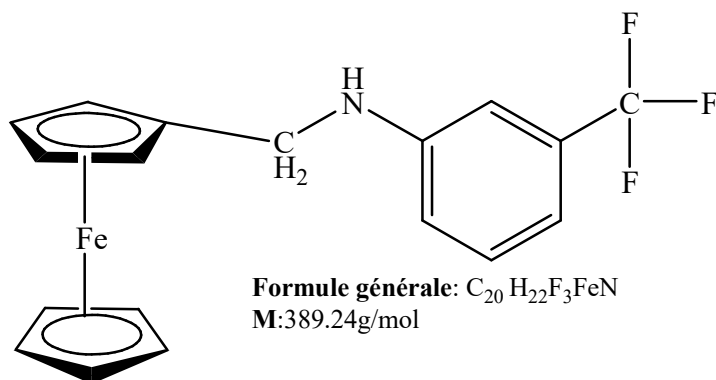


Figure II.7 : Structure chimique de N-Ferrocenylmethyl N-3-trifluorométhylaniline.

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

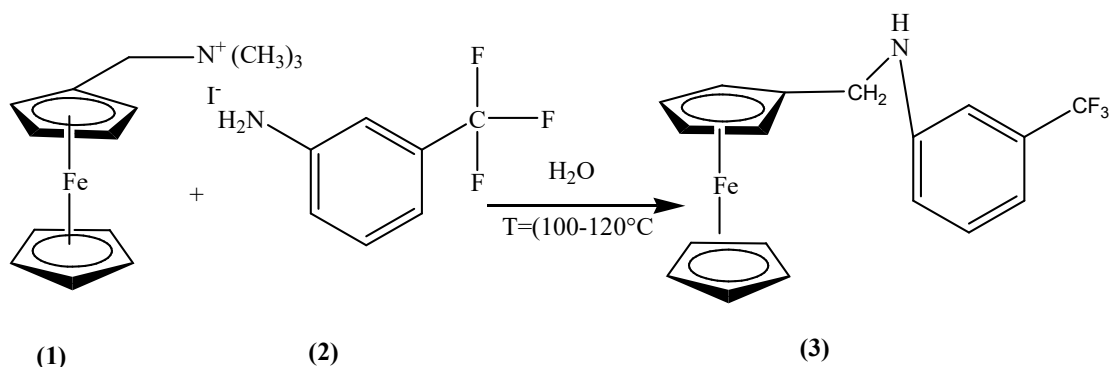


Figure II.8 : Chemin réactionnel de synthèse de dérivé N-ferrocenylmethyl -3-trifluoromthylaniline ((1) : Sel quaternaire, (2) : La base 3-trifluoromthylaniline et (3) : Le dérivé ferrocénique synthétisé)

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

II.3.2.2 Synthèse de dérivé N- Ferrocenylmethyl 2 et 3-chloroaniline

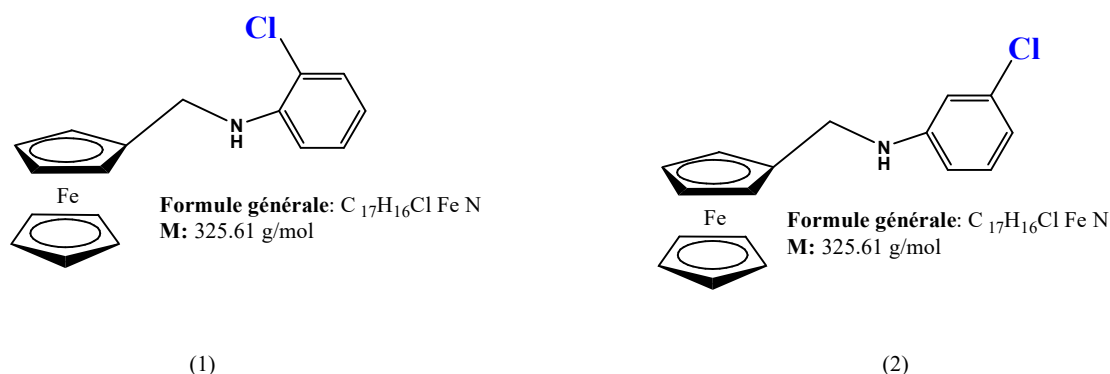


Figure II.9 : Structure chimique de (1) N-Ferrocenylmethyl. (2) 2-chloroaniline N-Ferrocenylmethyl 3 chloroaniline

La synthèse a été réalisée en introduisant le réactif 2 ou 3 chloroaniline (0.250 g, 0.64 mmol) au sel d'iodure ferrocenylmethyl triméthylammonium (0.1635g, 1.28mmol), le mélange réactionnel dans l'eau bidistillé a été chauffé à une température d'environ 115°C mène à la formation d'un seul produit après une durée d'environ 8 heures avec un rendement de 45% et Rf 0.9 et point de fusion 78°C, la recristallisation donne des cristaux jaune doré de dérivé N-ferrocenylmethyl 2-chloroaniline et des cristaux marron foncé de dérivé N-ferrocenylmethyl 3-chloroaniline[4].

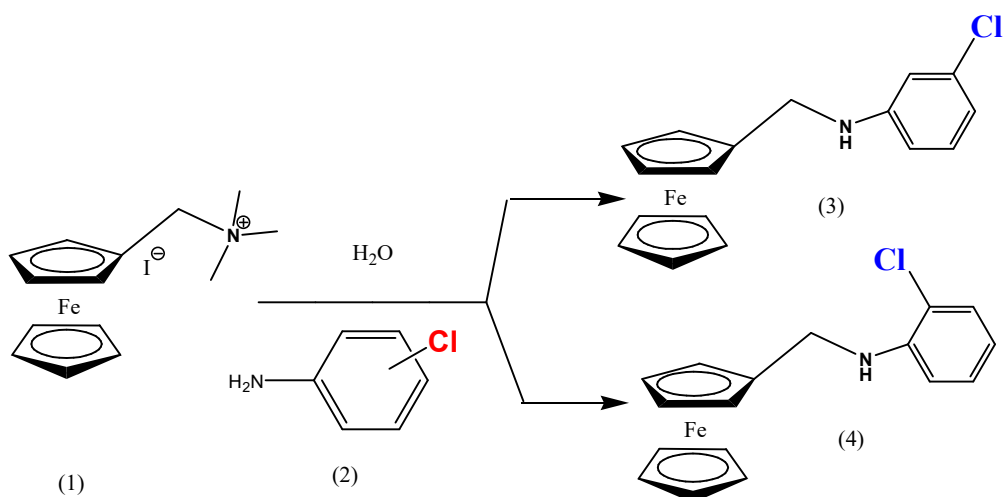


Figure II.10: Chemin réactionnel du synthèse N-ferrocenylmethyl 2 et 3 chloroaniline via la réaction de sel quaternaire.

II.4. Propriétés physique et analytique des dérivés ferrocéniques synthétisés

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

Des tests de solubilité sur l'ensemble des dérivés révèlent que les dérivés (Fc-tris, DMAMF, Sel quaternaire) sont solubles dans l'eau ainsi que les autres solvants organiques. En revanche, les dérivés (Fc3FManiline, Fc2Cl aniline et Fc3Cl aniline) sont solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau.

Les propriétés analytique et physique des complexes synthétisés sont regroupées dans le tableau II.1

Tableau II.1 : Caractéristiques physicochimiques des dérivés ferrocéniques synthétisés

Nom de dérivé ferrocénique	M (g/mol)	Formule brute	Point de fusion °C	Temps (h)	Rdt (%)	Rf (CH ₂ Cl ₂)
Fc-tris	319.18	C ₁₅ H ₂₁ FeNO ₃	77	4	31	0.54
DMAMF	272.19	C ₁₅ H ₂₂ FeN	/	29	90	
IFAMATA	414.13	C ₁₆ H ₂₅ FeIN	/	30	94	0
Fc3FManiline	389.24	C ₂₀ H ₂₂ 3FFeN	71.7	6	31.30	0.88
Fc 2 et 3Cl aniline	325.61	C ₁₇ H ₁₆ Cl FeN	78/88	6	45	0.9

II.5. Caractérisation structurelle et identification des dérivés synthétisés

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

II.5.1. Caractérisation UV-VIS

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

Tableau II.2: Tableau de correspondance Couleur – Longueur d'onde

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

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

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

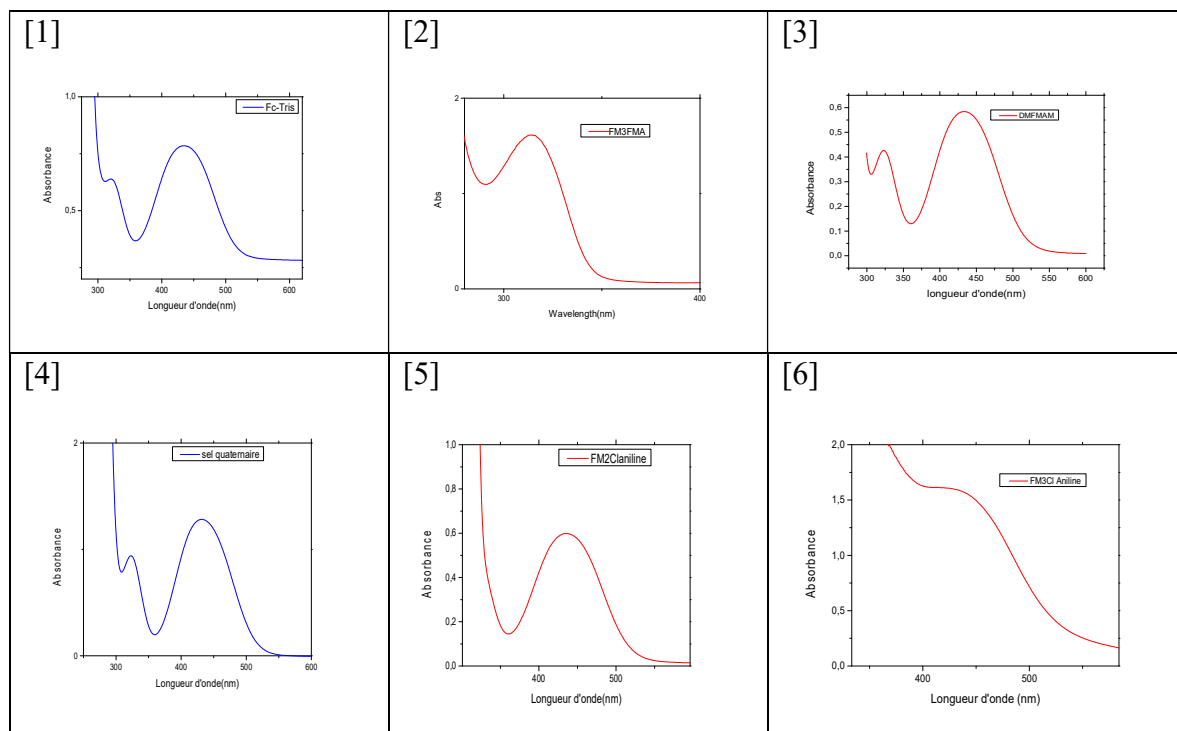


Figure II.11 : Spectroscopie électronique UV-Vis des différents dérivés synthétisés.

[1] : Le spectre UV-Visible de Fc-tris a été réalisé dans l'acétonitrile, affiche deux bandes caractéristiques de la transition $n \rightarrow \pi^*$ est signalée dans l'ultraviolet à $\lambda_{\max 1} = 321 \text{ nm}$ et une deuxième bande dans le visible à $\lambda_{\max 2} = 434 \text{ nm}$.

[2] : Le spectre UV de composé ferrocénique FM3FMA dans l'acétonitrile ne présente qu'une seule bande dans le domaine du UV à une longueur d'onde $\lambda_{\max 1} = 314 \text{ nm}$ caractérisé par la transition ($n \rightarrow \pi^*$).

[3] : D'après le spectre UV-Vis de dérivé ferrocénique intermédiaire DMAMFc, nous observons deux bandes claires caractéristiques à la transition ($n \rightarrow \pi^*$), la première est signalée dans l'UV à $\lambda_{\max 1} = 323 \text{ nm}$ et la deuxième dans le visible à $\lambda_{\max 2} = 432 \text{ nm}$.

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

[5] : Le spectre de dérive ferrocénique FcM2Cl aniline dans l'acétonitrile affiche dans le visible une seule bande à une longueur d'onde $\lambda_{\max 1} = 435 \text{ nm}$ correspondant à la transition ($n \rightarrow \pi^*$).

[6] : Le spectre de dérive ferrocénique FcM3Cl aniline dans l'acétonitrile affiche dans le visible une seule bande à une longueur d'onde $\lambda_{\max 1} = 436 \text{ nm}$ caractéristique à la transition ($n \rightarrow \pi^*$).

II.5.2. Comportement électrochimique par voltamétrie cyclique

L'étude électrochimique par voltamétrie cyclique des dérivés synthétisés a été effectuée en solution organique, l'acétonitrile (ACN), l'électrolyte support est le Bu_4NBF_4 à une vitesse de balayage 100 mV/s . Le produit à étudier est dissous dans la solution contenant le sel du fond. Des voltamogrammes cycliques de tous les composés ont été enregistrés en utilisant le couple ferrocène / ferricénium comme étalon rédox interne. Chacune présentait un pic réversible à un électron, dû à l'oxydation du groupe ferrocénoyle en cation ferricénium. Les mesures sont effectuées en générale dans le domaine $100\text{--}900 \text{ mV}$. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau II.3.

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

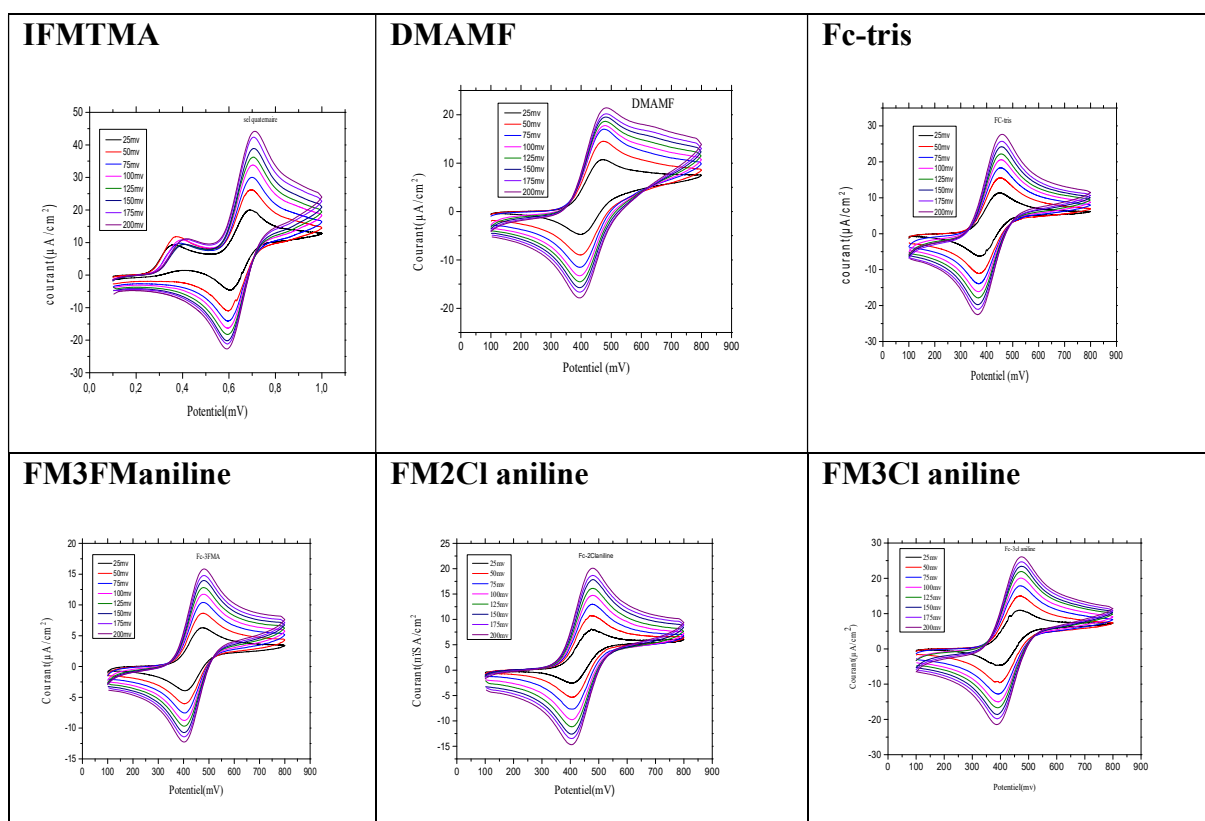


Figure II.12 : Voltamogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques 10^{-3}M enregistré en milieu organique (acétonitrile) en présence de Bu_4NBF_4 10^{-3}M à différentes vitesses de balayage sur une électrode de CV.

La réversibilité de la réaction d'oxydoréduction a été démontrée par voltamétrie cyclique, les paramètres électrochimiques tirés de voltamogramme de ferrocène montrent que le processus d'oxydoréduction se fait d'une façon rapide, réversible et monoélectronique [1].

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

Tableau II.3 : Valeurs caractéristiques des données électrochimiques tirés des voltamogrammes des produits synthétisés à une vitesse de balayage 100mV/s

Produits	$I_{pa}(\mu\text{A})$	$I_{pc}(\mu\text{A}/\text{cm}^2)$	$\left \frac{ip_a}{ip_c} \right $	$E_{pa}(\text{V})$	$E_{pc}(\text{V})$	$E_{1/2}(\text{V})$
Fc-tris	32.29	-31.29	1.016	0.275	0.088	0.881
DMAMF	13.855	-9.191	1.507	0.385	0.319	0.352
IFMTMA	11.568	-15.825	0.730	0.420	0.369	0.394
Fc3FMA	6.914	-5.411	1.277	0.511	0.443	0.477
Fc2CIA	14.88	-9.12	1.63	0.564	0.344	0.454
Fc3CIA	12.266	-9.403	1.304	0.533	0.347	0.440
Ferrocène	16.9	-16.69	1.012	0.439	0.362	0.380

D'après le tableau II.3, le rapport $\left| \frac{ip_a}{ip_c} \right|$ est proche à l'unité, le couple étudié constitue alors un système rapide et réversible. En comparant les valeurs de potentiel de demi-vague de composé étudié avec celui de ferrocène on constate qu'il est déplacé vers les valeurs les plus positives. Les composés étudiés deviennent difficilement oxydables, donc on pourra dire que les groupements substitués sur le ferrocène a un effet électroattracteur et que la réaction est rapide et monoélectrique.

En résumé les données caractéristiques des résultats spectroscopique UV-Vis et électrochimiques pour les dérivés synthétisés sont tabulés dans le tableau II.4

Tableau II.4 : Données spectroscopique et électrochimiques de dérivé ferrocénique

Composé ferrocénique	$\lambda_{\max}$ (nm)	$E_{1/2}$ (V) à 100mV/s
IFMTMA	322	0.394
DMAMF	323	0.352
Fc-Tris	434	0.881
FM3FMA	314	0.477
Fc-2ClA	435	0.454
Fc-3ClA	436	0.440

II.5.3. Caractérisation par la méthode spectroscopique d'identification FTIR

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

Les échantillons ont été analysés sous forme de pastilles KBr.

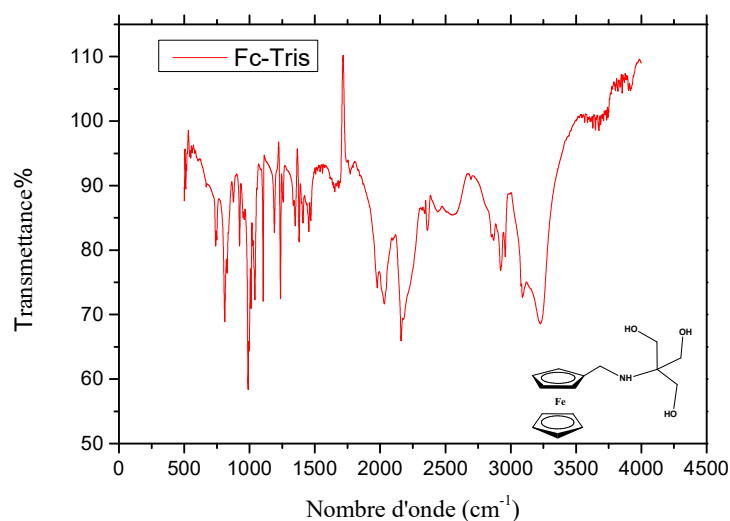


Figure II.13: Spectroscopie FT-IR de dérivé Fc-Tris

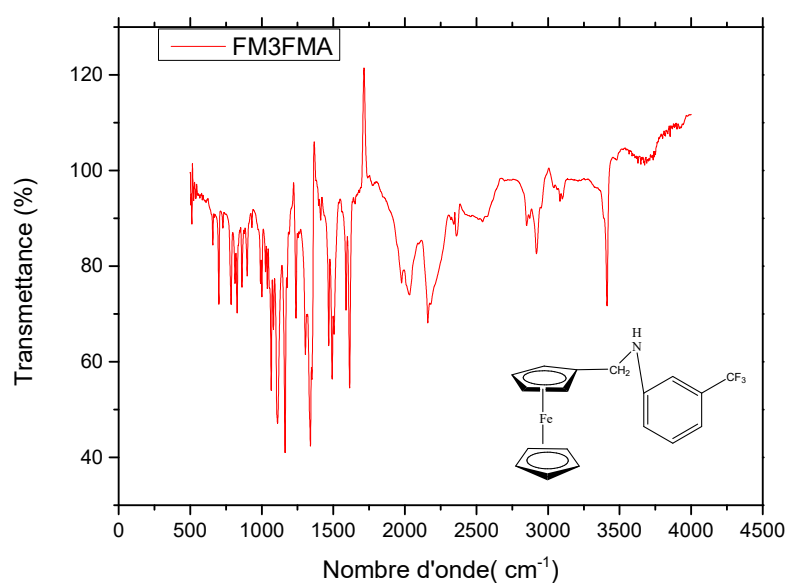


Figure II.14: Spectroscopie FT-IR de dérivé FM3FMA

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

IR Fc-Tris $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2969 (N-H), 2029.93 et 2155.39 (C-C), 3233.089 (O-H), 1116.77, 1108.54, 1182.56 (ferrocène), 1443.78 (C=C aromatique), 983.089 (C-O).

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

IR FM2Cl aniline $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3390.6 (N-H) ; 744 (C-Cl) ; 819 (phényle à deux substitution) ; 1001 (C-N) ; 1589. (C=C aromatique) ; 2833.2 et 2927.7 (C-H) ; 1130.2, 1253.6, 979.8 (ferrocène).

IR FM3Cl aniline $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3411.6 (N-H) ; 744 (C-Cl) ; 871.8 (phényle à deux substitution) ; 1473 et 1458.1. (C=C aromatique) ; 2736.8 et 2950.9 (C-H) ; 1130.2, 1253.6, 979.8 (ferrocène)

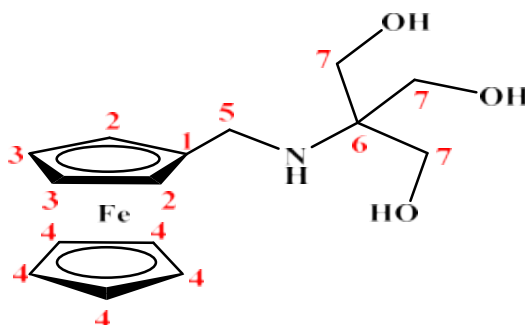
II.5.4. Caractérisation par la Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Les résultats RMN ^1H et ^{13}C ont confirmé la structure proposée de chaque composé, cependant, l'analyse des spectres de résonance magnétiques nucléaires sont présentés ci-dessous :

✓ Spectre RMN ^1H des dérivés ferrocéniques

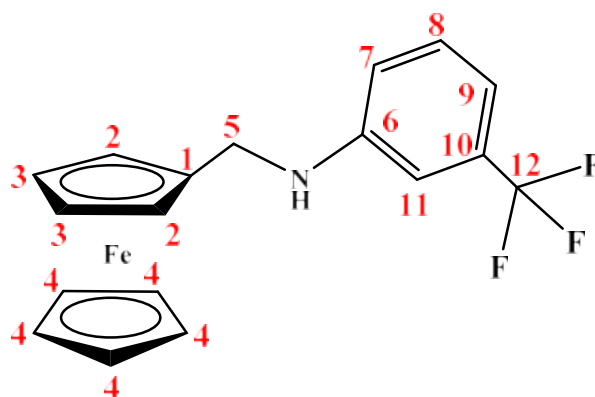
La conformation moléculaire de n'importe quel composé est essentielle pour déterminer son activité biologique, et cela dépend en grande partie du nombre et de la force des liaisons hydrogène formées en solution. La spectroscopie RMN- ^1H est une méthode inestimable pour déterminer la conformation de l'état de la solution adoptée par de tels composés. Tous les spectres ont été enregistrés dans le solvant de liaison H DMSO et, si nécessaire, dans CDCl_3

II.5.4.1. RMN ^1H et RMN ^{13}C de Fc-Tris



^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.40 (2H, t, α -protons of C_5H_4), 4.02 (2H, t, β protons of C_5H_4), 4.10 (5H, s, C_5H_5), 4.18 (2H, d, CH_2N), 4.28 (1H, s, NH), and 4.75 (6H, m, H7).

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO): δ 42 (1C, C5), 59 (3C, C7), 67 (4C, C3, C2), 69 (5C, C4), 87 (2C, C1, C6)

II.5.4.1. RMN ^1H et RMN ^{13}C de FM3FM aniline

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.41 (2H, t, α -protons of C_5H_4), 4.02 (2H, t, β protons of C_5H_4), 4.12 (5H, s, C_6H_5), 4.25 (2H, d, CH_2N), 4.34 (1H, s, NH), 6.22 (1H, d, H₉), 6.81 (1H, d, H₈), 6.82 (1H, m, H₁₁), and 7.3 (1H, m, H₇).

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO): δ 42(1C, C₅), 67(2C, C₃), 69(5C, C₄), 87(2C, C₂), 109(1C, C₁), 112(1C, C₇), 116(1C, C₉), 124(1C, C₈), 126(1C, C₆), 128(1C, C₁₁) 131(2C, C₁₀), 149(1C, C₁₂).

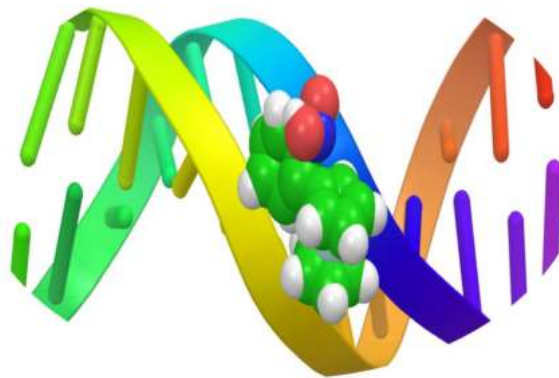
Références bibliographiques

- [1] Khelef, A. (2014). Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N-phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N' phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines, Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider – Biskra .Algerie, 156p.
- [2] 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. Université Echahiid Hamma Lakhdar EL-OUED. 169p.
- [3] 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 Echahiid Hamma Lakhdar EL-OUED. 185p.
- [4] Rahim Oum elkhir (2014), Synthèse et étude électrochimique et structurale de quelques N-ferrocényl méthyle anilines substitués Applications à l'inhibition de la corrosion aqueuse, thèses de doctorat en chimie, université Kasdi merbah Ouargla, Algérie

Etude de l'activité antimutagénique des dérivés synthétisés

CHAPITRE

III



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

III. Introduction

L'utilisation de dérivés ferrocéniques comme molécule bioactive a été établie récemment plusieurs rapports montrent qu'un grand nombre de composés contenant du ferrocène présentent d'intéressantes activités cytotoxiques et de clivage de l'ADN qui sont avérés être des agents thérapeutiques potentiels contre des maladies majeures [1,2]. En effet, certains composés synthétisés à partir des fragments organométalliques en sandwich ont été étudiés pour leurs différentes propriétés biologiques. Propriétés antipaludiques, antimicrobiennes, anticancéreuses [3, 4,5]. Cependant, L'interaction médicament-ADN in vivo implique des interactions concomitantes avec les enzymes ADN topoisomérase I ou II pour former un complexe ternaire [6]. Celles-ci peuvent conduire à des cassures mortelles de l'ADN double brin et finalement à la mort sélective des cellules tumorales. Cependant, les médicaments cytotoxiques ont généralement une toxicité élevée pour toutes les cellules normales et cancéreuses et leur index thérapeutique est habituellement faible. En outre, Si l'ADN représente le plan d'architecte de la vie, alors les protéines sont définies comme les machines moléculaires accomplissant ce plan. L'objectif était donc d'étudier de nouvelles dérives synthétisées et comprendre leur mode d'action envers les macromolécules biologiques afin d'en améliorer leur efficacité. Pour nos travaux, nous nous intéressons d'étudier les composés ferrocéniques et leur interaction avec les macromolécules biologiques tel que l'ADN et la BSA afin d'évaluer leur activité anticancéreuse in vitro par deux méthodes d'analyses : la spectroscopie UV-Vis et l'électrochimie.

III.1. L'ADN une cible moléculaire des anticancéreux

III.1.1.Introduction

L'ADN est la principale cible intracellulaire des médicaments anticancéreux. L'étude de l'interaction des petites molécules avec l'ADN a fait l'objet de l'étude depuis des décennies par ce qu'il donne un aperçu de la conception de l'examen préalable [7]. De nouveaux médicaments plus efficaces ciblant l'ADN, causant des dommages aux cellules cancéreuses et bloquent leur division et même entraînent sa mort, ce qui peut accélérer la découverte de médicaments et les processus de développement [8] Ainsi, il a été jugé utile d'étudier l'interaction des composés à base de métal avec l'ADN pour une meilleure compréhension de leurs propriétés pharmacologiques, de ce fait aujourd'hui les mécanismes complexes expliquant les processus de la production de lésions dans l'ADN jusqu'à la mort cellulaire, ouvrant des perspectives prometteuses dans la mise au point de nouveaux agents antitumoraux plus sélectifs et plus performants .

Les processus oncologiques sont caractérisés par des processus incontrôlés augmentation de la prolifération cellulaire ; l'ADN est donc la cible biologique de nombreux médicaments antitumoraux [9].

III.1.2. Définition de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique)

L'ADN joue un rôle central dans la vie cellulaire. Il est un biopolymère universel présent dans toutes les cellules. Il se trouve dans le cytoplasme des cellules procaryotes, tandis qu'il se localise dans le noyau, les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. Par conséquent l'ADN est le support de l'information génétique [10].

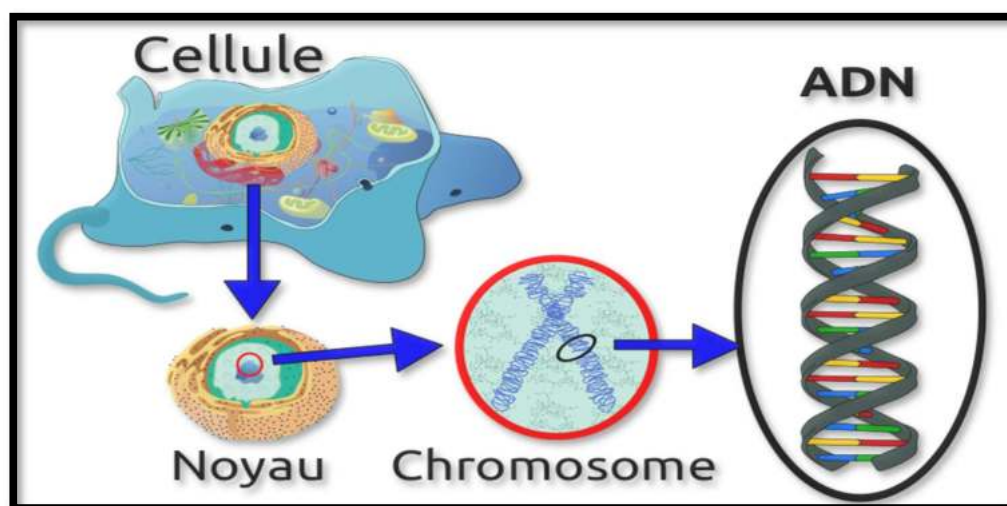


Figure III.1 : ADN dans le noyau cellulaire.

III.1.3. Structure de l'ADN

L'ADN est un polymère linéaire, il est empaqueté sous forme de chromosomes par association à des protéines chromatinienne au sein des noyaux des cellules eucaryotes. Ses monomères sont appelés nucléotides. Les nucléotides eux-mêmes sont composés d'un sucre, d'un phosphate et une base azotique. Un sucre et une base forment un nucléoside, tandis qu'un nucléotide est un phosphorylnucléoside. Les bases trouvées dans l'ADN sont présentées dans la figure III.2. Tous sont basiques parce que ce sont des amines hétérocycliques. Deux de ces bases ; adénine (A) et guanine (G) sont des purines et les deux autres cytosines (C) et thymine (T) sont des pyrimidines [10,11].

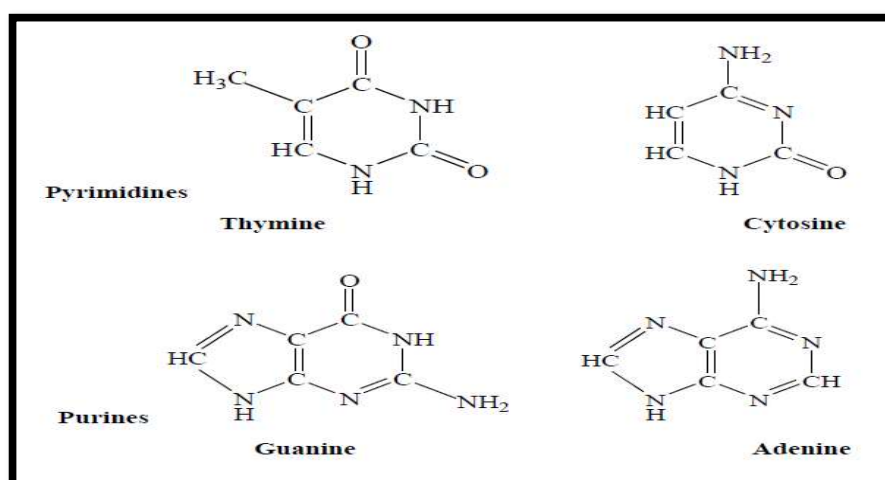


Figure III.2. : Les bases azotiques : pyrimidine et purine

III.1.4. La structure primaire et secondaire de l'ADN

L'ADN a deux structures primaires et secondaires. La structure primaire de l'ADN schématisé à la figure (III.3) peut être divisé en deux parties : (1) Le squelette de la molécule et (2) Les bases qui forment les groupes de la chaîne latérale. Le squelette de l'ADN est composé de groupes désoxyribose et phosphate en alternance. Chaque groupe de phosphate est lié au carbone 3 'd'une unité de désoxyribose et simultanément au carbone 5' d'unité de désoxyribose suivante. De même, chaque unité monosaccharidique forme un ester de phosphate au 3 'et un autre à la 5'. Le squelette assure la stabilité structurelle du Molécule d'ADN. Les bases liées, une à chaque unité de sucre, sont les chaînes latérales, et ils contiennent toutes les informations nécessaires à la synthèse des protéines. Les sucres dans les acides nucléiques sont liés les uns aux autres par des ponts phosphodiester. Plus précisément, le 3 - hydroxyle (3 -OH) du groupe sucre du nucléotide est estérifié en un groupe phosphate, lequel est, à son tour, associé au groupe 5-hydroxyle du sucre adjacent [10].

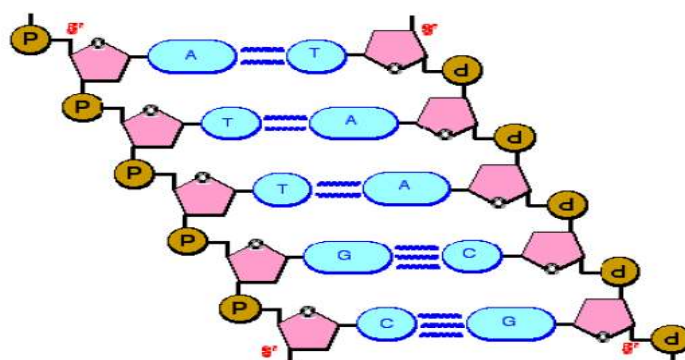


Figure III.3 : La structure primaire de l'ADN

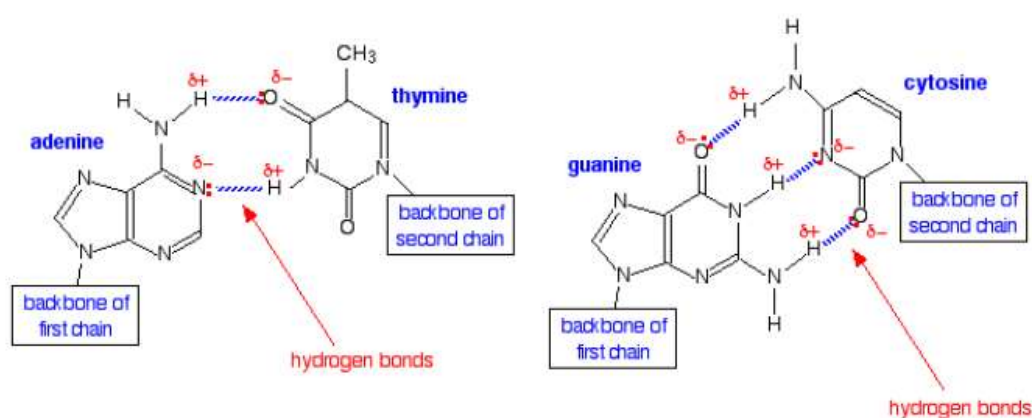


Figure III.4 : Structure des paires de base proposée par **Watson and Crick**.

L'analyse de la composition en bases de molécules d'ADN obtenues selon Erwin Chargaff a montré que la quantité d'adénine toujours approximativement égale à celle de la thymine et la quantité de guanine est toujours approximativement égale à celle de la cytosine. Cette information importante a aidé à établir la structure secondaire de l'ADN. En 1953, James Watson et Francis Crick ont créé la structure secondaire tridimensionnelle de l'ADN [13]. Leur modèle était basé sur deux informations importantes obtenues par d'autres chercheurs : (1) la règle de Chargaff (A et T) et (G et C) sont présents en quantités équimolaires et (2) la diffraction des rayons X photographies obtenues par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins. En utilisant ces faits Watson et Crick ont conclu que l'ADN est composé de deux brins enroulés les uns autour les autres dans une double hélice comme le montre la figure III.4.

III.1.5. Stabilisation de la double hélice

La double hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes.

L'existence d'interactions spécifiques d'appariement de bases a été découverte au cours d'études visant à déterminer la structure tridimensionnelle de l'ADN.

Dans la double hélice de l'ADN, les deux chaînes polynucléotidiques vont dans des directions opposées. Le squelette du phosphate de sucre est à l'extérieur ; exposé à l'environnement aqueux et les bases pointent vers l'intérieur. Les bases forment des paires spécifiques les unes avec les autres qui sont stabilisées par des liaisons hydrogène. Selon le modèle de Watson et Crick, L'appariement des bases entraîne la formation de deux brins complémentaires enroulés en hélice de façon antiparallèle donnant naissance à un grand et à un petit sillon [5].

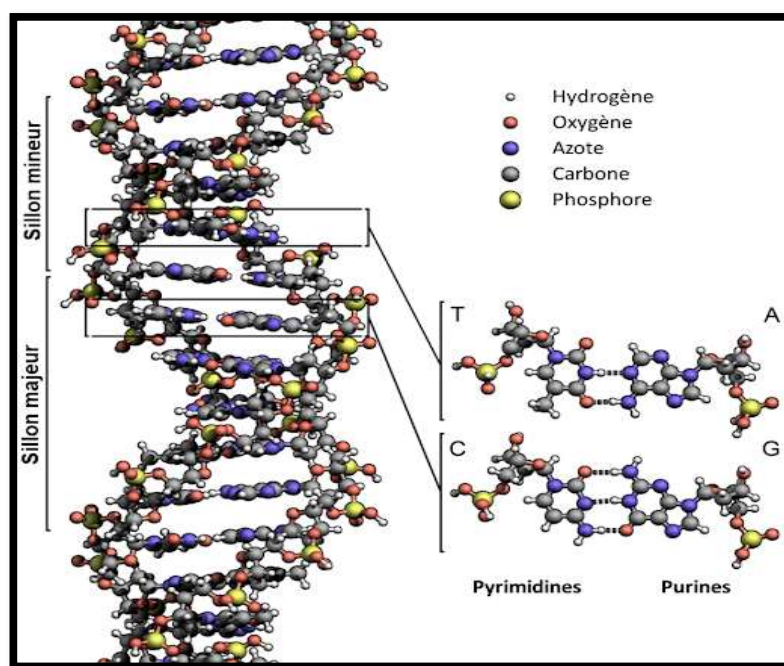


Figure III.5: Structure secondaire de l'ADN.

III.1.6. Les sillons de l'ADN

La double hélice constituée de deux brins antiparallèles. Bien que la conformation la plus adoptée par l'ADN double brin soit la forme B (fig. III.6) [14,16], les formes A et Z ont été observées sous certaines conditions [16]. L'ADN-B est caractérisé par une hélice droite régulière dans laquelle les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice. Lorsque les brins d'ADN s'enroulent les uns autour des autres, Deux sillons se forment entre les deux enchaînements phosphate, laissant apparaître les côtés des bases à l'intérieur. Ce sont les canaux d'informations de la double hélice

qui peuvent être lus à partir de l'extérieur, ils sont connus sous les noms de petit et grand sillons (fig. III.6). Le grand sillon (22 Å de large) et moyennement profond, il est fréquemment employé par les protéines de contrôle telles que les promoteurs et les répresseurs à cause de son contenu important en informations sous forme de groupements fonctionnels. Le petit sillon, moins large (12 Å) mais plus profond, est le principal site de fixation de petites molécules. En effet, le manque d'informations contenues dans le petit sillon (en termes de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène) permet seulement à de petites protéines et des petites molécules d'entrer en contact avec les bases [15]. Les grands et les petits sillons sont opposés à 180°. Ils diffèrent non seulement par la taille, mais également par la polarité. La chimie des sillons est spécifique aux paires de bases, ce qui peut entraîner une liaison spécifique du médicament ou de la molécule semblable au médicament dans les sillons. La reconnaissance moléculaire de séquences particulière de l'ADN par ces molécules fait intervenir des liaisons hydrogènes spécifiques, des interactions électrostatiques et des contacts de Van der Waals.

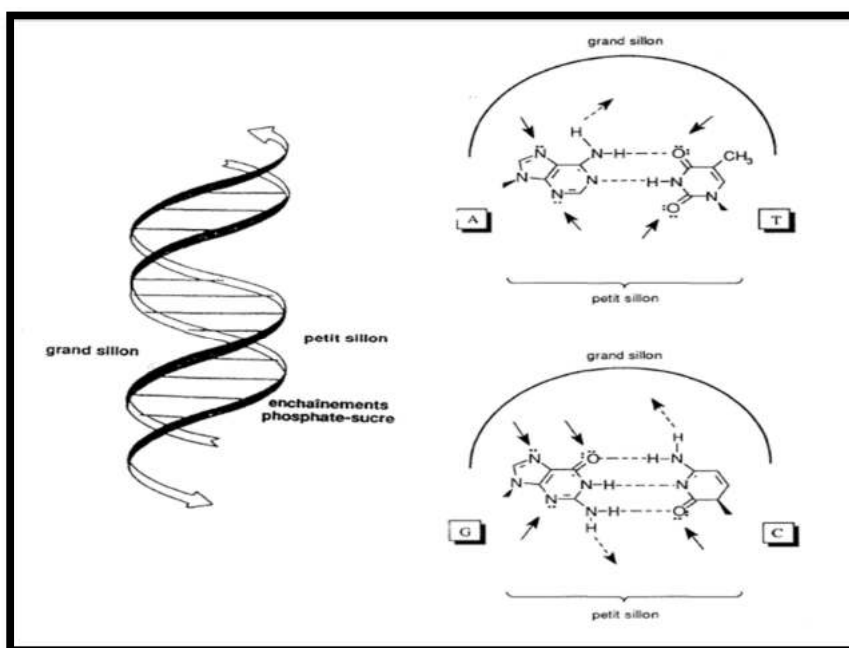


Figure III.6 : Vue schématique de l'ADN-B double brin montrant le grand et le petit sillon. A droite : les deux paires de bases AT et GC avec leurs groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.

III.1.7. Fonction

L'ADN joue un rôle central dans la vie cellulaire. En effet, il remplit deux rôles centraux :
 (1) il est le détenteur de l'information génétique qui permet à la cellule de synthétiser

continuellement ses protéines, sa réplication permettant de transmettre le message génétique au cours des générations cellulaires [13], (2) La synthèse des protéines.

➤ Réplication de l'ADN

Avant qu'une cellule puisse se diviser, elle doit dupliquer son ADN. Chez les eucaryotes se produit au cours de la phase S du cycle cellulaire. Les étapes impliquées sont :

- Une partie de la double hélice est déroulée par une enzyme hélicase.
- Une molécule d'ADN polymérase se lie à un brin d'ADN et commence à se déplaçant le long des 3' à 5' (les groupes phosphate sont attachés au sucre en 3' et 5' positions) en l'utilisant comme fourche pour l'assemblage du brin principal de nucléotide et reformer une double hélice. Comme la synthèse de l'ADN ne peut se produire qu'en 5' à 3', une molécule d'un second type de L'ADN polymérase se lie à l'autre brin matrice lors de l'ouverture de la double hélice. Cette molécule doit synthétiser des segments discontinus de polynucléotide (appelé fragment d'Okazaki). Une autre enzyme, l'ADN ligase, les assemble ensuite pour former un brin retardateur [12].

Lorsque le processus de réplication est terminé, deux molécules d'ADN identiques et identiques à l'original sont produites. Chaque brin d'ADN mère reste intact car il sert de matrice pour la synthèse du brin complémentaire. La réplication est dite semi-conservative car chaque hélice contient un brin provenant de l'ADN modèle et un brin néosynthétisé. Alors l'information génétique est fidèlement transmise aux cellules filles. Le résumé de la réplication de l'ADN suggéré par Watson et Crick est présenté à la figure (III.7).

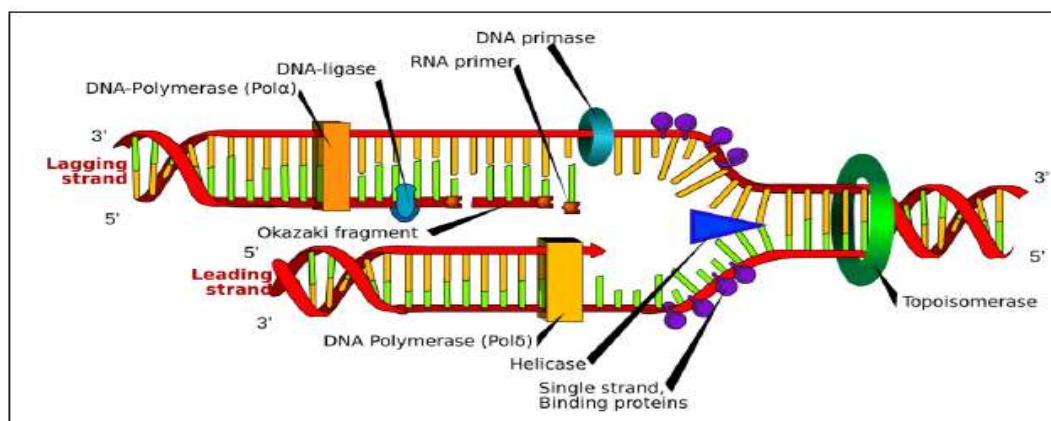


Figure III.7: Fourche de réplication.

➤ Synthèse protéique

Les informations génétiques stockées dans l'ADN sont continuellement déchiffrées par des systèmes protéiques sur la base d'un code à quatre lettres (A, T, G, C). L'ADN contient un code

qui est transcrit en ARN qui est ensuite traduit en protéines (Figure III.8). Chaque gène est une section de la molécule d'ADN. Certaines régions des gènes, dites codantes, possèdent l'information nécessaire à la synthèse des protéines, alors que d'autres régions dites non-codantes permettent la régulation de l'expression des gènes, via la fixation de protéines régulatrices ayant une fonction répressive ou activatrice. Une molécule intermédiaire, l'ARN messager, permet le passage de l'information du noyau au cytoplasme [17].

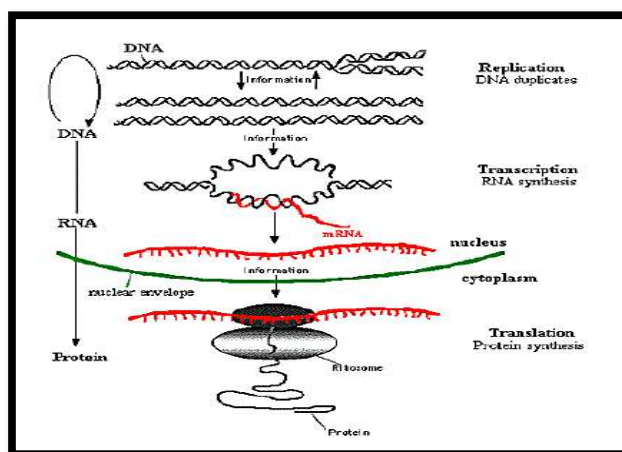


Figure III.8 : Synthèse des protéines.

III.1.8. Caractérisation de l'acide désoxyribonucléique

III.1.8.1. Instabilité chimique d'ADN

- L'ADN se décompose spontanément en solution. Ainsi, la présence du désoxyribose rend la liaison N-glycosidique fragile à l'hydrolyse, particulièrement celle des purines qui est 20 fois plus instable que celle des pyrimidines.
- Les fonctions amine exo-cycliques des bases peuvent être sujettes à des réactions d'hydrolyse à une température et un pH physiologique.
- La base C, ainsi qu'une base plus rare, la 5-méthylcytosine, sont les bases les plus sensibles à ces réactions de désamination. Elles sont alors respectivement converties en U et T.
- La structure en double hélice de l'ADN assure une bonne protection contre ces réactions. L'A et la G sont alors transformées en hypo xanthine et xanthine respectivement [17].

III.1.8.2. Electro activité des acides nucléiques

L'électrochimie des acides nucléiques est en plein essor à l'heure actuelle en raison du développement de dispositifs à base de transducteurs électrochimiques pour la détection de

séquences de nucléotides et de dommages à l'ADN. Il est bien établi que l'oxydation de l'ADN est une source importante d'instabilité génomique, car il existe des preuves que les produits d'oxydation des bases de l'ADN jouent un rôle important dans la mutagenèse, cancérogenèse, vieillissement. La modification chimique de chacune des bases de l'ADN provoque des perturbations moléculaires de la machinerie génétique qui conduit à un dysfonctionnement cellulaire et à la mort des cellules. Les méthodes électrochimiques sont très encourageantes pour l'étude des dommages oxydatifs de l'ADN et pour l'étude du mécanisme d'interaction des médicaments avec l'ADN [24]. La plupart des biosenseurs électrochimiques d'ADN reposent sur la détermination des pics d'oxydation de la guanine, Son principal produit d'oxydation la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) est considéré comme un biomarqueur utile des dommages d'ADN dus au stress oxydatif [18-20] et peut être facilement quantifiable par voltamétrie cyclique [18].

III.1.9. Les propriétés spectrales

Les hétérocycles des différentes bases ainsi que leurs dérivés, nucléosides ou nucléotides, présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'UV, spectres dépendant du pH. L'aire de ces spectres dans cette région est plus élevée pour les purines : leurs absorptions sont donc plus importantes. Ces propriétés optiques sont communément utilisées pour la détection, le dosage et le contrôle de pureté d'acides nucléiques [19].

III.1.9.1 Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

Lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion ou T_m (melting temperature), les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons H qui les maintiennent appariés. La T_m est la température où 50 % de l'ADN est déroulé. La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire, on dit que l'ADN est dénaturé [11].

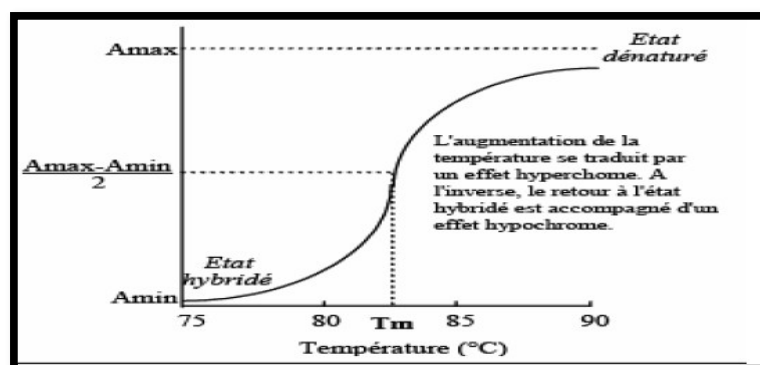


Figure III.9 : Dénaturation de l'ADN par la Température [11].

III.1.10. Mutation

De nombreux facteurs physiques et chimiques induisent des dommages dans l'ADN (mutation). Ces changements incluent des distorsions structurelles qui interfèrent avec la réplication et la transcription, ainsi que des mutations ponctuelles qui perturbent les paires de bases et exercent des effets néfastes sur les futures générations en modifiant la séquence de bases de l'ADN [8]. Si le dommage est mineur, il peut souvent être réparé. Si le dommage est important, il peut induire des mutations entraînant de nombreux troubles et maladies. Plus de 74 000 dommages sont distingués dans l'ADN par cellule et par jour, principalement par oxydation, hydrolyse, alkylation, radiation ou toxicité pouvant directement endommager l'une des 3 milliards de bases contenues dans l'ADN ou créer des ruptures dans le squelette du phosphodiester sur lequel reposent les bases. Des mutations peuvent être dans des gènes qui sont traduits en (protéine). Si ces mutations se font dans les gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire, les cellules peuvent commencer à se développer d'une manière incontrôlable [24]. Les cellules ont donc développé des mécanismes pour réparer Les dommages à l'ADN, mais quand ils cessent de fonctionner efficacement, le nombre de mutations dans le génome augmente et le cancer peut se développer.

III.1.10.1. La tumorigénèse :

L'ADN est continuellement soumis à des agressions. Ces altérations sont soit dues à des facteurs internes (mutations, insertions ou délétions au niveau de la séquence d'ADN), soit dues à des facteurs externes (virus, bactéries, agents chimiques, radiations.) [21]. Néanmoins, la majorité de ces altérations sont réparées grâce au différent système de réparation d'ADN. Mais dans de rares cas, une mutation peut subsister et modifier l'expression des gènes qui contrôlent la prolifération cellulaire, comme les oncogènes ; ces anomalies génétiques peuvent conduire à l'apparition d'un cancer [20].

III.1.10.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est traditionnellement basée en grande partie sur l'interaction de ligands cytotoxiques avec l'ADN. Elle se repose sur le fait d'empêcher les cellules de se reproduire et bloquer la réplication de l'ADN dans le noyau cellulaire. En effet, L'un des composés de la chimiothérapie le plus efficace connu de nos jours est le cisplatine. Cette molécule est cependant assez toxique et entraîne de nombreux effets secondaires. Son mode d'action est assez bien connu : il forme une liaison covalente entre le platine et les bases azotées constituant l'ADN. Ces liaisons

empêchent la réplication de la macromolécule et entraînent la mort cellulaire. Pour limiter les effets indésirables du cisplatine, d'autres composés organométalliques ont été étudiés [1]. Plusieurs de ces composés ont déjà montré une activité anticancéreuse [23].

III.1.11. Interaction petites molécules organométalliques-ADN

Le DNA est la cible pharmacologique de la plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie. Les ligands de petites molécules se lient à l'ADN et altère et/ou inhibe sa fonction. Ces petites molécules réagissent comme médicament quand l'altération ou l'inhibition de la fonction d'ADN permet de traitement ou le control d'une maladie [24].

III.1.11.1. Type d'interaction petite molécule –ADN

Il y a trois différents modes par laquelle un anticancer interagit avec l'ADN.

- 1- A travers le control des facteurs de la transcription et les polymérase.
- 2- A travers de la liaison ARN-ADNdb pour former une structure d'un acide nucléique triple brins ou RNA hybridé (liaison spécifique à la séquence aux hybrides ADN-ARN formant un simple brin d'ADN exposés qui peuvent interférer avec l'activité de transcription
- 3- A travers la liaison d'un ligand de petite molécule avec l'ADN par interaction électrostatique, intercalation entre les paires de base et interaction avec le petit et le grand sillon [18,19].

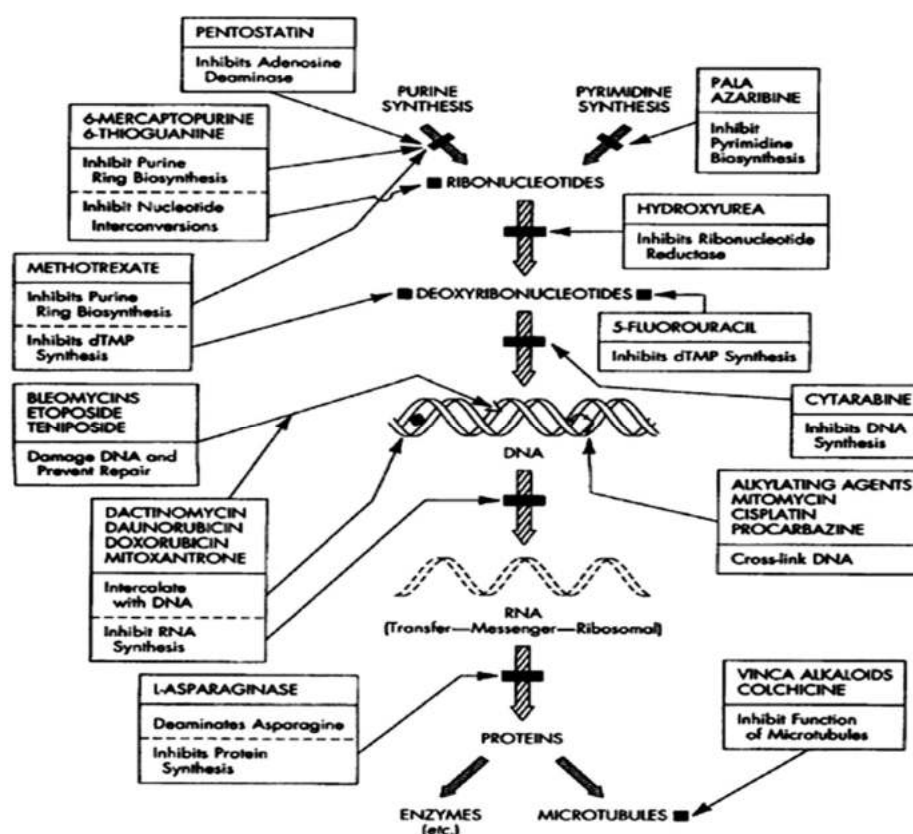


Figure III.10 : Résumé du mécanisme d'action des anticancéreux.

III.1.11.2. Mode de liaison petite molécule –ADN

Le ligand interagissant avec l'ADN est doté d'un effet cytotoxique quand des dommages sur l'ADN interviennent suite à sa liaison à la double hélice. Le mode d'action de certains médicaments pour le traitement du cancer devrait donc être soigneusement étudié. Les petites molécules interagissant avec l'ADN peuvent être classées en deux grandes catégories pratiques en fonction de leur mode d'interaction : liaison non covalente et liaison covalente. Il y a des subdivisions à l'intérieur de chaque classe, qui se chevauchent fréquemment : une interaction électrostatique avec le phosphate anionique de squelette de l'ADN, l'intercalation dans les poches empilées de paires de bases d'ADN, d'interaction hydrophobe le long des sillons de l'ADN [07] liaison externe et liaison d'alkylants [19].

a-Mode de liaison covalent

Beaucoup des agents anticancéreux utilisés en clinique lient l'ADN à travers l'interaction covalente tel que l'alkylation ou l'interaction inter et intra brin. Ce mode de liaison est irréversible

et provoque une distorsion de squelette de l'ADN ou il peut affecter la transcription et la réplication et la mort cellulaire. L'alkylation est un procédé dans lequel un ou plusieurs groupes alkyle (C_nH_{2n+1}) sont ajoutés ou substitués à un atome hydrogène dans un composé. La formation d'une liaison covalente entre un site nucléophile d'une base purique ou pyrimidique (le plus souvent l'azote en 7 de la guanine) et l'alkylant électrophile, induit une inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN, parmi les principaux alkylants, se trouvent, le cisplatine [20].

b- Mode de liaison non covalente

L'interaction non covalente des petites molécules avec l'ADN est réversible se fait par la liaison au sillon de l'ADN et par les intercalateurs, sont généralement considéré moins toxique que les alkylants. Bien que l'impact de la liaison non covalente sur le plan moléculaire et biochimique soit pas bien caractérisé. L'effet le plus important inclue le changement de conformations d'ADN, interrompre l'interaction protéine-ADN et permet la rupture des brins d'ADN. Ce mode est de plus classé en trois types : intercalation, liaison au sillon de l'ADN et liaison externe (en dehors de double brin d'ADN) [18,21].

c-Intercalateurs

L'intercalation est l'inclusion réversible d'une molécule entre deux autres molécules qui peut se glisser entre les paires de bases empilées de double hélice par intercalation. Les intercalants sont des hétérocycles aromatiques planes, qui se glissent entre deux plateaux de paires de bases de la double hélice d'ADN, le plus souvent une guanine et une cytosine provoquant ainsi une déformation de l'hélice [9]. L'intercalation déforme géométriquement la double hélice d'ADN ce qui signifie que la traduction du code génétique ne fonctionne pas correctement. Pour qu'un intercalateur s'adapte entre les paires de bases, l'ADN doit ouvrir dynamiquement un espace entre ses paires de base en se déroulant. Le degré de déroulement varie selon l'intercalateur [24]. La famille des anthracyclines, dont le chef de file est la doxorubicine est la plus représentative des agents intercalants.

d-Les ligands du sillon

Les ligands qui se lient au niveau des sillons, comporte les molécules qui se lient de façon réversible et sans intercalation. De nombreuses protéines présentent une spécificité élevée de se lier au grand sillon de l'ADN et de petites molécules préfèrent les petits sillons. Les petites molécules qui se lient au petit sillon ont généralement un cycle aromatique, minces et en forme de croissant pour

s'intégrer stériquement dans le petit sillon étroit. Les ligands du petit sillon sont dotés de plusieurs activités biologiques. La plupart de ces ligands possèdent au moins une charge positive et se lient dans le petit sillon en reconnaissant de façon prédominante les séquences riches en résidus AT [25], elles ont une activité cytotoxique parce qu'elles interfèrent avec la liaison des protéines nécessaires pour la réplication et la transcription de l'ADN [18].

e-Liaison externe

Ce type de liaison est de nature électrostatique. Certains ligands sont également capables de former des interactions d'empilage non spécifiques avec le squelette du phosphate d'ADN. Ce mode se produit habituellement lorsque le ligand s'associe pour former des agrégats qui s'empilent sur le squelette anionique d'ADN afin de réduire la répulsion charge-charge entre les molécules ligand. Certains complexes métalliques interagissent également avec l'ADN par liaison externe. Liaison de complexes de Ru (II) de charge positive (+2) avec le squelette du sucre phosphate d'ADN qui est chargée négativement. Ce mode d'association a été proposé pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{+2}$ car l'augmentation de la luminescence de ce complexe lors de la liaison à l'ADN dépend fortement de la force ionique. Les cations comme Mg^{+} , interagissent généralement aussi de cette façon [7,18].

III.2. La BSA et la pharmacocinétique des anticancéreux

III.2.1. Introduction

L'albumine sérique humaine (HSA) est le principal vecteur des molécules exogènes et endogènes dans le plasma humain [27]. La compréhension et la caractérisation de l'interaction des médicaments avec l'HSA ont suscité d'énormes intérêts de recherche depuis des décennies [28]. À ce jour, de nombreux médicaments anticancéreux puissants à base de métaux ont été mis au point et de nombreux systèmes d'administration de médicaments ont été exploités pour améliorer le ciblage et réduire les effets secondaires des médicaments anticancéreux dont l'action repose sur leur affinité pour l'albumine sérique [33]. La fixation des médicaments aux HSA influence fortement leur comportement pharmacocinétique et contribue de manière significative à la découverte de nouveaux candidats-médicaments [28]. En effet, l'interaction des petites molécules avec l'albumine bovine sérique est un aspect important du développement des médicaments. Albumines sériques augmentent la solubilité des ligands hydrophobes dans le plasma, modulent leur libération en agissent comme réservoir de médicaments et affectent la biodisponibilité. Une vue d'ensemble de l'HSA et de l'interaction entre les ligands anticancéreux

est le besoin du moment, car ces médicaments représentent plus de la moitié de la consommation totale de médicaments dans le monde [35]. Le présent travail donne non seulement un bref aperçu des propriétés de la BSA (similaire de HSA), mais aussi un aperçu des caractérisations de liaison et de pouvoir anticancéreuses des composé ferrocéniques qui peuvent guider la conception et le développement rationnels des médicaments à base de métal et des porteurs à base de BSA pour les applications cliniques [30]. En effet, Cet partie permettra de mieux comprendre l'importance de la liaison des composés anticancéreux aux protéines plasmatiques et l'effet de cette liaison sur sa distribution globale et ses activités pharmacologiques [36].

III.2.2. Caractéristiques Générales Des Protéines

III.2.2.1. Structure

Une protéine est un assemblage d'acides aminés liés ensemble par des liaisons peptidiques (liaisons covalentes entre un atome de carbone et un atome d'azote de deux acides aminés) [27]. Les acides aminés ont des propriétés chimiques différentes grâce à leurs chaînes latérales [33]. Certains sont hydrophobes, d'autres hydrophiles ; certains s'ionisent négativement et d'autres positivement ; Certains se repoussent, et d'autres s'attirent et forment des liaisons chimiques plus au moins fortes avec d'autres chaînes. La chaîne d'acides aminés aura donc tendance à se replier sur elle-même pour adopter une structure tridimensionnelle précise [29].

Quatre grands types d'interactions interviennent dans le repliement de la chaîne (Figure III.11) :

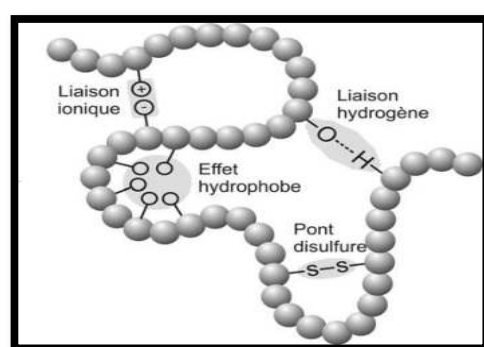


Figure III.11: Représentation d'une chaîne d'acides aminés où sont montrés les différents types d'interaction intervenant dans le repliement de la chaîne latérale [29].

Premièrement La chaîne latérale a tendance à se replier de façon à les regrouper entre eux au centre

de la molécule, sans contact direct avec l'eau par liaison hydrophobe. Inversement, les acides aminés hydrophiles. Deuxièmement, Les chaînes latérales qui s'ionisent positivement forment des liaisons ioniques avec ceux qui s'ionisent négativement. Troisièmement, ce sont des liaisons chimiques faibles (ou ponts hydrogène) qui relient les molécules, et qui impliquent un atome d'hydrogène. En fin, Les ponts disulfures se font entre la chaîne latérale des AA contenant un atome de soufre. C'est le cas de la cystéine. Deux cystéines peuvent former une liaison covalente entre elles [28, 31].

La structure d'une protéine est gouvernée par Les propriétés des acides aminés (charge, hydrophobicité.) elle est décrite en termes de quatre niveaux.

- **La structure primaire**, est une séquence linéaire des acides aminés dans la protéine.
- **La structure secondaire**, les groupes d'acides aminés sont organisés en éléments structuraux simples : hélices alpha, feuillets et tours beta.
- **La structure tertiaire**, c'est le repliement de la protéine dans l'espace tridimensionnel par l'organisation des éléments de structure secondaire entre eux.
- **La structure quaternaire** c'est la multimérisation par liaisons faibles entre des protéines de structures primaires identiques (homoassociation) ou différentes (hétéroassociation) [29, 34].

III.2.2.2. Dénaturation

Dans certaines conditions, ces liaisons reliant les chaînes latérales peuvent se défaire et alors la protéine perd sa structure tridimensionnelle, sa conformation chimique. La fonction biologique d'une protéine étant intimement liée à sa forme, la protéine modifiée ne peut plus assurer sa fonction elle devient alors dénaturée. En effet, les trois principaux facteurs pouvant provoquer la dénaturation d'une protéine sont : La chaleur, un pH extrême et un milieu très concentré en ions [30].

III.2.3. L'Albumine de Sérum Bovin (BSA)

L'albumine de sérum bovin (BSA en anglais) est une protéine globulaire avec un poids moléculaire de 66,43 kDa (66430 g mol^{-1}). Son point isoélectrique est compris, en solution aqueuse et à 25 °C, entre 4,7 et 4,9. Elle présente une structure primaire en forme de cœur. Sa structure secondaire contient entre 50 et 68% d'hélices α et entre 16 et 18% de feuillets β [27,28,32].

III.2.3.1. Composition et Propriétés Physico-chimiques

L'albumine, dont le nom provient du latin *albus* qui signifie blanc, est la protéine du plasma la plus abondante chez l'homme (HSA) et d'autres mammifères (BSA albumine de Bovine, albumine de cheval, albumine de rat, ...). L'albumine est essentielle pour maintenir la pression colloïdale osmotique requise pour la distribution appropriée des fluides corporels entre les compartiments intravasculaires et les tissus. La BSA est généralement utilisée comme une protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche [32, 33].

La composition en acides aminés de la BSA a été publiée pour la première fois par J. R. Brown en 1975 [38] ensuite une révision de la structure primaire de la BSA a été faite, en 1990, par Hirayama *et al.* [39]. Les résultats obtenus par les deux groupes sont présentés dans le Tableau III.1. À partir de l'assemblage d'acides aminés, il est possible de déduire la composition élémentaire de la protéine, c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre que l'on peut trouver dans chaque molécule de BSA (Tableau III.2).

Tableau III.1 : Composition en acides aminés de la BSA.

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

*Présence de S dans la molécule.

Tableau III.2 : Composition atomique de la BSA

NOMBRE D'ATOMES	C	N	O	S
Brown <i>et al.</i> (1975) [38]	29	77	8	39
	26	9	9	
			7	
Hirayama <i>et al.</i> (1990) [39]	30	84	9	40
	30	1	4	
			7	

III.2.3.2. Structure de la BSA

La molécule de la BSA est constituée de trois domaines pratiquement homologues (I, II, III) ; chaque domaine est consécutivement le produit de deux sous-domaines (IA, IB ...), divisé en neuf boucle (L1-L9) et liés par dix-sept liaisons disulfures ; les boucles de chaque domaine se compose d'un ordre de série formant un triplet (Figure III.12) [38].

L'analyse de la structure cristalline de la BSA indique que l'attache spécifique des ligands par la protéine provient de la présence des accepteurs sélectifs de ligand nommés : Site I et II situé dans les sous-domaines IIA et IIIA [40].

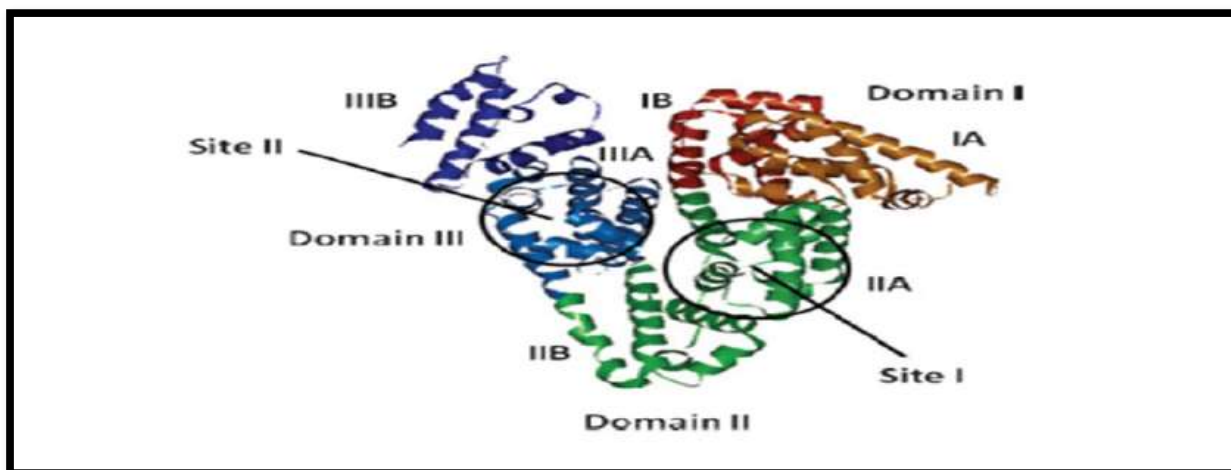


Figure III.12 : Représentation de la structure du BSA indiquant les domaines et les accepteurs.

La structure tertiaire de la BSA n'est toujours pas connue et, en raison de sa similitude avec l'Albumine de Sérum Humain (HSA en anglais) (le pourcentage d'homologie de séquences entre la BSA et la HSA est de 76%, un acide aminé hydrophobe étant remplacé par un autre acide aminé hydrophobe, un acide aminé hydrophile étant remplacé par un autre acide aminé hydrophile de même

charge), les chercheurs supposent que les deux protéines possèdent une structure tridimensionnelle très proche. À ce sujet, des études récentes indiquent qu'il y a des différences parmi certains résidus lysine dans la structure tertiaire de la BSA et de la HSA [43].

III.2.3.3. Fonction :

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma et, en tant que protéine porteuse, elle est responsable du transport d'une variété de composés, y compris les vitamines, les acides gras et les produits pharmaceutiques [37].

III.2.4. Interaction du composé organométallique-BSA

Afin de connaître les effets résultant de l'interaction protéine-ligand, il nous a fallu dans un premier temps sélectionner une protéine dont la structure et les facteurs modifiant sa structure sont déjà bien connus [41]. En effet, la BSA est une protéine qui est souvent utilisée comme protéine modèle pour étudier les interactions protéine-ligand du fait de son faible coût et d'une bonne connaissance de ses propriétés (similaires à celles de l'albumine de sérum humain (HSA)) [42].

Les interactions entre un composé métallique et l'albumine déterminent la distribution globale, l'excrétion et les différences d'activité, de toxicité et d'efficacité [36, 44].

Le cisplatine peut se lier efficacement à l'albumine, car il a une forte affinité pour les acides aminés riches en soufre. Par conséquent, cela conduit à des adduits Pt-méthionine, qui peuvent agir comme un platine réservoir pour la platination ultérieure de l'ADN.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'étudier les interactions entre une protéine modèle, la BSA, et les dérivés ferrocéniques synthétisés au laboratoire.

L'utilisation de méthodes électrochimiques a permis de définir, dans quelles conditions de potentiel la présence de BSA a une influence sur le comportement électrochimique du dérivé ferrocénique (accélération ou inhibition). Des analyses par spectroscopie UV-Vis ont été réalisées afin de savoir si la protéine interagit avec le dérivé ferrocénique ou non. En couplant les résultats électrochimiques et les données spectroscopiques, nous avons tenté de relier un changement de comportement électrochimique induit par la BSA à une éventuelle interaction BSA- composé.

III.3. Partie expérimentale

Le but de ce travail est d'évaluation de l'activité biologique de six dérivés ferrocéniques. Dans cette étude, le choix du composé ainsi que les paramètres suivis sont des points essentiels à discuter. En effet, La base de notre choix pour ce composé c'est pour la contribution à l'amélioration d'un

traitement efficace avec moins d'effet secondaire, nous avons mené à essayer de valoriser ce dérivé ferrocénique à travers l'étude de l'aspect scientifique de l'effet thérapeutique par leur interaction avec l'ADN et la BSA.

Toutes les expériences ont été réalisées au niveau du laboratoire de la Valorisation et Technologie des Ressources Saharienne (VTRS), université Echahid Hamma Lakhdar El oued.

III.3.1.-Instrumentation

Le détail des instruments utilisés pour l'extraction de l'ADN, de l'électrochimie et l'UV-Vis sont présentés ci- dessous :

Instruments utilisés pour l'extraction d'ADN

- La centrifugeuse modèle DLAB [Bouton de réglage de la vitesse de rotation de 0 à 4000 tr/min] a été utilisée pour l'extraction de l'ADN du sang de poulet.
- Balance électrique de type KERN EMB 2200-O Pour la mesure de la masse, a été utilisée.
- Agitateur thermo-programmable, type Heizmodul, Heidolph 1000 instruments Germany
- Vortex modèle VWR
- pH-mètre 210 MeterLAB

Instruments utilisés pour les mesures spectroscopiques UV-Vis

Le UV-Visible (spectrophotomètre UV-1800 Shimadzu), cuve en quartz avec de longueur d'onde de 200-900 nm a été utilisé.

Les mesures UV-Vis ont été effectuées grâce au spectrophotomètre UV-Vis (SHIMADZU 1800) lié à un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel de visualisation et acquisition des données (Logiciel UV probe Spectrum). L'interaction se fait dans des cuves en quartz, l'appareil contient double emplacement des cuves en quartz, une pour le blanc (solution tampon approprié) comme référence et le deuxième pour l'échantillon (le dérivé ferrocénique seul ou avec l'adduit d'ADN), puis les données sont traitées en utilisant le logiciel d'analyses Origin 9.

Instruments utilisés pour les mesures électrochimiques

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

- Une électrode de travail en carbone vitreux surface 3 mm².
- Une électrode de référence Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturée.

- Une électrode auxiliaire (contre électrode) en platine. Diamètre 3 mm².

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

III.3.2- Produits chimiques

- **Les dérivés ferrocéniques étudiés :**

Les composés ferrocéniques utilisés dans ce travail ont été synthétisés au laboratoire. Le ferrocenylméthyle 2 et 3 chloroaniline sont mentionnés dans la littérature [45]. Le sel quaternaire et le Diméthylaminométhylferrocène sont des produits intermédiaires dans la synthèse des dérivés ferrocéniques bien connus. Les structures et les symboles des composés ferrocéniques utilisés dans ce travail sont donnés ci-dessous :

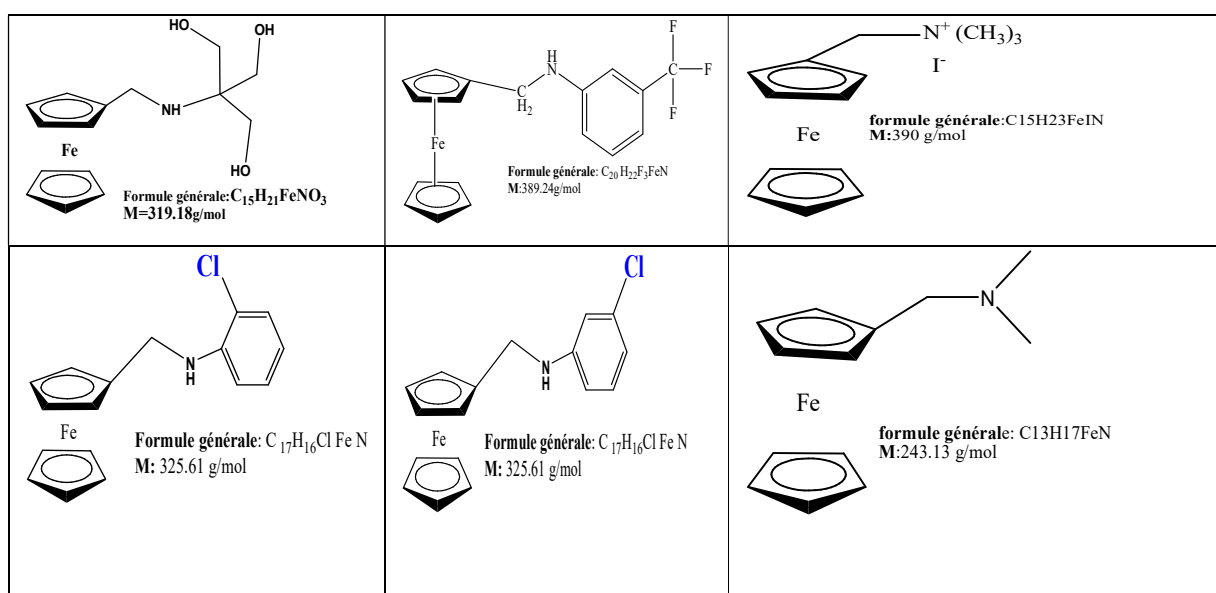


Figure III.13: Les structures chimiques des composés étudiés

- **Les produits chimiques utilisés pour l'extraction d'ADN**

Pour l'extraction de l'ADN du sang, les deux types de tampons de lyse suivants ont été utilisés.

- Tampon de lyse des globules rouges ■ Tampon de lyse des globules blancs

- ✓ Tampon de lyse des globules rouges a été préparé par mélange : EDTA (0.1mM), $NaHCO_3$ (12mM), NH_4Cl (155mM) dans l'eau distillé.

- ✓ Tampon de lyse des globules blanc (tampon a pH8) a été préparé par mélange :
NaCl (50mM), EDTA (100mM), Tris10mM à pH=7.4
- ✓ Isopropanol 99%
- ✓ Ethanol 70%
- Les Produits chimiques utilisés dans les mesures électrochimiques et spectroscopiques UV-Vis comme solvants et électrolytes supports

a) Solvants

- Les mesures électrochimiques sont généralement effectuées soit dans une solution tampon pH7.2 (K_2HPO_4/KH_2PO_4), soit dans un milieu organique DMF ou ACN contenant de l'électrolyte support. Le choix du solvant est important avant tout du point de vue de la solubilité et de l'activité redox de l'analyte.
- Le solvant doit être inerte à l'analyte et à ses produits redox, et ne doit pas subir des réactions électrochimiques sur la gamme de potentiels utilisé.
- Dans le présent travail différents solvants ont été utilisés pour résoudre le problème de la solubilité. Le détail des solvants utilisés est le suivant :

*Eau provenant d'un système Millipore Milli-Q (conductivité 0,1 S cm⁻¹), *DMF (pureté 99,9%) et l'acétonitrile de Sigma-Aldrich.

b) Électrolytes support

- Dans le présent travail de recherche, le tétrabutylammonium hexafluorophosphate de qualité électrochimique (Bu_4NBF_4) ($C_{16}H_{36}BF_4N$) (Sigma ALDRICH, pureté 99%), a été utilisés comme électrolytes supports.

III.3.3 -Procédures de travail

- ✓ Extraction et contrôle de qualité d'ADN
- ✓ Mesures spectroscopique UV-Vis de l'interaction Fc-ADN
- ✓ Mesures électrochimiques par voltamétrie cyclique de l'interaction Fc-ADN

III.3.3.1. Extraction de l'ADN

Dans le présent travail, la méthode de NaCl saturé (salting out) a été utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique du sang de poulet, selon le protocole suivant :

1. 20 mL de sang prélevé sur EDTA congelé a été mis dans un tube Falcon de 50 mL dans une température ambiante afin de le décongeler. 20 mL de tampon de lyse de GR a été ajouté et mélangé par inversion et conservé dans la glace pendant 20min.

2. Centrifugé à 2000 tr/min pendant 15 minutes à température ambiante. J'ai jeté le surnageant (répété cette étape 3 fois) jusqu'à l'obtention de culot blanc dépourvu des globules rouges.
3. Remettre le culot en suspension dans 3 ml de tampon de lyse des GB pour détruire la membrane cellulaire et vortexer pendant 6 min.
4. Digéré pendant une heure et demi à 55°C en ajoutant 150 µL de SDS 20%.
5. Ajout de 1 mL d'une solution saturée (6 M) de chlorure de sodium. Secouer vigoureusement pendant 15 s, centrifugé à 1500 tr/min pendant 10 min.
6. À la partie surnageante, ajouter un volume d'isopropanol (99 % ou 95 %) ou deux d'éthanol et inversé les tubes plusieurs fois pour précipiter l'ADN.
7. L'ADN a été retiré du tube et ensuite placé dans un autre tube propre. La méduse d'ADN est ensuite lavée avec 70 % d'éthanol froid, puis retiré l'éthanol à l'aide d'une micropipette ou la centrifugation rapide.
8. L'ADN est laissé sécher toute la nuit en inversant les tubes sur papier absorbant.
9. On a ajouté de l'eau bidistillée pour dissoudre l'ADN et on le mélange bien sans vortexer.

Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN

La concentration d'ADN db a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide de la méthode coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (exprimé en molarité du nucléotide) selon la loi Beer-Lambert. Le dosage de nos échantillons d'ADN à 260 nm donne des concentrations 8×10^{-5} et $8 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ (figure III.14). La pureté d'ADN (exempt de protéines liées) a été évaluée, le rapport A_{260}/A_{280} était de 1,80-1,90, montrant que l'ADN était suffisamment dépourvu de protéines.

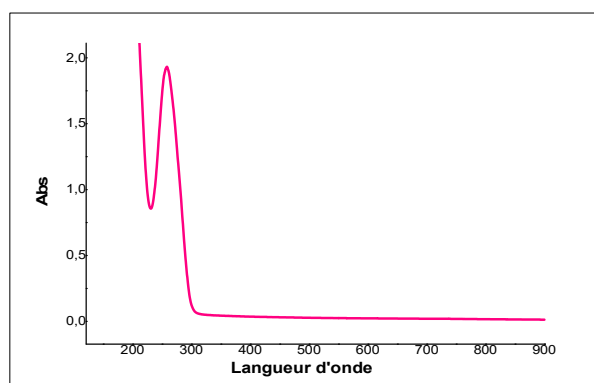


Figure III.14: Spectre d'absorption de l'ADN.

Tableau III.3 : Représentation des résultats des ratios DO_{260}/DO_{280} des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.

Longueur d'onde	DO ADN	
260	1.404	0.281
280	0.793	0.142
Ratio = DO_{260}/DO_{280}	1.77	1.97

III.3.3.2. Mesures spectrophotométriques UV-Vis de l'interaction DF-macromolécule

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec l'ADN, l'absorbance et la longueur d'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition de l'ADN. Ces variations peuvent être utilisées pour la détermination des paramètres de liaison. Il est bien connu dans la littérature scientifique que les techniques spectroscopiques UV-visible sont particulièrement utilisées pour l'étude de l'interaction des dérivés ferrocéniques avec l'ADN ou la BSA en raison de leur couleur intense, ce qui permet des mesures spectroscopiques dans le domaine visible.

Mode opératoire

Les solutions mères des composés ont été préparées dans des solvants appropriés selon leur solubilité.

Dans un premier temps, les spectres des composés ferrocéniques avant l'ajout de l'ADN ont été enregistrés. Ensuite, les spectres ont été enregistrés par addition de différentes concentrations d'ADN. Toute l'expérience a été réalisée en maintenant le volume et la concentration des composés constants tout en faisant varier la teneur de la quantité d'ADN.

Les paramètres étudiés

D'après les résultats expérimentaux, nous pouvons calculer la constante K et ΔG à partir des valeurs de l'absorbance des différents dérivés ferrocéniques en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN. En effet, La constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation (2) de Benesi-Hildebrand suivante [46] :

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

Où A_0 est l'absorbance du composé libre, A l'absorbance de l'adduit, ϵ_0 et ϵ sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire. Dans le cas de l'interaction avec la BSA, $[ADN]$ est changé par $[BSA]$ dans l'équation (III.1)

La constante de liaison est calculée par le rapport pente/interception, du tracé du $A_0/(A - A_0)$ en fonction de $1/[DNA]$. Et en fonction de $1/[BSA]$ dans le cas de BSA

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation (III.2) suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K \text{ (III.2)}$$

Où, R : constante des gaz parfait, T : température en kelvin, K constant de liaison.

III.3.3.3. Mesures électrochimiques par voltamétrie cyclique de l'interaction DF-ADN

Nous avons utilisé un montage électrochimique classique à trois électrodes constituées d'une électrode de travail, d'une contre-électrode et d'une électrode de référence. Avant chaque mesure, la cellule de mesure est nettoyée avec de l'eau de robinet, puis à l'eau distillée et, enfin, séchée à l'acétone.

➤ Mode opératoire

La cellule électrochimique a été préparée par 1mM de chaque dérivé ferrocénique dissout dans 25ml soit de solution tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 0.1 M à pH = 7.2 pour (Fc-Tris, sel quaternaire et DMAMF), ou le DMF pour les composés qui ne se dissolvent pas dans l'eau (Fc-3FMA, Fc-2ClA et Fc-3ClA dans ce cas le sel de fond 0.1M est ajouté dans la cellule.

Après avoir nettoyé la surface de l'électrode de travail en carbone vitreux, il a été immergé dans la cellule avec l'électrode référence et l'auxiliaire. La cellule ensuite est saturée par le N_2 pendant 15min, le courant d'azote est maintenu au-dessus de la solution pendant la durée de l'expérience pour chasser l' O_2 qui se trouve dans la cellule. La fenêtre du potentiel était de -200 à 800 mV avec une vitesse de balayage de 100 mV/s à 500 mV/s. En premier temps les voltamogrammes de dérivés ferrocéniques seuls ont été enregistrés à différentes vitesses, ensuite l'ADN a été ajouté par différentes concentrations et les voltamogrammes sont enregistrés à différentes vitesses de balayage pour chaque concentration d'ADN ajoutée. Même protocole est utilisé pour la BSA.

➤ Paramètres électrochimiques étudiés

• Calcul de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison K et ΔG

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

La diminution du courant de pic anodique de DF par l'addition de différentes concentrations d'ADN a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation (III.3) [47] suivante :

$$\log \frac{1}{[ADN]} = \log K + \log \frac{ip}{ip_0} \quad (\text{III.3})$$

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

La constante de liaison K peut être calculé par l'intersection avec la pente de l'équation de la droite de régression de $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log(I/(I_0-I))$. Même équation utilisée pour l'interaction des DF avec la BSA.

La ΔG peut être calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{III.4})$$

D'où : R constant de gaz parfait ($J.K^{-1}.mol^{-1}$)

T : Température de réaction en Kelvin

K : constant de liaison (mol/l)

- **Coefficient de diffusion**

Afin de calculer les coefficients de diffusion du dérivé ferrocénique et celui de l'adduit DF-ADN, plusieurs voltamogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400 et 500 mV/s en présence et en absence d'ADN.

Pour confirmer davantage l'interaction du dérivé ferrocénique avec l'ADN, le courant des pics anodiques et cathodiques a été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel avant et après l'addition de l'ADN, en utilisant l'équation de Randles-Sevcik [48].

$$i = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (\text{III.5})$$

D'où

i : intensité de courant en (A)

n : nombre d'électron transmis lors de l'oxydation

A : surface d'électrode de travail (cm^2)

C : concentration de produit électriquement activé

D : coefficient de diffusion (cm^2/s)

V : vitesse de balayage (mV/s)

R : constant des gaz parfaits

T : température en kelvin

Les coefficients de diffusion du DF et de l'adduit DF-ADN ont été déterminés en utilisant l'équation ci-dessus et en traçant la droite de régression de l'intensité du courant en fonction de la racine carré de la vitesse de balayage.

- **Détermination du rapport des constants de liaison**

Le mode d'interaction DF-ADN peut être évalué à partir de la variation du potentiel formel. En général, le décalage anodique du potentiel formel (déplacement vers les valeurs les plus positives) est causé par l'intercalation du composé étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN [49], bien que le décalage cathodique (déplacement vers les valeurs les plus négatives) soit causé par l'interaction électrostatique du composé cationique étudié avec le phosphate anionique du squelette de l'ADN [50].

Ainsi, le déplacement positive du potentiel de pic (décalage anodique) dans le comportement de CV de dérivés Ferrocénique par l'ajout de l'ADN peut être attribué à la l'intercalation de dérivé étudié avec la structure de la double hélice de l'ADN. Le déplacement de potentiel de pic vers les valeurs les plus positive indique en outre que l'anion Fe (III) du dérivé ferrocénique est plus facile de s'oxydée en présence d'ADN parce que sa forme réduite est plus fortement liée à l'ADN que sa forme oxydée. Pour un tel système, où les deux formes de dérivé ferrocénique réagissent avec l'ADN, le schéma III.15 ci-dessous peut être appliqué.

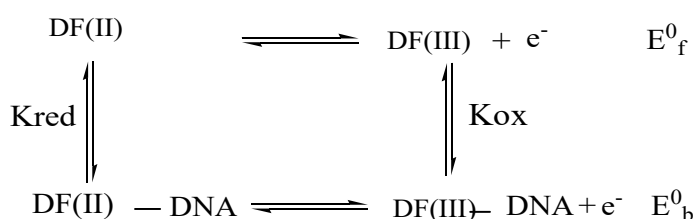


Figure III.15 : Chemins réactionnels des réactions électrochimiques de DF libre et celui lié à l'ADN

L'explication de ce chemin réactionnel se repose sur l'équation de Nernst suivante :

$$E_b^0 - E_f^0 = 0.059 \log \frac{K_{red}}{K_{ox}} \quad (\text{III.6})$$

Avec E_n est le potentiel redox de la forme DF non liée à l'ADN, E_n^0 est son potentiel redox standard, DF(III) et DF(II) sont respectivement les concentrations de la forme oxydée et réduite du dérivé ferrocénique non lié à l'ADN, K_{ox} et K_{red} sont respectivement leurs constantes de liaison.

- **Taille des sites de liaison**

La taille des sites de liaison (S) du DF avec l'ADN peut être déterminée à partir les données électrochimiques en utilisant de l'équation suivant [49]

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{s} \quad (\text{III.7})$$

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

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

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{K[\text{ADN}]}{2s} \quad (\text{III.8})$$

Le rapport des concentrations C_l / C_n est déterminé à partir de l'équation ci-dessous :

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{i_0 - i}{i} \quad (\text{III.9})$$

Le tracé de l'équation 8 donne une ligne droite, la partie de droite de l'équation (9) est obtenue directement à partir des résultats expérimentaux des valeurs du courants des pics, donc on peut exprimer la portion C_l/C_n par la concentration totale de l'ADN sur la concentration du composé étudié.

La taille du site de liaison déterminée à partir de la pente de la droite obtenue, en mettant :

$$\frac{K}{2s} = \text{pente}$$

III.4. Résultats et discussion

Dans ce travail nous allons présenter les résultats d'interaction des dérivés ferrocéniques étudiés avec l'ADN et aussi avec la BSA, en déterminant les constants ainsi que l'énergie libre de liaison entre les dérivés étudiés par deux méthodes : une méthode électrochimique basé sur la voltamétrie cyclique et une méthode spectroscopique basé sur l'analyse spectrale UV-Vis, nous allons aussi déterminer quelques paramètres thermodynamique et dynamiques par la méthode électrochimique.

Nous allons présenter dans cette partie seulement les résultats de Fc –Tris, et les restes des résultats seront présentés en annexe pour éviter la répétition vu qu'ils se ressemblent tous et ont même comportement électrochimique et spectroscopique.

III.4.1. Interaction DF-ADN

L'ADN est le moteur essentiel du cycle cellulaire, il est donc la cible thérapeutique rationnelle des anticancéreux. Au cours des dernières années, une nouvelle classe d'anticancéreux organométallique a été mise au point et testée de façon approfondie par rapport à cette cible.

III.4.1.1. Etude de l'Interaction Fc-tris-ADN par méthode spectroscopique

Les résultats des constantes de liaison K et des énergies libres de liaison ΔG de l'adduit FcTris-ADN ont été déterminés par l'étude de la variation d'absorbance de dérivé ferrocénique en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN. Cette étude du comportement spectroscopique a été réalisée par la technique de la spectroscopie UV-Visible dans une solution tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1M à pH = 7.2, la gamme des longueurs d'ondes balayée était de 350 à 600 nm.

Le spectre électronique de dérivé ferrocénique révèle que quel que soit la portion d'ADN ajoutée, il y a toujours une diminution de l'absorbance fig. (III.15).

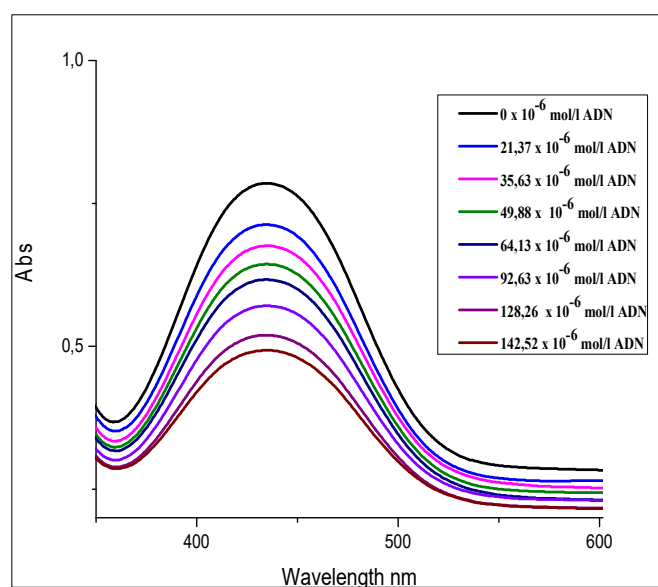


Figure III.16 : Spectre d'absorption UV-Vis de FcTris (4 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2.

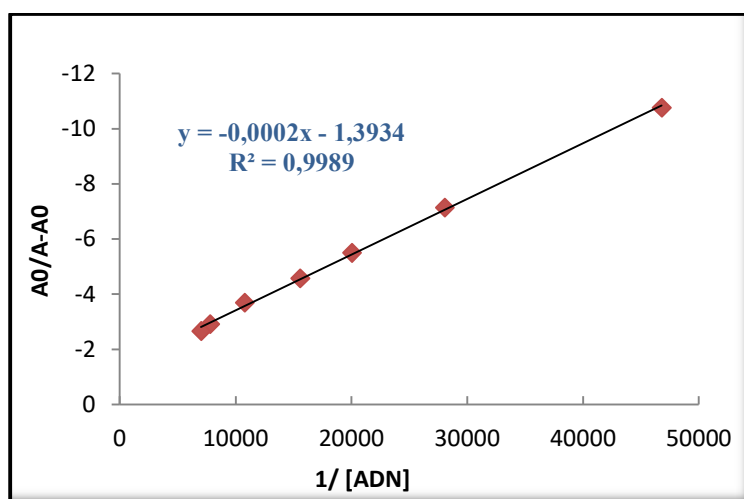


Figure III.17 : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN.

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

Tableau III.4 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Fc-Tris obtenu à partir des données spectroscopique UV-Vis.

$1/[ADN]$ mol/l	$A_0/A-A_0$	$K (mol^{-1})$	$\Delta G (KJ.mol^{-1})$
46794,571	-10,767	6.97×10^3	-21.90
28066,236	-7,145		
20048,115	-5,496		
15593,326	-4,569		
10795,638	-3,690		
7796,663	-2,911		
7016,559	-2,664		

La variation des valeurs d'absorbance en fonction de l'augmentation de la quantité d'ADN a été utilisées pour calculer la constante de liaison et l'énergie libre de Gibbs de Fc-tris-ADN.

La valeur de l'énergie libre a conclu que la Fc-tris interagissait avec l'ADN par mode d'intercalation, ce qui est bien soutenu par la littérature disponible pour des composés similaires [48, 51.53]. Il est également indiqué que l'interaction avec l'ADN par intercalation a été stabilisé par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène [52]. Par conséquent, les composés organométalliques ont révélé une affinité de liaison plus forte envers la double hélice de l'ADN.

III.4.1.2. Etude de l'interaction FcTris-ADN par méthode électrochimique (par la voltamétrie cyclique)

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

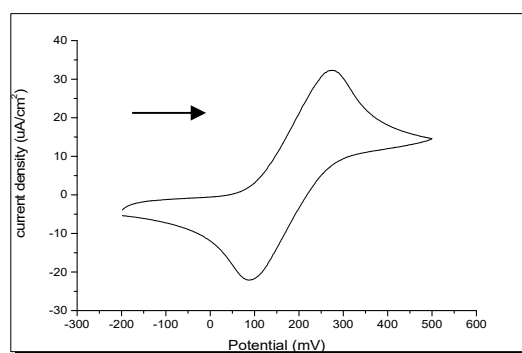


Figure III.18 : Voltamogrammes cycliques de Fc-Tris (2mM) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 à une vitesse de balayage du potentiel de 100 mV/s.

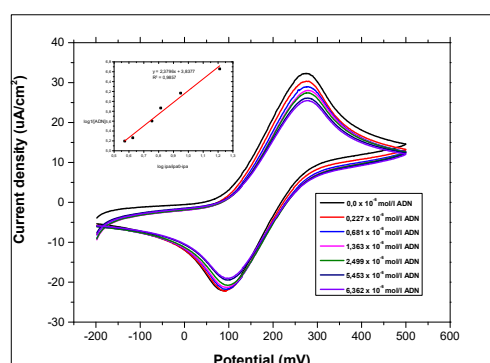


Figure III.19 : Voltamogrammes cyclique de FcTris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. à l'intérieur : Droite de régression du $\log 1/[\text{ADN}]$ en fonction de $\text{Log } I_{pa}/(I_{pa0} - I_{pa})$

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation (III.2). Les voltamogrammes cycliques représentés dans la fig.III.19 montrent que l'addition de l'ADN provoque toujours une diminution de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques ip_a et ip_c accompagné d'un déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques vers les valeurs les plus positives. Ces comportements peuvent être dus à la présence d'une grande quantité d'espèces électroactives à concentration plus élevée. Le système suit également un mécanisme de diffusion contrôlée.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.III.18 sont regroupés dans le tableau III.5 suivants :

Tableau III.5 : Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.III.19.

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

Les valeurs obtenues de constante liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN- FcTris sont regroupées dans le tab.III.6.

Tableau III.6 : Constante et énergie libre de liaison calculés à partir du tracé $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log I_{pa}/(I_{pa0} - I_{pa})$

$\log 1/[ADN]$	$\log ip_a/(ip_{a0}-ip_a)$	Equation	R^2	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
6,657	1,211	$y = 2,3796x + 3,8377$	0,9857	6.881×10^3	-21.90
6,167	0,948				
5,866	0,814				
5,603	0,755				
5,263	0,626				
5,196	0,572				

✓ Détermination du rapport de la constante des liaisons

Pour déterminer le rapport K_{ox}/K_{red} , des voltamogrammes cycliques de dérivé ferrocénique en absence et en présence de $2.49 \mu M$ d'ADN ont été obtenus fig.III.19.

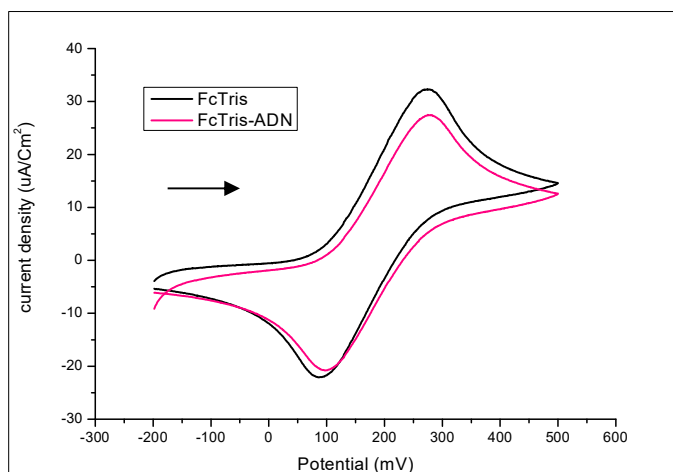


Figure III.20 : Voltamogrammes cycliques de Fc-Tris (2mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence de 2.49 μM d'ADN (ligne rose) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2.

Les valeurs de déplacement du potentiel des pics anodiques et cathodiques et la baisse de leurs courants, ainsi que le rapport des constantes de liaison sont tabulées dans le tab.III.7.

Tableau III.7 : Données électrochimiques de la forme libre de FcTris et celui de l'adduit FcTris-ADN

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

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

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

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

La variation de valeur du potentiel formel ΔE^0 calculé à partir de la relation (III.9) ainsi que le pourcentage de la baisse de la densité du courant anodique $\% \Delta i p_a$ est calculé à partir de relation (III.10) sont représenté dans le tab.III.8.

$$\Delta E^0 = E_n^0 - E_l^0 = E^0(FcTris) - E^0(FcTris - ADN) \quad (III.9)$$

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

Tableau III.8 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.

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

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

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

✓ Coefficient de diffusion

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

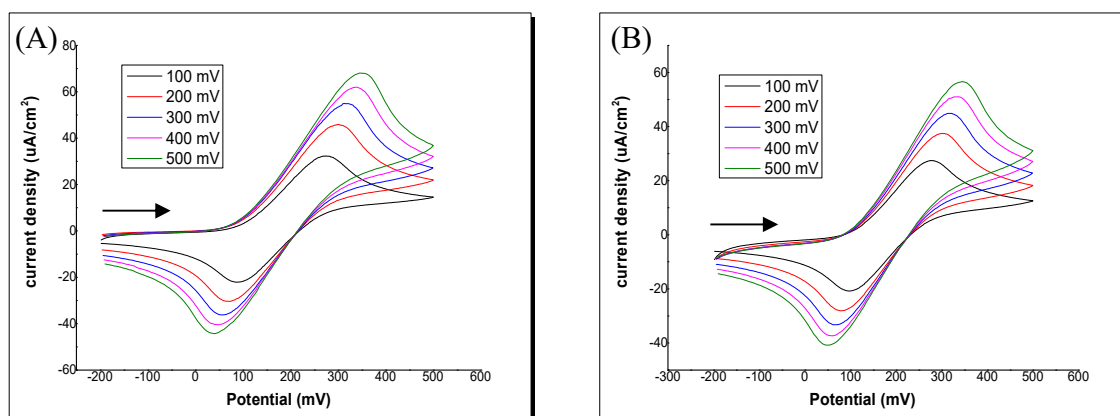


Figure III.21 : Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN.

D'autre part nous remarquons qu'à différente vitesse de balayage le courant à la fois cathodique et anodique augmente linéairement avec l'augmentation de la vitesse. La position du pic cathodique légèrement décalé vers le potentiel négatif et le pic anodique peu décalé vers le sens positif de la vitesse de balayage (Figure III.20), ceci peut être dû, au fait que la réaction de transfert électronique est suivie par une réaction chimique.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la fig.III.20, ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le tab.III.9.

Tableau III.9 : Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.

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

Les coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN ont été déterminés en utilisant l'équation (III.11) de Randles-Sevcik .

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

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

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

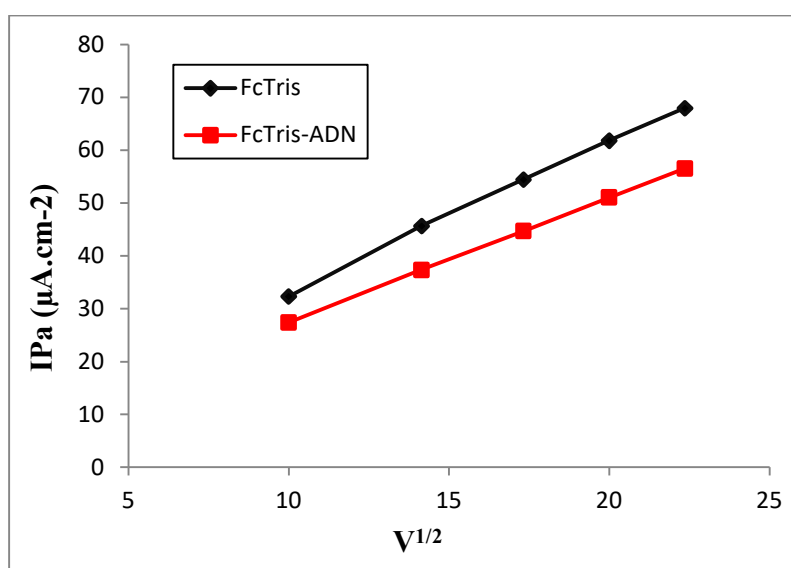


Figure III.22 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.

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

Tableau III.10 : Coefficients de diffusion de FcTris et de l'adduit FcTris-ADN

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

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

✓ Taille de site de liaison

La taille des sites de liaison S de dérivé ferrocénique avec l'ADN peut être déterminée à partir des données électrochimiques en utilisant de l'équation (III.12) [53] suivant :

$$\frac{Cl}{Cn} = \frac{K[\text{paires de bases libres}]}{S} \quad (\text{III.12})$$

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

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

$$\frac{Cl}{Cn} = \frac{K[\text{ADN}]}{2S} \quad (\text{III.13})$$

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

$$\frac{Cl}{Cn} = \frac{i_0 - i}{i} \quad (\text{III.14})$$

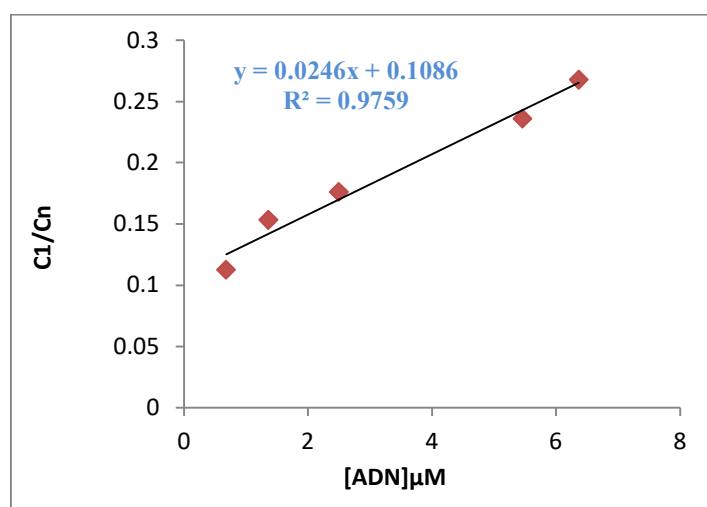


Figure III.23 : Tracé de Cl/Cn en fonction de $[\text{ADN}]$

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

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

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

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

III.4.1.3. Comparaison des constantes de liaison (mol^{-1}) et énergies libres de liaison (KJ.

Tableau III.12 : Comparaison des constantes (mol^{-1}) et des énergies libres de liaison (KJ.mol^{-1}) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique

		$\Delta G (\text{KJ.mol}^{-1})$	K (mol^{-1})
FM3FMA	UV-Vis	-25,00	28400
	CV	-25,80	33113,11
DMAMF	UV-Vis	-24,4	$1,85 \times 10^4$
	CV	-23,806	$1,1479 \times 10^4$
Sel	UV-Vis	-21,5	$5,94 \times 10^3$
	CV	-23,6350007	13803,84265
FM2Cla	UV-Vis	-2.18E+01	6.60E+03
	CV	-24.7767882	21877.61624
FM3Cla	UV-Vis	-2.54E+01	2.83E+04
	CV	-25.1136155	25061.09253

III.4.2. Interaction DF-BSA

Les sérumalbumines bovines (BSA) sont les protéines les plus étudiées en raison de leur teneur en capacité de transporter une variété de fragments endogènes et exogènes tels que les stéroïdes, les drogues, les médicaments, molécules, métabolites, etc. La BSA augmente la solubilité des médicaments dans le plasma et dans l'eau et module leur distribution aux cellules, habituellement elle est choisie pour des études de l'interaction d'un composé bioactif avec les protéines. Il est parfois très important afin d'acquérir des connaissances fondamentales sur le mécanisme de liaison et de comprendre le rôle des protéines et processus de transport d'un composé médicamenteux. Par conséquent, pour comprendre les activités de liaison protéique des composés ferrocéniques, la BSA a été utilisée comme une protéine modèle en règle générale.

Dans la présente étude, on s'est penché sur la compréhension du phénomène d'interaction entre nos dérivés ferrocéniques synthétisés et la BSA.

L'interaction de la BSA avec les composés synthétisés a été étudiée par spectroscopie UV-Vis et la voltamétrie cyclique à température ambiante. Une solution mère préparée de la BSA (1 μ M) a été ajoutée à différentes concentrations dans une solution contenant une dose fixe du produit à étudier (0.001M). Les spectres UV-Vis et les voltamogrammes ont été enregistrés puis interprétés. L'expérience d'interaction a été réalisée en conservant la concentration de dérivés synthétisés tout en variant les concentrations de la BSA. L'enregistrement des spectres UV-Vis, et les voltamogrammes se fait après chaque ajout d'une concentration de BSA à la solution de ferrocène. La solution de BSA a été préparée fraîchement avant d'être utilisée.

III.4.2.1. Etude de l'interaction Fc-Tris-BSA par méthode spectroscopiques UV-Vis

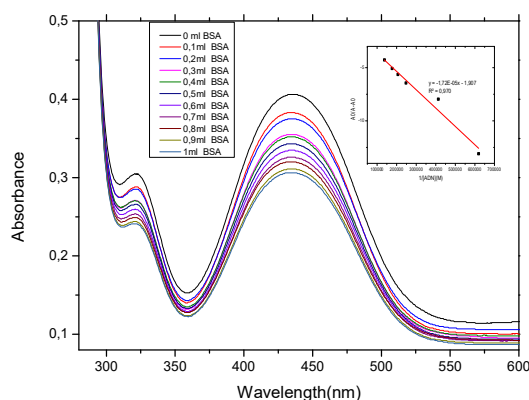


Figure III 24 : Spectre d'absorption UV-Vis de Fc-tris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'BSA dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2. à l'intérieur Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de BSA.

Tableau III.13 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction BSA-Fc-tris obtenu à partir des données spectroscopique UV-Vis.

[BSA] (mol/l)	1/[BSA]	$A_0/A - A_0$	K (L.mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
7,30645E-07	1368653,42	-16,91666667	3,82E+04	-2,62E+01
1,41563E-06	706401,766	-13,09677419		
2,05909E-06	485651,2141	-7,960784314		
3,23571E-06	309050,7726	-6,444444444		
0,000003775	264900,6623	-5,638888889		
4,28514E-06	233364,8691	-5,075		
5,22692E-06	191317,145	-4,273684211		

Les intensités du spectre des dérivés synthétisés montrent une tendance à la baisse remarquable avec l'augmentation de la concentration de BSA qui peuvent être rationalisés en des termes d'interaction forte entre les composés ferrocéniques et la BSA et pourrait provoquer des

changements conformationnels dans la structure des protéines, entraînant des changements dans le tryptophane environnement de BSA [54]. Ce résultat suggère une interaction certaine entre le composé ferrocénique et la protéine BSA. Les données indiquent que l'interaction des composés ferrocéniques avec la BSA sont en mode statique.

Les protéines peuvent interagir avec les molécules en utilisant des liaisons Van der Waals, électrostatique, les interactions de liaison hydrophobe et hydrogène. L'effet observé indique qu'il ya certaines interactions entre les composés synthétisés et les protéines [55, 56, 57].

III.4.2.2. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique de Fc-Tris- BSA

✓ Constante et énergie libre de l'interaction

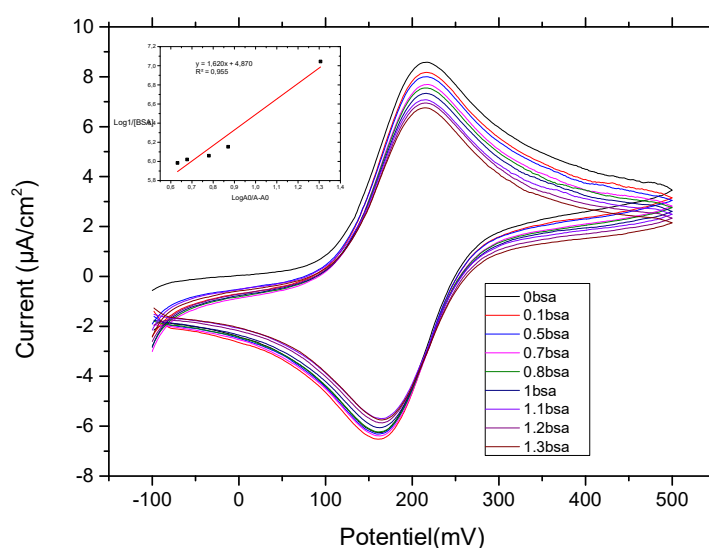


Figure III.25 : Voltamogrammes cyclique de Fc-tris (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon à pH 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. à l'intérieur : : Droite de régression du $\log I/[BSA]$ en fonction de $\log I_{pa} / (I_{pa0} - I_{pa})$

Tableau III.14: Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig.III.25.

[BSA]mol/L	EPa(mV)	IPa (μA)
0	215.112	8.578
9,0239E-08	215.112	8,258
4,44118E-07	215.112	8,095
6,16926E-07	213.56	7,797
7,02326E-07	213.56	7,637
8,71154E-07	213.30	7,432
9,54598E-07	213.30	7,16
1,0374E-06	213.30	7,025
1,11958E-06	213.30	6,856

La diminution du courant de pic anodique de dérivé ferrocénique par l'addition de diverses concentrations d'BSA a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation (4)[58] suivante :

$$\log \frac{I}{[BSA]} = \log K + \log \frac{I_{pa}}{I_{pa0} - I_{pa}} \quad (\text{III .15})$$

Les valeurs obtenues de constante liaison et d'énergie libre de l'interaction Fc-tirs-BSA sont regroupées dans le tab.III.14.

Tableau III.15 : Constante et énergie libre de liaison calculés à partir du tracé $\log I/[BSA]$ en fonction de $\log I_{pa} / (I_{pa0} - I_{pa})$

$\log I/[BSA]$	$\log I_{pa}/I_{pa0}-I_{pa}$	Equation	R ²	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
7,044605515	1,306214715	y = 1,620x + 4,870	0,955	74131,024	-27,802525
6,35250197	1,151580745				
6,209766877	0,952907758				
6,153461513	0,870507416				
6,059905142	0,779790541				
6,020179616	0,67708805				
5,984051839	0,631537748				
5,95094419	0,578392234				

✓ Détermination du rapport des constantes de liaison

Pour déterminer le rapport K_{ox}/K_{red} , des voltamogrammes cycliques de sel quaternaire en absence et en présence de BSA ont été obtenus fig.III.26.

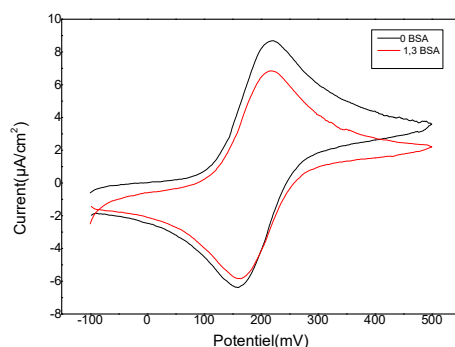


Figure III.26 : Voltamogrammes cycliques de Fc-tris(2mM) en absence de BSA (ligne noire) et en présence de BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon a différent pH 7,2

Tableau III.16 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié

Adduit	(V) ΔE^0	K_{ox} / K_{red}
Fc-tris-BSA	0,001	1,03979842

✓ Coefficient de diffusion

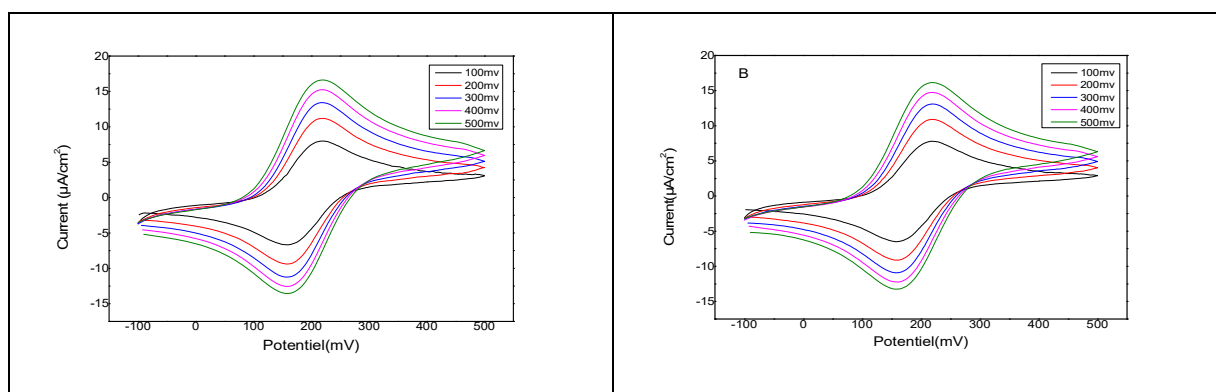


Figure III.27: Voltamogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de BSA.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltamogrammes cycliques de la fig. III.25, ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le tab.III.17.

Tableau III.17 : Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de BSA, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel

V de balayage	Racine de V	I _{pa} (0 μ M)	I _{pa} (0,61 μ M)
100	10	7,968	7,789
200	14,14213562	11,175	10,901
300	17,32050808	13,395	13,086
400	20	15,238	14,724
500	22,36067977	16,583	16,145

Le courant des pics anodiques a été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence et en présence de $0,61 \times 10^{-6}$ mol/l de BSA selon l'équation (III.11)

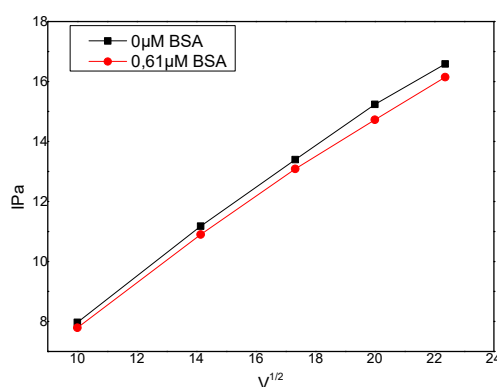


Figure III.28 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de BSA.

Les coefficients de diffusion de Fc-tris et de l'adduit Fc-tris-BSA sont tabulés dans le tableau suivant :

Tableau III.18 : Coefficients de diffusion de FC-tris et de l'adduit Fc-tris-BSA

Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
FC-tris	$y = 0,700x + 1,132$	0,997	4,0069E-08
FC-tris –BSA	$y = 0,675x + 1,206$	0,997	3,7258E-08

III.4.2.3. Comparaison des constantes de liaison (mol⁻¹) et énergies libres de liaison (KJ.

Tableau III.19 : Comparaison des constantes (mol⁻¹) et des énergies libres de liaison (KJ.mol⁻¹) calculées à partir de méthode spectroscopique et électrochimique de l'interaction Fc-BSA

		ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
FM3FMA	UV-Vis	-26.5	4,35E+04
	CV	-27,231	5,8884x10 ⁴
DMAMF	UV-Vis	-25.7	3,12 x10 ⁴
	CV	-26,261	3.9810 x10 ⁴
Sel	UV-Vis	-27	5,30 x10 ⁴
	CV	-29,743	16.2181x10 ⁴
FM2Cla	UV-Vis	-23.2	1.18 x10 ⁴
	CV	-29.800	16.5958 x10 ⁴
FM3Cla	UV-Vis	-26.3	3.97 x10 ⁴
	CV	-26.489	4.3651

III.5. Discussion

Les dérivés à base de ferrocène ont attiré la plus grande attention dans le domaine médical après l'apparition clinique de ferrocifen anticancéreux [59,60]. Le ferrocène s'est avéré être un excellent choix pour concevoir des nouveaux médicaments, probablement à cause de sa petite taille, son aromaticité, son hydrophobicité, sa faible cytotoxicité et son comportement redox. De plus, les dérivés ferrocéniques ont déjà trouvé des applications importantes comme agents anticancéreux [48,51]. La liaison à l'ADN est un prérequis pour un composé à utiliser comme agent antitumoral et leur corrélation avec les acides nucléiques aux effets biologiques a fait l'objet d'un intérêt particulier dans le cancer.

Il est bien établi que de nombreux médicaments anticancéreux organiques et inorganiques interagissent avec l'ADN et neutralisent les effets néfastes du cancer ainsi, leur distribution est facilitée par leur interaction avec la BSA [35, 59]. Diverses techniques sont disponibles pour étudier cette interaction. La spectroscopie UV-visible et la voltamétrie cyclique sont bien établies à cet égard.

L'étude de la variation de l'absorbance de dérivé ferrocénique en absence et en présence d'une concentration croissante d'ADN ou la BSA *par* la méthode spectroscopique, cette variation a permis de déterminer la constante de liaison ainsi que l'énergie libre selon l'équation de Benesi-Hildebrand. Les résultats montrent une valeur négative de l'énergie libre de Gibbs ce qui indique la spontanéité de la réaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN et la BSA par interaction physique de type électrostatique [60, 61, 62].

En général, quand une petite molécule interagit avec l'ADN et forme un complexe, les changements d'absorbance (effet hypochrome) se produisent. Généralement, lorsque les molécules se lient à l'ADN par une forte interaction : l'intercalation [7, 18].

Il est bien connu que le résidu de tryptophane (Trp) de la BSA est principalement responsable de son absorbance et que les altérations de la BSA reflètent les transformations qui se sont produites à proximité de microenvironnement du résidu de Trp. L'addition de la BSA induit une diminution de l'absorbance, ce qui suggère que le résidu d'acide aminé Trp se trouvait dans une région plus environnement hydrophobe [63]. Sachant qu'une liaison faible permet des concentrations plus élevées de médicament dans le plasma, et conduit ensuite à une courte durée de vie. Ou d'une mauvaise distribution du médicament, tandis qu'une forte liaison produit une diminution dans le plasma améliorant la distribution et l'effet pharmacologique de composé [68] indique qu'il existe un site de liaison de haute affinité entre les composés ferrocéniques et la BSA à différentes concentrations. Ces données ont montré que les dérivés ferrocéniques synthétisés pourraient être distribués et transportés *in vivo*.

L'étude électrochimique par la voltamétrie cyclique de l'interaction de Fc-tris et l'ADN ainsi que la BSA se repose sur la variation de l'intensité du courant et de potentiel de pic anodique et cathodique en présences des doses augmentés des macromolécules, une diminution de courant de pic anodique est marqué et les changements de potentiels de pic à de valeurs positives sont observés cette variation nous a permis de déterminer plusieurs paramètres électrochimiques comme : K , ΔG , D , k_{ox}/K_{red} et S qui nous indique des informations sur le type d'interaction entre Fc-macromolécule. Cependant, les résultats obtenus montrent que la valeur de l'énergie libre est

négative et moins de 30 KJ/mol, Il semble que cette diminution du courant de pic est provoquée par l'intercalation de FC-tris à la masse d'ADN [47], ce qui confirme que l'interaction de dérivé ferrocénique avec l'ADN et la BSA se fait spontanément par interaction physique. Cela signifie ainsi que ces composés ont une activité anti prolifératives antimutagènes.

Nos résultats montrent que la forme réduite de dérivé ferrocénique réagit plus quantitativement que celle de la forme oxydée traduit par la valeur du rapport K_{ox} / K_{red} .

D'ailleurs, la valeur de coefficient de diffusion a été déterminer selon l'équation de Randles-Sevcik, nous avons observé que la valeur de D de composé libre est plus élevée que le composé ferrocénique lié à la macromolécule cela est due à la formation d'adduits Fc-tris-macromolécule qui deviennent lourd. Généralement les molécules à grande masse moléculaires ont un faible coefficient de diffusion c'est-à-dire se diffusent lentement à la surface de l'électrode [64]. Ces résultats suggèrent que la réaction d'oxydoréduction est cinétiquement contrôlée par l'étape de diffusion. Nos résultats est comparable avec les études antérieures [48,53].

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

Références bibliographiques

- [01] Nafees Muhammad and Zijian Guo (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents *Chemical Biology* 2014, 19:144–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.003>
- [02] Muhammad Zaheera, Afzal Shaha, Zareen Akhtera*, Rumana Qureshia, Bushra Mirzab, Misbah Tauseef b and Michael Boltec Synthesis, (2011). characterization, electrochemistry and evaluation of biological activities of some ferrocenyl Schiff bases. *Appl. Organometal. Chem.* 25, 61–69
- [03] Sara Realista, Susana Quintal, Paulo N. Martinho, Ana I. Melato, Adrià Gil, Teresa Esteves, Maria De Deus Carvalho, Liliana P. Ferreira, Pedro D. Vaz & Maria José Calhorda (2016): Electrochemical studies and potential anticancer activity in ferrocene derivatives, *Journal of Coordination Chemistry*, DOI: 10.1080/00958972.2016.1257125
- [04] S. V, K. Ayyavoo and P. Rajakumar, (2017). Synthesis, characterization, optical, electrochemical properties and antifungal, anticancer activities of ferrocenyl conjugated novel dendrimers. *New J. Chem.* DOI: 10.1039/C6NJ01120A
- [05] Pier Giovanni Baraldi, Andrea Bovero, Francesca Fruttarolo, Delia Preti, Mojgan Aghazadeh Tabrizi, Maria Giovanna Pavani, Romeo Romagnoli (2000) DNA Minor Groove Binders as Potential Antitumor and Antimicrobial Agents Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara, 44100 Ferrara, Italy DOI 10.1002/med.20000
- [06] HURLEY L. H., BOYD F. L. (1988) DNA as target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 402–407
- [07] Muhammad sirajuddin, Saqib Ali, Amin Badshah. (2013) Drug-DNA interactions and their study by UV visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of photochemistry and photo biologie b biology* 124, 1–19.
- [08] Maolin Wang 1,2,3, Yuanyuan Yu 1,2,3, Chao Liang 1,2,3, Aiping Lu 1,2,3, and Ge Zhang 1,2,3, (2017). Review Recent Advances in Developing Small Molecules Targeting Nucleic Acid *International Journal of Molecular Sciences Medicinal Chemistry & Drug Discovery*
- [09] Baguley B.C. (1991) DNA intercalating anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Design* 6, 1–35.
- [10] Lewin, B. (1998). Gènes VI, 6^e édition De Boeck Université, 1288p.
- [11] Chennouf, F. (2011). Thèse de magister, L'influence de la chaleur sur l'ADN, université de Constantine, faculté des sciences exactes, département de physique, 103p.
- [12] Cooper, G-M. (1999). La cellule : Une approche moléculaire, 1^{re} édition américaine De Boeck Université, 706p.
- [13] Amzazi, S. (2006). Les Acides Nucléiques., Élément : Biochimie structurale semestre 3, Université Mohammed V-Agdal, p10.
- [14] Drew H. R., Dickerson R. E. (1981). Structure of B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration. *J. Mol. Biol.* 151, 5535–556
- [15] LOWN J. W. (1995). Design and development of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders. *Drug Development Res.* 34, 145–183
- [16] DREW H. R. (1984) Les doubles hélices d'ADN et les informations génétiques. *Pour la Science* 20–37.
- [17] Swynghedauw, B., Silvestre, J-S. (2008). Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires, 3^{ème} édition, Paris : Dunod, p21–22.
- [18] Afzal S. (2010). Redox Behavior and DNA Binding Studies of Some Electroactive Compounds., Quaid-i-Azam University Islamabad., these du doctorat., p 60–61.
- [19] H. Nasiri, M. Forouzandeh, n M.J. Rasaei, and F. Rahbarizadeh. (2005) . Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent; *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 19:229–232
- [20] Gaelle Lenglet. (2010). Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. Human health and pathology. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. French. <NNT : 2010LIL2S048>. <tel-00703474>
- [21] Baguley B. C. (1982). Non intercalative DNA-binding antitumor compounds. *Mol. Cell Biochem.* 43, 167–181.
- [22] F. A. P. Crisafulli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha (2012). DNA– interaction studied with single molecule stretching experiments *Integr. Biol.*, 4, 568–574 DOI : 10.1039/c2ib00183g
- [23] Meral Gormen (2010). Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocenophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la prostate. *Cancer. Chimie ParisTech, Français.* <Pastel-00600598>
- [24] X. Fu, D. Liu, Y. Lin, W. Hu, Z. Mao and X. Le, (2014). Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions *Dalton Trans.*, DOI: 10.1039/C3DT53577K
- [25] Zunino f, animati f., capranico g. (1995). DNA minor-groove binding drugs. *Curr. Pharm. Design* 1, 83–94.
- [26] Pingyu Zhang, Peter J. Sadler. (2017). Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *Journal of Organometallic Chemistry xxx* 1e10
- [27] D. C. Carter and J. X. Ho, (1994). “Structure of Serum Albumin”, *Advances in Protein. Chemistry*, 45, 153 – 203

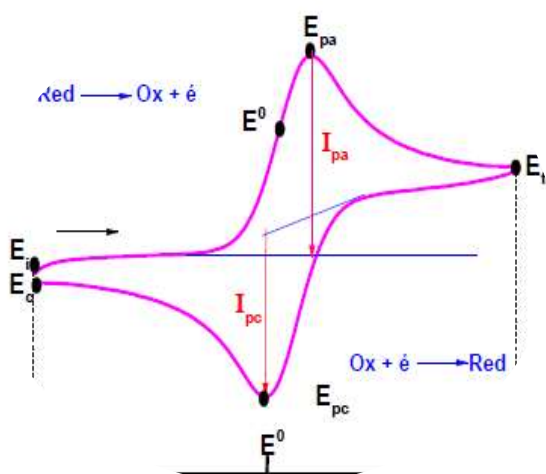
- [28] J. F. Foster, (V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild, Editors). (1977). "Albumin Structure, Function and Uses", Oxford; New York: Pergamon Press, P. 53 – 84
- [29] Luis Iartundo-rojas(2007): influence de l'adsorption de proteine (bsa) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17cr en solution aqueuse, thèse doctorat université pierre et marie curie Paris VI
- [30] M. J. Geisow and G. H Beaven, (1977). "Physical and Binding Properties of Large Fragments of Human Serum Albumin", *Biochemical Journal*, 163; 3. 477 - 484
- [31] M. Y. Khan, (1986). "Direct Evidence for the Involvement of Domain III in the N-F Transition of Bovine Serum Albumin", *Biochemical Journal*, .236; 307 - 310
- [32] J. F. Foster, (1960). "The Plasma Proteins", (F. W. Putnam, Editor) Academic Press, New York. Vol. 1, 179 - 239
- [33] W. F. Harrington, P. Johnson and R. H. Ottewill,(1956). "Bovine Serum Albumin and its Behaviour in Acid Solution", *Biochemical Journal*, 62, 4. 569 - 582
- [34] O. J. Bos, J. F. Labro, M. J. Fischer, J. Wilting and L. H. Janssen, (1989). "The Molecular Mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Human Serum Albumin. Acid/base Titration and Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on a Large Peptic and a Large Tryptic Fragment of Albumin", *Journal of Biological Chemistry*, 264, 2 953 – 959- 174 -
- [35] Nab-Pacitaxel (Abraxane®) (2012). Liaison à l'albumine permettant une pénétration naturelle du taxane dans la cellule tumorale, LIGUE CONTRE LE CANCER.
- [36] Hong Gao, Liandi Lei a, Jiaqin Liu, Qin Kong, Xingguo Chena, Zhide Hua (2004) The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 167 ,213–221
- [37] S. Howard Armstrong, Jr., M.D(1976). Mechanisms of Action of Serum Albumin Therapy in Internal Medicine? *Boston, Massachusetts*
- [38] J. R. Brown, (1975). "Structure of Bovine Serum Albumin", *Fed. Proc.* 34, 591
- [39] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya and Ken-ichi,(1990). "Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum Albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173, 2, 639 - 646
- [40] R. Feng, Y. Konishi and A. W. Bell, (1991). "High Accuracy Molecular Weight Determination and Variation Characterization of Proteins up to 80 ku by Ionspray Mass Spectrometry" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2, 5 ,387-401
- [41] Luciana G. Naso, Luis Lezama, Mar'ia Valcarcel, Clarisa Salado, Patricia Villac'e, Danel Kortazar, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams, (2016). Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium (IV) complex with luteolin, *Journal of Inorganic Biochemistry* (2016), doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.01.021
- [42] Kedroussi Mohammed Ibrahim (2015). L'intérêt de l'utilisation de l'Albumine péri opératoire dans les anastomoses digestives : étude descriptive. These de docotrat en pharmacie , université boubaker belkaid telemcen
- [43] B. X. Huang, H.-Y. Kim and C. Dass, (2004). "Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry", *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 15, 1237 – 1247
- [44] S. Howard Armstrong, Jr., M.D. (2012). Mechanisms of Action of Serum Albumin Therapy in Internal Medicine*Review *Boston, Massachusetts* special section: chemistry and biology 212 current science, vol. 102, NO. 2, 25 January.
- [45] Rahim oum elkhir (2014), Synthèse et etude electrochimique et structurale de quelques N-ferrocényl méthyle anilines substitués Applications à l'inhibition de la corrosion aqueuse, thèses de doctorat en chimie, université Kasdi merbah Ouergla, Algérie
- [46] Touhami Lanez, Hanane Benaicha, Elhafnaoui Lanez & Mokhtar Saidi (2017). Electrochemical, spectroscopic and molecular docking studies of 4-methyl-5-((phenylimino)methyl)-3H- and 5-(4-fluorophenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione interacting with DNA,*Journal of Sulfur Chemistry*, DOI:10.1080/17415993.2017.1391811
- [47] Ataf Ali Altaf, Bhajan Lal, Nasir Khan, Amin Badshah, Shafiq Ullah, and Kamran Akbar. (2016). Spectroscopic, Electrochemical, and *In Silico* Characterization of Complex Formed between 2-Ferrocenylbenzoic Acid and DNA. *Journal of Chemistry*.
- [48] Henni, M. (2017). Synthèse, caractérisation et évaluation in vitro de l'activité biologique et du pouvoir mutagène de quelques N-(ferrocénylméthyl) amino-benzonitrile. Thèse de doctorat. Uniiversiité Echahiid Hamma Lakhdar EL-OUED. 185p.
- [49] Aslanoglu M, Ayne G. (2004). Voltammetric studies of the interaction of quinacrine with DNA. *Anal. Bioanal. Chem*,380(4):658-663.
- [50] LIAW Y. C., Gao Y. G., Robinson H., Van Der Marel G. A., Van Boom J.H., Wang A. H. J. (1989). Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry* 28,9913-9918.v

- [51] Elhafnaoui Lanez, Lazhar Bechki, Touhami Lanez (2019). Computational molecular docking, voltammetric And spectroscopic dna interaction studies of 9*n*-(ferrocenylmethyl)adenine, *Chem. Chem. Technol.*, 2019, Chemistry Vol. 13, No. 1, pp. 11–17 <https://doi.org/10.23939/chcht13.01.011>
- [52] Rangappa Santosh, Ashwini Prabhu, et al. (2019). Design, synthesis, and pharmacology of some oxadiazole and hydroxypyrazoline hybrids bearing thiazoyl scaffold: antiproliferative activity,,molecular docking and DNA binding studies. *Heliyon* 5 e01255. doi: 10.1016/j.heliyon.e01255
- [53] 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. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED. 169p.
- [54] Jaldappa SEETHARAMAPPA And Bhalchandra Purushottam KAMAT (2004). Spectroscopic Studies on the Mode of Interaction of an Anticancer Drug with Bovine Serum Albumin, *Chem. Pharm. Bull.* 52(9) 1053—1057.
- [55] Hong Gaoa, Liandi Lei a, Jiaqin Liu a,b, Qin Kong a, Xingguo Chena, Zhide Hua,(2004). The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 167, 213–221
- [56] P.B. Kandagal a, S. Ashoka a, J. Seetharamappa a, S.M.T. Shaikh a, Y. Jadegoud b, O.B. Ijare b, (2006). Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 393–399
- [57] Disha Sharma 1, Hosakere Doddarevanna Revanasiddappa 1, *, Basappa Chidanda Vasantha Kumar1, Basavegowda Jayalakshmi 2, Nangappagowda Dharmappa Rekha.,(2019). Co(III) and VO(IV) complexes with a new bidentate Schiff base: Interaction with BSA and antimicrobial studies *Volume 9, Issue 1, 2019, 3776 – 3782*, <https://doi.org/10.33263/BRIAC91.776782>
- [58] Qiao Hua Wei a,b,*, Li Jing Han a, Jing Hua Chen a, Fang Nan Xiao a, Shen Liang Zeng a, Guo Nan Chen(2011). Electrochemical behavior of Ru(H₂bpp)₂(PF₆)₂ and its interaction with bovine serum albumin (BSA) a Chinese Chemical Letters 22 (2011) 713–716
- [59] Sasmita Mishra (2017): Synthesis and reactivity of cyclopentadienyl based organometallic compounds and their electrochemical and biological properties, thèse de doctorat National Institute of Technology Rourkela
- [60] Ananya Paul1 and Santanu Bhattacharya1 Chemistry and biology of DNA-binding small Molecules *Integr. Biol.*, 2012, 4, 568–574
- [61] Nezha Boitoe-Haddou (1996). synthèse de dérivés anthraquinoniques. Etude de leurs propriétés physicochimiques, biologiques et d'interaction avec l'adn. Thèse de doctorat, université de LILLE1 doi: 10.1016/j.heliyon.2019. e01255
- [62] Yanjun Shi, Hongyan Liu, Min Xu, Zhenpeng Li, Guoqiang Xie, Liang Huang, Zhengzhi Zeng, (2012). Spectroscopic studies on the interaction between an anticancer drug ampelopsin and bovine serum albumin *Spectrochimica Acta Part A* 87, 251– 257
- [63] Sułkowska, J. Ro'wnicka, B. Bojko, W. Sułkowski, (2003). Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin *Journal of Molecular Structure* 651–653, 133–140.
- [64] Afzal Shah, Rumana Qureshi, Asad M. Khan, Rasheed A Khera and Farzana L. Ansari. (2010). Electrochemical Behavior of 1-Ferrocenyl-3-phenyl-2-propen-1-one on Glassy Carbon Electrode and Evaluation of its Interaction Parameters with DNA *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 21, No. 3, 447–451.
-

Evaluation de l'activité antioxydant des dérivés synthétisés

CHAPITRE

IV



IV. Introduction :

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes [1]. Ces sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres [2]. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire, ils sont nécessaires à des mécanismes vitaux mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des organes en entraînant un stress oxydant qui contribue à la création de différentes maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, etc.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle [3].

IV.1. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, possédant un électron célibataire (ou électron non apparié) sur sa couche périphérique, qui est beaucoup plus réactive que la molécule ou l'atome dont elle est issue. La majorité des espèces radicalaires sont dérivées de l'oxygène, mais certaines peuvent être dérivées du soufre ($RS\bullet$) ou de l'azote ($\bullet NO$) qui possède un électron partagé entre son atome d'azote et son atome d'oxygène [3.4]. En revanche, La majorité des molécules biologiques sont des molécules non radicalaires, toutes les leurs électrons sont appariés [5]. Les espèces non radicalaires sont plus stables que les radicaux en raison de leurs électrons appariés.

Les radicaux peuvent créer divers types de réactions avec d'autres molécules et les uns avec les autres... si réagissent ensemble, ils joignent leurs électrons non appariés par liaison covalente [4]. Tout en cherchant à se stabiliser, les radicaux libres changent leur situation pour s'apparier en donnant ou en prenant des électrons non appariés à une autre molécule ou à partir d'une autre molécule [7]. Quand les radicaux réagissent avec des molécules non radicalaires (prendre ou donner à) des électrons non appariés, ces électrons non radicaux deviendront aussi des radicaux et ce nouveau radical réagira pour former une paire et un autre radical comme celui-ci déclenche une chaîne de réaction des radicaux [2].

IV.1.1. Génération de radicaux libres et d'oxydants

La production de radicaux libres dans l'organisme se fait par deux voies l'un est interne ; il s'agit de sources endogènes, résultant d'une activité biologique normale comme le métabolisme oxydatif, la protection immunitaire et les maladies. Ou être externe, cela signifie

des sources exogènes résultant de l'influence de l'environnement telles que la pollution, la cigarette et les radiations [7,8].

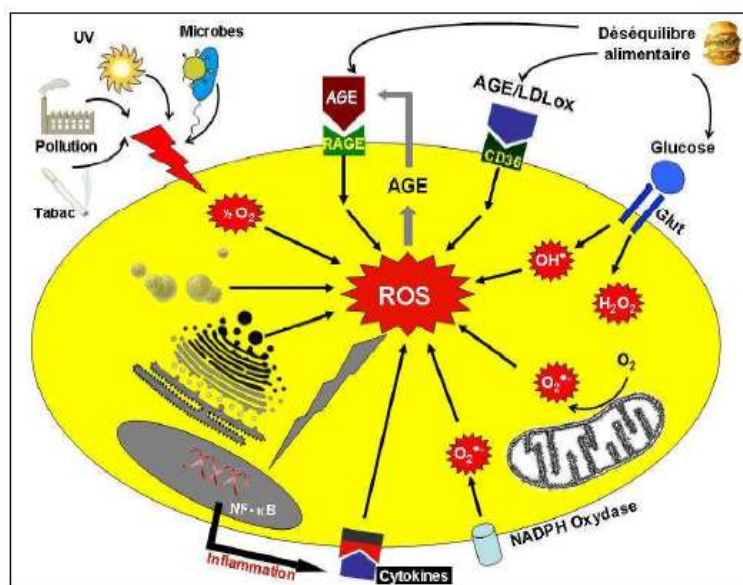


Figure IV.1: Les principales sources de radicaux libres [9].

IV.1.2. Espèces d'oxygène actives et réactives

L'organisme a besoin d'oxygène pour toutes ses fonctions vitales. Mais sa forte concentration dans le corps peut avoir des effets secondaires sur la vie [10].

La réduction du dioxygène qui a une faible réactivité en général, sa réduction produit un type différent d'espèces d'oxygène actif (AOS) comme l'oxygène singulet, l'anion radicalaire superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, etc. ceci est l'un des résultats négatifs et nocifs de l'oxydant sur la fonction physiologique ou ce que l'on appelle le stress oxydant [11].

Les oxydants sont des molécules non radicalaires ayant un pouvoir d'oxydation élevé et plus stables telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet, l'acide hypochloreux, l'acide nitreux (HNO_2), le peroxyde de nitrite, le trioxyde de dinitrogène, le peroxyde lipidique [12].

Les radicaux libres plus réactifs que les oxydants et moins stables qu'eux tels que les hydroxyle ($OH\cdot$), superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), oxyde nitrique ($NO\cdot$), dioxyde d'azote ($NO_2\cdot$), peroxyde ($ROO\cdot$) et peroxyde lipidique ($LOO\cdot$) [4,13]. Les différentes espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir facilement avec les lipides membranaires, les acides nucléiques, les protéines, les enzymes... ces réactions résultant les dommages cellulaires [7].

IV.1.3. Réaction d'oxydation dans le système biologique

Les mitochondries utilisent l'oxygène pour produire de l'ATP, la source d'énergie de l'organisme [3, 7]. Les espèces réactives de l'oxygène sont les radicaux libres formés pendant

le redox cellulaire. Ces espèces sont utiles et nuisibles en même temps, ou si elles sont en faible concentration elles sont utiles pour le système immunitaire et si elles sont en concentration élevée elles sont nuisibles et elles sont la première raison du stress oxydant et causent des dommages significatifs au système cellulaire [3, 14].

La génération des radicaux libres dans l'organisme se produit généralement de différentes manières :

- 1- Résultat du métabolisme aérobie : dans lequel la cellule exploite 90% de l'oxygène dans le système de transport des électrons des mitochondries.
- 2- Un système de défense contre les virus et bactéries : dans lequel résultant de la force oxydante du phagocyte lors de la destruction des virus et bactéries
- 3- Métabolisme du médicament dans lequel ces réactions agissent souvent pour détoxifier les composés toxiques [4, 12, 15, 16]

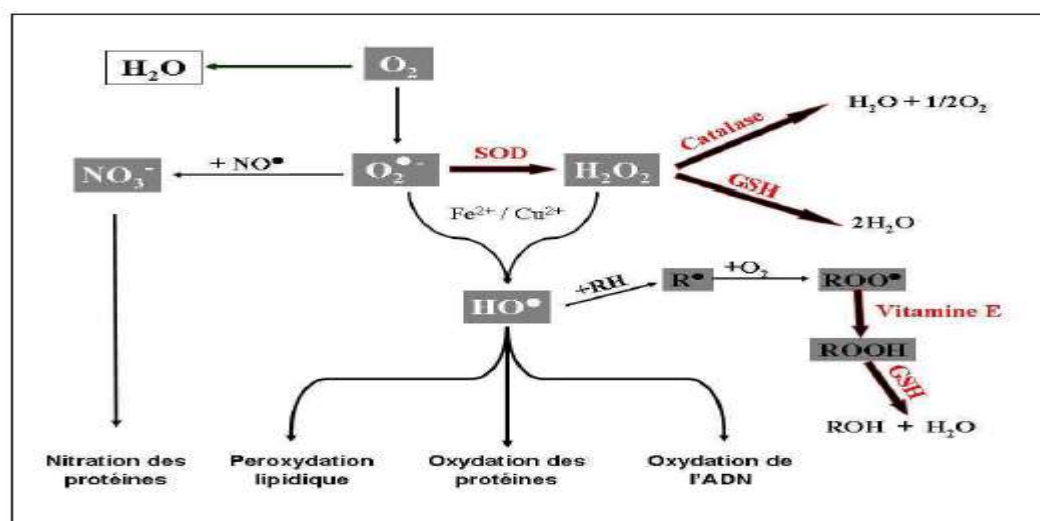


Figure IV.2 : Les principaux radicaux libres et les mécanismes de detoxification.

IV.1.3. Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants: - Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire, - Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : c'est le stress oxydatif [12,13].

IV.1.4. Rôle des radicaux libres chez l'homme

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal. Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NAD(P) H oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines [11].

IV.1.5. Les radicaux libres et leur rôle dans les maladies

Plus d'une centaine de troubles comme la polyarthrite rhumatoïde, le choc hémorragique, les troubles cardiovasculaires, les maladies cardiovasculaires, troubles métaboliques, maladies neurodégénératives, ulcérogènes gastro-intestinale et SIDA ont été signalées comme étant médiées par la ROS (tableau IV.1) [17].

Les dommages cellulaires provoqués par les radicaux libres sont fréquents pendant le vieillissement ; une fois dans cette étape de la vie, les cellules produisent moins d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), etc. [2, 5].

Tableau IV.1: Quelques maladies cause par le radical libre [18]

<i>Diseases</i>	<i>References</i>
Atherosclerosis	(Mitchinson and Ball, 1987)
Autoimmune diseases	(Halliwell and Gutteridge, 1999).
Cancer	(Cerutti, 1994).
Diabetes	(Wolff and Dean, 1987).
Inflammation	(Valentao et al., 2002)
Parkinson's disease	(Halliwell and Gutteridge, 1999).
Rheumatoid arthritis	(Krane et al., 1990)
Alzheimer's disease	(Rao and Balachandran, 2002)
Ageing	(Finkel and Holbrook, 2000)

IV.1.6. Stress oxydant :

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers. Il est le résultat de l'excès de radicaux libres dans le corps [19]. Organisme incapable de résister à la chaîne réactionnelle des radicaux (propagation des radicaux libres), ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles. Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites.

En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer [20].

IV.2. Activité antioxydante

Une substance qui peut arrêter ou inhiber toute réaction d'oxydation d'une autre substance ces réactions capables de générer des radicaux libres qui endommagent les cellules durant leur chaîne de réaction, cette substance appelée antioxydant. Toute la fonction biologique des cellules vivantes dépend du métabolisme oxydatif dans lequel la production d'énergie est l'un des processus les plus importants de l'oxydation cellulaire [21]. Au fur et à mesure que le résultat de ce processus est la production de radicaux libres et de différents types d'oxygène réactif et des espèces azotées qui sont à l'origine des changements oxydatifs. Les antioxydants ont le pouvoir d'arrêter la chaîne de réaction des radicaux en réagissant avec le radical intermédiaire pour être inactif et en inhibant toute la réaction d'oxydation quand ils s'oxydent et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxique de radicaux libres [3].

IV.2.1. Le pouvoir antioxydant

L'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'Évolution.

IV.2.1.1 Protections cellulaires

Un bon antioxydant se devra respecter quelques critères :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+}) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- Être rapidement absorbé.
- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire [14].

IV.2.2. Principaux systèmes de défense antioxydants

Les cellules et tissus de l'organisme sont continuellement menacés par les dommages causés par les radicaux libres. Les espèces réactives de l'oxygène, qui sont produites au cours du métabolisme normal de l'oxygène ou qui sont induite par des dommages exogènes [2]. Les antioxydants peuvent être définie comme "toute substance, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable qui retarde considérablement ou empêche l'oxydation de ce substrat [22].

IV.2.2.1. Système de défense par les antioxydants naturels

IV.2.2.1.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Il existe trois types importants d'antioxydants enzymatiques efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase

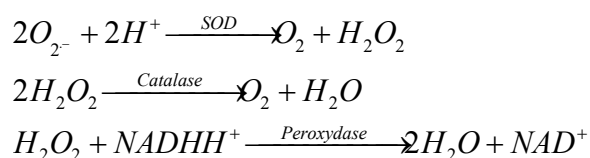


Figure IV.3 : Les principales réactions des Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

a. Superoxyde dismutases (SOD)

C'est la première ligne de défense contre les ROS et c'est un métal lié à une enzyme, Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. Il existait dans tous les organismes aérobies. L'anion métallique peut être du cuivre, du zinc, du manganèse ou du fer. Pour le corps humain, les mitochondries contiennent du superoxyde de manganèse dismutase tandis que le cuivre/zinc superoxyde dismutase existe à l'intérieur et à l'extérieur des cellules du cytosol et de l'ADN, des fluides extracellulaires [23].

b. Catalases

La catalase est une enzyme importante, tétramère qui possède quatre sous-unités identiques, chaque sous-unité se compose de plus de 500 acides aminés (poids moléculaire 60.000) contenant quatre groupes hémiques porphyrine, elle est également considérée comme l'une des plus puissantes unités de défense dans l'organisme qu'il existait dans les différents types de cellules vivantes aérobies à l'exception des globules rouges. La catalase est localisée intracellulairement, en particulier dans les peroxysomes, et agit efficacement dans les cas des concentrations élevées de H₂O₂. Dans les faibles concentrations, c'est principalement la forme réduite de glutathion (GSH) qui transforme le peroxyde d'hydrogène [24]. L'activité de la catalase est significativement réduite dans les tumeurs du foie et d'autres organes, ainsi que

dans une variété de pathologies. La catalase est l'une des enzymes les plus efficaces connues en raison de son mouvement de rotation élevé. D'ailleurs, une molécule de catalase peut rejeter des millions d'oxygène et d'eau de peroxyde d'hydrogène chaque seconde.

c. Glutathion peroxydases

Le glutathion est un tripeptide thiol glutathion (GSH), il a un pouvoir réducteur élevé selon son groupe sulfhydryle (-SH) en tant que bon donneur d'électrons et l'existant avec une concentration accrue dans les cellules (soit 5mM dans les cellules animales). Les glutathions peroxydases (GPxs) représentent la principale défense enzymatique contre les oxydants. Le stress causé par les hydroperoxydes. L'activité du glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur fourni par GSH [1,25].

Les systèmes de glutathion contiennent différents types de glutathion comme la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la glutathion S-transférase.

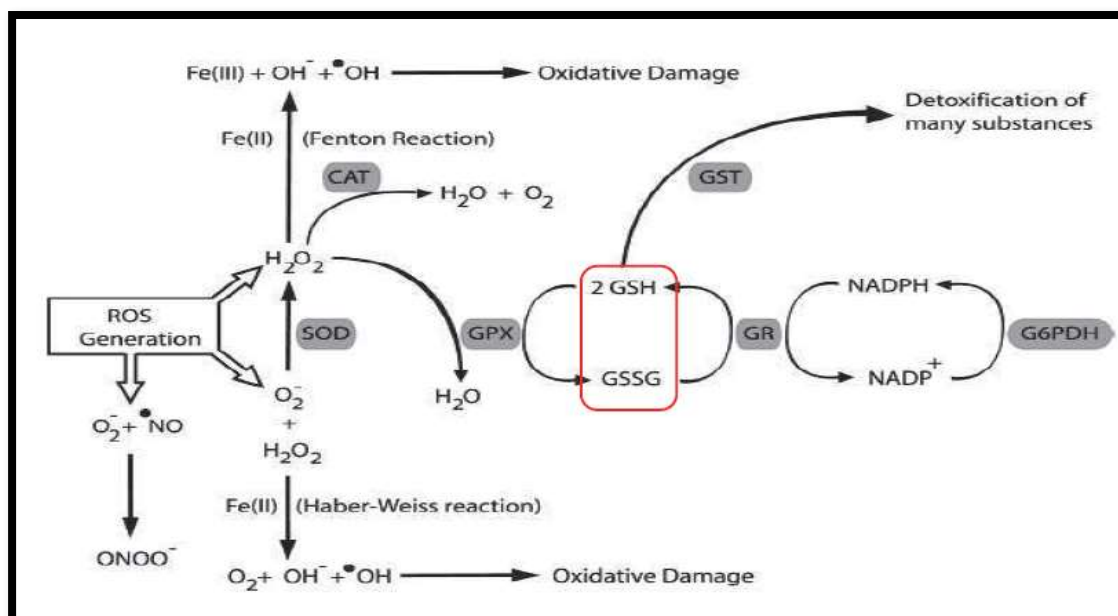


Figure IV.4: Les principales enzymes antioxydantes. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). En rouge est entouré le glutathion, sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG.

IV.2.2 .1.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, in vitro, avec les radicaux $HO\cdot$, $RO_2\cdot$, $RO\cdot$, $1O_2$, $ONOO^-$, des radicaux centrés sur le

carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl. Autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes in vitro en piégeant les HO•, RO₂•, l'HOCl et l'IO₂. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes [14,18, 19]. L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes in vitro contre les HO• et RO₂•, tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine [3].

IV.2.2.1.3. Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes, des composés phénoliques et des oligoéléments [26].

Les vitamines

- La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire [8,22]. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle. Paradoxalement, les études in vivo de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant in vitro de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton [19].
- La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO• [18].
- Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O₂•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet [14, 27].
- Les polyphénols sont des molécules organiques hydrosolubles largement retrouvées dans le règne végétal. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols sont

capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations. Ils sont cependant présents en faible concentration dans le plasma. Il paraît néanmoins que les polyphénols interagissent avec des cibles protéiques (enzymes, signalisation intracellulaire, récepteurs nucléaires...) ce qui leur assure des effets anti-thermogéniques, anti-inflammatoires, antithrombotiques, anticancérigènes. Les polyphénols naturels forment un ensemble de molécules comportant au moins un groupe phénolique dans leur structure et sont en général de haut poids moléculaire [8,18]

Les polyphénols sont classés en deux groupes : les composés flavonoïdes qui sont regroupés en diverses familles : flavanols, flavanols, flavones, isoflavones, flavanones et anthocyanes et les composés non flavonoïdes sont divisés en acides phénols et dérivés, lignanes et stilbènes.

Les oligoéléments

Les oligoéléments sont des éléments chimiques présents dans le corps humain en concentration inférieure à 0.01%. Ce sont des éléments qui doivent être apportés par l'alimentation. Ce sont des cofacteurs indispensables pour des réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Ils sont fortement impliqués dans l'homéostasie énergétique. Il s'agit principalement du cuivre, du manganèse, du sélénium et du zinc [8].

- **Cuivre** : Le cuivre d'origine alimentaire est absorbé au niveau digestif par l'intermédiaire de protéines spécifiques. Il a un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire car il est le cofacteur de nombreuses enzymes. Il présente aussi une activité anti-inflammatoire en déviant le métabolisme des prostaglandines et des leucotriènes, entraînant à la place des métabolites dénués de toute activité anti-inflammatoire. Il se comporte également comme un antioxydant en stimulant le superoxyde dismutase, protégeant ainsi la cellule contre l'effet toxique des radicaux libres [20].
- **Manganèse** : Il est présent en grande quantité dans les mitochondries du muscle squelettique, du foie, du pancréas et du rein. Il est impliqué dans la synthèse, la sécrétion et l'action de l'insuline en association au zinc et au cuivre. Il est également indispensable pour la maturation des os et du cartilage. Il participe aussi à la synthèse des vitamines E et B1.
- **Sélénium** : Le sélénium est un oligoélément retrouvé dans tous les organes du corps humain mais il est principalement localisé dans le foie, les reins, le sang, le cerveau, le muscle cardiaque et les testicules. L'apport se fait principalement par l'alimentation. Les principales fonctions biologiques du sélénium en font un élément antioxydant. En effet, le sélénium a un effet immunostimulant, notamment en stimulant l'expression des récepteurs à l'IL-2 à la

surface des lymphocytes activés et de la cellule *natural killer*. Il évite la progression de certaines infections virales. Chez l'homme, le sélénium a un effet dans la protection de certains cancers, dont le cancer du foie, du poumon ou de la prostate. Enfin, cet oligoélément possède un effet antioxydant par l'optimisation de l'activité glutathion peroxydase en s'incorporant à cette dernière [14, 19].

- Zinc : Le zinc est principalement retrouvé dans les os, les muscles et les liquides riches en protéines du fait de ses liaisons, comme par exemple dans le plasma ou le liquide céphalorachidien. L'apport en zinc se fait principalement par l'alimentation. Le zinc se complexe facilement avec les groupements thiols, amine ou imidazole et il n'existe quasiment pas de zinc libre dans l'organisme. Du fait de la liaison avec des protéines, le zinc est impliqué dans de nombreuses réactions métaboliques par l'intermédiaire de métalloenzymes, notamment l'anhydrase carbonique ou la superoxyde dismutase qui est un *scavenger* capital des ions superoxydes, précurseurs de la chaîne des radicaux libres. C'est en ce sens que le zinc a des propriétés antioxydantes [18].

IV.2.2.2. Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [19]. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques.

Le schéma suivant résume les rôles les plus importants des antioxydants enzymatiques dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres et le stress oxydatif

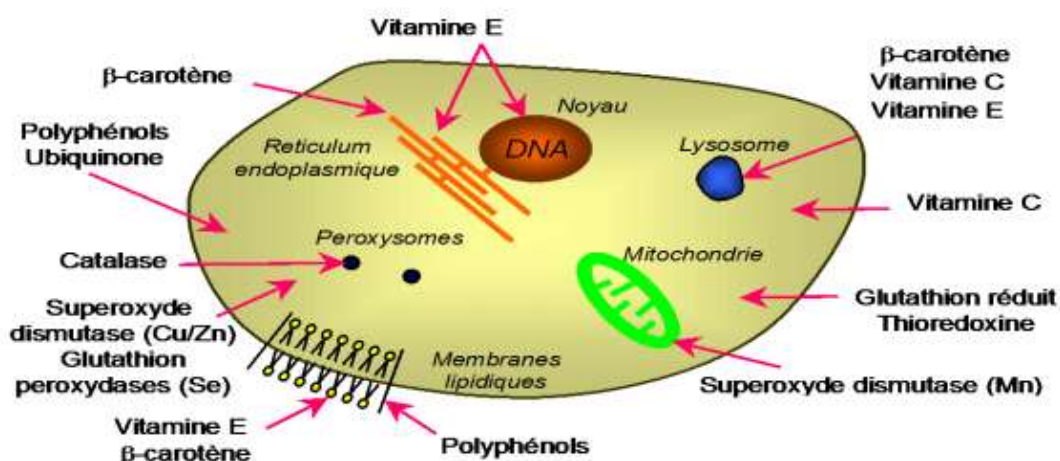


Figure IV.5: Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires

IV.2.3. Utilisation des antioxydants :

Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de transition.

Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.

Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorant au soufre ou des colorant de cuve lors de la teinture [19].

IV.2.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est évaluée par la mesure de l'efficacité du composé à piéger les radicaux libres. Il existe une multitude de tests pour la mesure de l'activité antioxydant d'un composé, parmi ces méthodes nous avons choisi deux méthodes : la méthode spectroscopique et la méthode électrochimique.

IV.2.4.1. La méthode spectroscopique

Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante in vitro par méthode spectroscopique. Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire induisent la mesure de l'arrêt ou l'inhibition de l'oxydation. Cette étude se focalisera sur les méthodes témoignant la capacité d'une molécule organique à piéger des radicaux libres – par transfert d'électron et/ou de proton -issus de phénomènes d'oxydations. On parlera alors d'évaluation in vitro de l'activité antioxydante. Les méthodes les plus utilisées pour les tests in vitro, est la méthode du DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) [28]. Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune en mettant en avant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de la méthode [18]. Nous allons abordées aussi dans ce chapitre les méthodes mesurant le pouvoir antioxydant in vivo sur un modèle animal. Dans cette partie nous allons détailler un peu sur le test de DPPH.

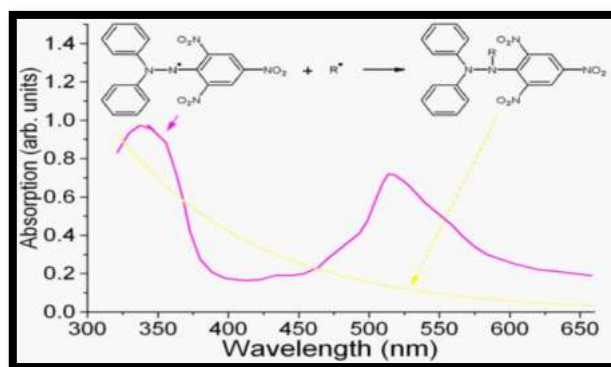


Figure IV.6: l'absorption de DPPH de couleur violet devient jaune après la neutralisation [19].

IV.2.4.1.1. Procédé de piégeage des radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

✓ Définition du DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, donc le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [19].

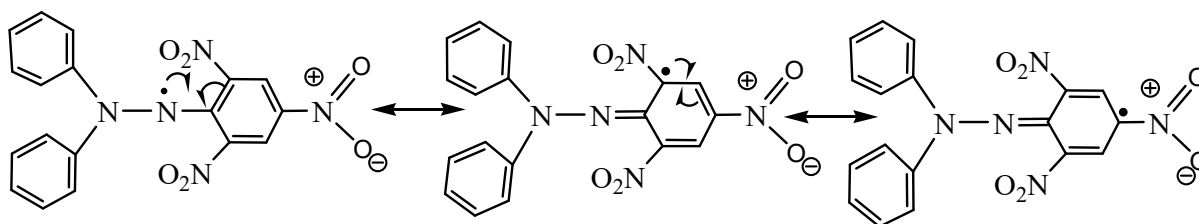


Figure IV.7: Structure de la molécule de DPPH.

La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 517 nm [9, 21].

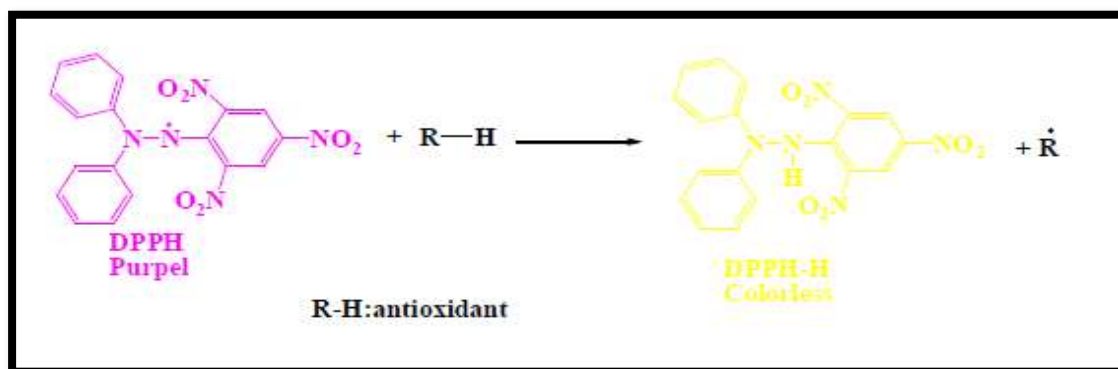
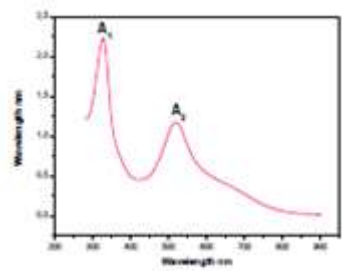
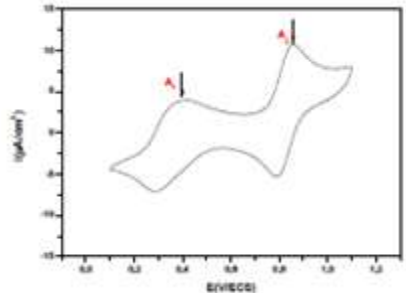


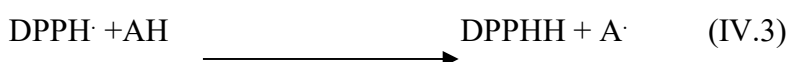
Figure IV.8 : La réaction de DPPH en présence des antioxydants [19]

✓ **Caractéristique du radical de DPPH****Tableau IV.2:** Propriétés physicochimiques de la DPPH

La formule chimique	$C_{18}H_{12}N_5O_6$
La masse moléculaire	394.32 g/mol
Point de fusion	135°C
La densité	1.4 g/cm³
Spectre d'absorption du radical DPPH soluble dans l'acétonitrile dans le domaine UV-VIS, est caractérisé par deux pics : $\lambda_{\max} (A_1) = 330\text{nm} : (n \rightarrow \pi^*)$ $\lambda_{\max} (A_2) = 517\text{nm} : (n \rightarrow \pi^*)$	
Le voltamogramme cyclique de DPPH dissout dans l'acétonitrile à une vitesse de balayage 100mV/s en utilisant l'électrode Carbon vitreux et $0.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ de $\text{Bu}^n_4\text{NBF}_4$	

✓ **Mécanisme réactionnel du radical de DPPH avec les antioxydants**

Le mécanisme réactionnel implique le transfert de H d'un composé antioxydant au radical DPPH. L'interaction de la radical DPPH (de couleur pourpre) avec un composé phénolique capable de neutraliser son caractère radicalaire, conduit à la formation d'hydrazine jaune incolore. L'effet résultant peut être quantifié par spectrophotométrie à 515 nm [9]

✓ **Avantages :**

Une méthode rapide, simple et peu coûteuse pour estimer l'activité antiradicalaire de composés organométalliques.

Il produit des radicaux azotés organiques stables caractérisés par une couleur pourpre foncé.

✓ **Inconvénients :**

Certains antioxydants comme les caroténoïdes ont des spectres qui se chevauchent avec le DPPH à 515 nm et interférer avec les résultats [18]. Le radical DPPH ne peut être dissous que dans des solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone, acétonitrile), ce qui constitue une

limitation dans l'interprétation du rôle de l'acétone hydrophile antioxydants. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur l'essai, tels que le solvant, le pH, la concentration de l'échantillon et la teneur en temps de réaction.

L'absorbance du radical DPPH à 515-520 nm après la réaction avec un oxydant est réduite par la lumière, l'oxygène et les types de solvants [19].

✓ Principe de test de DPPH

Ce test spectrophotométrique utilise le radical stable DPPH comme réactif. Diverses concentrations des composés dans un solvant organique acétonitrile ont été ajoutées à une solution de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante, l'absorbance a été lue contre un blanc à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Le pourcentage de l'activité antioxydante est calculé de la manière suivante :

$$\text{Activité antioxydant (I\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon et At est l'absorbance du test à chaque concentration. La concentration du composé à condition que 50 % d'inhibition (IC_{50}) ait été calculée à partir de la courbe du pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration du composé en mg/ml [9].

IV.2.4.1. La méthode électrochimique

Les méthodes de chimioluminescence et de radio-spectroscopie sont le plus souvent utilisées pour étudier les anions radicaux superoxyde. Cependant, ces méthodes sont plutôt laborieuses et coûteuses ; par conséquent, l'utilisation des méthodes d'analyse électrochimique est prometteuse.

La mesure de l'activité antioxydante par méthode électrochimique est basé sur la voltamétrie cyclique. Deux tests principaux sont utilisés pour cette méthode : La mesure de l'activité antioxydante par le piégeage du radical de DPPH et la deuxième est le piégeage du radical superoxyde anion généré électrochimiquement. Dans cette partie nous avons choisi l'évaluation de l'activité antioxydante basée sur la mesure du courant d'oxydation du radical anion superoxyde généré électrochimiquement plus particulièrement les dérivés organométalliques à base du ferrocène [29].

IV.2.4.2.1. Test de piégeage de radical superoxyde anion :

Les techniques électrochimiques utilisées pour produire de $O_2^{\cdot-}$ par réduction de l'oxygène dissous dans les solvants aprotiques sont également des procédés convenable et pratique. Le $O_2^{\cdot-}$ est une espèce à longue vie dans les milieux aprotiques. En outre, la voltamétrie cyclique est très adéquate à suivre la réaction de l' $O_2^{\cdot-}$ électrogénéré avec le substrat. Cela a déjà été décrit pour certains agents antioxydants et des extraits des plantes. Les approches

électrochimiques ont également des avantages particuliers pour l'évaluation des propriétés antioxydantes en mesurant le potentiel d'oxydation des substrats [19].

✓ Electrogénération de radicaux superoxydes

La technique de voltampérométrie cyclique est utilisée pour générer le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ dans la couche de diffusion de l'électrode de carbone vitreux par la réduction à un électron de l'oxygène moléculaire dans le DMF. La présence du radical $O_2^{\bullet-}$ est facilement détectable par son courant d'oxydation anodique mesuré à la même électrode pendant le balayage en retour. La réduction d' O_2 est une réaction réversible et il est connu que le radical $O_2^{\bullet-}$ est stable dans les milieux aprotiques et la dismutation ne se produit pas au cours des mesures voltamétrique cyclique dans une solution de DMF. Par conséquent, est un moyen pratique pour générer $O_2^{\bullet-}$ sans systèmes enzymatiques et d'étudier sa réaction avec une molécule à condition que le substrat est inactif dans la gamme de potentiel de la réduction de l'oxygène [9], afin d'éviter des interférences ou une interprétation complexe de l'anion Superoxyde avec les substrats étudiés. Heureusement, que cela a été observé dans cette étude le fait que nos produits synthétisés sont des agents réducteurs. En effet, ils ont été oxydés à des potentiels positifs.

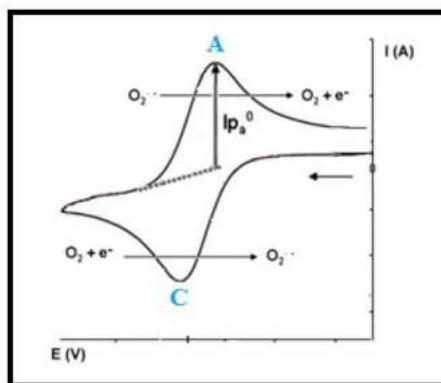


Figure IV.9: Voltamogramme cyclique de l'oxygène dans le DMF/0.1M(Bu₄NPF₆) à une vitesse du balayage 100mV/s.

✓ Procédure

Lors de l'élaboration de cette technique, le CV a d'abord été enregistrées en l'absence du substrat pour déterminer la valeur I_{pa0} comme courant anodique de pic d'oxydation d' $O_2^{\bullet-}$. L' I_{pa0} est directement lié à la concentration d' $O_2^{\bullet-}$ à la surface de l'électrode et dépend de la solubilité de l'oxygène dans le DMF et les paramètres expérimentaux choisis pour enregistrer le CV. Il est clair que l' I_{pa0} est déterminée dans les mêmes conditions pour chaque expérience. Cela signifie que l'échelle de temps du CV et la surface de l'électrode doit être la même. La vitesse de balayage est de 0,1V/s et le potentiel variait de 0 à -1,6V.

✓ Inhibition des radicaux libres de l'anion superoxyde

Lorsqu'un oxygène moléculaire acquiert un électron, le résultat est la formation d'un radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

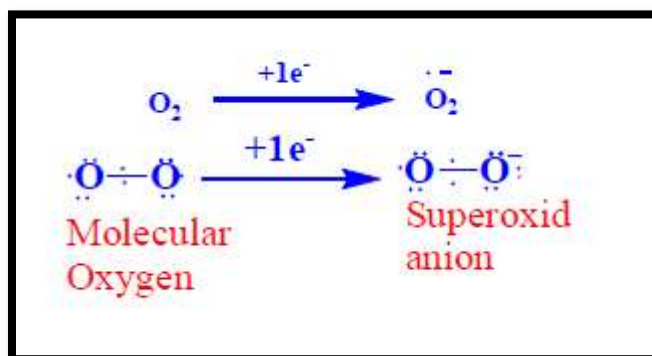
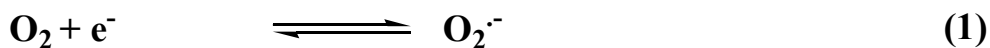


Figure IV.10: Formation d'anion superoxyde.

✓ Réactivité de l'anion superoxyde

La réactivité chimique de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) peut être modifiée pour être plus réactive et selon son environnement cellulaire, deux réactions principales sont responsables de cette transformation. Réactivité de l'anion superoxyde avec lui-même ou Protonation d'anion superoxyde.

Les équation (1-2-3) montrent le comportement électrochimique de l'oxygène, (AH) est l'antioxydant. Après la réaction réversible de la réduction de l'oxygène (1) le radical ($O_2^{\cdot-}$) se réagit avec l'antioxydant (AH) (2) cela donne des produits non actifs, dans cette réaction on peut supposer le passage de l'hydrogène (3) de (A) et la formation du radical fenoxil.



IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

IV.3.1. Matériels et méthodes

Produits chimiques et matériels utilisés pour l'étude *in vitro*

- ✓ Le diméthylformamide (DMF) de qualité analytique acheté à PROLABO a été utilisé. Comme solvant sans purification supplémentaire.
- ✓ L'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (TBFP) de qualité électrochimique (98%) Sigma-Aldrich, a été utilisé comme électrolyte support (0,1 M).
- ✓ Les dérivés ferrocéniques synthétisés, Papier abrasif p 4000.
- ✓ Une cellule électrochimique à trois électrodes : Une électrode de travail en Carbon vitreux d'une surface 0.013 cm² une électrode de référence Calomel saturé par le KCl (ECS) Hg/Hg₂Cl₂ (3,0 M KCl) et une électrode auxiliaire en fil de platine de diamètre 0.5mm (Radiomètre Analytique SAS).
- ✓ Un Potentiostat / Galvanostat Model PGZ 301 (Radiomètre Analytical SAS).
- ✓ UV spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU) cuves en Quartz.
- ✓ Acide gallique (99%) (Prolabo) et BHA.

Appareils et logiciels

- Des mesures voltampérométriques cycliques ont été effectuées avec voltalab40 PGZ301 potentiostat/galvanostat. Des expérimentations ont été effectuées dans une cellule électrochimique de 25 mL et le système conventionnel à trois électrodes a été utilisé. Les données sont traitées à l'aide du logiciel VoltaMaster4 version 7.08 (radiomètre analytique SAS). Les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Origin Lab version 2.0 (Integral Software, France). Des mesures voltampérométriques cycliques ont été effectuées entre 0 et -1600 mV. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante (25 ± 1 °C).

IV.3.2. Résultats et Discussion

IV.3.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante *In vitro* par Technique électrochimique

IV.3.2.1.1. Méthode de scavenging du radical superoxyde anion par voltamétrie cyclique

Le radical superoxyde anion a été généré électrochimiquement selon les conditions expérimentales déterminés précédemment à une température ambiante dans. Les composés synthétisés et les standards sont alors ajoutés au radical superoxyde anion généré dans la cellule électrochimique et les voltamogrammes ont été enregistrée.

IV. 3.2.1.2. Etude de l'interaction entre le radical superoxyde anion et l'antioxydant $O_2^{\cdot-}$ OA

Cette étude est basée sur l'inhibition des radicaux libres par les dérivés synthétisés pour former l'oxygène moléculaire, avec une diminution de l'intensité du courant du pic anodique en augmentant la concentration de l'antioxydant.

D'après les voltamogrammes cyclique de l'oxygène en absence et en présence des standards et les composés synthétisés, nous allons étudier l'interaction entre le radical et ces composés en déterminant quelques paramètres thermodynamiques par la méthode électrochimique.

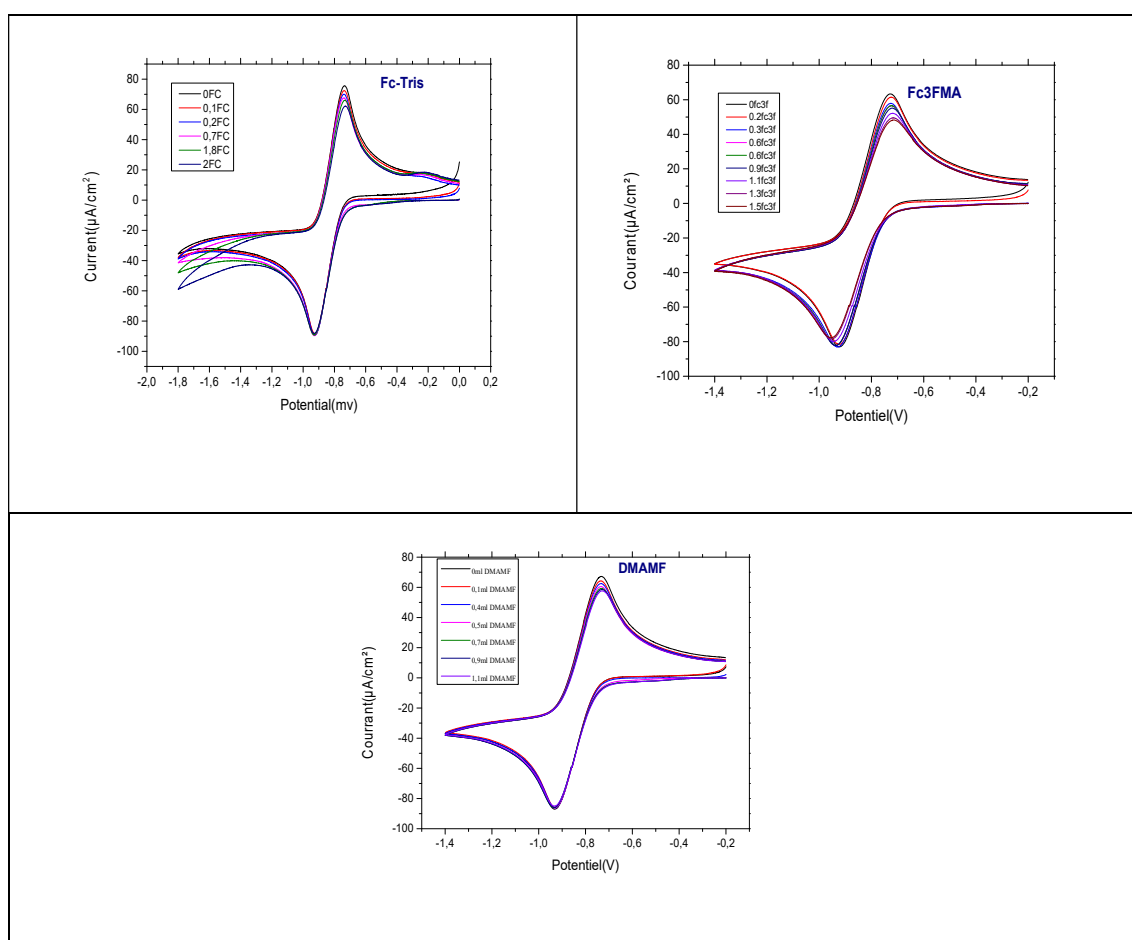


Figure IV.11 : Voltamogramme cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

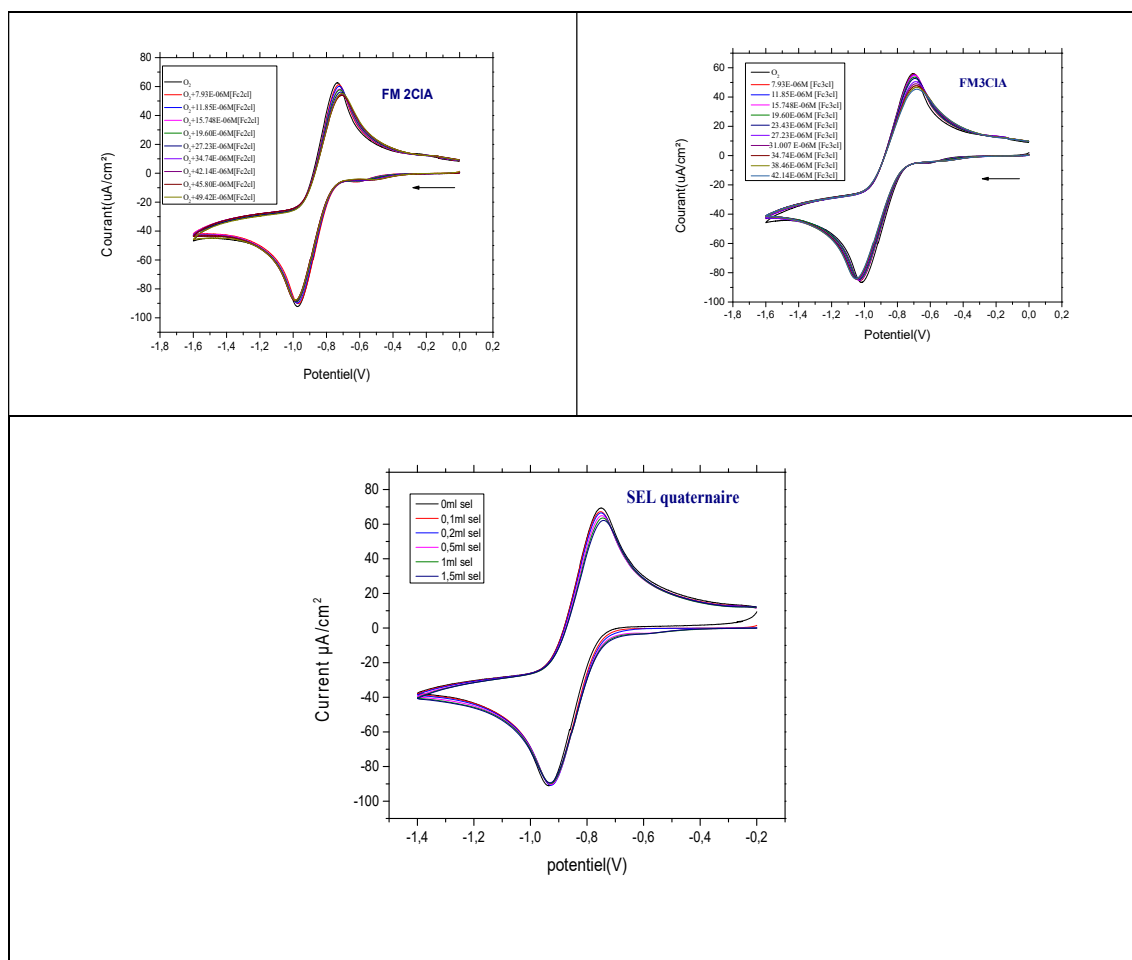


Figure IV.12 : Voltamogramme cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

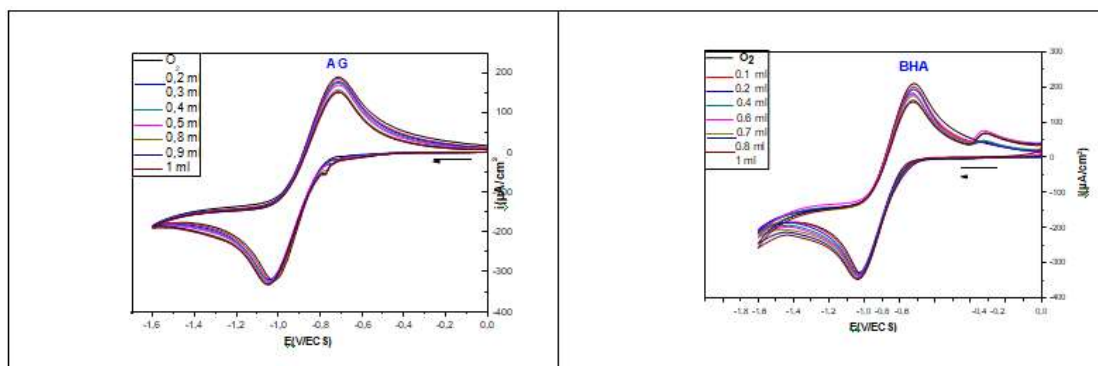


Figure IV.13 : Voltamogramme cyclique saturée par le dioxygène en absence et en présence de différentes concentrations de FC-3cl aniline enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

1- Le rapport des constantes de liaison (Kox/Kred)

La diminution de courant de pic de réduction de l'oxygène en présence de l'antioxydant (standards et composés synthétisés) nous permettra de calculer la constante de liaison, la valeur de K_{red}/K_{ox} permet de déterminer le type de réaction obtenue entre le radical et l'antioxydant.

Le déplacement du potentiel vers une valeur plus négative est lié à l'oxydation de O_2 en présence des produits antioxydants due à la réduction de l'oxygène de la forme $O_2^{\cdot-}$ qui a besoin d'une force comparé à l'antioxydant dans sa forme oxydée le schéma suivant explique l'intrication.

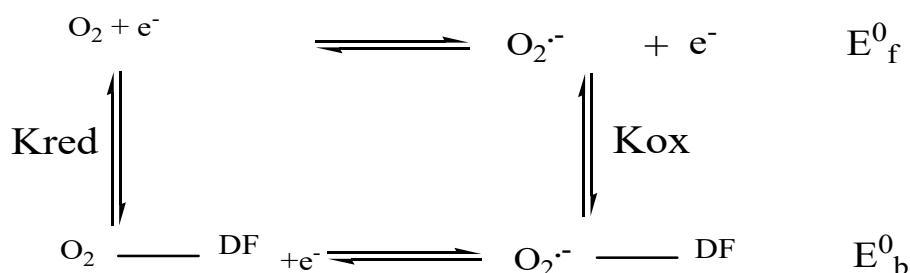


Schéma IV.1: Mécanisme générale d'oxydoréduction de radical $O_2^{\cdot-}$. Libre et lié au dérivé ferrocénique

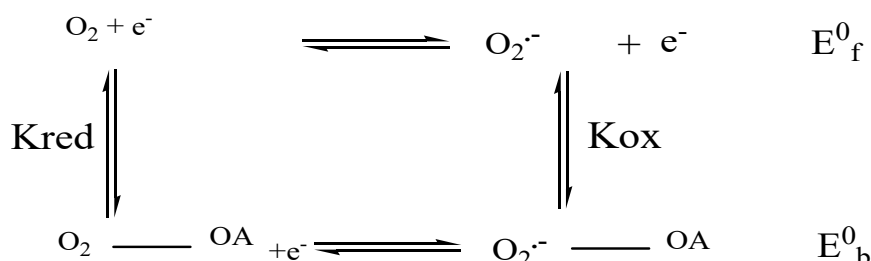


Schéma IV.2: Mécanisme générale d'oxydoréduction de radical $O_2^{\cdot-}$ Libre et lié au standard

L'équation de Nernst interprète le schéma ci-dessus [30]

$$E_b^0 - E_f^0 = 0.059 \log \frac{K_{red}}{K_{ox}}$$

Où : E_f , E_b sont les valeurs de potentiel de ($O_2/O_2^{\cdot-}$) libre et lié à l'antioxydant.

ΔE^0 et E^0 peuvent être calculer en utilisant les equation suivantes:

$$E^0 = \left| \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \right|$$

$$\Delta E^0 = E^0(O_2^{\cdot-} - OA) - E^0(O_2^{\cdot-}) = E_b^0 - E_f^0$$

Les valeurs des données électrochimiques de l'interaction entre l'anion superoxyde et le DF et standard snt présentés dans le tableau suivant :

Tableau IV.3 : Données électrochimiques de voltamogramme dioxyde seul et celui de l'adduit O_2^- -DF

Composé	I _{pa} (μ A)	E _{pa} (V)	E _{pc} (V)	E° (V)	ΔE° (V)	$\Delta I_{pa} \%$	K _{ox} /K _{red}
O_2^-	75.95	-0,679	-0,955	-0,817			1,168
O_2^- _ Fc tris	62.47	-0,674	-0,952	-0,813	0,004	17.74	
O_2^-	64.32	-0,726	-0,924	-0,825			
O_2^- FM3FMA	47.134	-0,724	-0,935	-0,8295	-0,0045	26.72	0,838
O_2^-	67.30	-0,733	-0,931	-0,832			
O_2^- DMAMF	56.12	-0,729	-0,937	-0,833	-0,001	16.51	0,961
O_2^-	63.24	-0,734	-0,978	-0,856			
O_2^- FM2ClA	54.33	-0,726	-0,991	-0,8585	-0,0025	14.089	0,907
O_2^-	55.44	-0,702	-1,017	-0,8595			
O_2^- FM3ClA	45.70	-0,695	-1,053	-0,874	-0,0145	17.56	0,567
O_2^-	69.738	-0,745	-0,946	-0,8455			
O_2^- _ sel		-0,743	-0,926	-0,8345	0,011	12.735	1,536
O_2^-	321,915	-0,717	-1,018	-0.878			
O_2^- _ BHA	293,242	-0,717	-1,036	-0.863	-2,054	8.607	1,420
O_2^-	308,759	-0,7108	-1.017	-0,867	-0,8639		
O_2^- _ AG	273,152	-0,7094	-1.04	-0,876	-2.065	11.532	1,78

Les valeurs de rapport K_{ox} / K_{red} obtenues montrent que la forme réduit de l'oxygène O_2^- réagit avec les composés FM3FMA, DMAMF, FM2ClA et FM3ClA plus que la forme oxydée de l'oxygène avec : 0.838, .961, 0.907 et 0.567 successivement. En revanche, la forme oxydée de l'oxygène réagit avec les composés FC-tris, sel quaternaire, BHA et AG plus que la forme réduit de l'oxygène avec : 1.168, 1.536, 1.420 et 1.78 successivement.

2 –Calcul de la constante K et énergie libre de liaison ΔG

La diminution de pic du courant anodique des voltamogrammes cyclique en augmentant la concentration de l'antioxydant (composés synthétisés 0.001 M et standards) dans une cellule saturée d'oxygène en présence de l'électrolyte support dessous dans le DMF tandis que le courant cathodique est fixe comme indiqué sur la figure IV.17, 18,19. Le voltampérogramme

de l'oxygène en présence de DF ou standard a été obtenue afin d'évaluer son activité antioxydante en fonction de sa réaction avec l'oxygène.

La diminution du pic de courant anodique signifie que les DF et standard réagissent avec le superoxyde anion par une réaction réversible. Cette diminution peut être expliquée par la diminution de la concentration de radical superoxyde libre et la formation de complexe ($O_2^{\cdot-}$ OA) dans le cas de DF ou Standards ce qui limite la diffusion de radical libre due à l'augmentation de son poids moléculaire lors de la formation de complexe.

La diminution du pic de courant anodique lors de l'addition d'une concentration croissante des antioxydants permettent de calculer la constante de liaison en utilisant la relation suivante:

$$\log \frac{1}{C} = \log K + \log \frac{i}{i_0 - i}$$

Les valeurs de $\log(1/C)$ et $\log i/(i_0-i)$ sont présentées dans les tableaux IV.9, 10 et 11

Tableau IV.4: Les valeurs de $\log(1/C)$ et $\log i/(i_0-i)$ extraites du voltamogramme cyclique de Fc-tris, FM3FMA et DMAMF.

Composé	C (mol/L)	Log (1/C)	I (μA)	Log i/(i ₀ -i)
Fc-tris	0	/	75,4305	/
	3,98406E-06	5,399673721	72,324	1,36701108
	7,93651E-06	5,100370545	69,966	1,107336615
	2,72374E-05	4,564835083	67,496	0,929758472
	6,71642E-05	4,172862289	65,999	0,844956586
	7,40741E-05	4,130333768	62,125	0,669235202
FM3FMA	0	/	63,332	/
	7,93651E-06	5,100370545	61,003	1,418181705
	1,18577E-05	4,925999266	57,803	1,019303789
	2,34375E-05	4,630088715	56,512	0,918356303
	3,4749E-05	4,459057255	54,996	0,819373397
	4,21456E-05	4,375247822	52,058	0,664409449
	4,94297E-05	4,306012396	49,419	0,550473168
	5,66038E-05	4,247154615	48,166	0,50186953
DMAMF	0	/	67,215	/
	3,98406E-06	5,399673721	64,184	1,325840843
	1,5748E-05	4,802773725	62,406	1,11317157
	1,96078E-05	4,707570176	60,404	0,947854819
	2,72374E-05	4,564835083	59,244	0,871131564
	3,4749E-05	4,459057255	58,57	0,830910226
	4,21456E-05	4,375247822	57,578	0,776314716

Tableau IV.5: Les valeurs de $\log(1/C)$ et $\log i/(i_0-i)$ extraites du voltamogramme du Fm2CIA, FM3CIA et Sel quaternaire

Composé	C (mol/L)	Log (I/C)	I (μ /A)	Log $i/(i_0-i)$
FM2CIA	0	/	62,676	/
	7,93651E-06	5,100370545	61,4	1,682317697
	1,18577E-05	4,925999266	60,208	1,387309046
	1,5748E-05	4,802773725	58,13	1,106770892
	1,96078E-05	4,707570176	57,698	1,064105867
	2,72374E-05	4,564835083	56,247	0,941955938
	3,4749E-05	4,459057255	55,077	0,860213832
	4,21456E-05	4,375247822	54,577	0,828578261
	4,58015E-05	4,339120045	54,42	0,818988853
	4,943E-05	4,306012396	53,847	0,785249995
FM3CIA	0	/	55,701	/
	7,93651E-06	5,100370545	55,701	2,071001851
	1,18577E-05	4,925999266	55,116	1,716792024
	1,5748E-05	4,802773725	54,879	1,627136421
	1,96078E-05	4,707570176	53,765	1,34866285
	2,34375E-05	4,630088715	52,796	1,193941375
	2,72374E-05	4,564835083	50,488	0,948381312
	3,10078E-05	4,508529719	49,035	0,836868798
	3,4749E-05	4,459057255	47,785	0,755581396
	3,846E-05	4,414973348	46,625	0,688660951
	4,21456E-05	4,375247822	45,398	0,624579138
Sel quaternaire	0	/	69,218	/
	3,98406E-06	5,399673721	67,208	1,524224914
	7,93651E-06	5,100370545	66,49	1,386911967
	1,96078E-05	4,707570176	64,844	1,170991018
	3,84615E-05	4,414973348	63,512	1,046524022
	5,66038E-05	4,247154615	62,164	0,945103496

Tableau IV.6: Les valeurs de $\log(1/C)$ et $\log i/(i_0-i)$ extraites du voltamogramme des standards BHA et AG.

Standard	C (mol/L)	Log (1/C)	I (μ /A)	Log i/(i_0-i)
BHA	0,0	/	321,915	/
	0,0004	3,398	311,505	1,476
	0,0008	3,097	304,203	1,235
	0,0016	2,796	293,242	1,010
	0,0024	2,620	290,867	0,972
	0,0028	2,553	284,11	0,876
	0,0032	2,495	272,239	0,739
	0,004	2,398	269,19	0,708
AG	0,0	/	308,759	/
	0,0002	3,6990	306,251	2,087
	0,0003	3,5229	300,224	1,546
	0,0004	3,3979	297,302	1,414
	0,0005	3,3010	292,91	1,267
	0,0008	3,0969	278,167	0,959
	0,0009	3,0458	276,144	0,928
	0,001	3,0000	273,152	0,885

Les figures suivantes montrent les droites de régression de $\log(1/C)$ en fonction de $\log(I/I_0-I)$ des composés synthétisés et standards

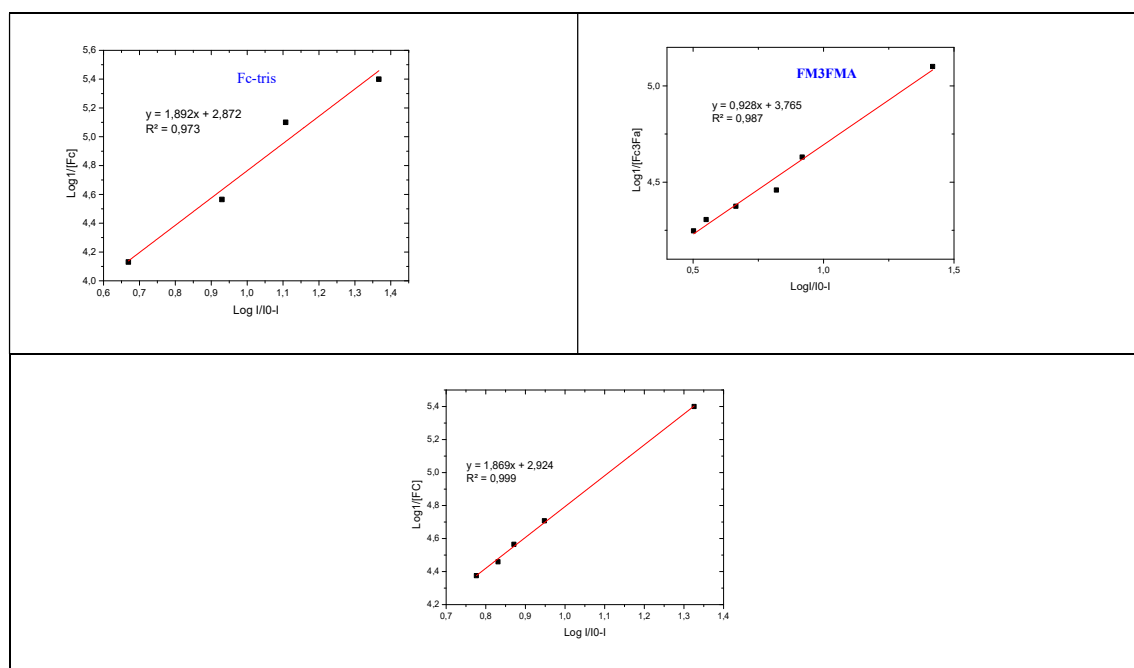


Figure IV.14 : Droite de régression du $\log i/Fc$ en fonction de $\log i/(ip_0 - ip)$

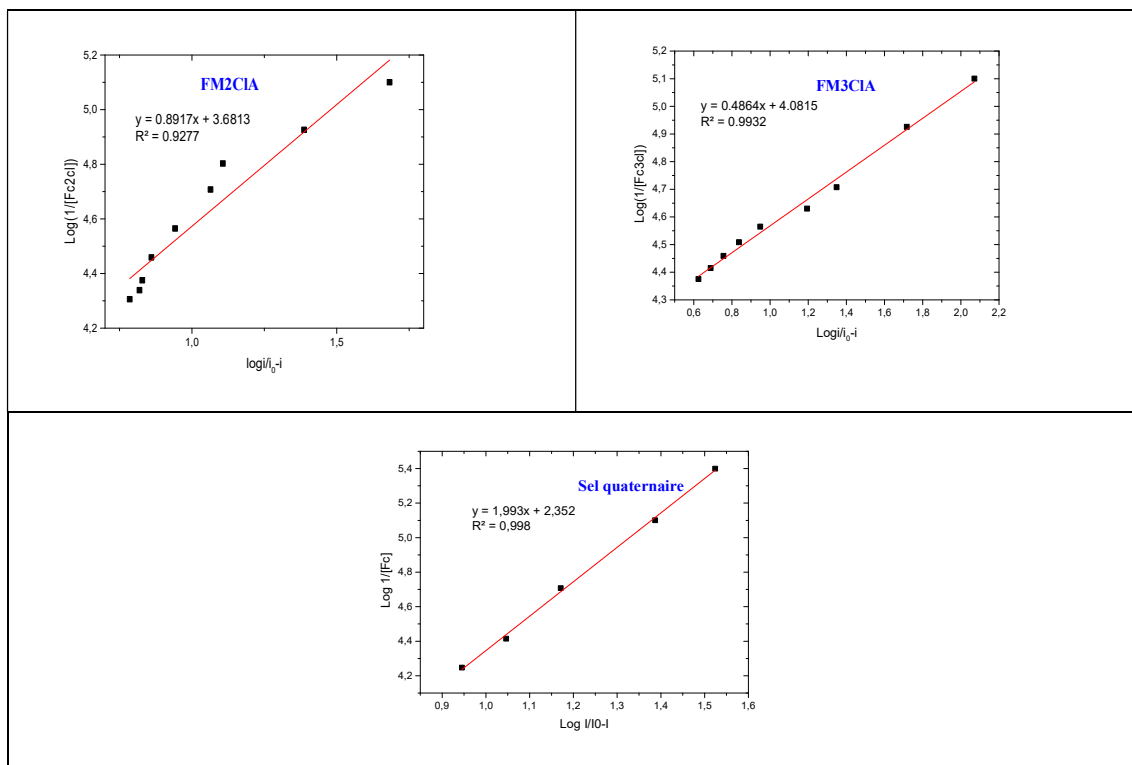


Figure IV.15 : Droite de régression du $\text{Log}1/\text{Fc}$ en fonction de $\text{logip}/(ip_0 - ip)$

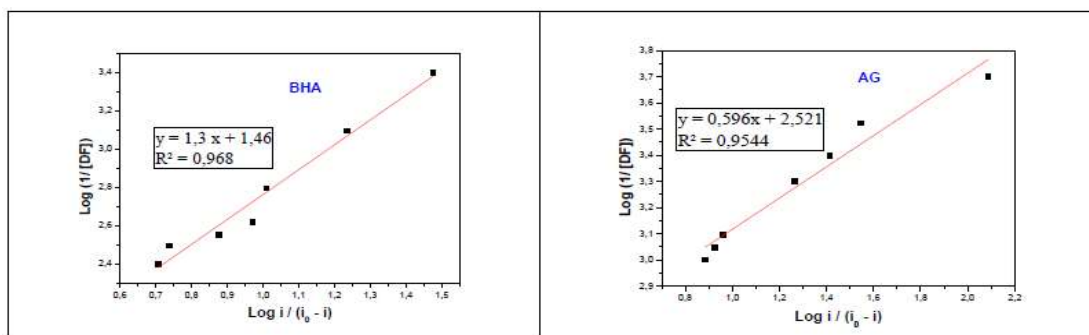


Figure IV.16 : Droite de régression du $\text{Log}1/\text{Fc}$ en fonction de $\text{logip}/(ip_0 - ip)$

La valeur de K est déterminée par le Log décimal de la valeur de l'intersection de la droite de régression avec l'axe de Y , à partir de laquelle nous pourrions calculer la valeur de ΔG selon l'équation suivante : $\Delta G = -RT \ln K$.

Les valeurs de K et ΔG du complexe formé entre le radical et les composés synthétisés et standards sont présentés dans le tableau IV.12.

Tableau IV.7 : Constante et énergies libres de liaison calculée à partir du la figure IV.15

Composé	Equation	R ²	K(L.mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
O ₂ ⁻ - Fc-tris	y = 1,892x + 2,8721	0,9731	744,7319739	-16,39606814
O ₂ ⁻ - FM3FMA	y = 0,9289x + 3,7653	0,9875	5821,032178	-21,49414922
O ₂ ⁻ - DMAMF	y = 1,8699x + 2,9241	0,9991	839,4599865	-16,69293289
O ₂ ⁻ - FM2CIA	y = 1,9935x + 2,3524	0,9984	4786,300923	-21,00888954
O ₂ ⁻ - FM3CIA	y = 0,4864x + 4,0815	0,9932	12022,64435	-23,29246449
O ₂ ⁻ - Sel quaternaire	y = 1,9935x + 2,3524	0,9984	223,8721139	-13,41600283
O ₂ ⁻ - AG	Y=0.596X+2.521	0.954	331.94	-14.39
O ₂ ⁻ - BHA	Y= 1.3X +1.46	0.968	2 8.84	-8.33

D'après les voltammogrammes cycliques de réduction de l'oxygène en présence des concentrations augmentées des composés synthétisés et standards que le potentiel d'oxydation tend vers les valeurs le plus positif ce qui confirme les valeurs de ΔG de liaison. Cette dernière indique la spontanéité de la réaction et que cette interaction est de type physique. En revanche, la valeur de potentiel d'oxydation de standard BHA tend vers les valeurs le plus négatif cela confirme que la nature de la réaction est de type chimique.

3-Coefficient de diffusion

Les comportements électrochimiques du radical d'oxygène O₂⁻ libre et lié avec les différents composés synthétisés et standards (O₂-OA) à différentes vitesses de balayage (de 100 à 500mV/s) sont présentés dans la figure IV.23 et 24.

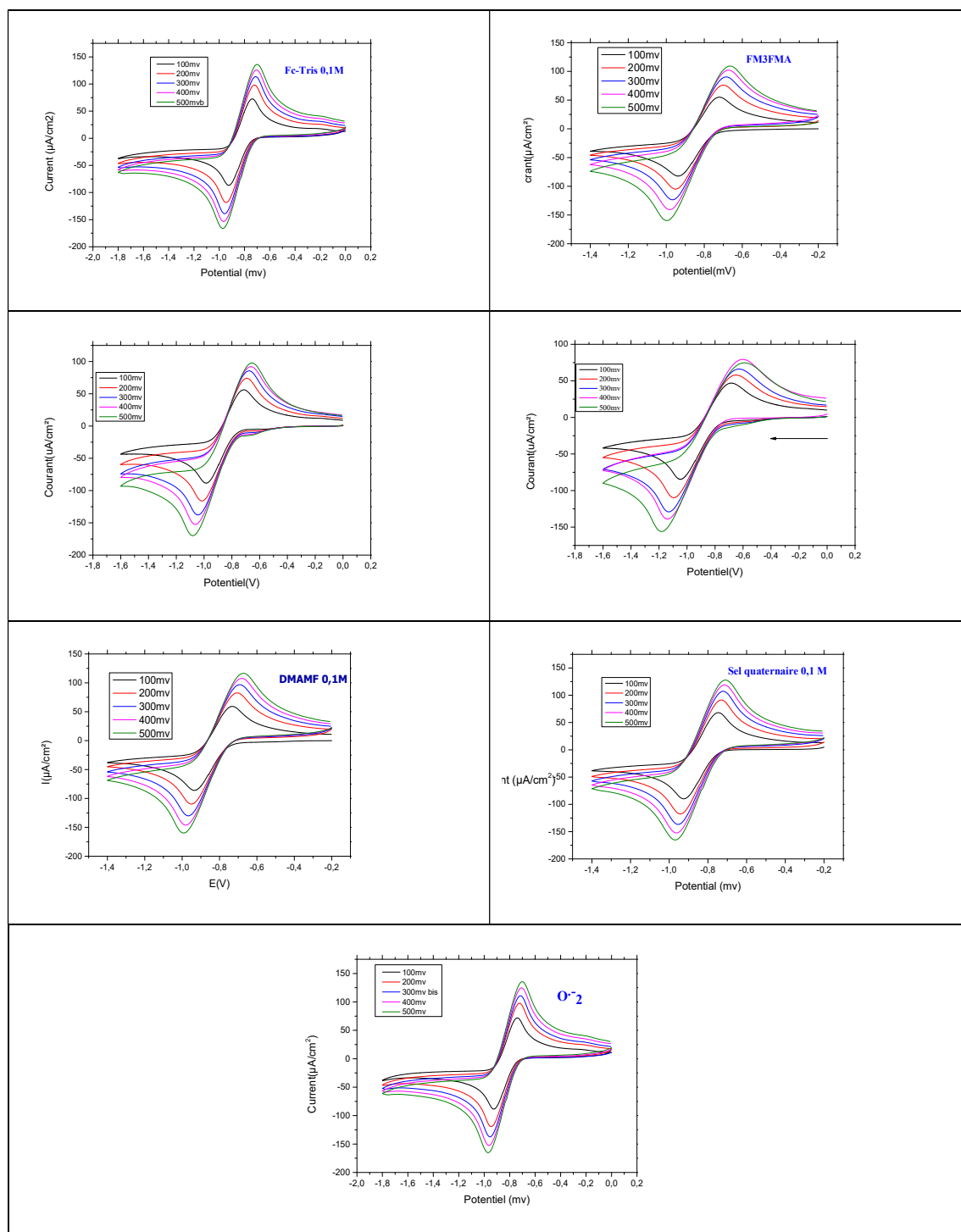


Figure IV.17 : Voltamogrammes cycliques d' O_2 à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 À 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de DF.

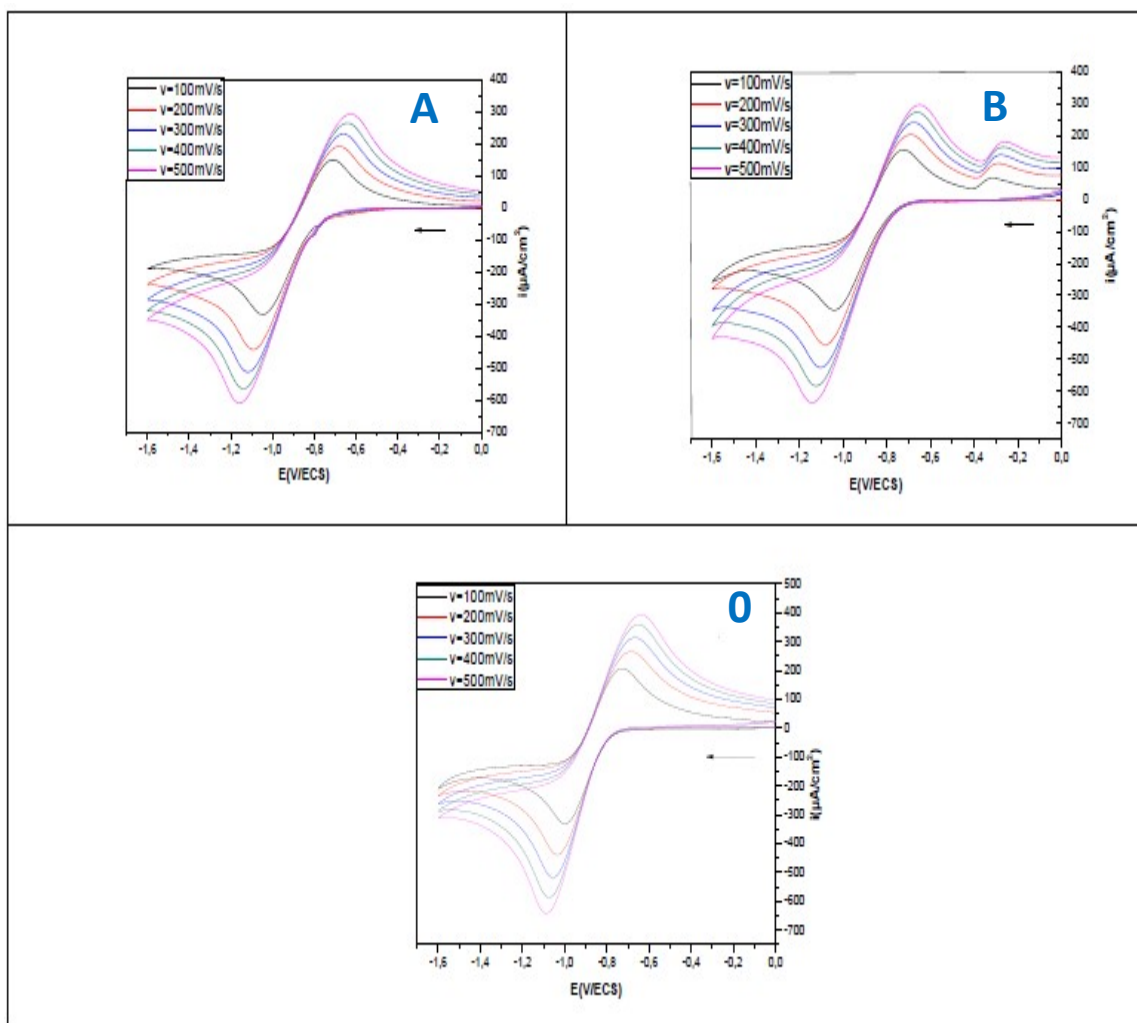


Figure IV.18 : Voltamogrammes cycliques d'O₂ à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 À 500 mV/s en absence (0) et en présence AG (A) et BHT (B).

Les voltamogrammes cycliques à différents vitesses montrent que le système est stable, réversible et ne se diffère pas à différentes vitesses de balayage, ce qui peut être expliqué par la réduction du couple (O₂/O₂⁻).

Le coefficient de diffusion du radical O₂⁻. Libre et lié avec l'antioxydant (préparé ou standards) a été déterminé par l'équation de Randles-Sevcik.

Les tableaux suivants montrent les valeurs de la densité du courant de composés synthétisés et standards correspondante à chaque vitesse de balayage.

Tableau IV.8 : Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence de DF, et la racine carrée de la vitesse de balayage

Composé	V (mV/s)	$V^{1/2}$	I($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
O_2	100	10.00	71,865
	200	14.14	97,477
	300	17.32	110,818
	400	20.00	124,509
	500	22.36	135,125

Tableau IV.9 : Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en présence de DF, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel

Composé	V (mV/s)	$V^{1/2}$	I($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Fc-Tris	100	10.00	72,401
	200	14.14	98,071
	300	17.32	113,56
	400	20.00	125,389
	500	22.36	135,845
FM3FMA	100	10.00	55,007
	200	14.14	76,241
	300	17.32	89,346
	400	20.00	100,928
	500	22.36	109,158
FM2CIA	100	10.00	55,44
	200	14.14	71,97
	300	17.32	84,477
	400	20.00	90,775
	500	22.36	96,98
FM3CIA	100	10.00	47,177
	200	14.14	57,834
	300	17.32	65,711
	400	20.00	73,666
	500	22.36	78,299
DMAMF	100	10.00	58,963
	200	14.14	82,298
	300	17.32	96,744
	400	20.00	107,429

	500	22.36	116,355
Sel quaternaire	100	10.00	68,0005
	200	14.14	91,033
	300	17.32	107,24
	400	20.00	118,864
	500	22.3V6	127,641

Tableau IV.10 : Courant des pics anodiques de dioxyde enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en présence de standard, et la racine carrée de la vitesse de balayage

Composé	V (mV/s)	$V^{1/2}$	I(μ A/cm ²)
BHA	100	10.00	278.85
	200	14.14	341.822
	300	17.32	404.702
	400	20.00	450.353
	500	22.36	503.214
AG	100	10.00	285.633
	200	14.14	337.967
	300	17.32	403.127
	400	20.00	457.479
	500	22.36	496.91

Pour déterminer les valeurs de D on devrait tracer les valeurs de l'intensité du courant en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

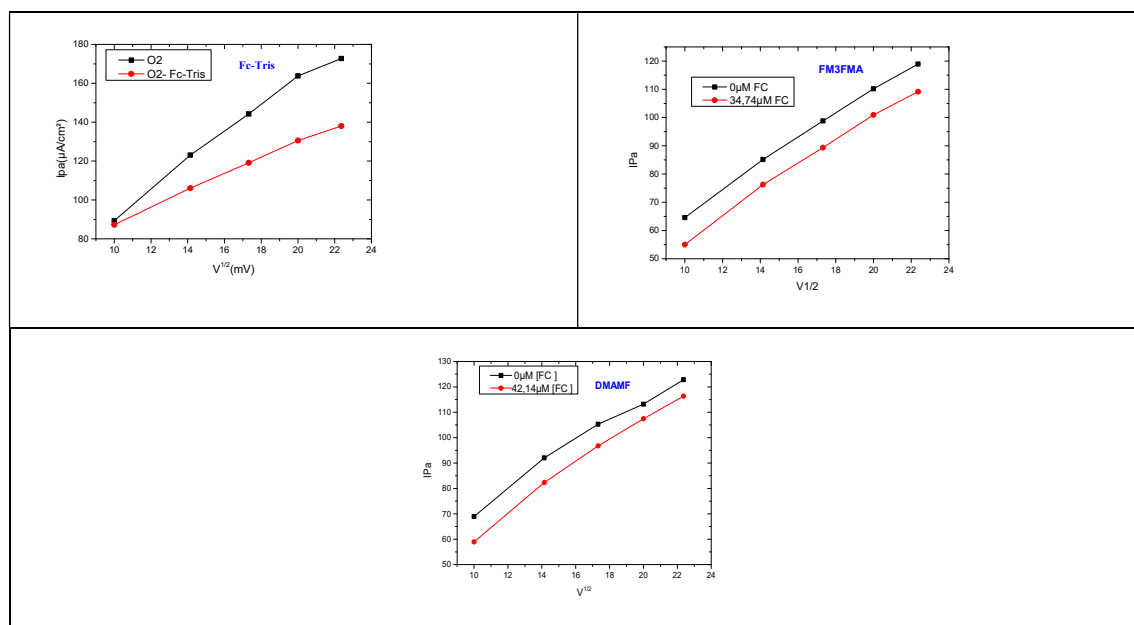


Figure IV.19 : Courant des pics anodiques de O_2 ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de DF.

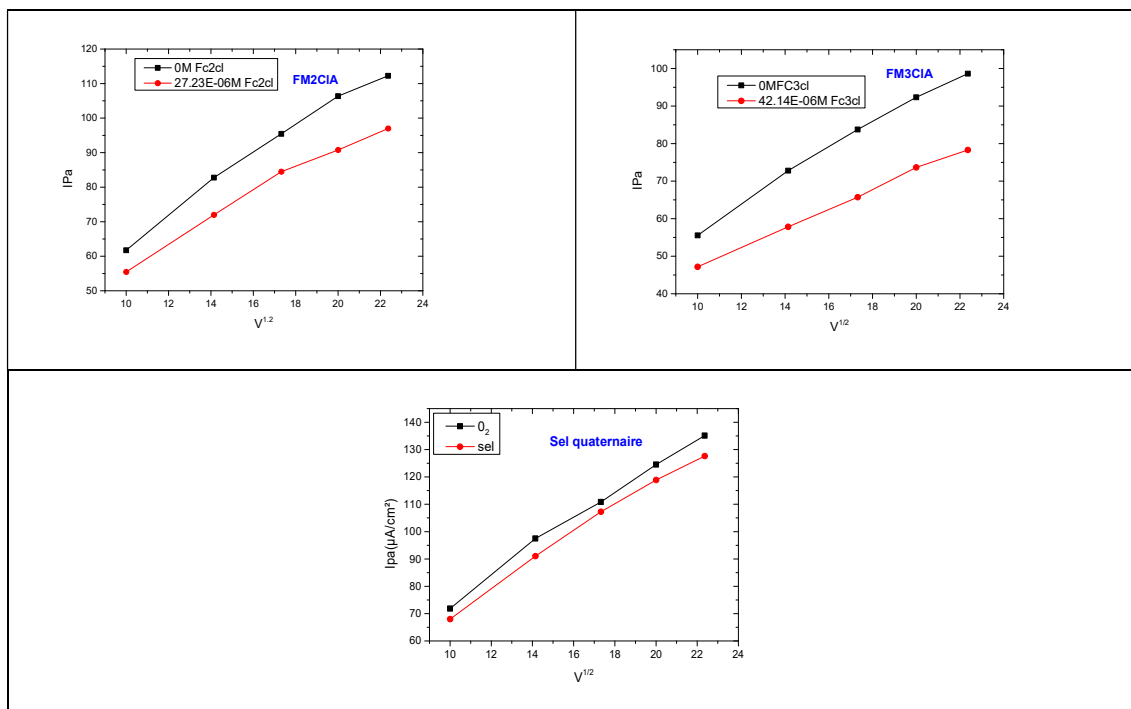


Figure IV.20 : Courant des pics anodiques de O_2 ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de DF.

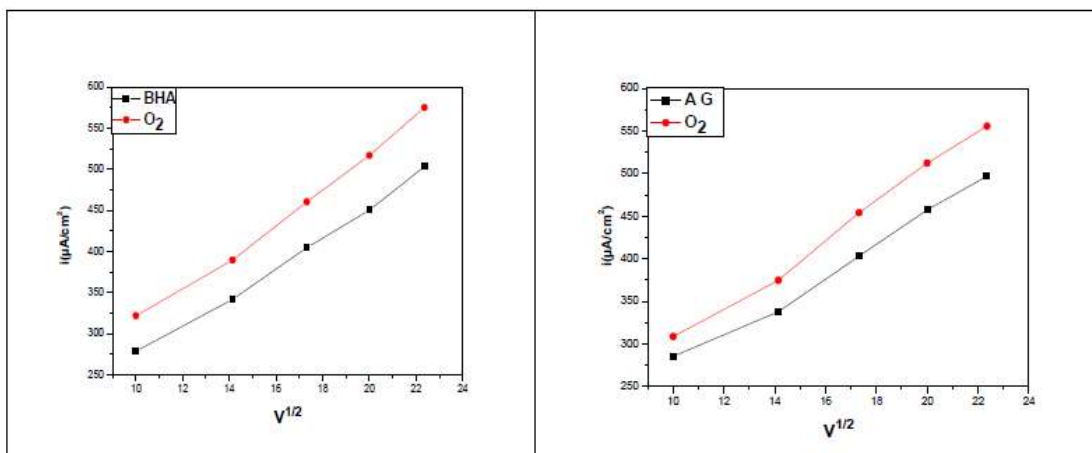


Figure IV.21 : Courant des pics anodiques de O_2 ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de standard.

La relation linéaire $I_{pa}=f(V^{1/2})$ montrent que le phénomène de diffusion est responsable dynamiquement de la réaction de réduction, les valeurs de D ont été déterminé par la relation de Randles-Sevcik,

$$ip_a = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} ACD^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

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

Tableau IV.11 : Coefficients de diffusion d'O₂ et de l'adduit O₂-DF

Composé	Equation	R ²	D(cm ² /s)
O ₂ ^{•-}	y = 24.65x + 4.312	0,964	4.96E-05
O ₂ ^{•-} - Fctris	y = 5,0544x + 23,223	0,9948	2,0887E-06
O ₂ ^{•-} —FM3FMA	y = 4,3809x + 12,692	0,9956	1,5688E-06
O ₂ ^{•-} —DMAMF	y = 4,6213x + 14,884	0,9924	1,7461E-06
O ₂ ^{•-} —FM2CIA	y = 3,3735x + 23,373	0,9871	9,2869E-07
O ₂ ^{•-} —FM3CIA	y = 2,5569x + 21,672	0,9982	5,3423E-07
O ₂ ^{•-} —Sel	y = 4,8529x + 21,198	0,9942	1,7461E-06
O ₂ ^{•-} —BHA	Y=18.10x+92.23	0.995	1.96.10-6
O ₂ ^{•-} —AG	Y=17.59x+101.3	0.991	4.75.10-6

D'après le tableau IV.11, les valeurs de D dans l'état du radical libre sont plus grandes que l'état lié avec l'antioxydant, cette diminution de la valeur de D du complexe O₂-OA est expliqué par le poids moléculaire de la forme lié de O₂^{•-}.

Le coefficient de diffusion de l'acide gallique est plus grand que les autres composés cela s'explique par le fait que son poids moléculaire est plus petit que les autres, concernant les autres composés la différence des valeurs de d est due au fait que ces composés se diffèrent par le groupement fonctionnel de substitué sur le ferrocène, d'ailleurs les molécules qui ont un poids moléculaire élevé donnent un coefficient de diffusion plus petit, la seule différence entre les molécule de meme groupe substitué est la position de groupement fonctionnel.

✓ **Calcul du pouvoir antioxydant $O_2^{\cdot-}$ %**

La technique de voltampérométrie cyclique a été utilisée pour générer le radical libre de l'anion superoxyde. En réduisant l'oxygène moléculaire dissout dans le DMF à la surface de diffusion de l'électrode de carbone vitreux, où l'oxygène moléculaire acquiert un électron pour être un groupe radical libre superoxyde anion $O_2^{\cdot-}$. Cette méthode est considérée comme le meilleur moyen de générer l'anion superoxyde sans avoir besoin d'un système enzymatique pour étudier son interaction avec d'autres molécules. Les dérivés ferrocéniques étudiés sont ajoutés au radical superoxyde dissout dans le DMF et les voltamogrammes ont été enregistrés. Il est facile de détecter l'existence de $O_2^{\cdot-}$ par le courant anodique mesuré pendant le balayage inverse à chaque concentration ajoutée du composé synthétisé au de standard.

En général, l'activité antioxydante des molécules étudiées est liée à leur capacité à donner un électron ou de l'hydrogène, à travers l'étude électrochimique des dérivés dans différents milieux organiques considérés comme un bon donneur d'électrons, en outre, ils sont inactifs dans la gamme potentielle de l'oxygène pour éviter l'interaction latérale ou toute complexité empêchant l'interprétation des résultats.

La capacité de produit testé pour piéger les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) est calculée en utilisant l'équation suivante [30]:

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

Où: Ip_0 et Ip_s sont l'intensité du courant de pic anodique de l'oxygène libre et lié avec le composé à tester

Le tableau suivant résume le pourcentage d'inhibition correspondante à chaque composé ajouté (standard ou préparé)

Tableau IV.12 : Valeurs des pourcentages d'inhibition de O₂% correspondante à chaque addition des dérivés synthétisés.

Composé	Volume ajouté (ml)	Concentration (g/l)	I _{pa} (μA/cm ²)	Pourcentage d'inhibition I%
Fc-tris	0,1	1,24892E-08	72,324	4,118
	0,2	2,48793E-08	69,966	7,244
	0,7	8,53836E-08	67,496	10,519
	1,8	2,10546E-07	65,999	12,504
	2	2,32207E-07	62,125	17,639
FM3FMA	0,2	2,04023E-08	61,003	3,677
	0,3	3,04825E-08	57,803	8,730
	0,6	6,02506E-08	56,512	10,769
	0,9	8,93291E-08	54,996	13,162
	1,1	1,08343E-07	52,058	17,801
	1,3	1,27069E-07	49,419	21,968
	1,5	1,45511E-07	48,166	23,947
DMAMF	0,1	1,63866E-08	64,184	4,509
	0,4	6,47721E-08	62,406	7,155
	0,5	8,06476E-08	60,404	10,133
	0,7	1,12028E-07	59,244	11,859
	0,9	1,42924E-07	58,57	12,862
	1,1	1,73346E-07	57,578	14,338
FM2 CIA	0,2	2,43743E-08	61,4	2,036
	0,3	3,64169E-08	60,208	3,938
	0,4	4,83647E-08	58,13	7,253
	0,5	6,02188E-08	57,698	7,942
	0,7	8,36502E-08	56,247	10,258
	0,9	1,0672E-07	55,077	12,124
	1,1	1,29436E-07	54,577	12,922
	1,2	1,40664E-07	54,42	13,173
	1,3	1,51806E-07	53,847	14,087
FM3CIA	E0,2	2,43743E-08	55,701	0,842
	0,3	3,64169E-08	55,116	1,883
	0,4	4,83647E-08	54,879	2,305
	0,5	6,02188E-08	53,765	4,288
	0,6	7,19803E-08	52,796	6,013
	0,7	8,36502E-08	50,488	10,122
	0,8	9,52297E-08	49,035	12,709

	0,9	1,0672E-07	47,785	14,934
	1	1,18121E-07	46,625	16,999
	1,1	1,29436E-07	45,398	19,183
Sel quaternaire	0,1	1,02155E-08	67,208	2,904
	0,2	2,035E-08	66,49	3,941
	0,5	5,02765E-08	64,844	6,319
	1	9,86193E-08	63,512	8,244
	1,5	1,45138E-07	62,164	10,191

Tableau IV.13 : Valeurs des pourcentages d'inhibition de O₂% correspondante à chaque addition des standards

Composé	Volume ajouté (ml)	Concentration (g/l)	Ipa (μA/cm ²)	Pourcentage d'inhibition I%
BHA	0,0	/	321,915	/
	0,1	2,22.10 ⁻⁶	311,505	3,234
	0,2	4,44.10 ⁻⁶	304,203	5,502
	0,4	8,88.10 ⁻⁶	293,242	8,907
	0,6	1,33.10 ⁻⁵	290,867	9,645
	0,7	1,55.10 ⁻⁵	284,11	11,744
	0,8	1,77.10 ⁻⁵	272,239	15,431
	1	2,22.10 ⁻⁵	269,19	16,379
AG	0,0	/	308,759	/
	0,2	1,17.10 ⁻⁶	306,251	0,812
	0,3	1,76.10 ⁻⁶	300,224	2,764
	0,4	2,35.10 ⁻⁶	297,302	3,711
	0,5	2,94.10 ⁻⁶	292,91	5,133
	0,8	4,70.10 ⁻⁶	278,167	9,908
	0,9	5,29.10 ⁻⁶	276,144	10,563
	1	5,88.10 ⁻⁶	273,152	11,532

À partir des valeurs obtenues dans les tableaux IV.12,13, on peut obtenir la droite de régression de changement de pourcentage d'inhibition O₂-. % en fonction de concentration massique de composés ferrocéniques ou de standards.

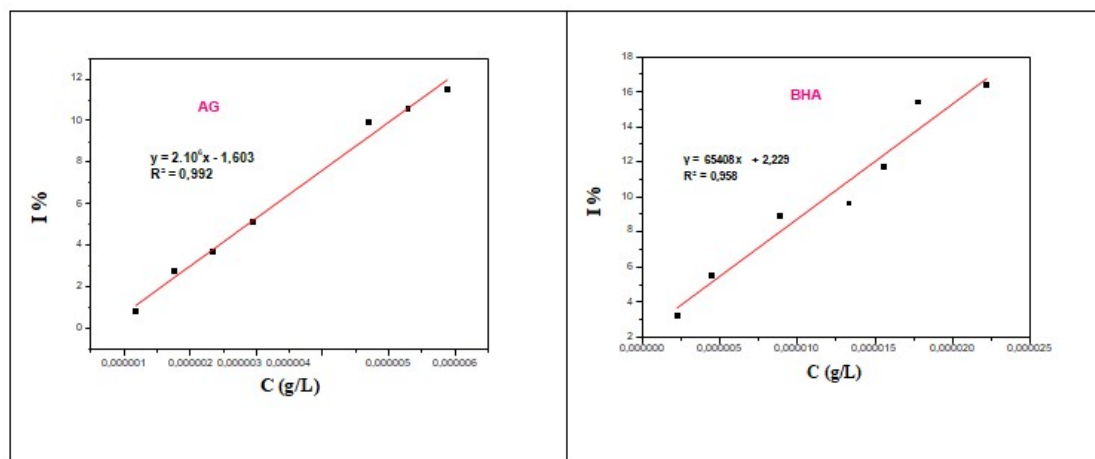


Figure IV.22 : Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de AG, BHA

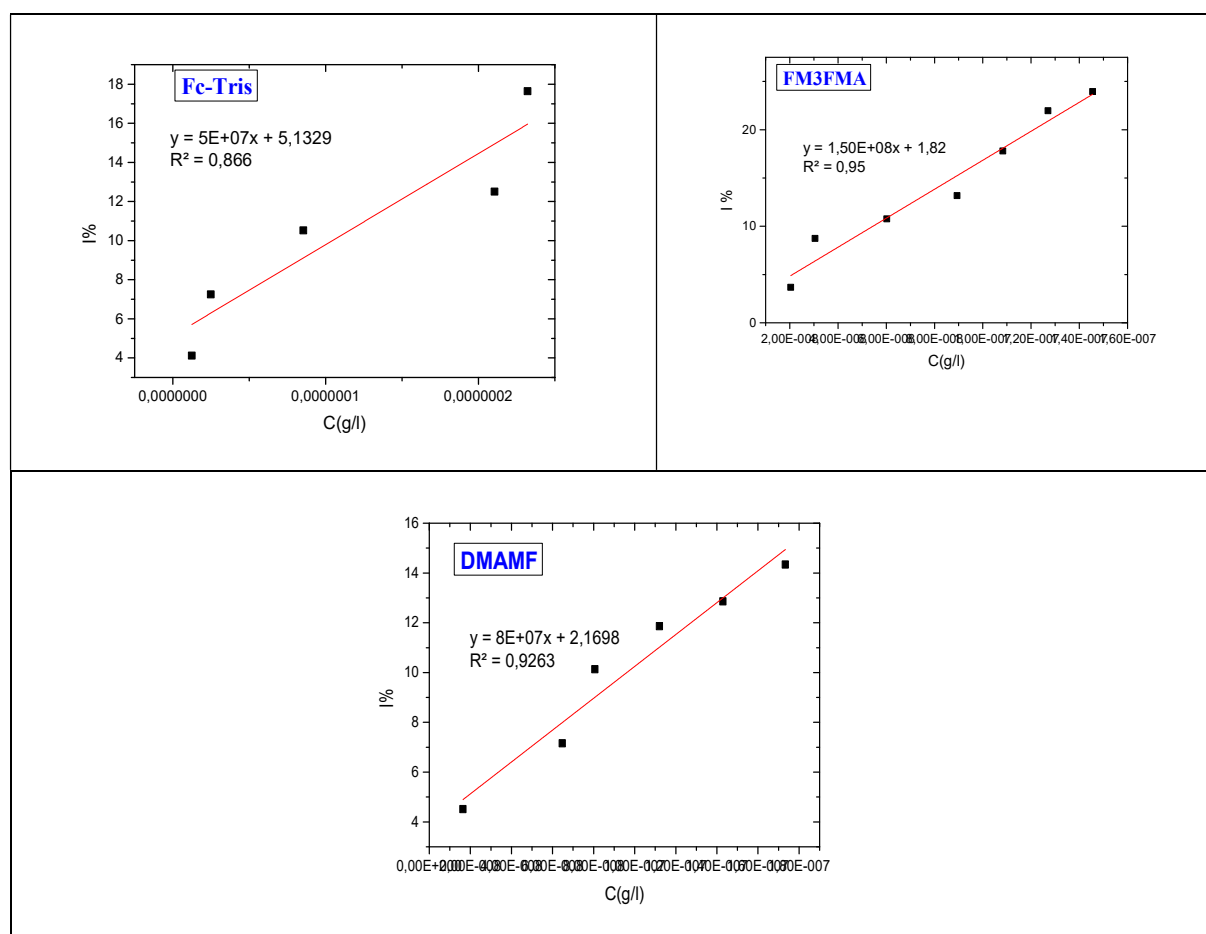


Figure IV.23 : Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de chaque DF

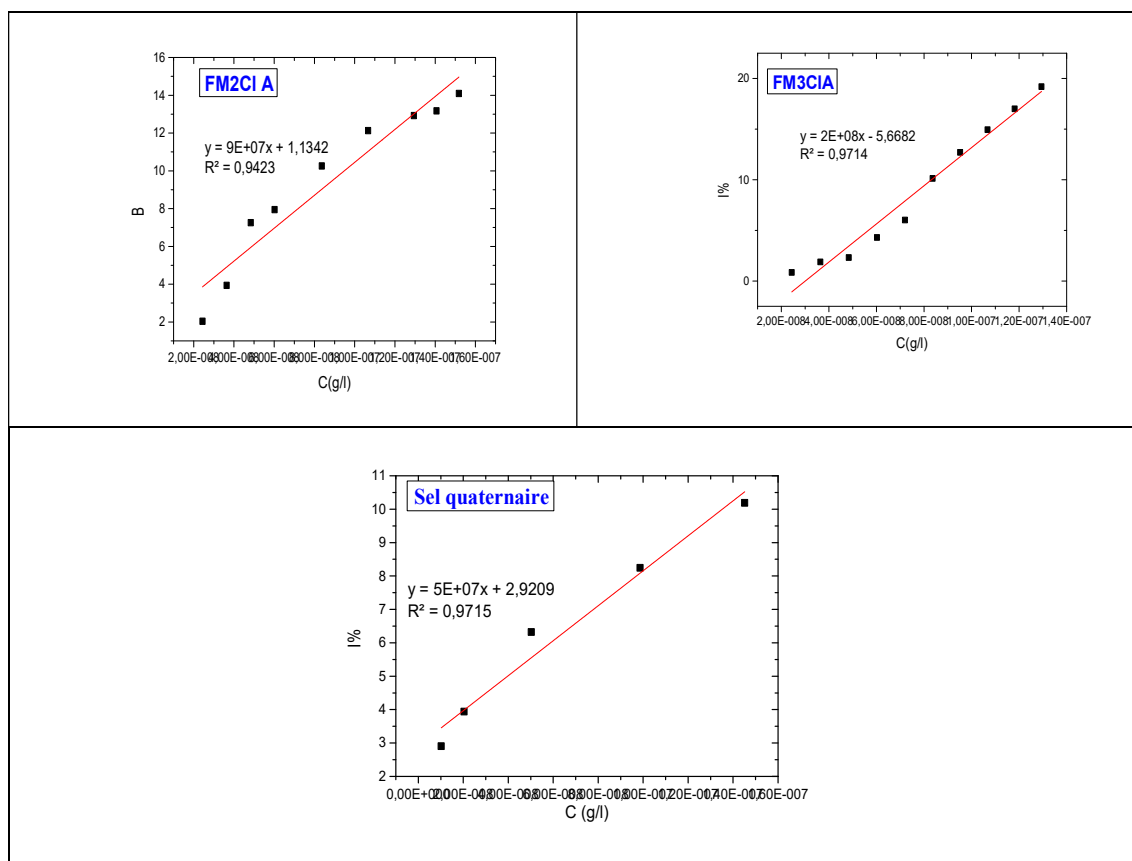


Figure IV.24 : Droite de régression des variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de chaque DF

Les valeurs de IC₅₀ ont été calculé à partir des droites de régression du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration massique de composés ou de standard, le tableau suivant présente les valeurs obtenues

Tableau IV.14 : Valeurs d'IC₅₀ de chaque dérivé

Composé	Equation	R ²	IC ₅₀
AG	$y = 2 \cdot 10^6 x - 1,603$	0,992	$2,58 \cdot 10^{-5}$
BHA	$y = 65408x + 2,229$	0,958	$7,35 \cdot 10^{-5}$
Fc-tris	$Y = 5 \cdot 10^7 x + 5,1329$	0,866	$5,26 \cdot 10^{-4}$
FM3FMA	$y = 1,5 \cdot 10^8 x + 1,82$	0,951	$3,21 \cdot 10^{-7}$
FM2CLA	$Y = 9 \cdot 10^7 x + 1,134$	0,942	$5,429 \cdot 10^{-7}$
FM3CIA	$Y = 2 \cdot 10^8 x - 5,668$	0,971	$2,783 \cdot 10^{-7}$
DMAMF	$Y = 8 \cdot 10^7 x + 2,169$	0,9263	$5,97 \cdot 10^{-7}$
Sel quaternaire	$Y = 5 \cdot 10^7 x + 2,92$	0,97	$9,416 \cdot 10^{-7}$

Les valeurs de IC₅₀ montrent que la capacité antioxydante du composé FM3ClA est plus élevée que les autres composés et même les standards, sachant que la diminution de la valeur de IC₅₀ est proportionnelle de l'augmentation de l'efficacité antioxydante de composé.

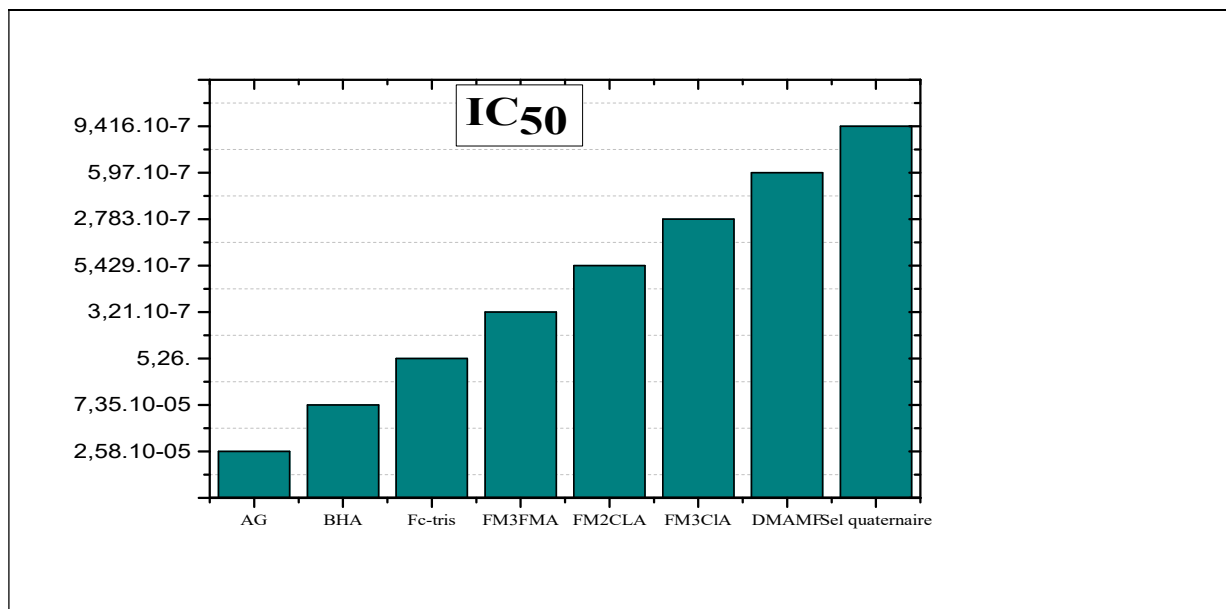


Figure IV.25 : Histogramme de la variation des valeurs d'IC₅₀ des composés standard et synthétisés.

A partir des voltamogrammes cycliques de l'oxygène en présence des dérivés ferrocéniques étudiés, on peut remarquer que tous ces dérivés montrent une activité antioxydante vis-à-vis l'anion radical superoxyde, et ça se traduit par la diminution des intensités des courants d'oxydation d'oxygène. FM3ClA possède la plus petite des IC₅₀ avec une valeur de 2,783.10⁻⁷, c'est-à-dire l'activité antioxydante la plus élevée tandis que Fc-tris possède la plus mauvaise capacité de piégeage du radical superoxyde avec un IC₅₀ de 5,26.10⁻⁴. Sachant que ces valeurs d'IC₅₀ sont loin de ceux des antioxydants standards.

✓ Discussion

Les résultats obtenus par la méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* est le test de piégeage de radical O₂^{•-}. Les résultats montrent que ces dérivés ont une activité antioxydante contre l'anion radical superoxyde, traduite par la diminution de l'intensité de pic anodique de courant d'oxydation d'oxygène en augmentant la concentration de substrat antioxydant (dérivé ferrocénique et standards). Cette diminution de pic du courant anodique d'O₂^{•-} suggère que le dérivé ferrocénique réagit de manière irréversible avec O₂^{•-}.

D'après la valeur d'IC₅₀ obtenue de la FM2ClA on peut constater que ce dérivé possède une très forte activité antioxydante en comparaison avec l'activité de l'acide gallique. Nos résultats obtenus sont comparables à ceux trouvés dans la littérature [30].

IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante in vivo.

Les dérivés ferrocéniques sont des cibles étudiées pour des thérapies anti-prolifératives. Pour bien conforter cette thèse, les données *in vitro* sur certains dérivés sont bien décrites dans la littérature. En revanche les publications sur les études *in vivo* sont très rares et peu documentées.

IV.4.1. Matériels et méthodes

Produits chimiques et matériels utilisés pour l'étude *in vivo*

- | | |
|--|--|
| ✓ NH ₄ Cl | ✓ DMF |
| ✓ 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) | ✓ Trishydroxyméthylaminométhane (Tris) |
| ✓ Bleu de Coomassie | ✓ Métribuzine |
| ✓ Acide salicylique | ✓ Cisplatine |
| ✓ Butylhydroxytoluène (BHT) | ✓ Sodium DodecylSulfat (SDS) |
| ✓ Acide thiobarbiturique (TBA) | ✓ Ethanol |
| ✓ Acide trichloroacétique (TCA) | ✓ Méthanol |
| ✓ MgCl ₂ | ✓ NaHCO ₃ |
| ✓ le tween 80 | ✓ Chlorure de sodium (NaCl) |
| ✓ UV-Vis spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU) cuves en Quartz. | ✓ Chlorure de potassium (KCl) |
| ✓ pHmètre 210 MeterLAB | ✓ KH ₂ PO ₄ |
| ✓ Formol 35% | ✓ Eau Ultra pure et eau bi-distillée. |
| ✓ Glutathion réduite (GSH) | ✓ Acide éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) |
| ✓ 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) | |

Les animaux

Nous avons utilisé vingt-cinq rats femelles, de type *Wistar albinos* pesant entre 140 à 150 g, apportés de l'institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été hébergés dans des cages portant les noms des lots, les traitements subissent et les dates d'expérimentations. Le traitement des rats se fait après une période d'adaptation de 25 jours, à température ambiante ayant l'accès libre à l'eau potable et l'alimentation standard.

Méthodes

- Traitement des rats

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

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

Lot 2 (TP) : Rattes à l'exposition au métribuzine solubilisé dans l'eau potable (30mg/Kg) durant 50 jours.

Lot 3 (D_{0.1}) : Rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par dose 0.1 mg/kg de dérivé ferrocénique solubilisé dans l'eau physiologique pendant 7 jours.

Lot 4 (D_{0.2}) : Rattes à l'exposition au métribuzine durant 50 jours et traitées par dose 0.2 mg/kg de dérivé ferrocénique solubilisé dans l'eau physiologique pendant 7 jours.

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

- Sacrifice et prélèvement du sang et des organes

Les rattes sont anesthésiées par chloroforme (94%) après 15h de jeûne et puis sacrifiées. Le prélèvement sanguin s'effectue au moment de sacrifice dans des tubes secs pour les analyses biochimiques et des tubes héparinés pour l'analyse d'alphafoetoprotéine (AFP).

Les foies, les reins, les coeurs et les poumons sont prélevés, rincés avec l'eau distillé ensuite avec du NaCl 0,9% puis pesés. Une partie des organes est utilisé pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé dans le formol 35% pour les coupes histologique.

- Dosage des paramètres de stress oxydatif

Le dosage des paramètres de stress oxydatif (protéines, glutathion réduit, glutathion-s-transférase et MDA) a été réalisé selon la littérature [21].

Préparation des homogénats tissulaire

Nous pésons 1 g de tissu des organes (foie, reins, coeur et poumon) de chaque ratte. Ensuite le broyage et l'homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), la suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 3000 trs/min pendant 15 minutes. Puis le surnageant obtenu est conservés dans la glace pour les dosages des paramètres du stress oxydatif.

IV.4.2. Résultats et Discussion

IV.4.2.1. Effet de traitement des rats par le FcTris et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine

Les poids relatifs de ces organes sont calculés comme suit :

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

Tableau IV.15: Poids relatif des organes (foie, reins, cœur, poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres		T	TP	D _{0.1}	D _{0.2}	Cispt
Poids Relative (%)	Foie	3,49 ±0,195	4,514±0,19 3*	3,608±0,175 ^a	3,158±0,08 6 ^b	3,092±0,067 ^b
	Reins	0,621±0,02 1	0,735±0,03 9 ^{NS}	0,662±0,027 ^{NS}	0,612±0,00 7 ^a	0,618 ±0,032 ^{NS}
	Cœur	0,367±0,03 3	0,366±0,02 9 ^{NS}	0,363±0,004 ^{NS}	0,353±0,01 9 ^{NS}	0,346±0,023 ^{NS}
	Poumon	0,867±0,04 7	0,896±0,06 6 ^{NS}	1,112±0,254 ^{NS}	0,836±0,04 5 ^{NS}	0,679 ±0,036 ^{NS}

Moy ± ESM de 5 rattes de chaque groupe.

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

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

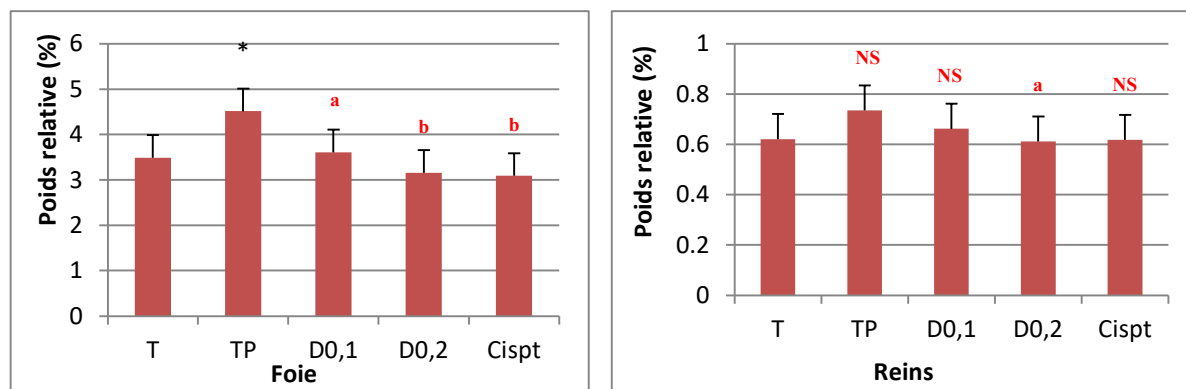


Figure IV.26 : Poids relatif des organes (foie et reins) chez les différents groupes expérimentaux.

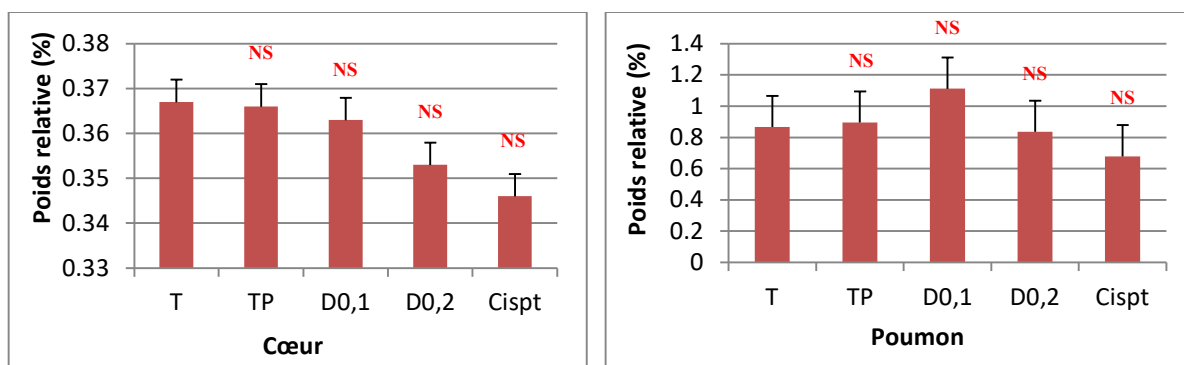


Figure IV.27 : Poids relatif des organes (cœur et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

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

IV.4.2.2. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les rattes exposées au métribuzine

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

Tableau IV.16 : Concentrations des marqueurs biochimiques chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres	T	TP	D _{0.1}	D _{0.2}	Cispt
Glycémie	1,0260 ± 0,0792	1,7920±0,0275*	1,1080±0,0537 * ^{NS}	1,1820±0,0779 ^{NSb}	1,220 ±0,194 ^{NS a}
Urée	0,3740 ±0,0189	0,43 ± 0,0141*	0,414± 0,0103 ^{**b}	0,41 ±0,0276 ^{NSb}	0,376 ±0,0081 ^{NS a}
Créatinine	5,560 ±0,441	6,3± 0,268 *	5,600 ± 0,358 ^{*b}	5,060 ± 0,112 ^{NSb}	6,240 ± 0,415 ^{NS a}
Acideurique	31,80 ± 2,01	38,20 ± 1,24*	37,40 ±1,47 ^{*b}	27,60 ± 0,51 ^{NS b}	38,80 ± 0,80 ^{NS a}
TGO	190,00 ±3,41	227,40 ±0,24***	132,20 ± 0,97*** ^c	184,20 ± 1,61 ^{NS c}	186,80 ±1,02 ^{NS c}
TGP	121,40 ± 2,58	188,00 ± 2,75*	100,20 ± 0,73 ^{***a}	110,00 ± 0,75 ^{NS c}	114,8 ± 0,374 ^{NS c}
Fersérique	2,510 ± 0,151	0,508 ±0,131 **	1,726 ±0,079 ^{*a}	2,386 ±0,0719 ^{NS b}	2,302±0,0948 ^{NS c}
Calcémie	96,80 ± 1,53	65,6± 0,75***	91,80 ±0,51 ^{*a}	95,00± 0,45 ^{NS c}	93,00 ±0.5 ^{NS c}
Phosphatase alcalines	100,00±0,374	172,2 ±0,451***	121,0±0,443 ^{*** c}	101,0±0,128 ^{NS c}	103,0 ± 1,41 ^{NS c}
AFP (alpha-foetoprptéin)	0,14±0,0071	0,54±0,0354***	0,29±0,0134 ^{***b}	0,282±0,0172 ^{***b}	0,263±0,0114 ^{***b}

Moy ± ESM de 5 rattes de chaque groupe.

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

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

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

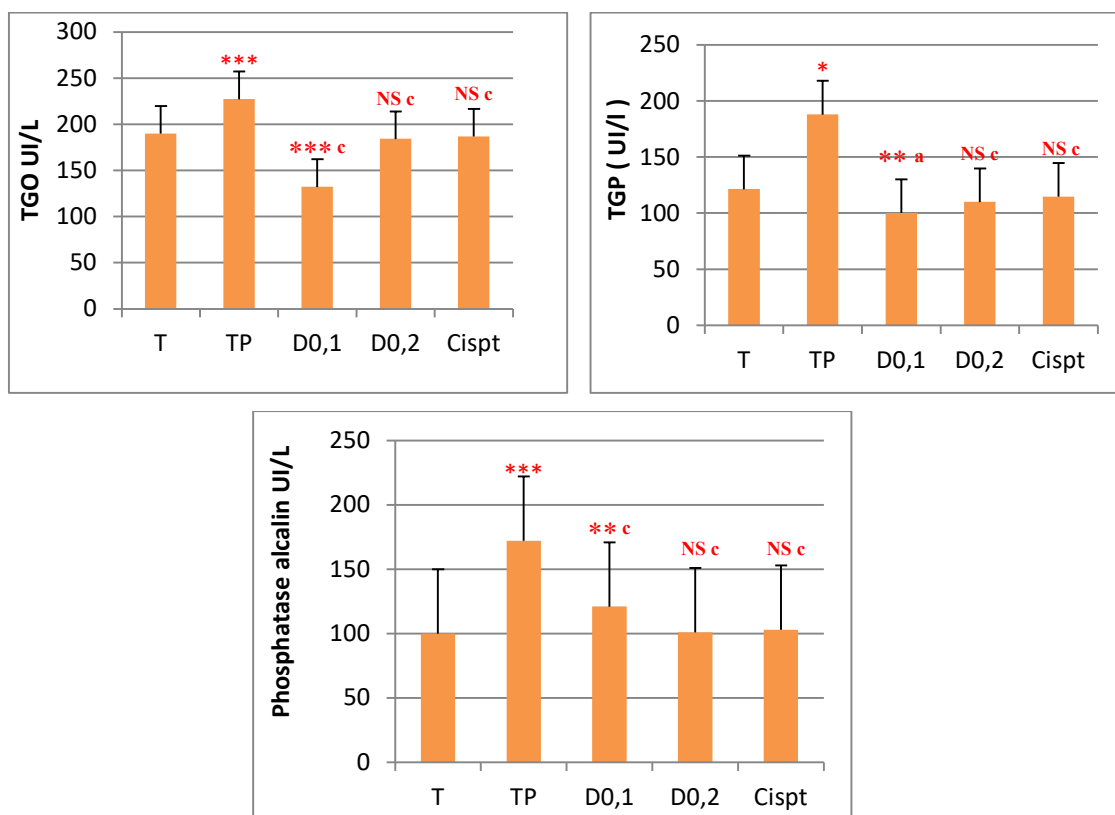


Figure IV.28 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP) et le taux de PAL chez les rattes exposées au métribuzine.

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

- Effet sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique)

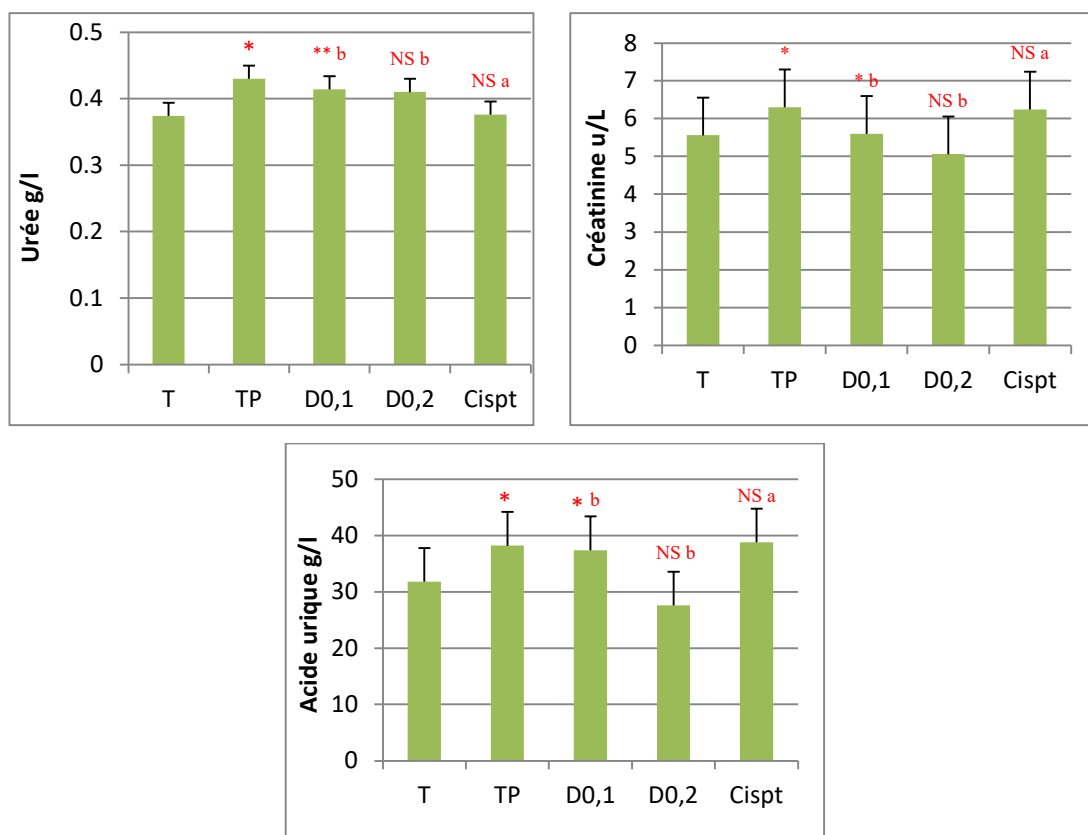


Figure IV.29 : Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine et acide urique) chez les rattes exposées au métribuzine.

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

- Effet sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium

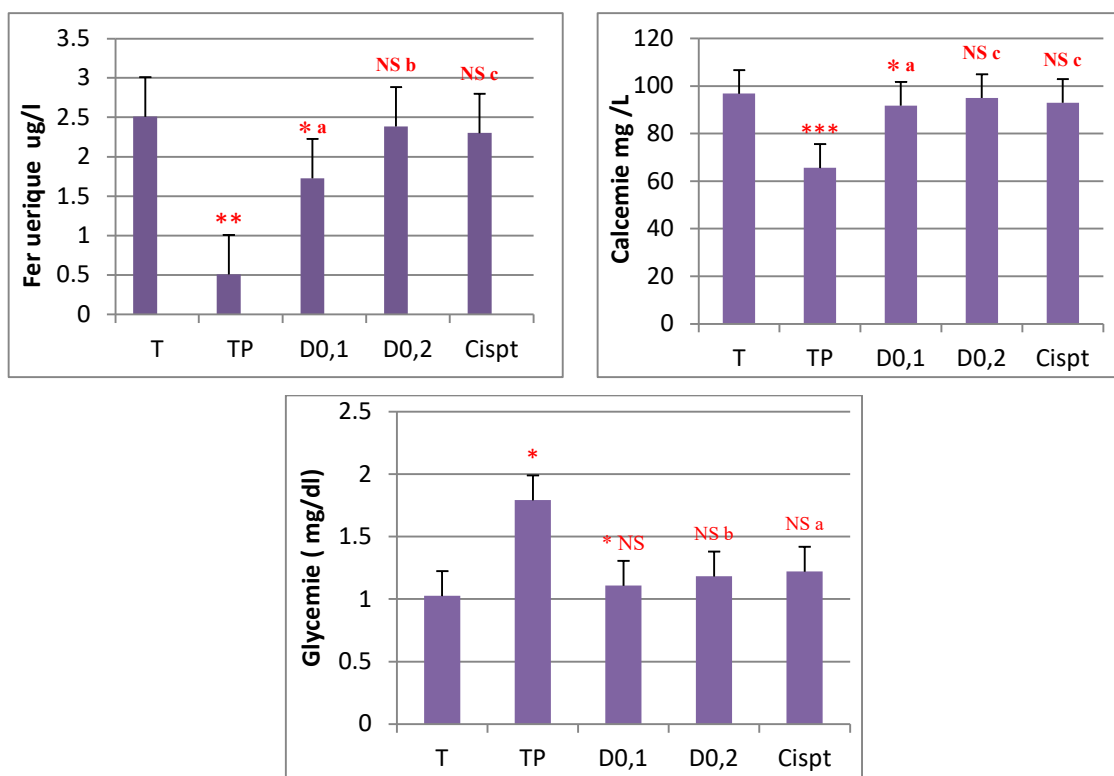


Figure IV.30: Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations sériques de glucose, de fer et de calcium chez les rattes exposées au métribuzine.

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

- Effet sur le marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine “AFP”)

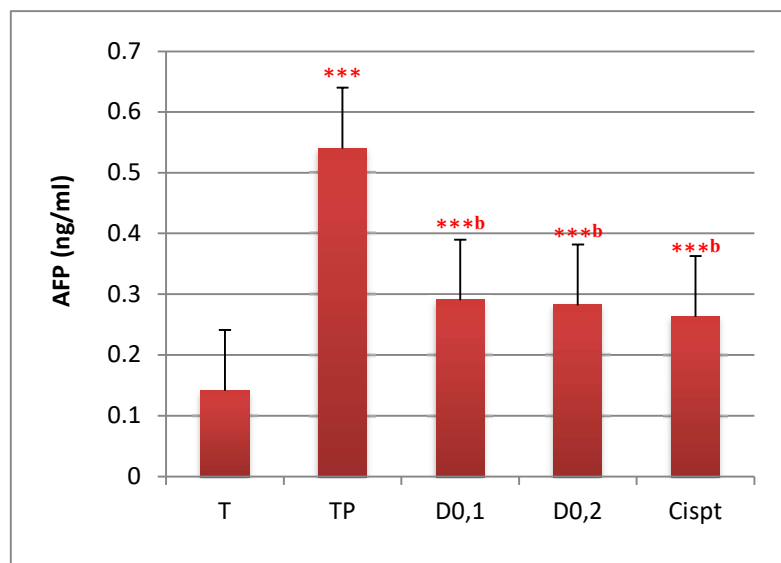


Figure IV.31: Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les concentrations de marqueur tumoraux (alpha-feotoprotéine “AFP”) chez les rattes exposées au métribuzine.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des rattes au métribuzine **provoque** une augmentation très hautement significative de concentration de AFP ($p < 0.001$) par rapport aux rattes saines. Ainsi le traitement des rattes par des doses de 0.1 et 0.2 mg/kg de FcTris et par le cisplatine provoque une diminution hautement significative des concentrations de AFP ($p < 0.01$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

IV.4.2.3. Effet de traitement par le FcTris et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine

Après 50 jours d'exposition des rattes au métribuzine sont traitées par le FcTris (des doses 0.1 et 0.2 mg/kg) et le cisplatine pendant 7 jours, dans les organes prélevés ont été effectués les tests des stress oxydatifs (Malondialdéhyde « MDA », glutathion réduit « GSH » et l'activité de Glutathion S Transférase « GST »).

Tableau IV.17 : Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA), glutathion réduit (GSH) et l'activité de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux.

Paramètres		T	TP	D _{0.1}	D _{0.2}	Cispt
MDA (μM/mg prot)	Foie	0,518±0,128	1,228±0,168 [*]	0,585±0,095 ^{NS c}	0,534±0,014 ^{NS a}	0,582±0,046 ^{NS a}
	Reins	0,85±0,069	1,19±0,035 [*]	0,7714±0,025 ^{NS b}	0,7618±0,066 ^{NS c}	0,7894±0,051 ^{NS b}
	Cœur	0,468±0,031	0,448±0,0247 ^{NS}	0,4160±0,026 ^{NS}	0,376±0,116 ^{NS}	0,414±0,12 ^{NS}
	Poumon	0,2734±0,031	0,5658±0,032 ^{**}	0,3204±0,017 ^{NS b}	0,247±0,039 ^{NS b}	0,2678±0,046 ^{NS a}
GSH (nM/mg prot)	Foie	0,2724±0,002	0,248±0,0318 ^{NS}	0,244±0,0085 ^{NS}	0,279±0,0018 ^{NS}	0,216±0,0094 ^{NS}
	Reins	0,2322±0,034	0,1363±0,013 [*]	0,1914±0,022 ^{NS a}	0,2608±0,026 ^{NS a}	0,2518±0,025 ^{NS a}
	Cœur	0,295±0,0318	0,237±0,0069 ^{NS}	0,216±0,0237 ^{**NS}	0,2412±0,0305 ^{NS}	0,2312±0,0185 ^{*NS}
	Poumon	0,6092±0,0866	0,2492±0,0174 [*]	0,462±0,105 ^{NS}	0,2324±0,0072 ^{*NS}	0,2742±0,0216 ^{*NS}
GST (nM/min/mg prot)	Foie	14,18±0,712	9,428±0,082 [*]	11,458±0,723 ^{NS}	12,74±0,092 ^{NS c}	9,36±0,702 ^{**NS}
	Reins	7,53±0,603	2,686±0,575 [*]	6,67±0,747 ^{*c}	6,608±0,718 ^{NS a}	4,276±0,73 ^{*NS}
	Cœur	4,154±0,718	1,65±0,492 ^{**}	3,256±0,763 ^{NS b}	3,308±0,779 ^{NS b}	2,298±0,603 ^{*a}
	Poumon	2,592±0,419	2,414±0,394 ^{NS}	2,544±0,407 ^{NS}	2,578±0,286 ^{NS}	2,098±0,342 ^{NS}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. a, b, c, d, e, indiquent les différences significatives obtenues entre les différents groupes (p < 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test K student. Moy ± ESM de 5 ratte de chaque group.

^{*}p < 0.05; ^{**}p < 0.01; ^{***}p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

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

✓ Effet sur la concentration tissulaire de Malondialdéhyde (MDA)

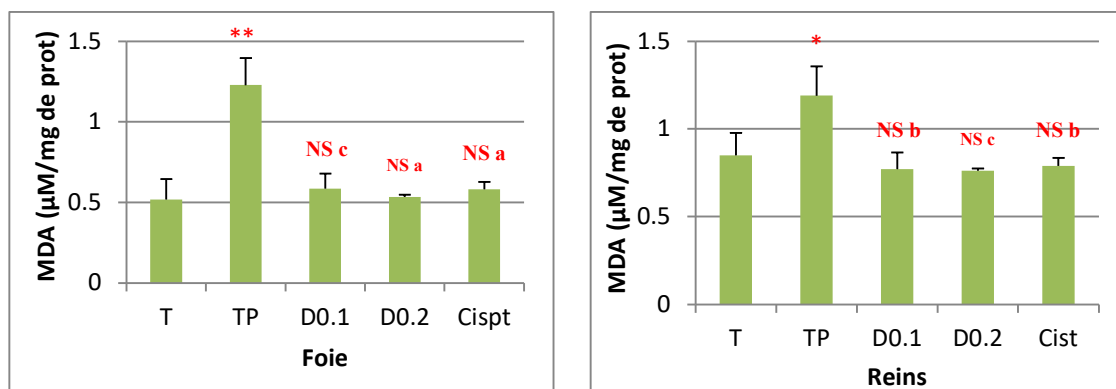


Figure IV.32 : Concentrations hépatique et rénale de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.

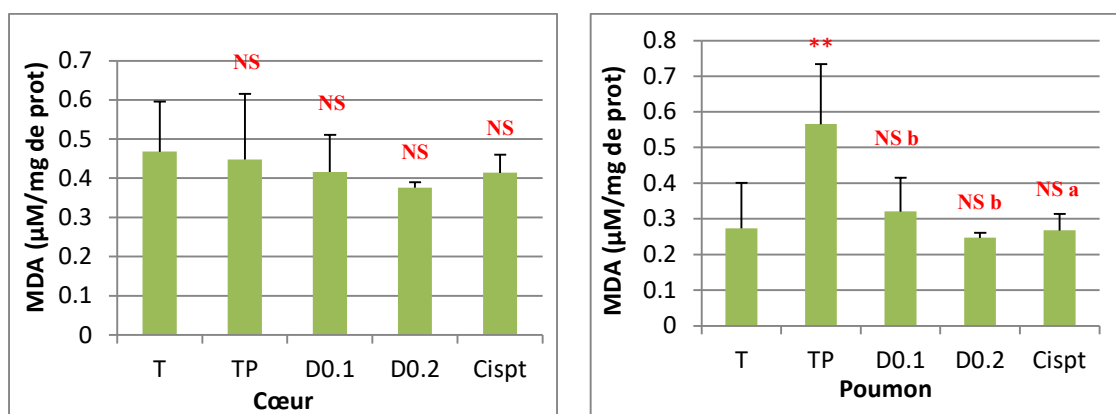


Figure IV.33 : Concentrations cardiaque et pulmonaire de Malondialdéhyde (MDA) chez les différents groupes expérimentaux.

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

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

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

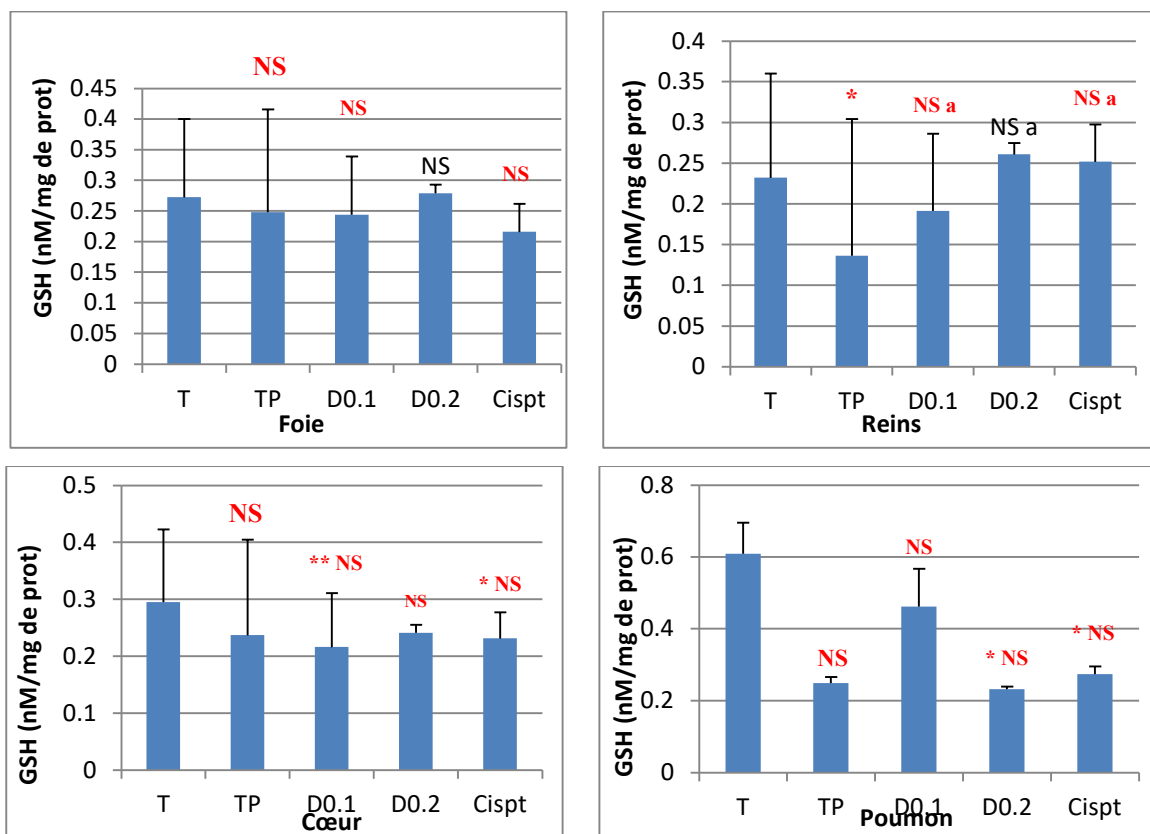


Figure IV.34 : Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des rattes au métribuzine **provoque** une diminution non significative de la concentration hépatique, pulmonaire et cardiaque de GSH ($p>0.05$), une diminution significative de la concentration rénale de GSH ($p<0.05$), par rapport aux rattes saines. Les résultats montrent aussi que le traitement des rattes par une dose de 0.1 mg/kg de Fc-Tris provoque une diminution non significative de la concentration hépatique et cardiaque de GSH ($p>0.05$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire de GSH ($p>0.05$) et une augmentation significative de la concentration rénale de GSH ($p<0.05$). En parallèle, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation non significative de la concentration hépatique et

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

✓ Effet sur la concentration tissulaire de Glutathion S Transférase (GST)

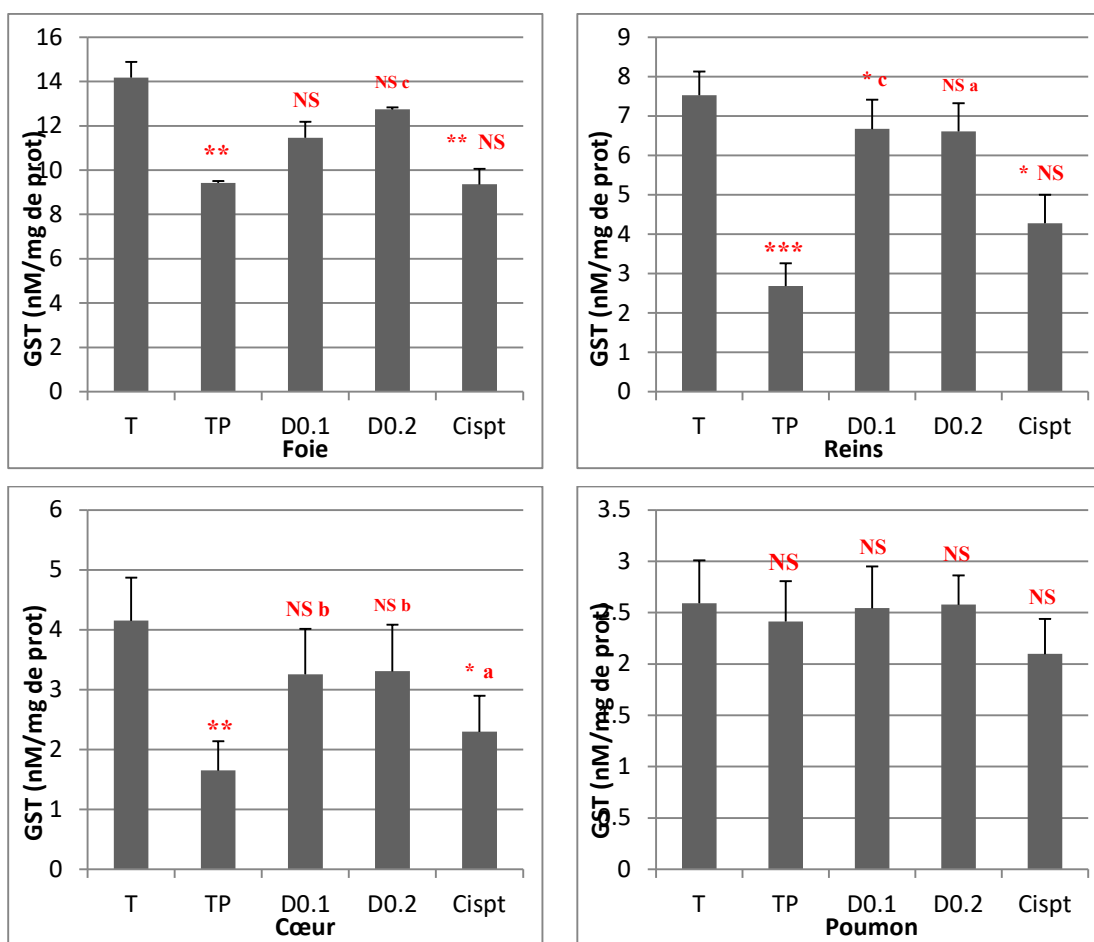


Figure IV.35 : Concentrations tissulaires de Glutathion S Transférase (GST) chez les différents groupes expérimentaux

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une diminution hautement significatif de la concentration hépatique et cardiaque de GST ($p<0.01$), une diminution très hautement significative de la concentration rénal de GST ($p<0.001$) et une diminution non significative de concentration pulmonaire de GST ($p>0.05$) par rapport aux rattes saines. Les résultats montrent aussi que le traitement des rattes par une

dose de 0.1 mg/kg de FcTris provoque une augmentation non significative de la concentration hépatique et pulmonaire de GST ($p>0.05$), une augmentation très hautement significative de la concentration rénale de GST ($p<0.001$) et une augmentation hautement significative de la concentration cardiaque de GST ($p>0.01$). En parallèle, le traitement par une dose de 0.2 mg/kg de FcTris provoque une augmentation très hautement significative de la concentration hépatique de GST ($p<0.001$), une augmentation significative de la concentration rénale de GST ($p<0.05$), une augmentation hautement significative de la concentration cardiaque de GST ($p<0.01$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire de GST ($p>0.05$). En revanche, le traitement par le cisplatine provoque une diminution non significative de la concentration hépatique de GST ($p>0.05$), une augmentation non significative de la concentration pulmonaire et rénal de GST ($p>0.05$) et une augmentation significative de la concentration cardiaque de GST ($p<0.05$) par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide).

IV.3.2.2.4. Etude histologique du foie

Les foies de tous les lots sont prélevés. Ils doivent être rapidement prélevés pour éviter son autolyse qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau distillé ensuite avec du NaCl 0,9%, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 30% pour l'étude histologique.

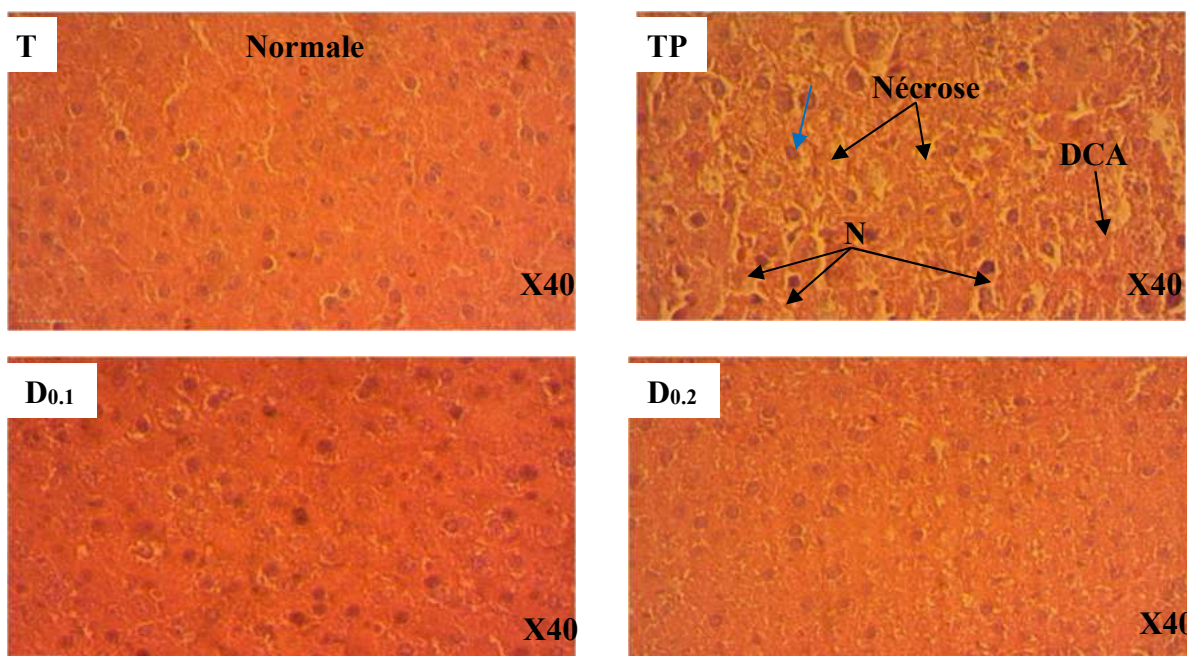


Figure IV.36 : Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, agrandissement x40, (T) foie de ratte témoin ; (TP) foie de ratte exposé au métribuzine sans traitement ; (D0.1) foie de ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 0.1 mg/kg de FcTris ; (D0.2) foie de ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 0.2 mg/kg de FcTris, N : noyau pycnotique, DCA : débris cellulaire amorphe, flèches bleues : hémorragie.

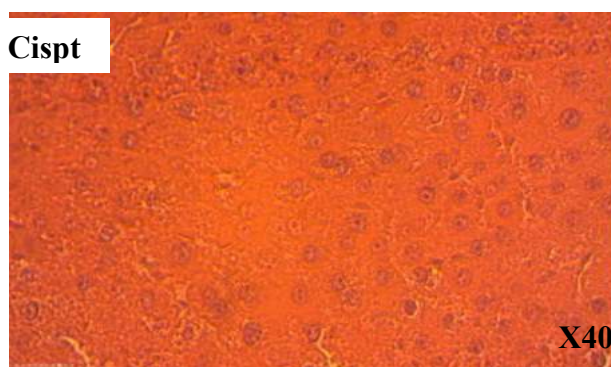


Figure IV.37 : Observation microscopique d'une coupe histologique de foie de ratte exposé au métribuzine et traité par cisplatine, agrandissement x40.

L'étude histologique du foie montrent la présence de nécrose tumorale indiquées par les flèches noires (N : noyau pycnotique, DCA : débris cellulaire amorphe), et la présence de zone d'hémorragie indiquée par flèche bleue dans la coupe histologique de foie de ratte exposé au métribuzine pendant 50 jours sans traitement (TP). En revanche, les coupes histologiques de foie des rattes exposées au métribuzine pendant 50 jours et traitées par les deux doses de dérivé ferrocénique « FcTris » (D_{0.1}, D_{0.2}) et par le cisplatine (Cispt) ne présentent aucun problème leur aspect est semblable à celle de témoin (T).

IV.5. Discussion

La base de notre choix pour ce composé c'est pour la contribution à l'amélioration d'un traitement efficace avec moins d'effet secondaire nous avons mené à essayer de valoriser ce dérivé ferrocénique à travers l'étude de l'aspect scientifique de l'effet thérapeutique. Parmi les paramètres étudiés, l'augmentation remarquable du poids relatif de foie nous indique une hépatomégalie provoquée par le pesticide. Une autre étude chez les souris mâles est comparable avec nos résultats, car celles-ci montrent que l'augmentation du poids du foie aboutit une apparition d'une tumeur du foie [31]. En revanche, le traitement par le FMA et le cisplatine par voie intra-péritonéale aux rattes intoxiquées par métribuzine a entraîné une amélioration de poids relatif des organes spécifiquement le foie. Cela peut être dû à l'effet protecteur de ces molécules qui pourrait être dû à leurs propriétés antiproliférative et antioxydante [32].

L'administration de la métribuzine induit plusieurs changements métaboliques. Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative des teneurs sériques en glucose chez les rats exposés aux métribuzine ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamohypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à l'activation du système orthosympathique, la réaction dans le système limbique actif l'hypothalamus pour

produire la corticolibérine (CRH). Ce dernier stimule l'hypophyse pour libérer l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui est un activateur de glandes surrénales pour la production et la sécrétion de cortisol dans le sang qui conduisent à du grand catabolisme du glycogène hépatique [33]. Ces résultats sont en accord avec d'autres auteurs qui sont utilisé d'autres pesticides [34, 35].

L'urée et la créatinine sont des produits finals du catabolisme des protéines dans le foie et les muscles, ils sont filtrés par les reins et ensuite sont éliminées par les urines, ils sont considérés comme des indicateurs de la dysfonction rénal. En effet, le traitement par le Fc-tris et le cisplatine a diminué la concentration sérique de glucose et a restauré la fonction rénale. Cela explique la capacité de ces molécules à protéger contre les dommages rénaux induits par le les pesticides [36].

L'administration journalière de la métribizine pendant 50 jours provoque une augmentation des transaminases qui sont considérées comme des indicateurs des dommages oxydatifs entraînant par la suite des changements de perméabilité et la fuite des enzymes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres travaux utilisant différents pesticides [36, 38].

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate en plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire. Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le plasma des rattes recevant le métribuzine et une diminution des activités de la PAL dans différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmatique ou à la nécrose cellulaire, montrant l'état d'un stress dans l'animal. L'augmentation de l'activité de PAL chez les rattes provoqué par le métribuzine D'autres études ont aussi montré l'augmentation de l'activité de PAL suite à l'exposition aux insecticides carbamates [39].

Nos résultats montrent une augmentation de taux de l'Alpha-foetoprotéine (AFP) chez les lots qui exposé, AFP est une glycoprotéine foetale [40]. Elle est sécrétée par le sac vitellin puis essentiellement par le foie. Sa concentration sérique diminue rapidement après l'accouchement et sa synthèse est réprimée après la naissance. En effet, la concentration sérique est corrélée à la masse tumorale. Il est considéré comme un marqueur du carcinome hépatocellulaire [41]. En revanche, le traitement des rattes par le Fc-tris et le Cisplatine a diminué le taux d'AFP. Cela explique l'effet anticancéreux de Cisplatine et de Fc-tris.

Le stress oxydatif a été suggéré comme un des principaux mécanismes de toxicité provoquer par le pesticide. Il est important de noter que les organes exercent correctement leurs fonctions dans un état d'équilibre par une balance oxydants / antioxydants. En effet,

l'activité des Organes est suivie de la formation de radicaux libres et de composés oxydés. Ces derniers sont normalement neutralisés par les substances antioxydantes intracellulaires, ce qui permet de maintenir un statut Redox normal favorisant une activité optimale. Dans le cas où les oxydants dépassent la capacité de défense antioxydante, la cellule se trouve dans un état de stress oxydatif altérant ses activités et pouvant entraîner la mort cellulaire.

Nous avons mesuré le taux MDA comme marqueurs des oxydants, et le taux du glutathion réduit (GSH) et le (GST) comme marqueurs de la défense antioxydante. Ainsi, les résultats de notre travail montrent l'existence d'un stress oxydant intracellulaire qui se manifeste par une augmentation des taux MDA, et une chute significative des teneurs en glutathion réduit (GSH) dans les organes exposés au Métribuzine. La métribuzine est capable d'induire un stress oxydatif intracellulaire [44]. La réduction du GSH pourrait être due à un piégeage des radicaux libres produits en excès dans les organes. Données antérieures montrent une augmentation de la concentration de MDA tissulaire chez des rats exposés à des faibles doses de la métribuzine [42]. Les niveaux réduits de GSH chez les rats traités par la métribuzine ont été observés dans les reins. Cela pourrait être le résultat de la plus grande utilisation de GSH pour la conjugaison et/ou de la participation du GSH en tant qu'antioxydant dans la neutralisation des radicaux libres produits en raison de la toxicité des pesticides. Le résultat de notre travail de la diminution du glutathion induite par la métribuzine dans le rein rejoint aux résultats d'autres auteurs à titre d'exemple [43] qui confirme *in vivo* la diminution du taux de GSH rénal chez les rats allaitants traités par du cobalt. Il est bien connu que les enzymes antioxydantes peuvent être désactivées dans des conditions d'oxydations élevées, lorsque les radicaux libres sont produits en grande quantité par les cellules.

Afin de confirmer l'effet thérapeutique de notre dérivé ferrocénique au niveau tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques de foie. En effet, le foie est le principal organe cible par la métribuzine. Leur étude histologique chez le groupe exposé à la métribuzine pendant 50 jours sans traitement montre la présence d'hémorragie et de nécrose tumorale qui est histologiquement définie par la présence de débris cellulaires amorphes habituellement intriqués à des polynucléaires neutrophiles [45, 48]. Cependant, le traitement par le FcTris avec les deux doses (0.1, 0.2 mg/kg) et par la cisplatine au groupe exposé à la métribuzine a entraîné une amélioration du tissu hépatique en inhibant la progression tumorale et donc, pas de nécrose tumorale. Cet effet protecteur des hépatocytes observé pourrait être dû à l'activité antioxydante importante du Fc-tris. Nos résultats confirment donc l'effet protecteur de FMA expliqué par sa capacité à protéger les dommages cellulaires contre le stress oxydatif comparable à celui de la cisplatine [46, 47].

Références bibliographiques

- [1] Delattre, j., Beaudoux, j. and Bonnefont-rousselot, d. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. 1st ed. Paris: Éditions Tec & doc.
- [2] Philippe BOTHOREL(2011), Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale& Intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie.Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université de Limoges
- [3] SAHNOUN Z, JAMOSSI K, ZEGHAL KM. (1997). Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. Therapie. Jul-Aug;52(4):251-70.
- [4] Kunwar A, Priyadarsini KI.(2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. J Med Allied Sci 2011;1:5360.
- [5] Jadot, G. (1994). Antioxydant et vieillissement. Ed, John Libbey Eurotext: Paris. P34.
- [6] Davies KJ.(1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp;61:131.
- [7] Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A (2007) Phytochemical antioxidants for health and medicine: A move towards nature. Biotechnol Mol Biol Rev 1: 97-104.
- [8] Jacotot, B., Campillo, B. (2003). Nutrition humaine. Ed. Elsevier Masson, Paris. 311p.
- [9] Benabdesselam, S. (2017). Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par l'arylation de ferrocène. Thèse de doctorat. Université Kasdi Marbah Ouargla. P12-13.
- [10] Turpaev KT.(2002) Reactive oxygen species and regulation of gene expression. Biochemistry(Moscow) ;67:28192.
- [11] Abheri Das Sarma, A. R. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR) , 185-192.
- [12] Paul Held. (2015). An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells.USA: BioTek Instruments, Inc.
- [13] P. Sharma, A. J. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. journal of Botany , 981-990.
- [14] Jean-Philippe Béguel (2012). Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français.NNT : 2012BRES0042. tel-00838503
- [15] Philippe Rondeau.(2009). Stress oxydant et glycation : relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Réunion. Français. NNT : 2009lare0014. tel-00527411
- [16] Zorov DB, J. M. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev , 909-950.
- [17] Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. AND Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. Joint Bone Spine, 74(4), pp.324-329.
- [18] Aïra REZAIRE (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)* these de Doctorat, École doctorale pluridisciplinaire : Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques
- [19] Benaïcha hanane (2019). Synthèse, étude de l'interaction avec le radical anion superoxyde, le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, et l'adn de quelques dithiolthiones et leur derives, thèse de doctorat.université Eloued.

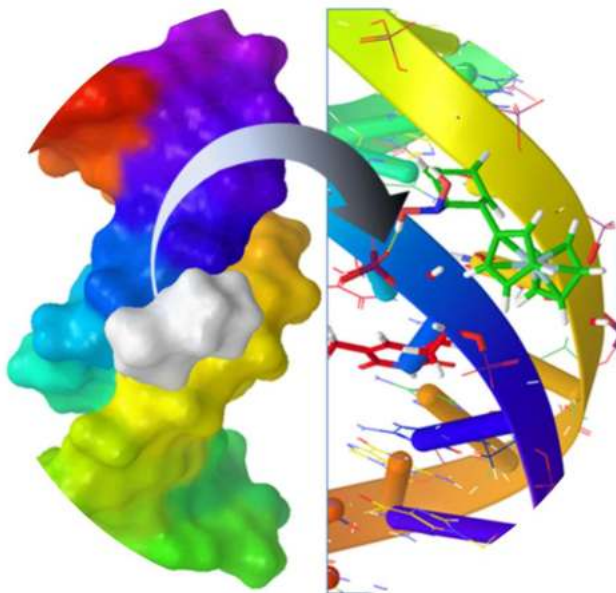
- [20] Yevgenia Shebis, D. I.-T. (2013). Natural Antioxidants: Function and Sources. Food and Nutrition Sciences .
- [21] Alam, Md.N. et al., (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- [22] GUILLOUTY Amandine (2016) Plantes médicinales et antioxydants, thèse de Doctorat, ToulouseIII Paul sebatier.
- [23] Deby, C. And Goutier, R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. Biochemical Pharmacology, 39(3), pp.399-405.
- [24] Claiborne, A. (1985). *Catalase activity*. Green Wald, R.A. (Ed.) (1985). *CRC Hand book of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press.
- [25] Aouacheri, W., Aouacheri, S., Saka, R.D. (2009). The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system, *Ann. Toxicol. Anal.* 21, 125–129
- [26] Nabi, G. and Liu, Z. Q. (2011). Radical-scavenging properties of ferrocenyl chalcones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: (944–946).
- [27] Edge R., Mearvey D., Truscott T. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 41 : 189-200
- [28] Ben Haoua K, Lanez T.(2018). Evaluation of the antioxidant activity of potatoes by radical scavenging activity using O₂⁻ and DPPH. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 10(1), 168-180.
- [29] Touhami Lanez*, Abdelkerim Rebiai(2013). Development of an electrochemical method for the measurement of antioxidant capacity of pure compounds and natural substances extracts *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*1 (2013) 46-54 ISSN 2299-3843
- [30] Lanez. T., Henni. M., (2016). Antioxidant activity and superoxide anion radical interaction with 2-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile and 3-(ferrocenyl-methylamino) benzonitrile. *J IRAN CHEM SOC*. DOI 10.1007/s13738-016-0891-1.
- [31] Quest, J.A., Copley, M.P., Hamernik, K.L., Rinde, E., Fisher, B., Engler, R., Burnam, W.L. and Fenner-Crisp, P.A. (1990). Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. *Reg. Toxicol.* 12: 117-126.
- [32] Miguel, M.G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287. doi:10.3390/molecules15129252 .
- [33] Pourramzan zide sarai, M., Mohammad likhani, M., Saheli, M., Farokhrouz, M., Zamani, A., Abbasian F. (2013). Determination of the Acute Toxicity of Pretilachlor on Liver and Gill Issues as well as Glucose and Cortisol Levels in Fingerling Grass Carps (*Ctenopharyngodonidella*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. (8): 721-726.
- [34] Kumar, J. and Rajini, P. S. (2009). Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: Role of gluconeogenesis. *Toxicology*. 257: 40-45.
- [35] Ksheerasagar, R. L., Kaliwal, B. B. (2006). Histological and Biochemical Changes in the Liver of Albino Mice on Exposure to Insecticide, Carbosulfan. *Caspian J. Env. Sci.* 4 : 67-70.
- [36] Choudhary, N., Sharma, M., Verma, P. and Joshi, S. C. (2003). Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J. Environ. Biol.* 24: 305-308.
- [37] Merzouk, H., Chiali, F.Z., Merzouk, S.A., Medjdoub, A., Narce, M. (2013). Chronic low level Metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (106): 38-44.

- [38]Yarbrough, J.D. (1976). The in vivo effects of Mirex on soluble hepatic enzymes in the rat. *Pesti. Biochem. Physiol.*, 6: 192-199.
- [39]Djeffal, A. (2014). Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C., Université Badji Mokhtar-Annaba., thèse du doctorat, 148 p.
- [40]Colette FOURNIER (1979)Microhétérogénéité de l' alpha-foetoprotéine de rat produite in vivo par l'embryon et in vitro par des hepatocytes primaire, thèse de Doctorat, université des sciences et techniques de Lille.
- [41]Huang, Q. F., Zhang S.J., Zheng L., He M., Huang R.B., Lin X. (2012). Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. (50): 713-718.
- [42]Chiali, F.Z. (2014).Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat Wistar,université aboubekr belkaid Tlemcen.
- [43]Battaglia V (2009). Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocytes primary cultures. *Int J Biochem Cell B*. 41:586-94.
- [44]Medjdoub, A., Merzouk, S.A., Merzouk, H., Chiali, F.Z., Narce M. (2011). Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (101): 27-33.
- [45]Abadjian, G. (2004). Diagnostic morphologique d'une tumeur des tissus mous. EPU tumeur des tissus mous, cours d'université ST, Joseph, 30p. 2. Abston, P.A.,
- [46]Gérard, A. (2012). Histologie en Pratique, Faculté de Médecine .p :14.
- [47] Lacave, R., Larsen, Ch-J., Robert, J. (2005). Cancérologie fondamentale, John LibbeyEurotext, Paris, 437p.
- [48]Hamaï, A., Muret, J., Cavalcanti, A., Bonvalot, S., Chouaïb, S. (2009). Le facteur de nécrose tumorale : de la biologie à la thérapie oncologique, *Hématologie* ; vol 15 (4) : pp291-304.

Etude de l'interaction de dérivés Fc-ADN/BSA par Amarrage moléculaire

CHAPITRE

V



V. Introduction

La plupart des médicaments agissent directement par des interactions avec des macromolécules biologiques (protéines, ADN ou ARN, polysaccharides, etc.) [1]. En effet, une bonne affinité est le résultat de la bonne complémentarité de forme et de fonctions chimiques entre le ligand et sa cible que l'on appelle le site actif [2]. Les interactions Ligand-récepteur jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques [3]. Différentes méthodes d'étude expérimentale telle que la cristallographie aux rayons- X et la résonance magnétique nucléaire (RMN) permettent généralement de déterminer cette interaction.

Cependant, d'une part ces méthodes ne sont pas toujours faciles à mettre en œuvre et certaines molécules ont une durée de vie courte qu'une impossibilité de l'étude *in vitro*. Or, pour comprendre les mécanismes qui permettent aux molécules biologiques d'assurer leurs fonctions, il faut tout d'abord comprendre comment elles interagissent entre elles ou avec d'autres molécules. D'où l'intérêt d'avoir des méthodes bio-informatiques procédant par simulation complémentaires à des approches expérimentales. Avec le développement des outils informatiques, la modélisation moléculaire et plus précisément le Docking moléculaire s'est très vite introduit dans les recherches biologiques [4,5]. Le programme de Docking moléculaire Auto dock Tools est développé pour la mise au point de molécules à activité thérapeutique [6]. Dans ce chapitre, une introduction brève des méthodes de modélisation commençant par la mécanique moléculaire et la méthode de la fonctionnelle de la densité (DFT) qui est actuellement le choix pour les calculs de la structure électronique des complexes de métaux de transition. Nous n'allons pas en donner ici une description complète des méthodes théoriques, mais nous allons nous arrêter sur certaines notions qui nous seront utiles pour l'interprétation de certains de nos résultats.

V.1. Modélisation moléculaire

Pour réaliser l'amarrage moléculaire, la structure du ligand doit être optimisée par la modélisation moléculaire qui est un ensemble de méthodes théoriques consiste à modéliser une structure tridimensionnelle d'un complexe, et plus généralement son interface, à partir des structures connues de ses constituants. Le niveau et la qualité des détails obtenus, dépendant du type de techniques expérimentales, qui vont peser sur la capacité des méthodes de modélisation à obtenir une bonne résolution des structures tridimensionnelles du complexe étudié et qui représentent la structure moléculaire de ces molécules [7,8].

V.1.1. Le logiciel d'étude la modélisation moléculaire "Gaussian09"

Basé sur les lois fondamentales de la mécanique quantique, le Gaussian nous permet de pronostiquer les énergies, structures moléculaires et fréquences de vibration de systèmes moléculaires complexes, et d'anticiper leurs propriétés chimiques. Les molécules et les réactions peuvent être étudiées dans une gamme étendue de conditions non seulement pour des espèces stables ou des composés complexes mais également pour des composés impossibles à observer expérimentalement, comme des intermédiaires éphémères ou des états de transition [7,9].

V.1.2. Mécanique moléculaire :

Est une méthode de calcul utilisée en mécanique classique pour calculer la plus faible énergie de conformation des molécules. Cela permet de calculer les énergies relatives entre différentes configurations ou entre différentes molécules, ainsi que les géométries d'équilibre et les états de transition, qui correspondent aux minima locaux de surface d'énergie potentielle correspondant à des conformations stables [1,8,9].

V.1.3. Champ de force en mécanique moléculaire

La Mécanique Moléculaire est basée sur un modèle mathématique d'une molécule comme un ensemble de billes correspondant à des atomes avec une distribution électronique fixe reliés entre eux par des ressorts, représentant les liaisons. Le principe de la Mécanique Moléculaire est d'exprimer l'énergie totale de cette molécule, en fonction d'une équation mathématique paramétrée. L'équation constitue un champ de force et peut s'écrire comme suit :

$$E_{Total} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{VanderWaals} + E_{electro} + \quad (V.1)$$

L'énergie totale du système moléculaire est calculée comme la somme des énergies de liaison, d'angle, dièdre et non liée (électrostatique et van der Waals).

$$V_{tot} = \sum V_{bond} + \sum V_{angle} + \sum V_{dihedral} + \sum V_{improper} + \sum V_{non-bonded} \quad (V.2.)$$

Paramètres spécifiques, obtenus par adaptation à des mesures expérimentales et/ou quantiques des simulations mécaniques, sont associées aux termes rapportés dans l'équation (V.2) [6,10].

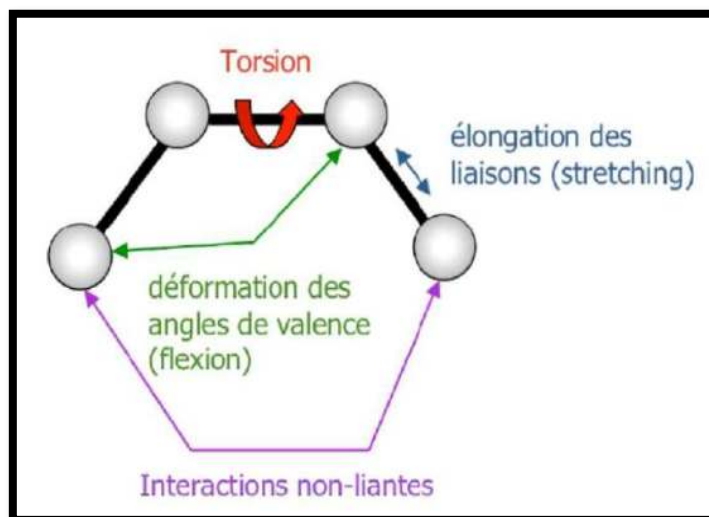


Figure V.1: Interaction intramoléculaire entre atome lié et non lié

Le jeu de paramètres est spécifique à un champ de force donné : il est transférable, capable de décrire le comportement d'un atome particulier entouré d'environnements différents.

V.1.4. La théorie fonctionnelle de La densité (DFT) :

Est une méthode de calcul utilisant la mécanique quantique pour déterminer la solution de l'équation de Schrodinger des systèmes de molécules, elle est utilisée pour étudier les propriétés structurales, magnétiques et électroniques des molécules [2, 3,7].

V.1.5. Les méthodes semi-empiriques :

Cette méthode est basée sur la collaboration entre la formulation Hertree-Fock et l'information expérimentale pour former les molécules. Par exemple, la méthode Hartree Fock (HF) est purement théorique, donc HF calcule la distance de liaison et d'autres propriétés. D'autre part, la méthode semi-empirique contient des informations expérimentales préchargées sur la distance de liaison et d'autres propriétés, de sorte qu'ils n'ont pas besoin de les calculer [11].

V.2. L'amarrage moléculaire (Docking)

Depuis le début des années 1980, l'amarrage moléculaire est devenu la méthode la plus importante utilisée pour étudier l'interaction d'une petite molécule (ligand) avec une macromolécule (récepteur) ou plus clairement utilisée pour prédire l'affinité de liaison entre deux molécules. La structure obtenue confère leurs propriétés à l'ensemble de complexe ainsi formées. Par exemple, la recherche de 'bonne 'structure est cruciale dans la conception de nouveau médicament. D'un point de vue informatique, la prédiction de structure se traduit par un problème d'optimisation. Chaque position relative possible est associée à une énergie (score

également appelé, forme physique, etc.). La structure la plus probable est alors celle qui minimise cette énergie. L'alternative la plus rapide aux méthodes expérimentales est la modélisation moléculaire ou « Docking » [3,12,13].

V. 2. 1. Principe du fonctionnement

Le Docking moléculaire peut se rapporter à un problème d'optimisation selon une valeur numérique qui rendrait compte de la conformation plus ou moins favorable de deux entités (e.g. l'énergie libre totale du système macromolécule-ligand). Pour cela le Docking moléculaire s'accomplit aux deux étapes complémentaires. Durant la première étape, le programme tend à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur. La deuxième étape, appelée score de Docking permet d'évaluer ces conformations par un calcul rapide de l'énergie libre totale du système macromolécule-ligand formé [12,14].

La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square derivation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. Le ratio admis est une différence maximum de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non pertinente [1,3].

V.2.2. Modélisation du potentiel énergétique

Pour calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, Auto dock utilise les termes d'un champ de force traditionnel auxquels sont ajoutés deux termes liés à l'entropie [10,15].

L'énergie est donnée par la relation suivante :

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol} \quad (V.3)$$

Où :

Δ est l'énergie de dispersion/répulsion

ΔG_h est l'énergie de liaison d'hydrogène

ΔG_{elec} est l'énergie de l'interaction électrostatique

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

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

V.2.3. Le logiciel d'amarrage moléculaire (l'AUTODOCK)

L'autodock est une suite de programmes de modélisation moléculaire dans le but de prédire l'interaction entre les petites molécules (ligands) et les macromolécules de structure 3D connues (récepteurs), il se compose actuellement d'outils de calcul suivant [14] :

Autodock 4 : un programme de calcul en 2 parties.

Autodock : utilisé dans l'amarrage du ligand au récepteur en fonction de l'énergie libre.

Autogride : utilisée dans le précalcul des grilles utilisées pour décrire les états des récepteurs en utilisant l'algorithme génétique lamarckien.

Autodock Vina : programme de calcul utilisé pour calculer la carte de quadrillage en interne pour le temps en adoptant une fonction de scoring.

Autodock Tools (ADT) : Outils graphiques utilisés pour l'analyse des Dockings et la préparation des coordonnées [11].

V.2.4. Les différents types de Docking moléculaire

Le Docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent lorsque plusieurs structures moléculaires s'assemblent, l'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres. Il existe deux grands types de Docking moléculaire [1,16].

Le Docking rigide (les ligands et les récepteurs sont tous deux rigides) consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système macromolécule-ligand en considérant que chacune des deux molécules sont incapables de changer leurs champs spatiaux ou leur forme géométrique pendant le processus d'amarrage c'est à dire conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, dans l'amarrage flexible, ils peuvent changer leur géométrie durant le processus de Docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités pour obtenir la conformation préférentielle [7,16] mais cela prend plus de temps de calcul que le processus d'amarrage rigide.

Différents logiciels sont développés pour obtenir les meilleurs résultats d'amarrage informatique [1] tels que FLOG, MD, AUTODOCK..... etc. l'auto dock 4.2 est le logiciel de choix dans ce travail.

V.3.Matériels et méthodes

V.3.1. Préparation de la Macromolécules (BSA/ ADN)

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

✓ *Détail informatique*

Protein Data Bank ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques [17]. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. La macromolécule a été téléchargée au format pdb après l'introduction de son code. Le programme Autodock Tools exige le format. PDBqt, les molécules sont donc protonées. La structure cristallographique de la protéine BSA (PDB ID – 3V03) et l'acide nucléique ADN (PDB ID – 1BNA) de l'*Homo sapiens* est obtenue de RCSB PDB website localisé à www.rcsb.org/pdb/

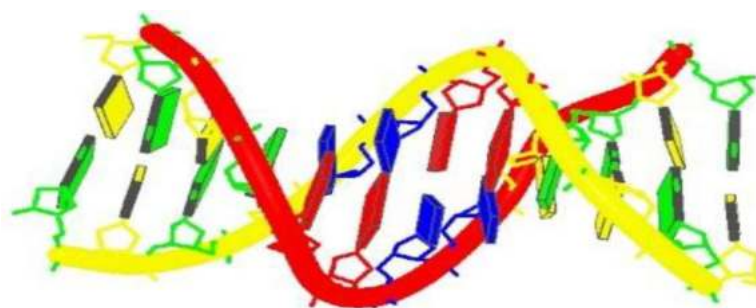


Figure V.2: Structure d'ADN d'un dodécamère

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

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

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

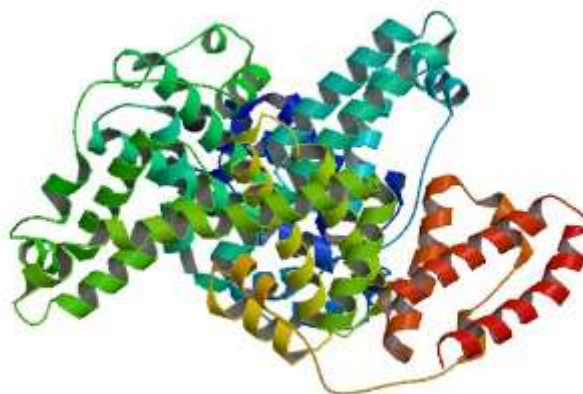


Figure V.3: Structure de la BSA téléchargée de la PDB (PDB ID : 3V03)
Résolution 2.7Å°, Résidue count 1166

V.3.2. Préparation des Ligands (dérivé ferrocénique)

La structure de dérivé ferrocénique a été préparée et optimisée avec le logiciel Gaussian 09 [9], puis elle est enregistrée sous format pdb.

✓ *Détails informatiques*

Le programme Gaussian 09 a été utilisé pour la théorie fonctionnelle de la densité DFT. La base déjà mise en place dans le programme a été utilisée pour les différents types de calculs. La géométrie du composé a été optimisée à la méthode hybride à trois paramètres de Becke avec niveau de corrélation LYP (B3LYP) et en utilisant le jeu de base 6-311++G(dp) et LanL2DZ.

V.3.3. Docking

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

- ✓ Génération de carte d'interactions de la structure d'ADN (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 :

A. Préparation de l'accepteur

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

B. Chargement de récepteur et du ligand

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

C. Configuration des paramètres de l'AutoGrid

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

D. Exécution de l'AutoGrid

- ✓ Run → AutoGrid

E. Exécution de l'AutoDock

- ✓ Doking → Macromolecule → Rigid Filname → select 1BNApr.pdbqt
- ✓ Docking → Ligand → Choose → select Ligand
- ✓ Docking → Search Parametres → Genitic Algorithm → set Number of GA Runs
- ✓ Docking → Output → Lamarckian GA (4.2) → save output as dock.dpf
- ✓ Run → Autodock

Pour effectuer le docking de ces molécules, nous avons utilise les parameters de Gride suivants :

Tableau V.1 : Les paramètres optimisés pour le Docking d'interaction Fc-ADN

Centre de grille	Fc-tris	FM3FMA	FM2Cla	FM3Cla	DMEMF	IFMAT A
X	14,753	14,753	14,780	14,122	28,949	14.780
Y	20,245	23,295	20,976	20,873	38,547	20.976
Z	19,179	15,199	8.807	15,357	24,342	8.807
Taille de Gride	60x60x60	40x40x40	50x50x50	24/24/24	50×50×50	60/40/40
Taille de pas	0.375	0,508	0,508	0,508	0,372	0.375
N de conformatio n	25	15	8	15	25	20

Tableau V.2 : Les paramètres de optimisés pour le Docking d'interaction Fc-BSA

Centre de grille	Fc-tris	FM3FMA	FM2Cla	FM3Cla	DMEMF
X	38,092	38,092	45.011	30.092	29,633
Y	22,671	22,671	22.756	22.756	24,040
Z	30,746	40,746	35.796	30.488	24,352
Taille de Gride	100x100x100	100x100x100	22x30x30	40/40/40	60x60x60
Taille de pas	0.497	0,503	1	1	0,500
N de conformation	25	25	8	15	25

F. Analyse des résultats

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

L'assemblage des fragments obtenus permet de rechercher les meilleures conformations du ligand dans le site actif de la macromolécule.

Les résultats d'amarrage moléculaire aboutissant aux constantes de liaison K et des énergies libres de liaison ΔG des adduits Fc-ADN, Fc-BSA selon les relations suivantes :

$$\Delta G^\circ = -RT \log K_a \quad (\text{V.4})$$

$$K_a = \exp(-\Delta G^\circ/RT) \quad (\text{V.5})$$

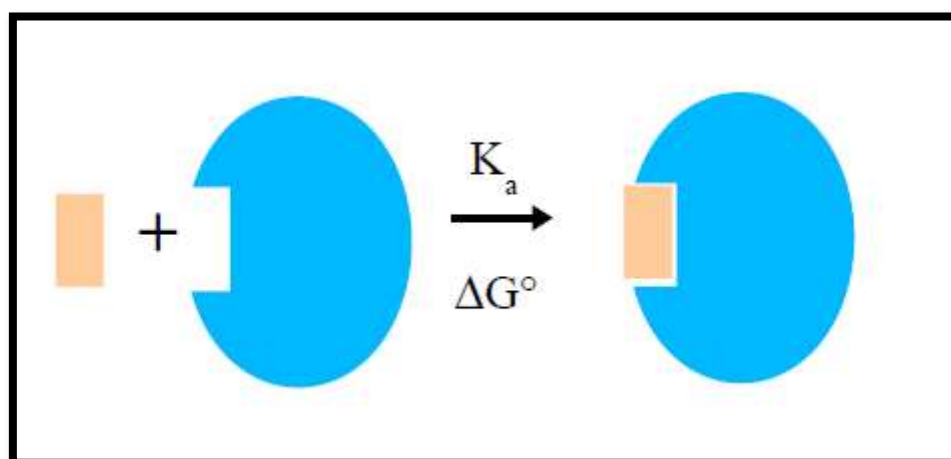


Figure V.4: Energie libre standard d'association/dissociation

V.4. Résultats et Discussion

L'objectif de ce travail était d'utiliser des approches de mécanique moléculaire classique pour mieux comprendre les événements structuraux et biologiques qui surviennent dans l'interaction entre les macromolécules et les récepteurs, en complément des informations obtenues à partir de méthodes expérimentales.

Les informations obtenues à partir de ces études de modélisations moléculaires peuvent être utilisées lors de l'interprétation de données physico-chimiques relatives aux interactions dérivé ferrocénique-AND/BSA, et ce type d'approche peut être source d'arguments théoriques entrant dans le cadre d'hypothèses de travail.

V.4.1. Modélisation des interactions FC- ADN par Amarrage moléculaire

V.4.1.1. Optimisation structurale

La structure chimique des dérivés ferrocéniques sont optimisés par le programme Gaussian 09, en utilisant la base 6-311++G (d, p) et LanL2DZ. Les structures optimisées du ligand sont présentées dans la figure **V.5**

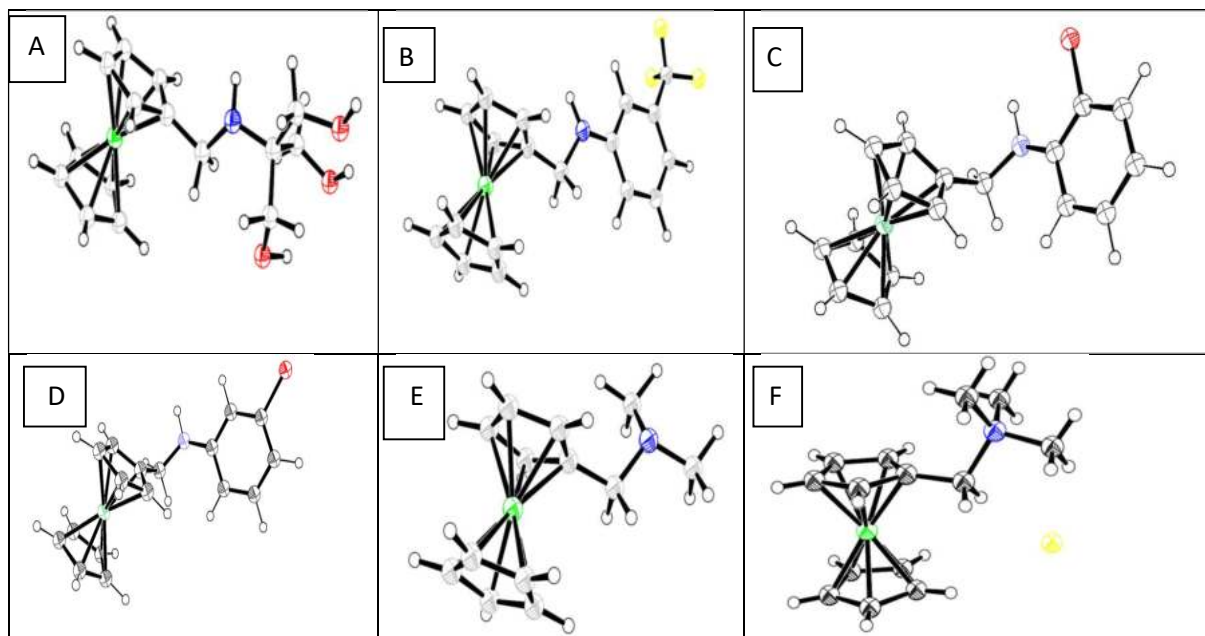


Figure V.5 : 3D conformation du ligand (A) FC-tris (B) FM3FMA, (C) FM2Cla, (D) FM3Cla (E) DMAMF, (F) sel quaternaire (ORTEP View 03, V1.08) ; le code couleur est : gris : Carbon blanc : hydrogène bleu : nitrogène, vert : le fer rouge : oxygène et Fluor, jaune : fluor

V.4.1.2. Docking moléculaire

La structure optimisée du ligand FC et de l'ADN a été importée dans le logiciel Auto Dock. Toutes les études d'amarrage ont été effectuées sur une micro-ordinateur Pentium 3.30 GHz et RAM 4.00 Go MB avec le système d'exploitation Windows 7

Tableau V.3 : Valeurs des énergies libres ΔG et constantes de liaison K de différentes interactions Fc-ADN.

Adduit	N de RUN	ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
Fc-Tris-ADN	6	-21,59	6.026×10^3
FM3FMA-ADN	2	-26,0832	3.7054×10^4
FM2Cla-ADN	9	-22,363	$8,264 \times 10^3$
FM3Cla-ADN	10	-23,575	13.473×10^3
DMAMF-ADN	24	-22,07	$7,342 \times 10^3$

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative.

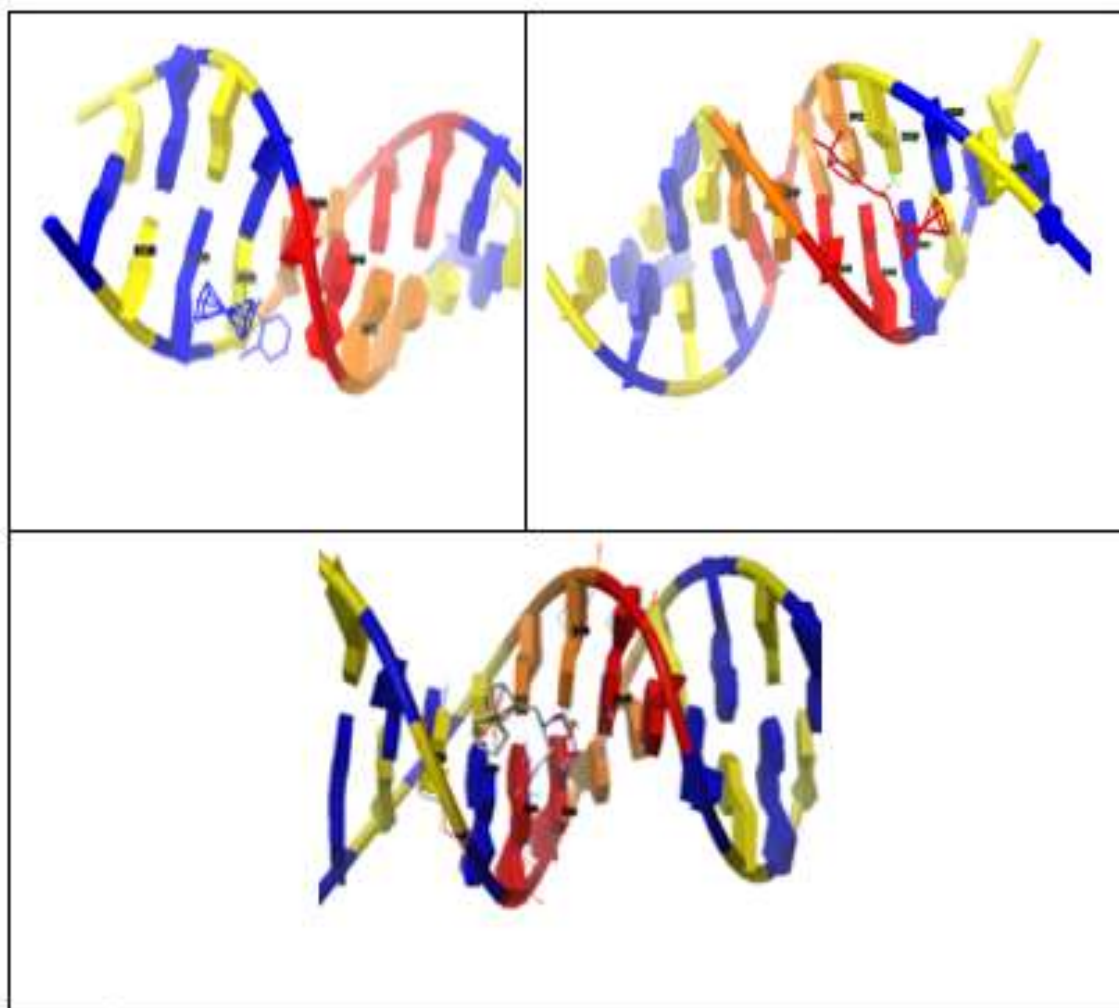


Figure V.6 : Interaction de FcTris avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé,

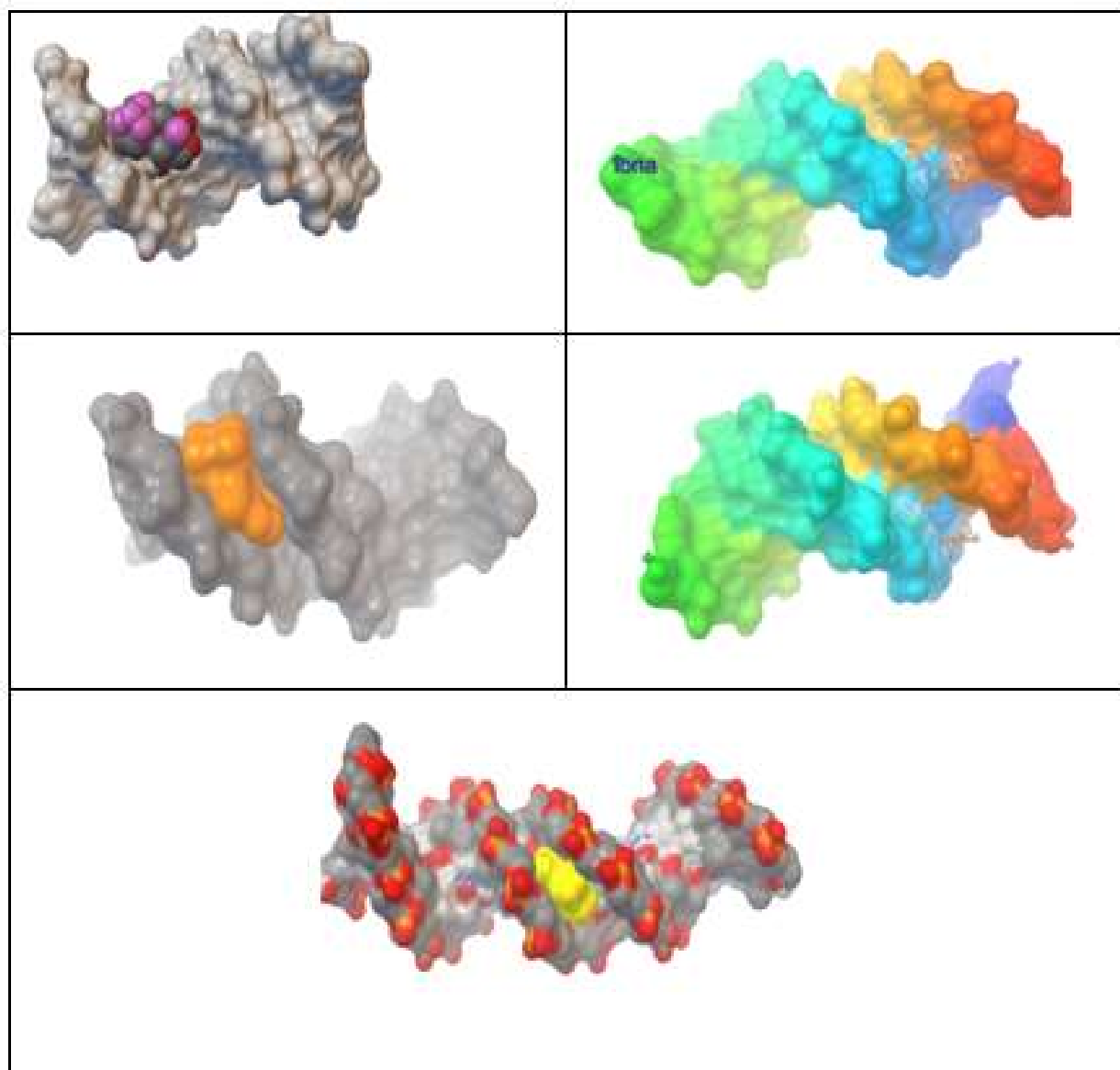


Figure V.7 : Mode de liaison de FC avec le site actif de l'ADN (Vue en surface)

D'après la figure V.5 Il montre que le FC Tris est attaché dans le grand sillon par liaison H. En revanche, la Fc3Faniline, DMAMF, FM2claniline et FM3Claniline sont attaché dans le petit sillon de l'ADN par liaison H.

Tableau V.4 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de Fc et de l'ADN impliqués dans ces liaisons.

Adduit	Liaisons	Distances(Å)	Energies (KJ.mol ⁻¹)
Fc-tris-ADN	ADN : chaîne A : DA5 : H62 <=> Ligand : O	2.161	-17.464
	ADN : chaîne B : DT19 : O4 <=> Ligand : H(N)	1.792	-4,13379
	ADN : chaîne A : DA6 : H62 <=> Ligand : O	2.156	-0,76567
	ADN : chaîne A : DA5 : H7 <=> Ligand : O	2.022	-18,2799
	ADN : chaîne B : DT19 : O4 <=> Ligand : H(O)	1.708	-3,3221
FM3FMA-ADN	ADN : chaîne B : DC21 : O2 <=> Ligand : O :H	2.026	-4.611
FM2Cla-ADN	ADN : chaîne B : DC21 : O2 <=> Ligand : O :HN	2.114	-1.851
FM3Cla-ADN	ADN : chaîne B : DC21 : O2 <=> Ligand : O :H	2.05	-1.263
DMAMF-ADN	ADN : chaîne B : DA12 : O4 <=> Ligand : N	2.942	None

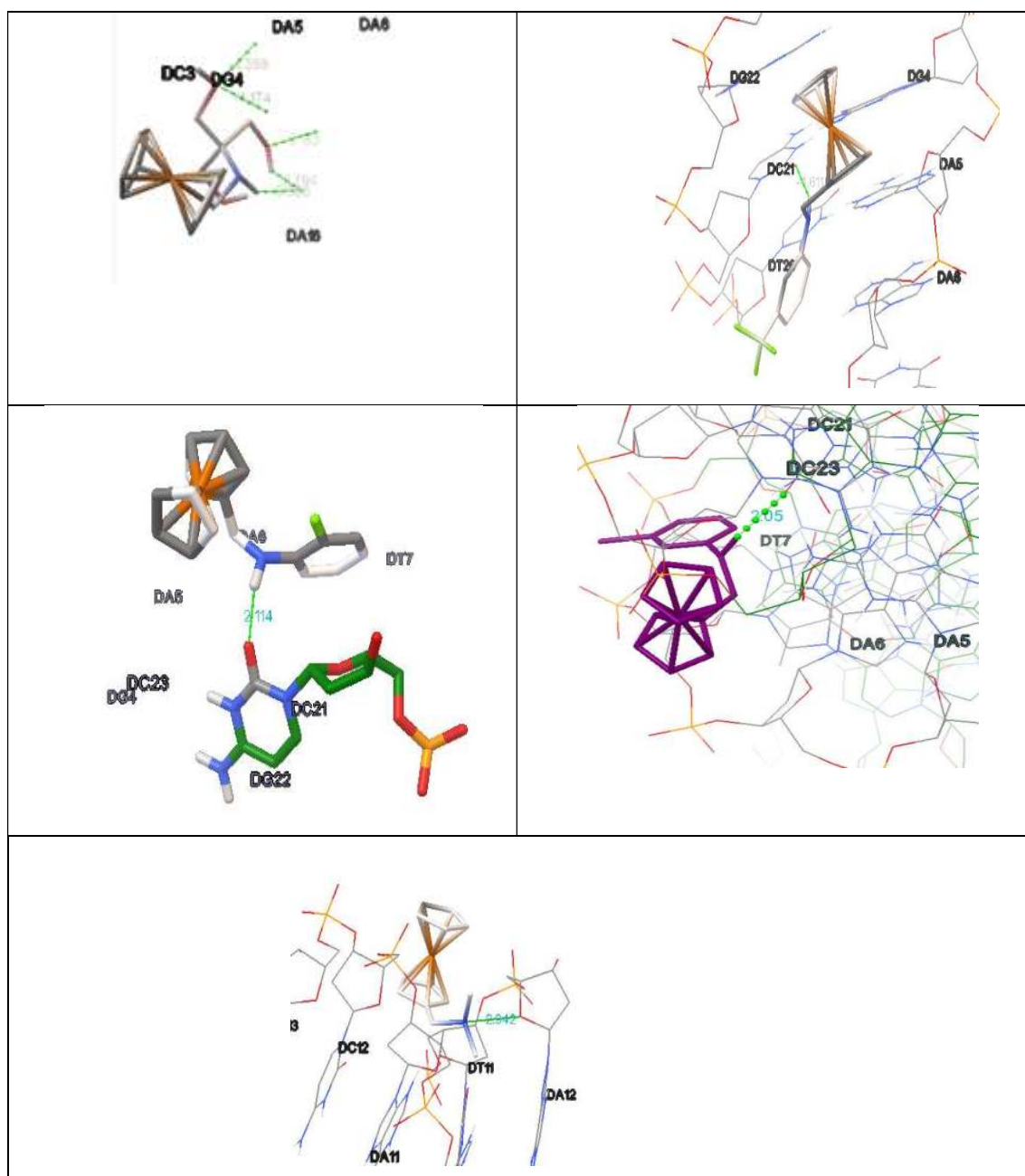


Figure V.8 : Distances exprimées en Å des liaisons hydrogènes formées entre le dérivé ferrocénique et l'ADN.

V.4.1.3. L'analyse visuelle des interactions

Le FC Tris se lie avec l'ADN en formant 5 liaisons hydrogènes, la première entre l'hydrogène n°62 de désoxyadénine (DA)n°5 de la chaîne A d'ADN et l'oxygène de FcTris, la deuxième entre l'oxygène n°4 de désoxythymidine (DT)n°19 de la chaîne B de l'ADN et

l'hydrogène de l'azote de FcTris, la troisième entre l'hydrogène n°62 de DAn°6 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de FcTris, la quatrième entre l'hydrogène n°7 de DA n°5 de la chaîne A de l'ADN et l'oxygène de FcTris et la cinquième entre l'oxygène n°4 de DTn°19 de la chaîne B de l'ADN et l'hydrogène de l'oxygène de FcTris.

Le Fc3Faniline se lie avec l'ADN en formant une liaison entre l'oxygène n°2 de désoxycytosine (DC)n°21 de la chaîne B d'ADN et l'hydrogène de Fc3Faniline

Le Fc2claniline se lie avec l'ADN en formant une liaison entre l'oxygène n°2 de désoxycytosine (DC)n°21 de la chaîne B d'ADN et l'hydrogène de l'azote de Fc2claniline

Le Fc3claniline se lie avec l'ADN en formant une liaison entre l'oxygène n°2 de désoxycytosine (DC)n°21 de la chaîne B d'ADN et l'hydrogène de Fc3claniline

Le DMAM se lie avec l'ADN en formant une liaison hydrogène entre l'oxygène n°4 de désoxyadénine (DA)n°12 de la chaîne B d'ADN et l'Azote de DMAM,

V.4.1.4. Discussion

Les résultats de l'étude théorique de la modélisation par amarrage moléculaire entre le dérivé ferrocénique et l'ADN révèle que ces dérivés interagissent avec l'ADN d'une façon exergonique (spontané) traduit par la valeur de l'énergie libre. Sachant que, lorsque le dérivé ferrocénique se lie à l'ADN peut provoquer des changements conformationnels en formant des liaisons hydrogènes ce qui ralentit la réplication de l'ADN et donc l'arrêt de la division cellulaire. D'ailleurs, le fait que les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération anormale dans l'organisme, l'attaque de ces cellules par le dérivé ferrocénique qui se lie avec l'ADN en empêchant leurs multiplications conduit à la mort cellulaire. D'un autre côté, l'amarrage moléculaire montre que ces dérivés ferrocéniques interagissent avec l'AND au niveau de petit sillon. En effet, la manque d'informations contenues dans le petit sillon (en termes de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène) permet seulement à de petites protéines et des petites molécules d'entrer en contact avec les bases [18].

Les petites molécules qui se lient au niveau du petit sillon de l'ADN ont une activité cytotoxique parce qu'elles interfèrent avec la liaison des protéines nécessaires pour la réplication et la transcription de l'ADN [19]. De ce fait, les dérivés ferrocéniques étudiées sont considérés théoriquement comme des anticancéreux potentiels.

V.4.2. Modélisation des interactions FC- BSA par Amarrage moléculaire

La structure optimisée du ligand ferrocénique et la BSA a été importée dans le logiciel Auto Dock Tools.

Tableau V.5 : Valeurs des énergies libres ΔG et constantes de liaison K de différentes interactions Fc-BSA.

Adduit	N de RUN	ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
Fc-Tris-BSA	1	-26,626	4,6122x 10 ⁴
FM3FMA- BSA	90	-28,84	11,265x10 ⁴
FM2Cla- BSA	2	-26.125	3,7684x 10 ⁴
FM3Cla- BSA	12	-26.668	4,6910x 10 ⁴
DMAMF- BSA	6	-22,446	0.8545x10 ⁴

Selon les valeurs des énergies libres de liaison ΔG , la plus stable conformation est la conformation 1 avec une valeur de ΔG plus négative.

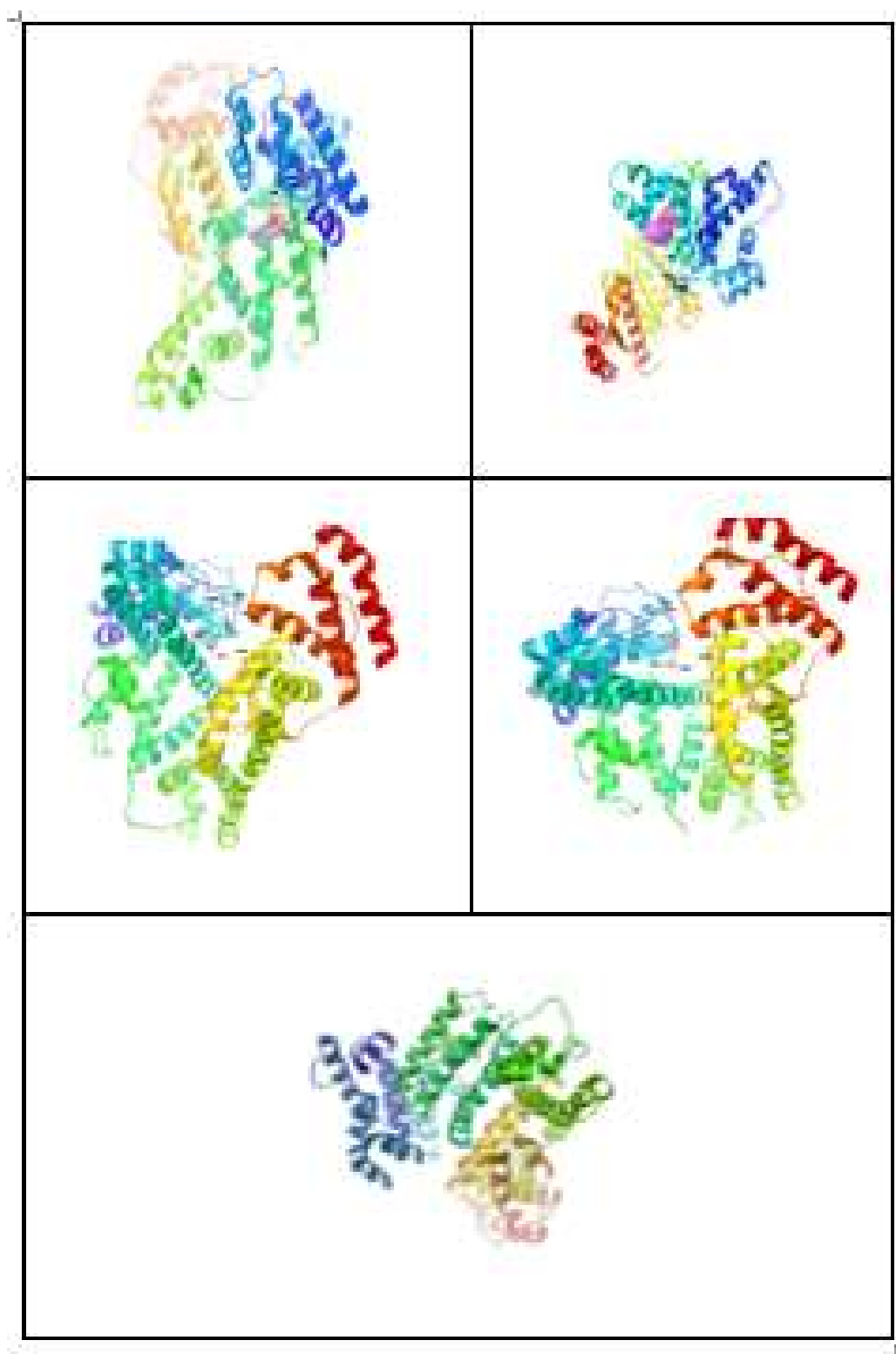


Figure V.9 : Interaction de FcTris avec l'ADN, (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction FcTris-ADN,

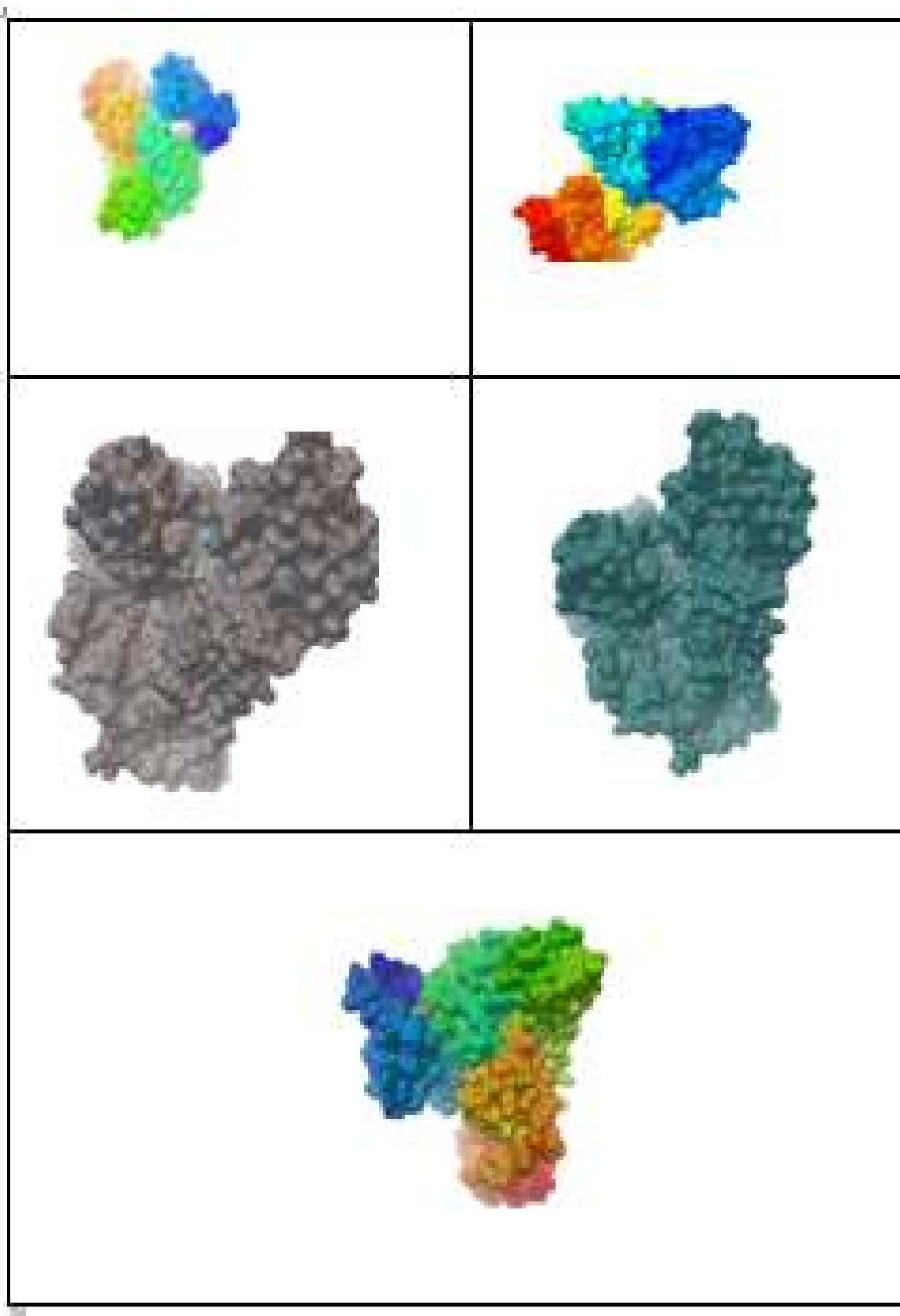


Figure V.10: Interaction de dérivés ferrocéniques avec la BSA : Amarrage moléculaire de l'interaction Fc-BSA.

Tableau V.6 : Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de FcTris et de le BSA impliqués dans ces liaisons.

Adduit	Liaisons	Distances(Å)	Energies (KJ.mol ⁻¹)
Fc-tris- BSA	BSA : chaine A : Glu 6 : O 1 <=> Ligand : OH	1.981	-1.617
	BSA : chaine A : His 67 : HN <=> Ligand : O(O)	2.01	-6,24
	BSA : chaine A : Asp 248 : O 2 <=> Ligand : O:H	2.156	-0,76567
FM3FMA-BSA	BSA : chaine B : Tyr160 : H (O) Ligand : O :H	2.216	-1.844
FM2Cla-BSA	BSA : chaine B : Asp108 H(O) <=>Ligand NH	2.056	-2.504
FM3Cla-BSA	BSA : chaine B : His145 H(N) <=>Ligand NH	1.71	-2.536
DMAMF-BSA	BSA : chaine A : Asp248 : OD2 <=> Ligand : O : N	2.97	None
	BSA : chaine A : 251 : OE2 <=> Ligand : O : N	2.781	None

V.4.2.1. L'analyse visuelle des interactions

Le FcTris se lie avec le BSA en formant 3 liaisons hydrogènes la première entre OE n°1 de l'acide glutamique (Glu)n°6 de la chaine A de BSA et l'hydrogène de l'oxygène de FcTris, la deuxième entre l'hydrogène de l'azote de l'histidine (His)n°67 de la chaine A de BSA et

l'oxygène de FcTris, la troisième entre l'oxygène n°2 de l'acide aspartique n°248 de la chaîne A de BSA et l'oxygène de FcTris,

Le Fc3Faniline se lie avec le BSA en formant une liaison hydrogène entre le OH de la Tyrosine n°160 de la chaîne B de BSA et l'oxygène de Fc3Faniline.

Le FM3Claniline se lie avec le BSA en formant une liaison hydrogène entre le l'hydrogène de l'azote de l'histidine n°145 de la chaîne B de BSA et l'azote de FM3Cl aniline.

Le FM2Claniline se lie avec le BSA en formant une liaison hydrogène entre le l'hydrogène de l'oxygène de l'aspartique n°108 de la chaîne B de BSA et l'azote de FM2Cl aniline.

Le DMAM se lie avec le BSA en formant une liaison hydrogène entre OD n°2 de l'acide Aspartique (Asp)n°248 de la chaîne A de BSA et l'OE n°2 de l'acide Glutamique (Glu)n°251 de la chaîne A de la BSA.

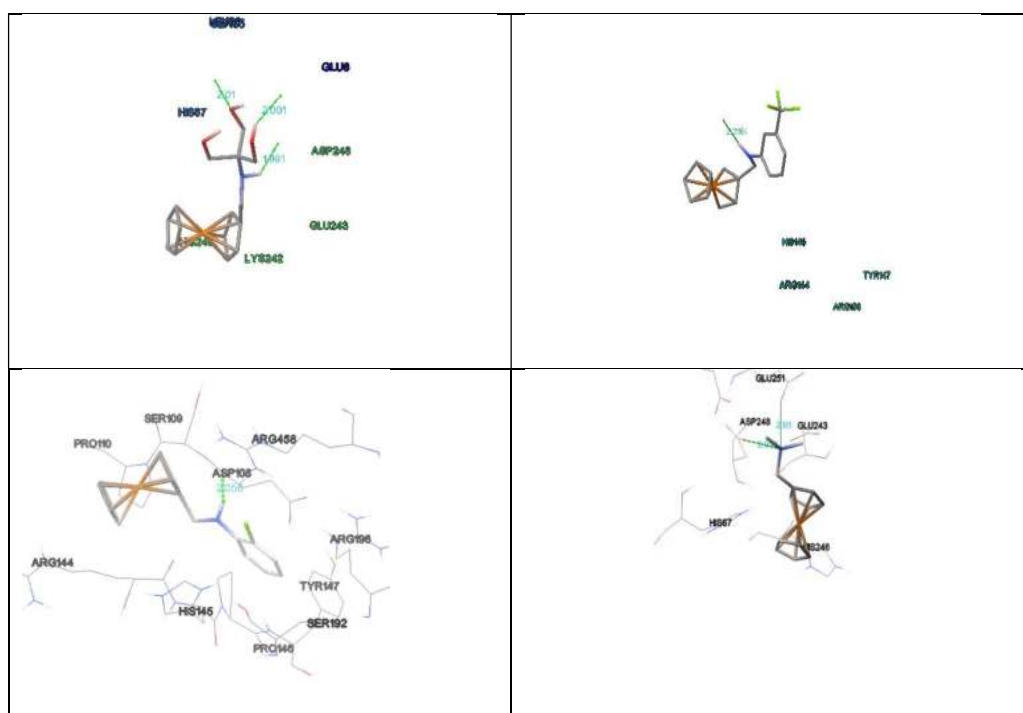


Figure V.11: Distances exprimées en Å des liaisons hydrogènes formées entre le dérivé ferrocénique et la BSA.

V.4.2.2. Discussion

L'objectif de la modélisation moléculaire est d'étudier la stabilité du complexe, déterminer sa structure géométrique optimale, décrire la nature des interactions intermoléculaires entre la

molécule hôte (ligand) et la macromolécule (le récepteur), de faire ressortir quelques propriétés thermodynamiques.

La protéine et les dérivés ferrocéniques ont été prétraités dans AutoDockTools [16,20] lorsque les hydrogènes non polaires ont été fusionnés, des charges de Gaisteiger ont été ajoutées et les types d'atomes ont été définis. L'algorithme génétique lamarckien avec les méthodes de recherche locale ont été utilisés en tant que l'algorithme de recherche [14].

Les résultats montrent qu'il y a des interactions entre les dérivés ferrocéniques étudiés et la BSA,

Le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique au niveau du site actif, Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes traduites par les valeurs de l'énergie libre de Gibbs obtenues. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de Van Der Waals et des ponts hydrogène [18]. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes.

V.4.3. Résultats des orbitales HOMO et LUMO

Les orbitales moléculaires (MO) et leurs diagrammes d'énergie sont importants pour déterminer les propriétés moléculaires. En particulier, les orbitales moléculaires frontières (FMO) jouent un rôle important dans la détermination de la réactivité chimique [22].

Deux orbitales moléculaires, appelées orbitales frontières, jouent un rôle particulier :

- HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) Traduit le caractère électro-donneur (nucléophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est élevée, plus la molécule cédera facilement des électrons.
- LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) Traduit le caractère électro-accepteur (électrophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est faible, plus la molécule acceptera facilement des électrons [3,21].

Les valeurs des orbitales HOMO et LUMO et leur écart d'énergie (ΔE) obtenues par la méthode DFT avec la fonctionnelle B3LYP en utilisant la base LanL2DZ représentés dans la figure.V.12 [19]. Les valeurs numériques sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau V.7: Calculs HOMO-LUMO pour les dérivés étudiés

Propriété	FM3FMA	DMAMF	Fc-tris	FM2Cla	FM3Cla
E_{HOMO} (eV)	-5,522	-5,385	-5,482	-5.484	-5.536
E_{LUMO} (eV)	- 1,053	-0,497	-0,541	-0.704	-0.754
$E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ eV	4.468	4.497	4.940	4.780	4.7823

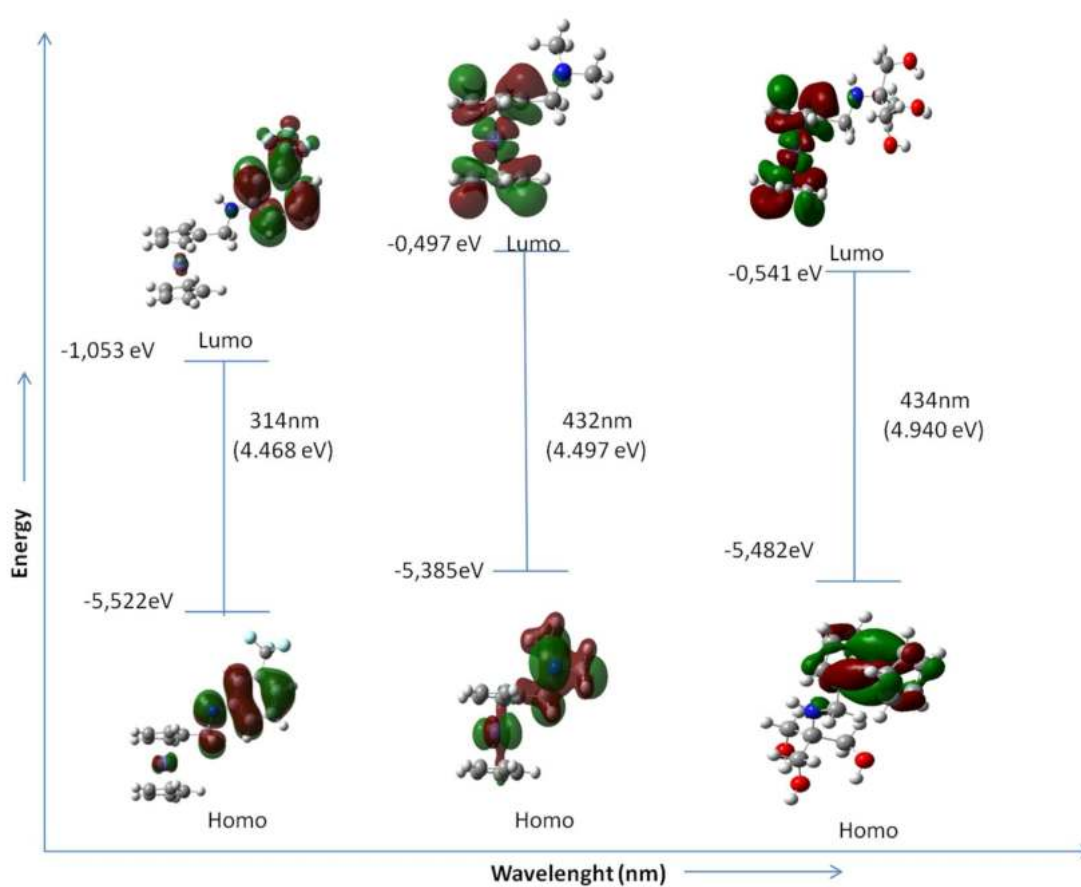


Figure V.12. Les orbitales HOMO et LUMO et écart d'énergie (ΔE) obtenu par la Méthode DFT/B3LYP/LanL2DZ du dérivés : FM3FMA, DMAMF et Fc-Tris.

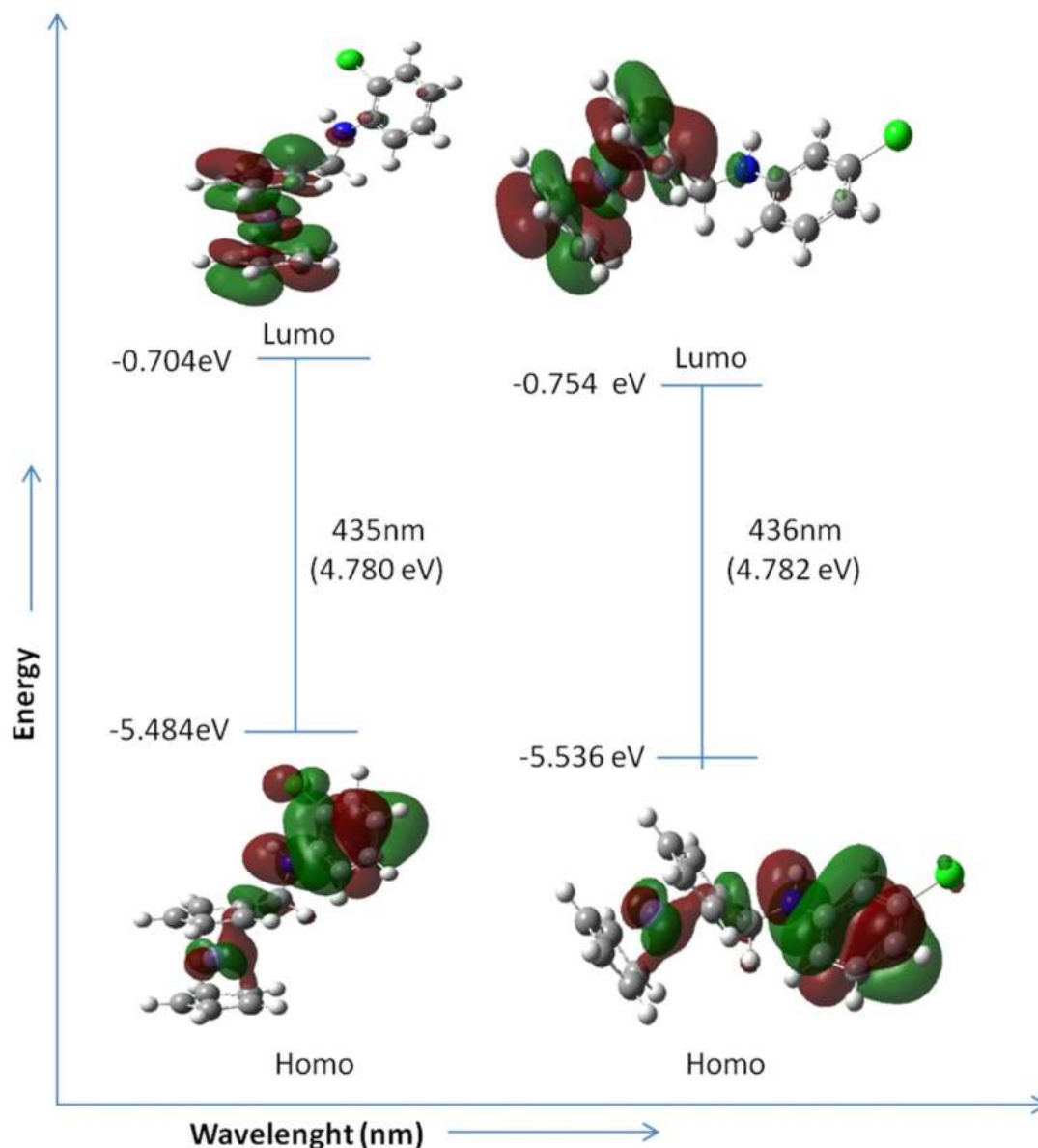


Figure V.13. Les orbitales HOMO et LUMO et écart d'énergie (ΔE) obtenu par la méthode DFT/B3LYP/Ln2DZ du dérivés : FM2C1A et FM3C1A

On peut constater que l'orbitale moléculaire LUMO se concentre principalement sur le ferrocène et sur les atomes d'oxygène et d'azote et de Fluor ; tandis que l'orbitale moléculaire HOMO se répartie sur le noyau aniline et sur le fer avec un manque de répartition sur le ferrocène. La faible valeur de ΔE nous permet de conclure que les molécules Fc sont réactive.

L'écart de l'énergie $E_{\text{HOMO LUMO}}$ est une échelle importante de la stabilité et les produits chimiques avec des grandes valeurs ont tendance à avoir une plus grande stabilité, l'écart de l'énergie représente l'activité chimique des molécules, LUMO définie comme un accepteur des

électrons représente la capacité d'obtenir un électron et HOMO représente la capacité de donner des électrons.

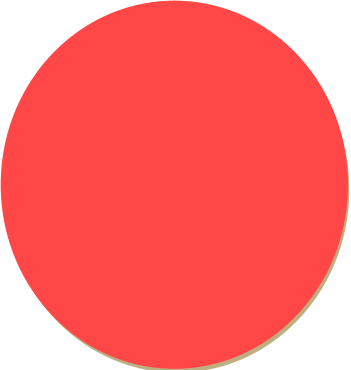
V.4.4. Conclusion

L'étude théorique effectuée à l'aide de calculs quantiques sur les complexes organométalliques du ferrocène étudié, a permis de comprendre leurs arrangements structuraux, leurs structures électroniques et d'interpréter quelques-unes de leurs propriétés physico-chimiques. L'étude théorique confirme aussi que le complexe formé FC-ADN/BSA font des interactions physiques de type électrostatique traduites par les valeurs de K et ΔG obtenues et qui sont similaires avec les résultats obtenus in Vitro. En fin Les sérum-albumine fournissent un environnement unique pour les substances non spécifiques et agissent comme un récepteur universel pour de nombreuses molécules d'intérêt médicamenteuses.

Bien que les structures électroniques des composés soient comparables, nous pouvons néanmoins noter l'écart HOMO-LUMO calculé pour le composé Fc-tris qui est plus important, soit de 4.94 eV par rapport aux autres dérivés, principalement à cause d'une plus haute énergie de l'orbitale haute occupée (HOMO) et d'une plus basse énergie de l'orbitale basse vacante (LUMO). D'une manière générale, nous pouvons dire que les diagrammes énergétiques des composés avec différents substituants sont similaires. La modélisation par la DFT surestime les énergies des orbitales moléculaires occupés

Références bibliographiques

- [1] 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
- [2] Sergio Filipe Sousa, P. A. (2006). Protein–Ligand Docking : Current Status and Future Challenges. *PROTEINS : Structure, Function, and Bioinformatics*, 15–26.
- [3] Uttam pal, Inspire Fellow (2016). Interaction of proteins with small molecules and peptides. Thèse de doctorat, structural biology and bioinformatics Division CSIR- indian Institute of chemical biology, KOLKATA. Université JADAVPUR
- [4] Sundaraj Rajamanikandan¹ & Jeyaraman Jeyakanthan¹ & Pappu Srinivasan^{1,2} (2016) Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations, Computational Screening to Design Quorum Sensing Inhibitors Targeting LuxP of *Vibrio harveyi* and Its Biological Evaluation. *Appl Biochem Biotechnol*. DOI 10.1007/s12010-016-2207-4
- [5] H. Boucherit, a. Chikhi, a. Bensegueni, a. Merzoug, k. S. Hioual, el h. Ikraoui (2013) l'amarrage moléculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le développement de la tuberculose. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 7, N°2, p : 133-149*
- [6] Collins Kiprotich Kigen (2019). *In silico* prediction of anti-malarial activity and pharmacokinetic properties of herbal derivatives of *Ajuga remota* and *Azadirachta indica*. Bachelor of Science degree in Medical Biochemistry in the Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology.
- [7] BOUDGHENE STAMBOULI (2013), Etude de l'Interaction Protéine-Protéine par Modélisation Moléculaire. Application aux Processus Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Tlemcen
- [8] CHIKHI ABDELOUAHAB (2007). Calculs et modélisations des interactions peptide deformylase – substances antibactériennes à l'aide de techniques de "DOCKING" (ARRIMAGE) MOLECULAIRE. Doctorat d'état en Microbiologie. UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
- [9] M.J. Frisch et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [10] E. Thiriot Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : Développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Reductases de classe A. thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 2009. 291 p.
- [11] Benaïcha Hanane (2019). Synthèse, étude de l'interaction avec le radical anion superoxyde, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, et l'ADN de quelques dithiolthiones et leur dérivés, thèse de doctorat. Université El oued.
- [12] Morris, G.M., and Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 443, 365–382. DOI : 10.1007/978-1-59745-177-2_19
- [13] Alessandra Nurisso (2010). *In silico* studies of carbohydrate-protein interactions. Chemical Sciences. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, English. Tel-00511855.
- [14] Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J. (1998). Automated docking, using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662. DOI :10.1002/(SICI)1096-987X (19981115)19 :14<1639 :AID-JCC10> 3.0.CO ;2-B
- [15] Ankur Dhanik, John S McMurray[†] and Lydia Kavrakci, (2012). Autodock based incremental docking protocol to improve docking of largeLigands.
- [16] Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4 : automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791. DOI : 10.1002/jcc.21256
- [17] H.M. Berman et al., (2000). The Protein Data Bank, *Nucl. Acids Res.* 28(1) 235-242
- [18] LOWN J. W. (1995) Design and development of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders. *Drug Development Res.* 34, 145-183
- [19] Adaïka A, Lanez T. Lanez E. (2019). In vitro and in silico evaluation of anticancer activity of N,N-dimethylaminomethylferrocene. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 11(2), 748-768.
- [20] Sheng-You Huang, a. X. (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.*, 3016-3034.
- [21] Mehmet Karabacak a, Sibel Bilgili b, Ahmet Atac (2015). Molecular structure, spectroscopic characterization, HOMO and LUMO analysis of 3,30-diaminobenzidine with DFT quantum chemical calculations. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier.
- [22] Benzya N, Messai A, Hamdaoui A, Lanez T and Sayin K. (2017). Synthesis, quantum chemical computations and x-ray crystallographic studies of a new complex based of manganese (+ii). *J. Fundam. Appl. Sci.*, 9(2), 770-789.



CONCLUSION



Conclusion générale

L'objectif de notre thèse est l'évaluation *in vitro*, *in silico* et *in vivo* de l'activité biologique de quelques dérivés ferrocéniques synthétisés au laboratoire. En effet, les produits synthétisés ont été caractérisés par UV-Vis, électrochimie, IR et RMN, les résultats obtenus confirment les structures proposées de ces composés.

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

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

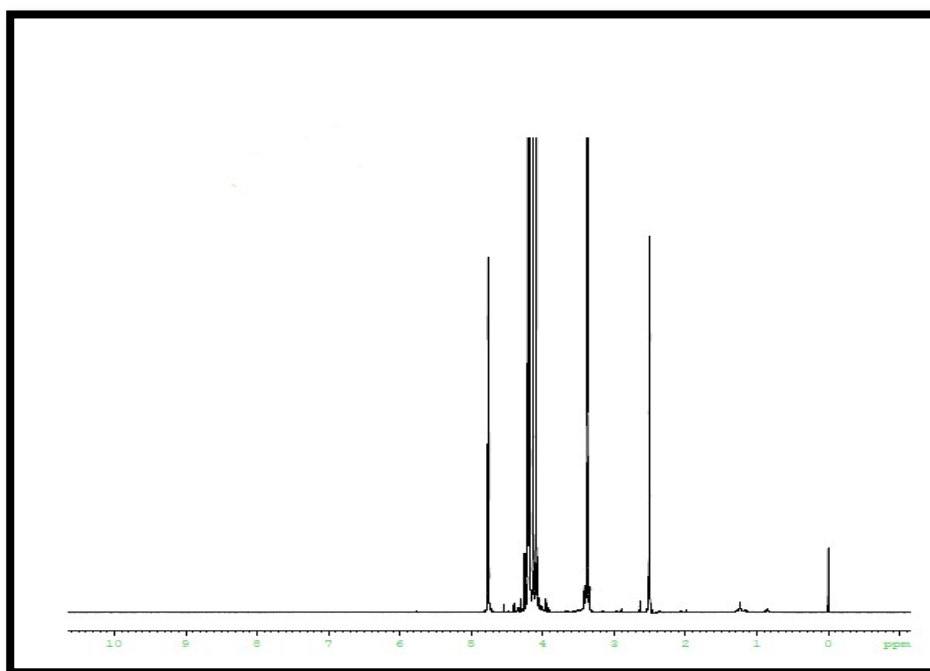
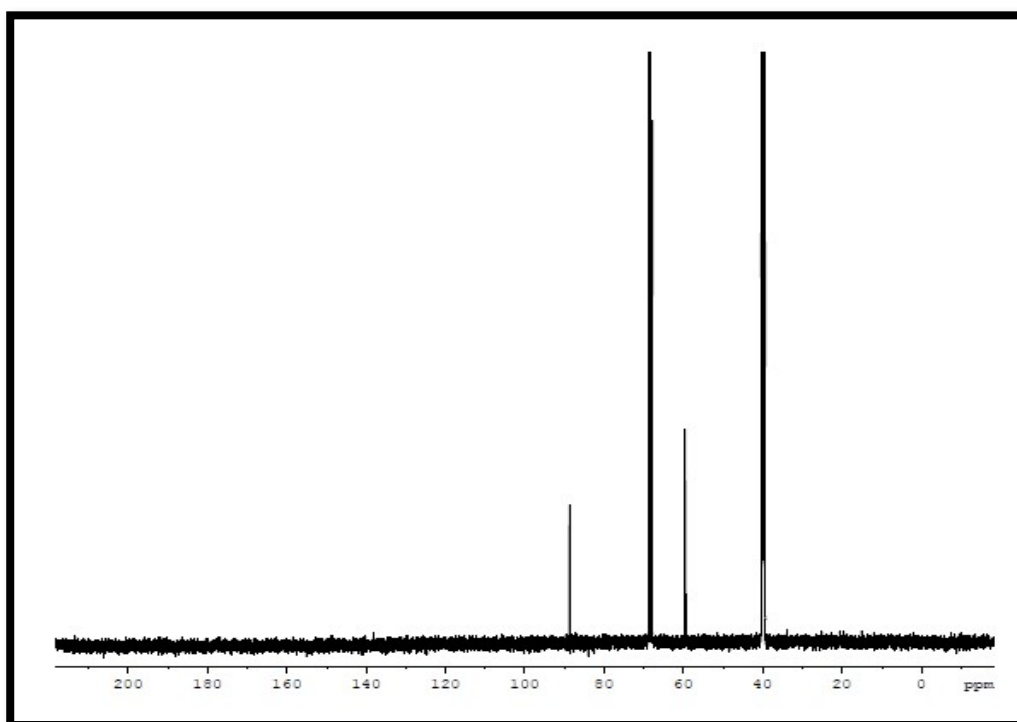
Par ailleurs, la plupart des dérivés synthétisés possède une activité antioxydante très importante *in vitro*. Il a été montré une inhibition très importante du radical superoxyde anion comparée avec l'acide gallique et la BHA. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur les rats wistar de type albinose, celles-ci nous ont permis de conclure que ces dérivés protègent le foie contre la nécrose tumorale et régule les paramètres biochimiques en diminuant l'état de stress provoqué par le pesticide utilisé.

Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives pour la compréhension des mécanismes d'action de ces dérivés. Parmi ceux-ci :

- ✓ Faire le test de la cytotoxicité *ex vivo* sur des cellules tumorales référenciés et précisé le type de cancer qui peut être traité par nos composés.
- ✓ Application *in vivo* des tests de toxicité pour l'exploration de ses effets secondaires possibles et l'identification de la dose létale DL50.
- ✓ Il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires observées pourraient aboutir à l'apparition des pathologies.

ANNEXES



Annexe I : Spectre RMN¹H et RMN¹³C des dérivés synthétisésFigure I.1 : Spectre RMN¹H de dérivé Fc-TrisFigure I.2 : Spectre RMN¹³C de dérivé Fc-Tris

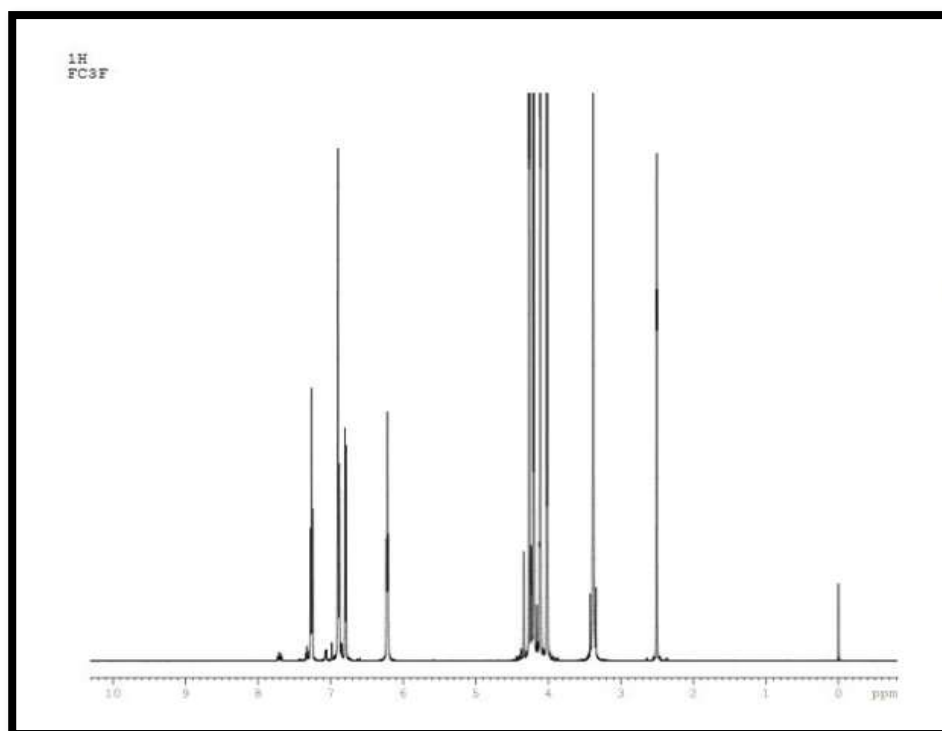


Figure I.3 : Spectre RMN ^1H de dérivé FM3FMA

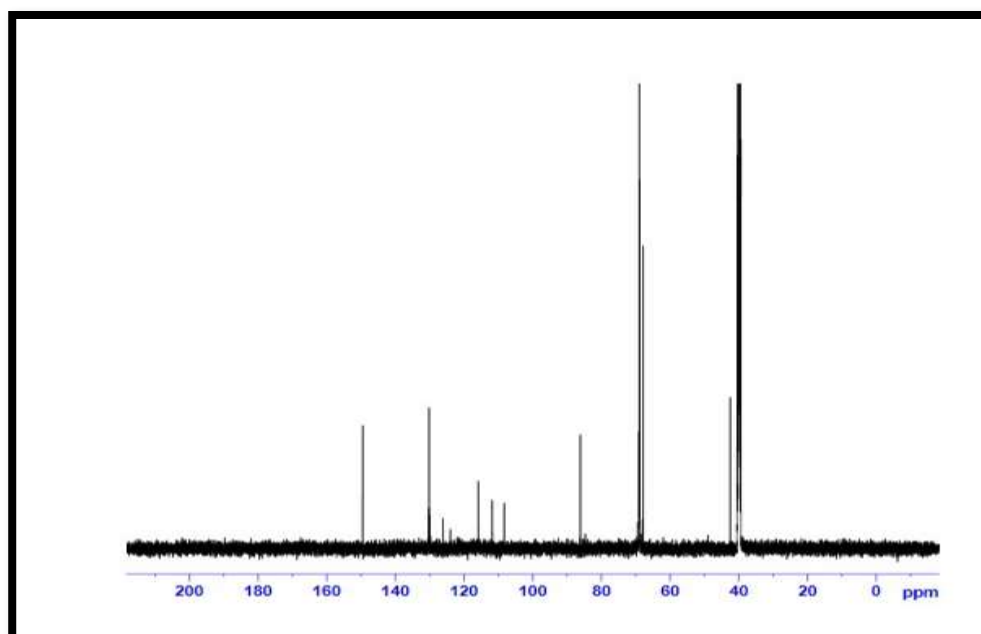


Figure I.4 : Spectre RMN ^{13}C de dérivé FM3FMA

Annexe II : Les données électrochimiques de l'interaction entre des dérivés synthétisés et l'ADN

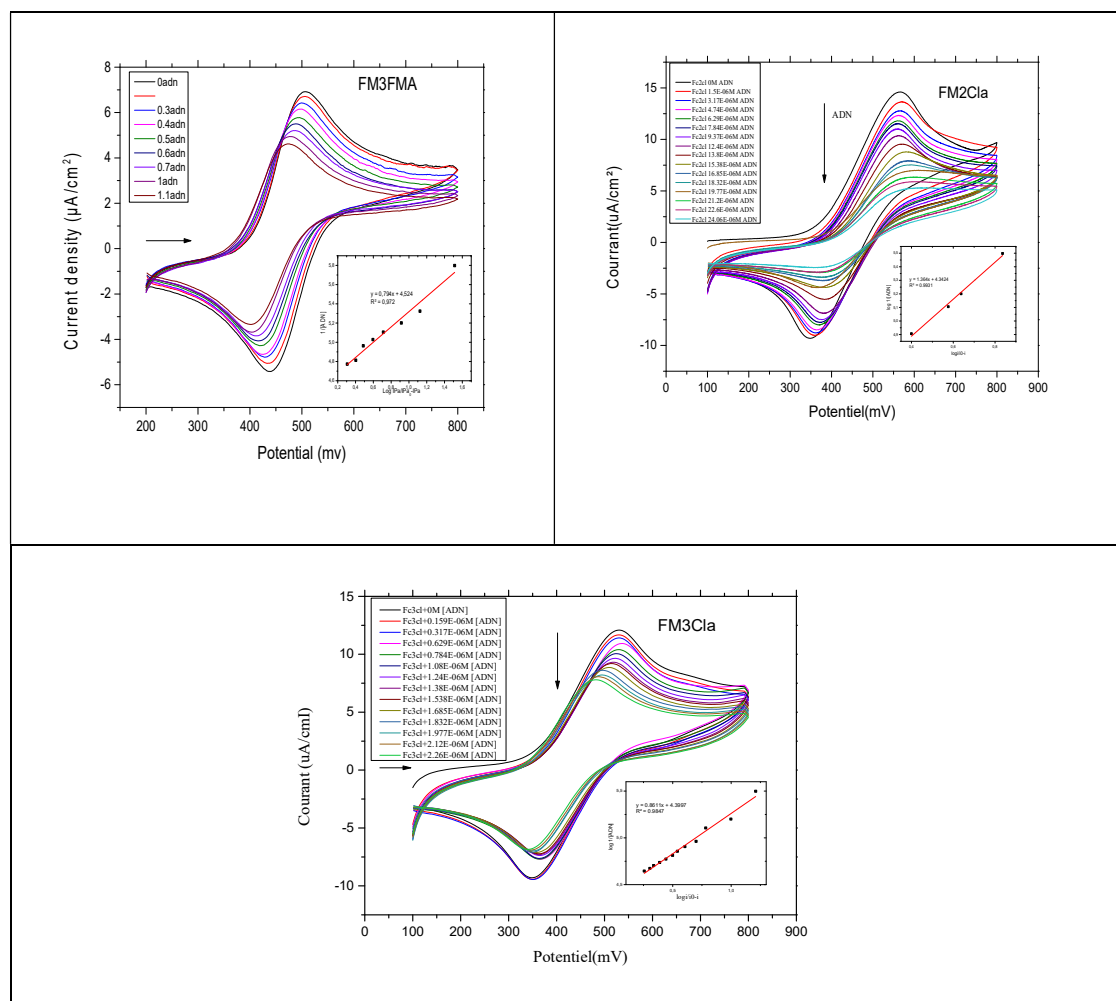


Figure II.1 : Voltamogrammes cyclique de dérivé ferrocénique (1 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

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

Les valeurs obtenues de constante liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FC

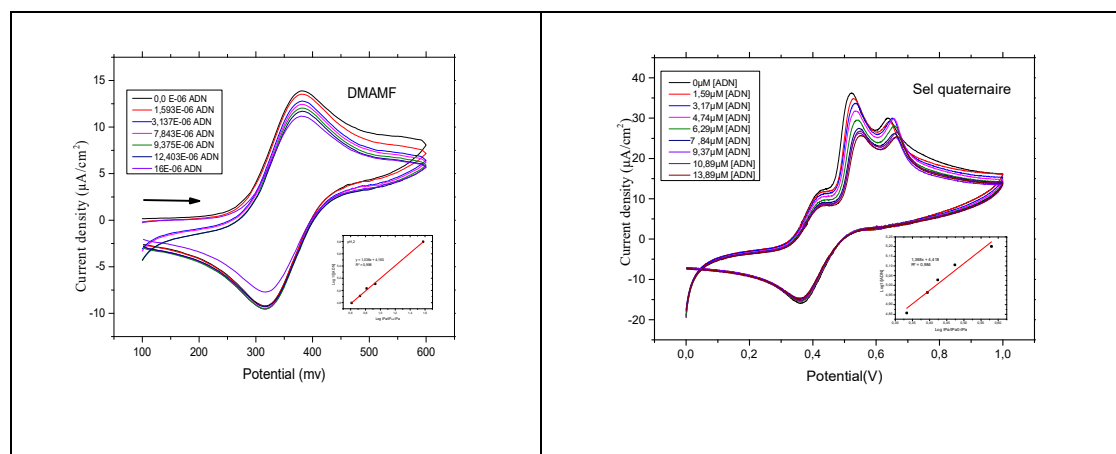


Figure II.2 : Voltamogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon à pH 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. Inset : Droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

Tableau II.1: Les valeurs obtenues de constante liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-FC

Adduit	Equation	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
FM3FMA	$y = 0,794x + 4,524$	$3,3113 \times 10^4$	-25,804
DMAMF	$y = 1,028x + 4,173$	1.479×10^4	-23.806
Sel	$y = 1,388x + 4,418$	1.380×10^4	-23,635
FM2Cla	$y = 1.364x + 4.3424$	2.1877×10^4	-24.7767882
FM3Cla	$y = 0.8611x + 4.3997$	2.5061×10^4	-25.1136155

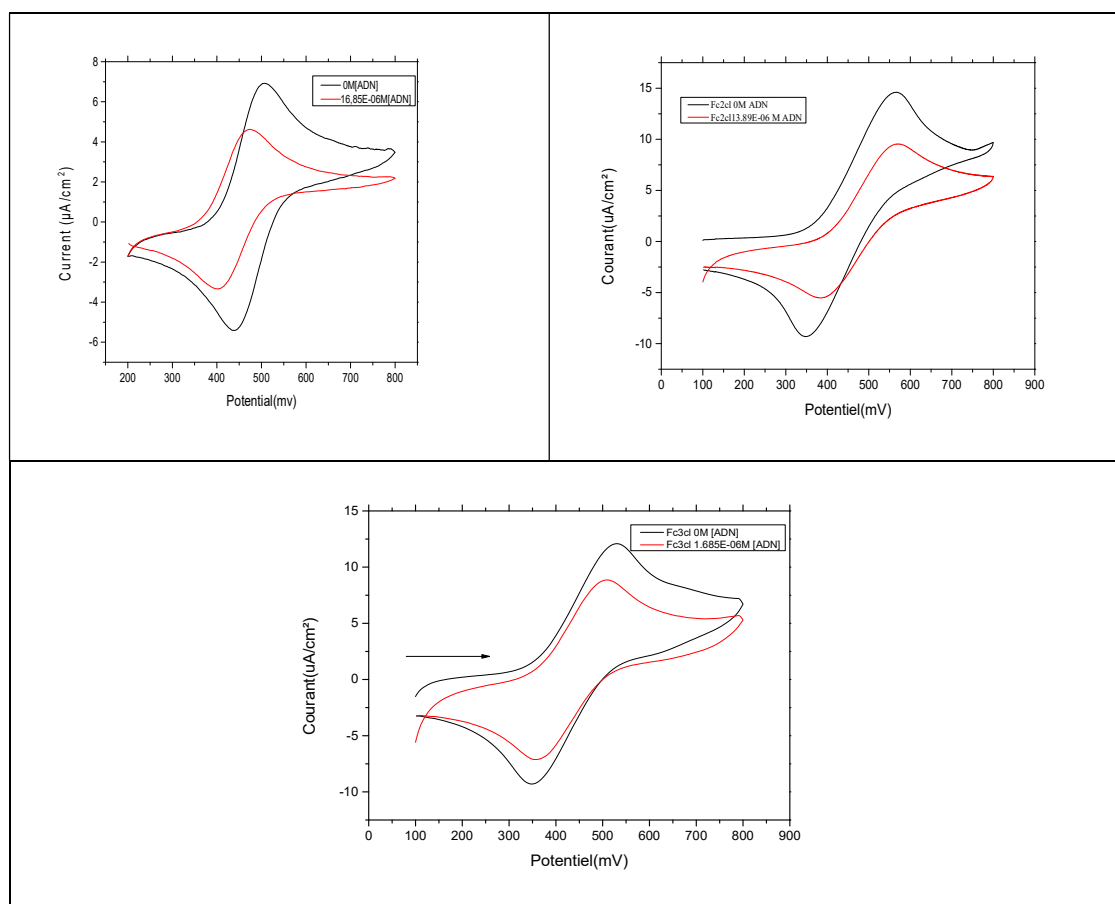


Figure II.3 : Voltamogrammes cycliques de dérivés ferrocéniques (1mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF

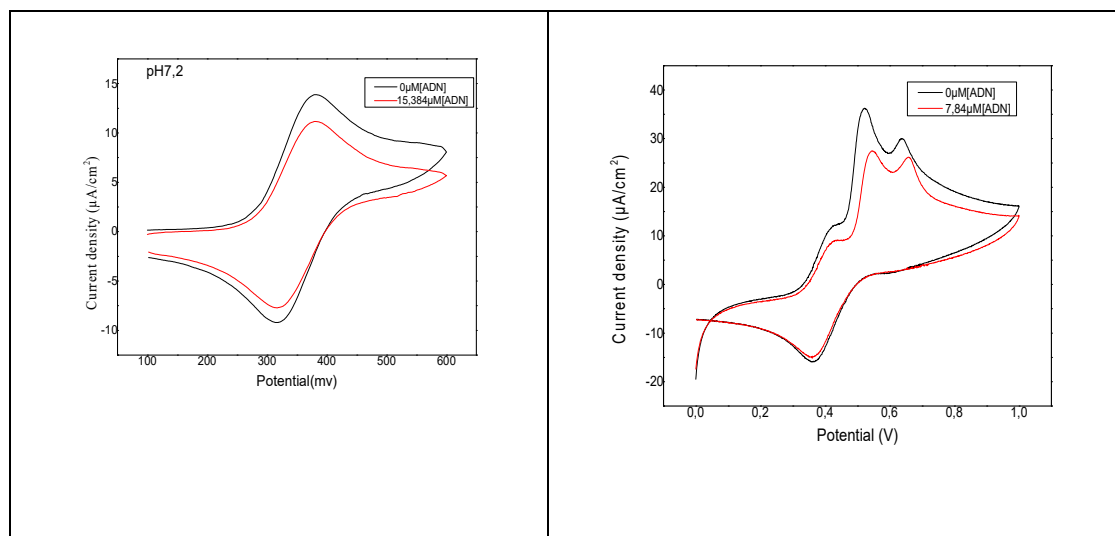


Figure II.4 : Voltamogrammes cycliques de dérivés ferrocéniques (1mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence d'ADN (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans la solution tampon pH7.2

Tableau II.2 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.

Adduit	ΔE^0 (V)	K_{ox} / K_{red}
FM3Ma-ADN	0,0395	4,67187835
FM2Cla- ADN	0.02078	2.25010814
FM3Cla-ADN	0.0046	1.19664712
DMAM-ADN	5,5	1,23942525
SEL-ADN	0,001	1,03979842

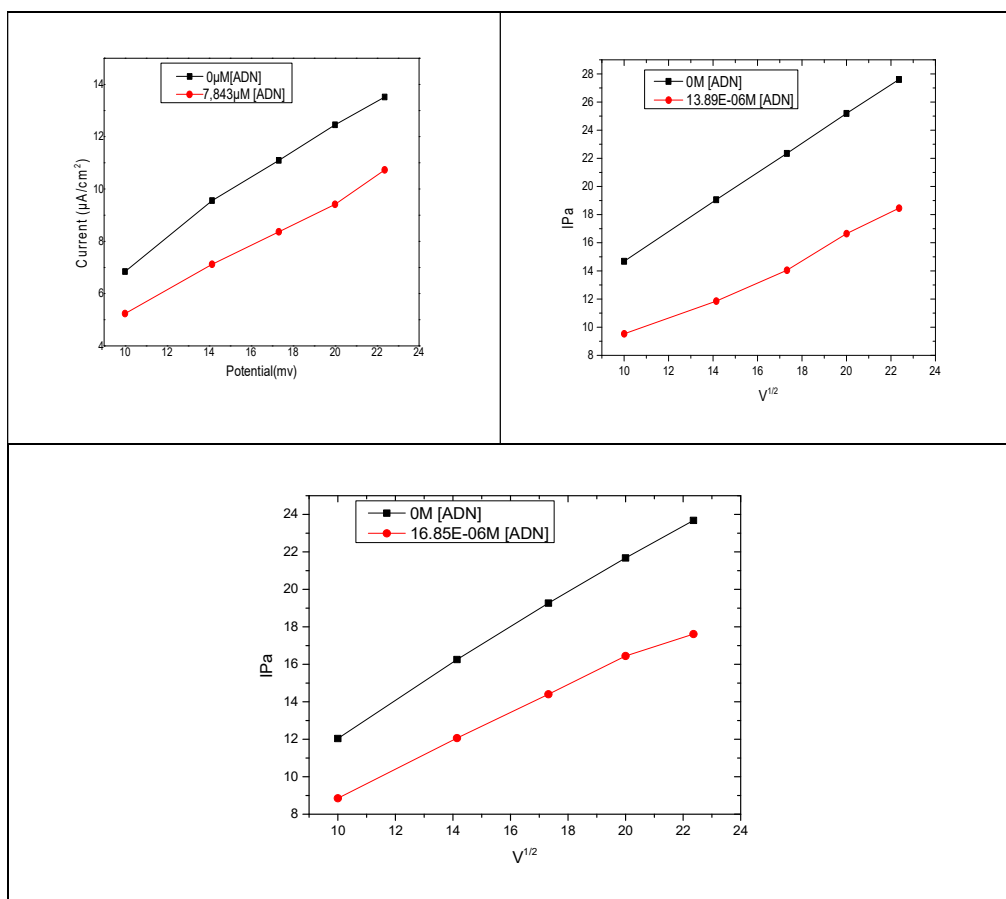


Figure II.5 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.

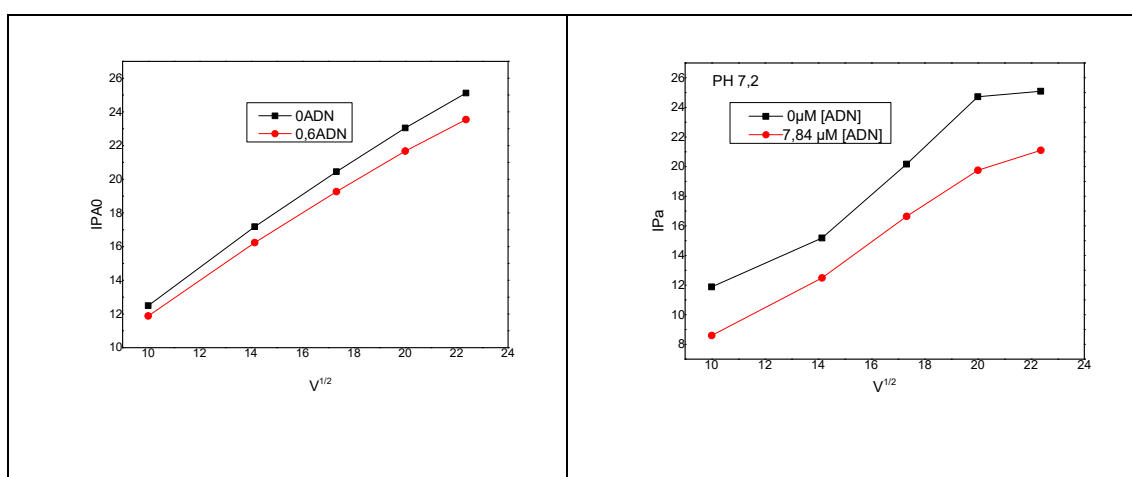


Figure II.6 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de l'ADN.

Tableau II.3 : Coefficients de diffusion de Fc et de l'adduit Fc-ADN

Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
Fc3FA	$y = 0,535x + 1,714$	0,994	2,3405E-08
Fc3FA-ADN	$y = 0,433x + 0,906$	0,997	1,5331E-08
Fc2CLA	$y = 1.0463x + 4.2361$	1	8.952E-08
Fc2CLA-ADN	$y = 0.7327x + 1.8208$	0.989	4.39E-08
Fc3CLA	$y = 0.9428x + 2.7772$	0.9987	7.2686E-08
Fc3CLA-ADN	$y = 0.7205x + 1.796$	0.9962	4.245E-08
DMAMF	$y = 1,022x + 2,511$	0,997	2,1353E-08
DMAMF –ADN	$y = 0,946x + 2,658$	0,997	1,8295E-08
SEL	$y = 1,022x + 2,511$	0,997	2,1353E-08
SEL –ADN	$y = 0,946x + 2,658$	0,997	1,8295E-08

Tableau II.4 : Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et le dérivé ferrocénique.

Adduit	Pente	K	S (bp)
FM3FMA	0,035	33113,11215	0,000579479
FM2CIA	0.12	21877.61624	0.001312657
FM3CIA	0.0245	25061.09253	0.000306998
DMAMF	0,015	14791,08388	0,000110933
Sel	0,043	13803,84265	0,000296783

Annexe III : Les données spectroscopiques de l'interaction entre des dérivés synthétisés et l'ADN

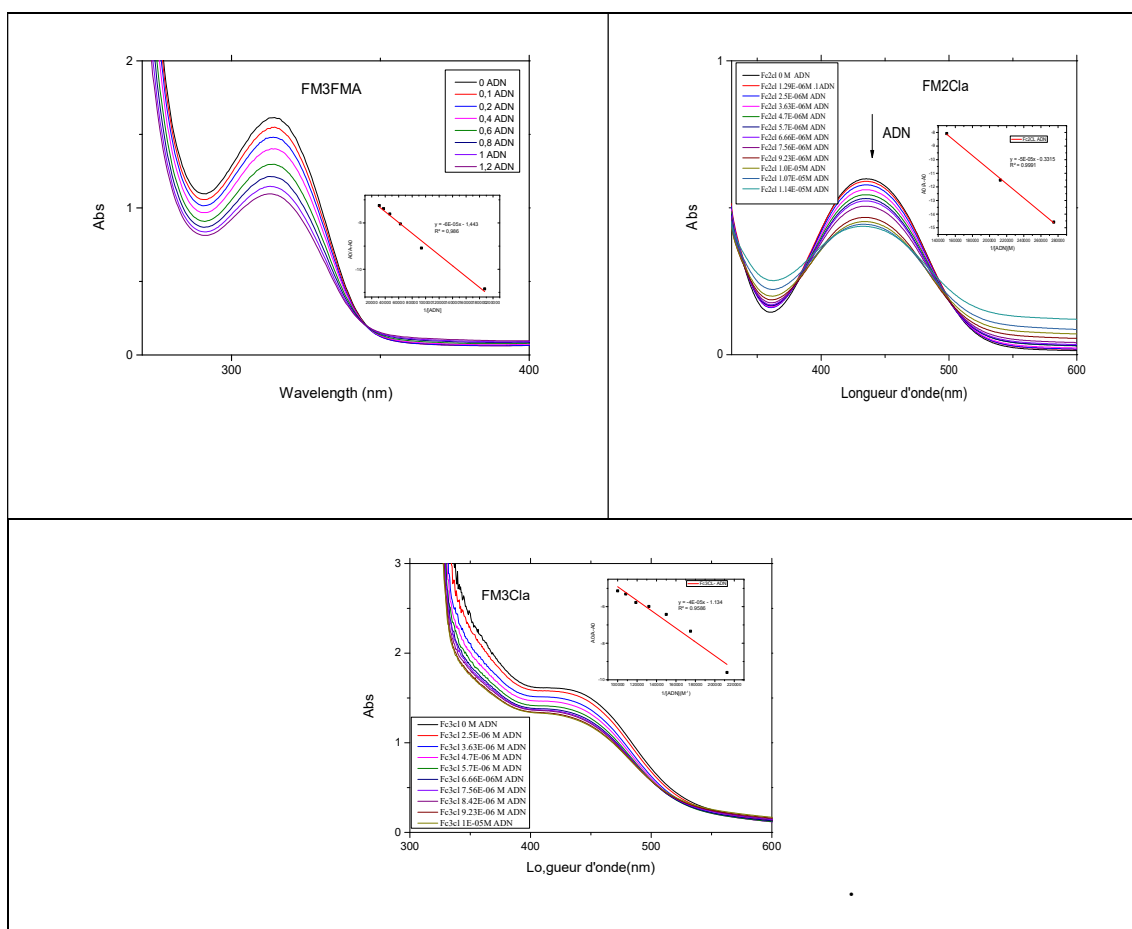
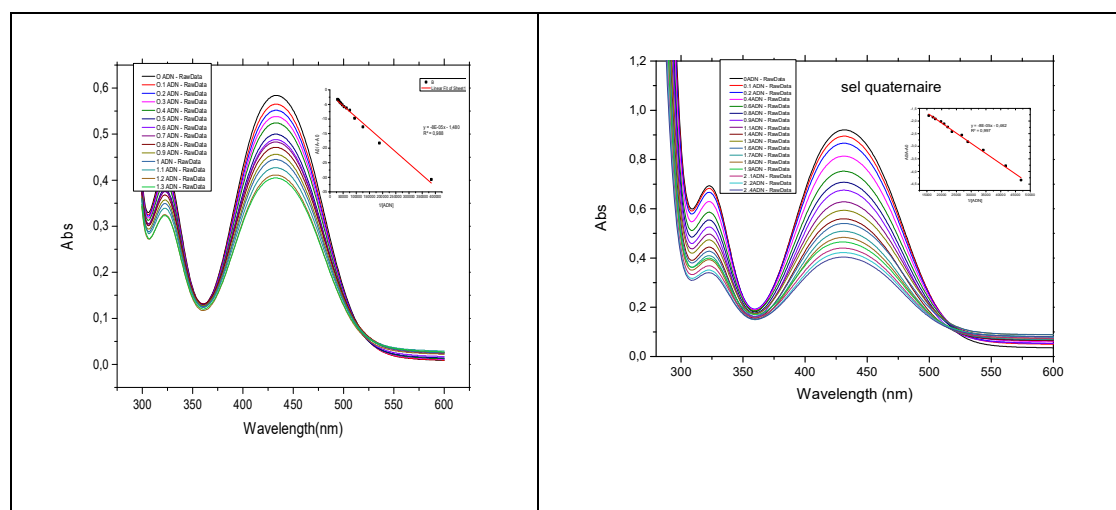


Figure III.1 : Spectre d'absorption UV-Vis de FC (1 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un le DMF. Inset : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN



FigureIII.2 Spectre d'absorption UV-Vis de DMEM (2,3 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 Inset : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN

TableauIII.1 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-FC obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.

Adduit	$K(\text{L.mol}^{-1})$	$\Delta G(\text{KJ.mol}^{-1})$
FM3FMA-ADN	2,41E+04	-25
DMAMF-ADN	1,85E+04	-24.4
Sel-ADN	5,78E+03	-21.5
FM2Cla-ADN	6.60E+03	-21.8
FM3Cla-ADN	2,506+04	-25.11

Annexe IV : Les données électrochimiques de l'interaction entre des dérivés synthétisés et la BSA

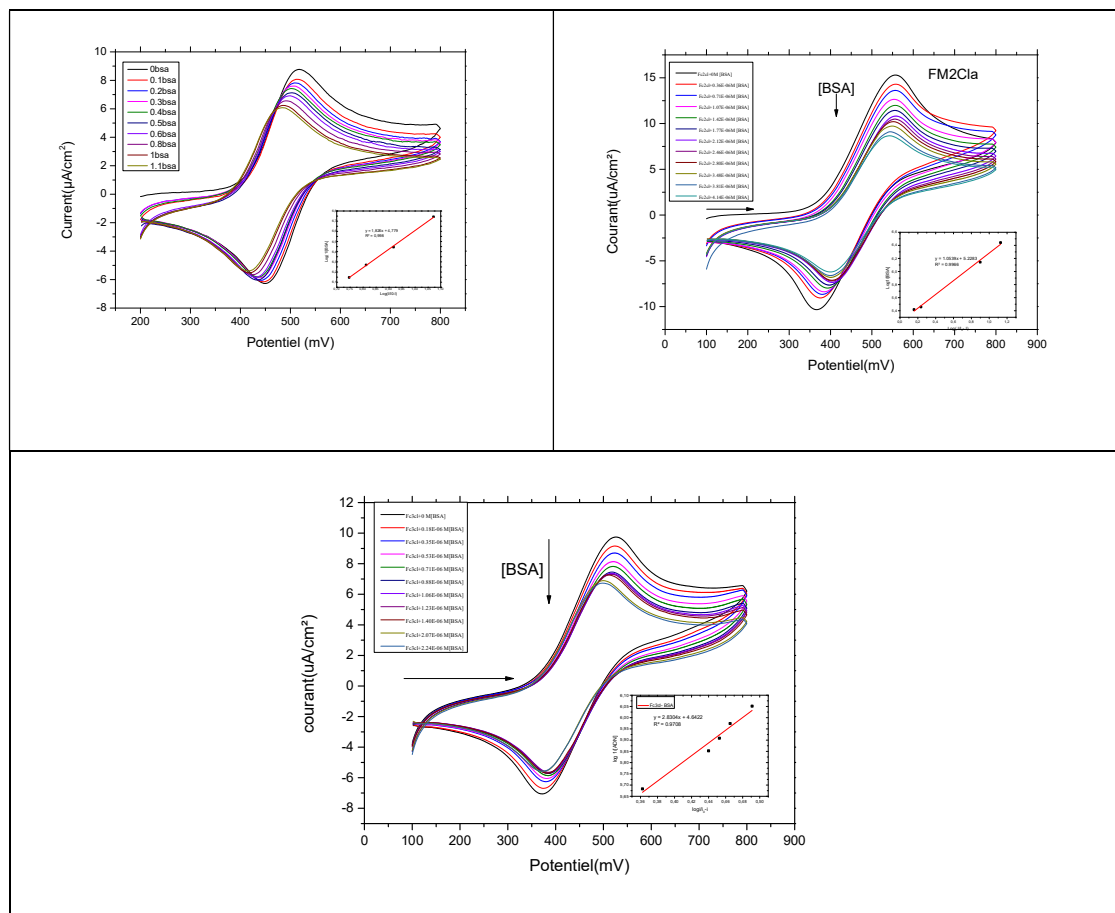


Figure IV.1 : Voltamogrammes cyclique de dérivé ferrocénique (1 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de la BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. INSET : Droite de régression du $\log 1/[\text{BSA}]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

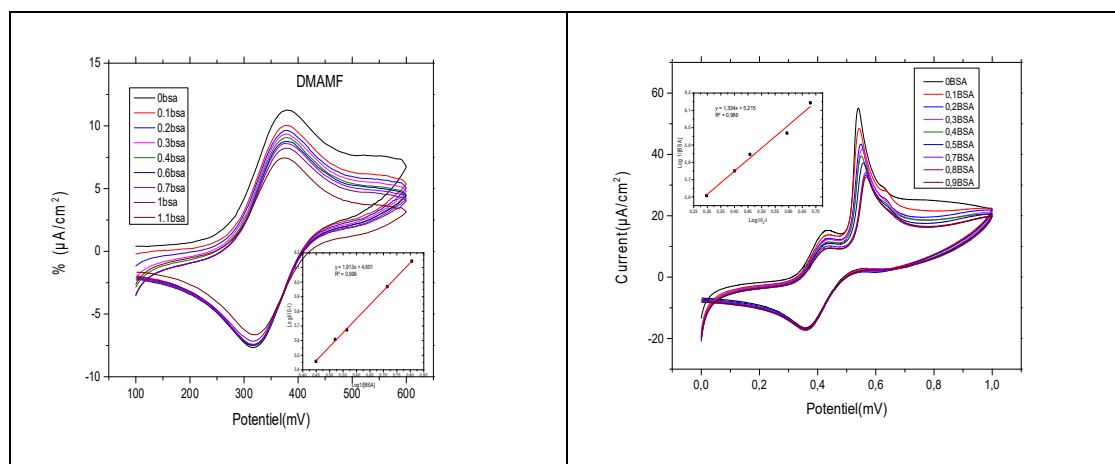


Figure IV.2 : Voltamogrammes cyclique de dérivés ferrocéniques (2 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de la BSA enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon à pH 7,2 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S. Inset : Droite de régression du $\log 1/[BSA]$ en fonction de $\log ip/(ip_0 - ip)$

Tableau IV.1 : Les valeurs obtenues de la constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction BSA-FC

Adduit	Equation	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
FM3FMA	$y = 1,826x + 4,779$	$5,8884 \times 10^4$	-27,231
DMAMF	$y = 1,913x + 4,601$	3.9810×10^4	-26,261
Sel	$y = 1,334x + 5,215$	16.2181×10^4	-29,743
FM2Cla	$y = 1.0539x + 5.2283$	16.5958×10^4	-29.800
FM3Cla	$y = 2.8304x + 4.6422$	4.3651×10^4	-26.489

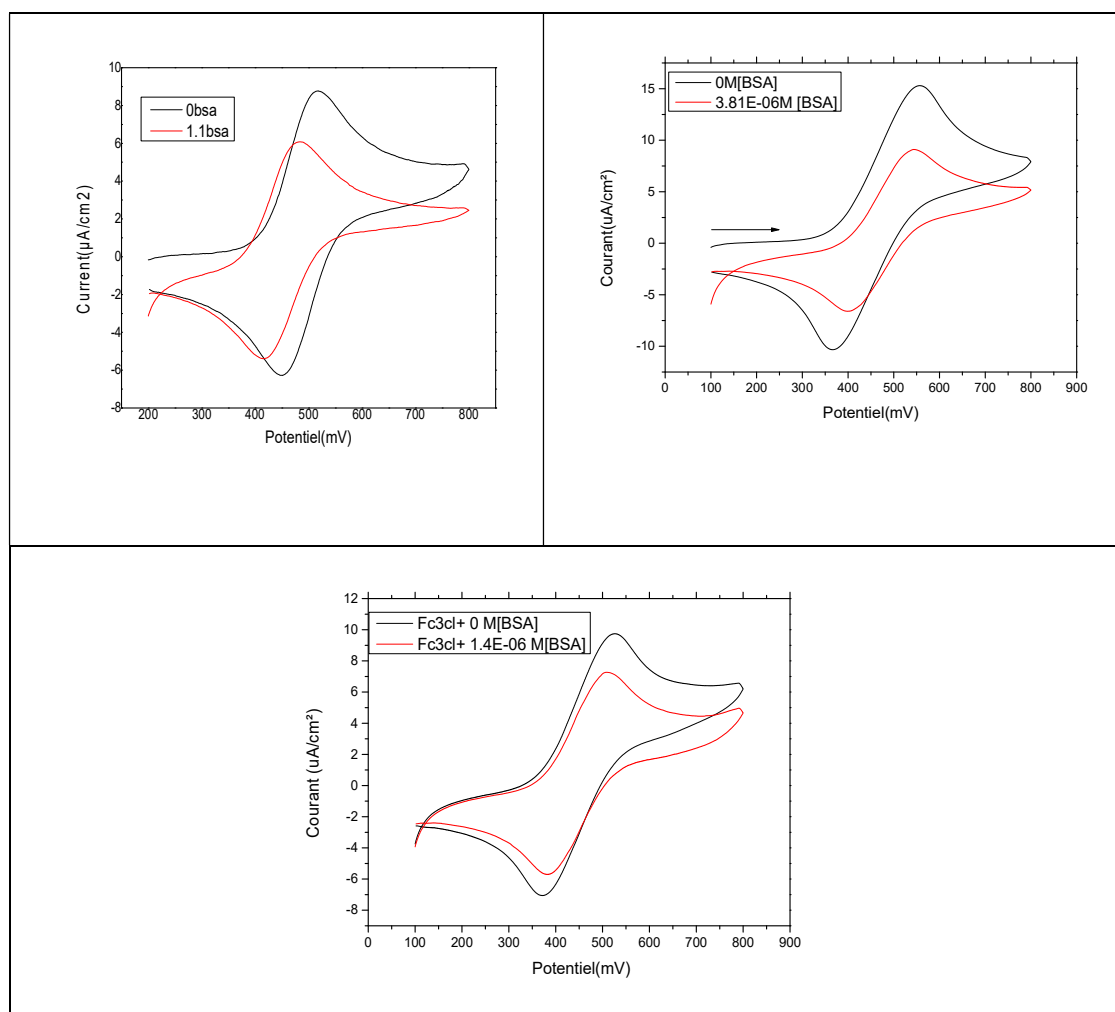


Figure IV.3 : Voltamogrammes cycliques de dérivés ferrocéniques (1mM) en absence de la BSA (ligne noire) et en présence de la BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans le DMF

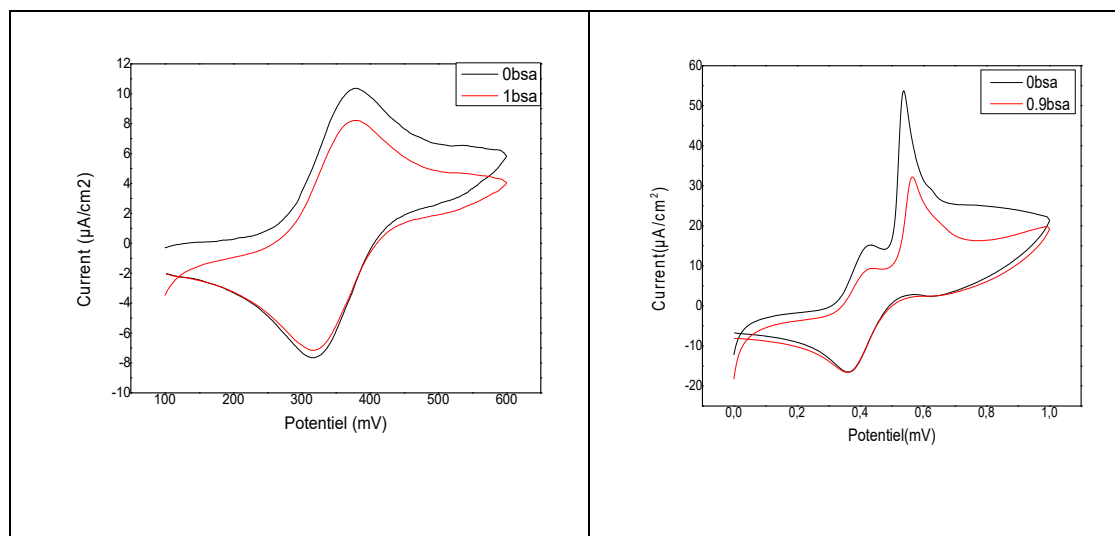


Figure IV.4 : Voltamogrammes cycliques de dérivés ferrocéniques (1mM) en absence d'ADN (ligne noire) et en présence de la BSA (ligne rouge) enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans la solution tampon pH7.2

Tableau IV.2 : Rapport des constantes de liaison, déplacement de potentiel formel et pourcentage de la baisse de la densité du courant des pics anodiques de l'adduit étudié.

Adduit	ΔE^0 (V)	K_{ox} / K_{red}
FM3Ma-BSA	0,0265	2,81288
FM2Cla-BSA	0.02279	2.4337
FM3Cla-BSA	0.001596	1.0642
DMAM-BSA	0,0022485	1,0917
SEL-BSA	0,001	1,0397

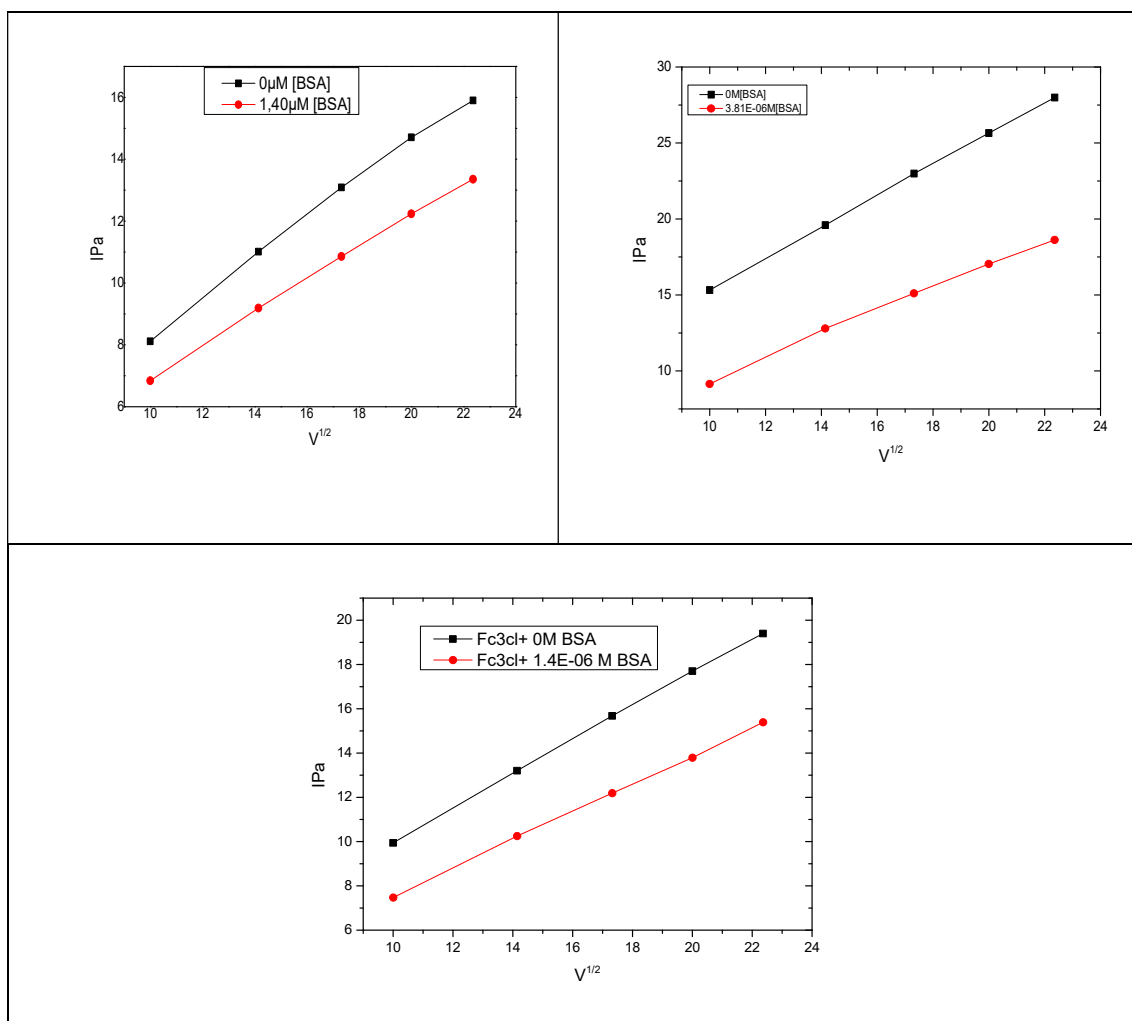


Figure IV.5 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de la BSA.

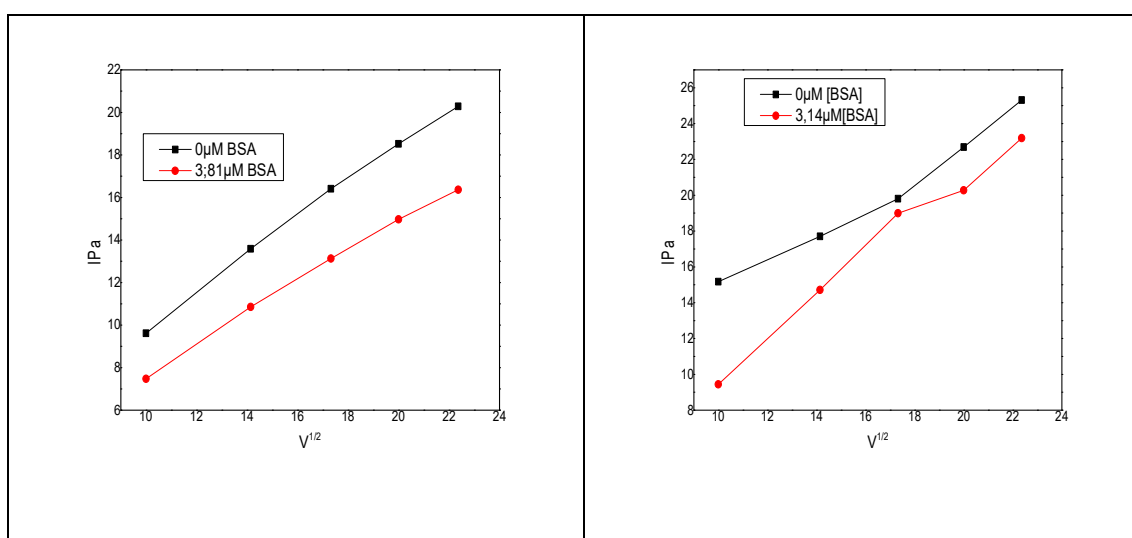


Figure IV.6 : Courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence (ligne rouge) de la BSA.

Tableau IV.3 : Coefficients de diffusion de Fc et de l'adduit Fc-BSA

Adduit	Equation	R ²	D (cm ² /s)
FM3FMA	$y = 0,634x + 1,934$	0,996	3,2869E-08
FM3FMA-BSA	$y = 0,527x + 1,651$	0,998	2,2711E-08
Fc2CLA	$y = 1.0279x + 5.0769$	0.9998	8.6399E-08
Fc2CLA-BSA	$y = 0.7637x + 1.7375$	0.9968	4.7693E-08
Fc3CLA	$y = 0.767x + 2.3275$	0.9997	4.8106E-08
Fc3CLA-BSA	$y = 0.6345x + 1.1787$	0.9995	3.2921E-08
DMAMF	$y = 0,864x + 1,185$	0,997	6,1043E-08
DMAMF -BSA	$y = 0,721x + 0,471$	0,996	4,2509E-08
SEL	$y = 0,813x + 6,497$	0,978	5,4049E-08
SEL -BSA	$y = 1,092x - 0,989$	0,983	9,7511E-08

Annexe V : Les données spectroscopiques de l'interaction entre des dérivés synthétisés et la BSA

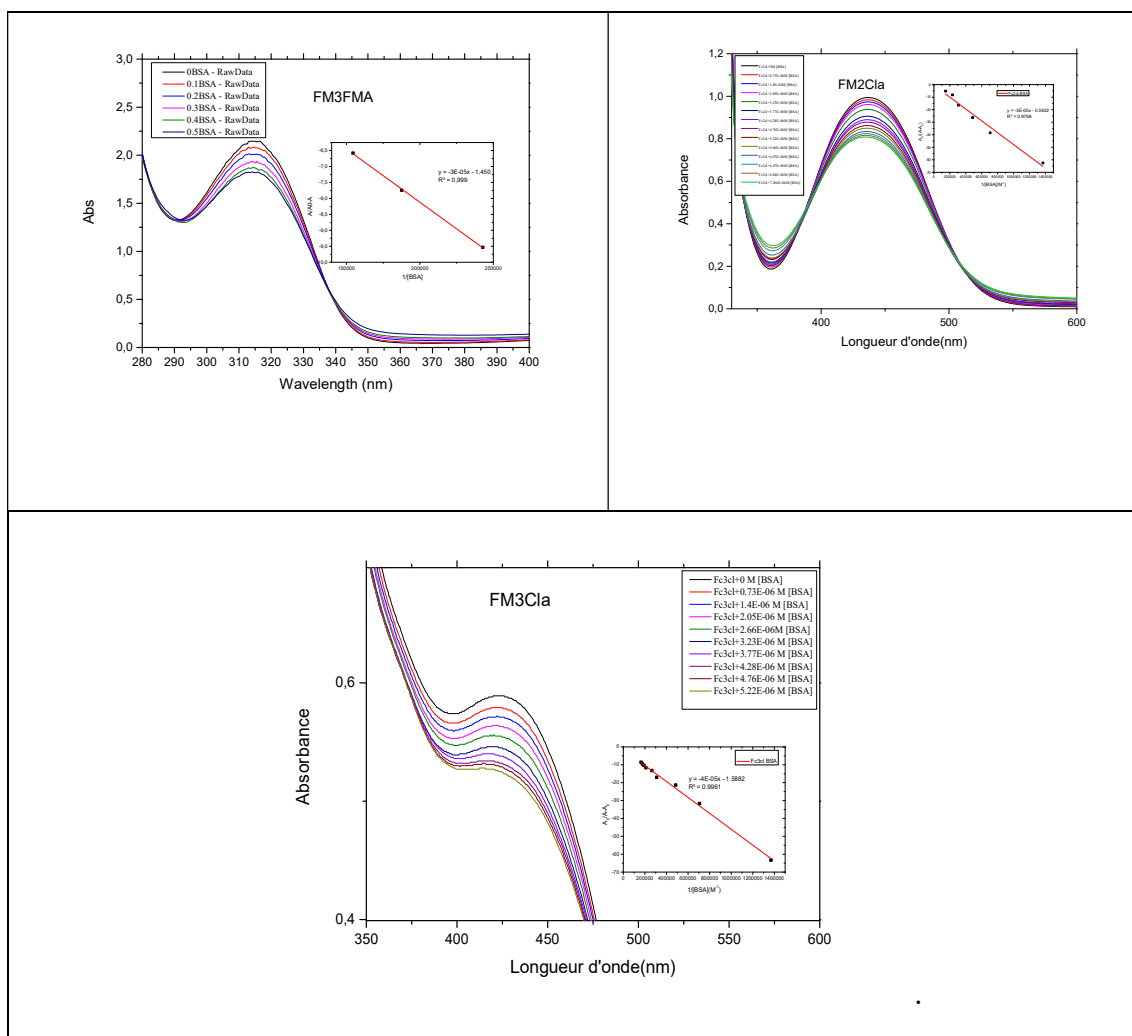


Figure V.1 : Spectre d'absorption UV-Vis de FC (1 mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de la BSA dans un le DMF. Inset : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de la BSA

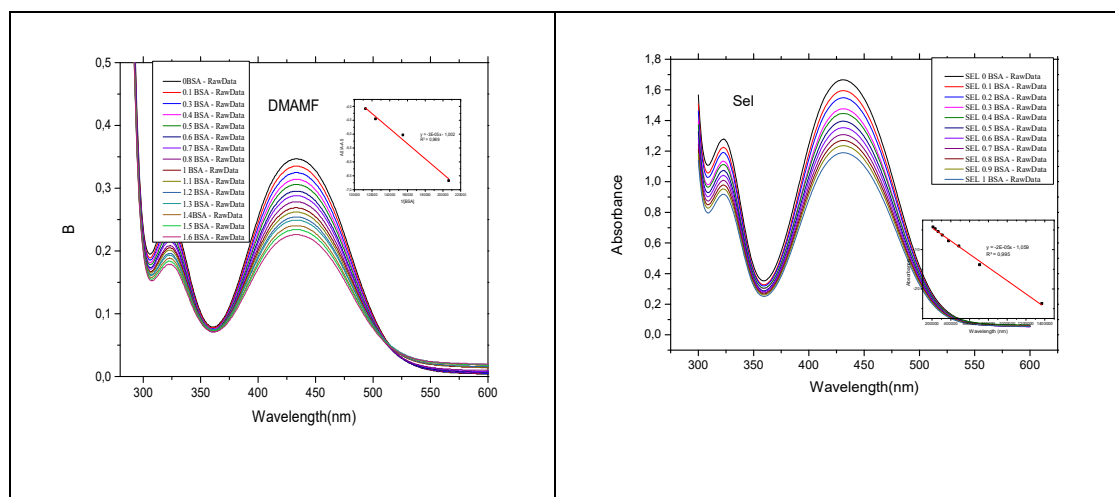


Figure V.2 Spectre d'absorption UV-Vis de Dérivés ferrocéniques (2mM/l) en absence et en présence de différentes concentrations de la BSA dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à pH = 7.2 Inset : Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de la BSA.

Tableau V.1 : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison de l'interaction FC – BSA obtenu à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.

Adduit	$K(\text{L.mol}^{-1})$	$\Delta G(\text{KJ.mol}^{-1})$
FM3FMA-BSA	$4,35 \times 10^4$	-26.5
DMAMF-BSA	$3,12 \times 10^4$	-25.7
Sel-BSA	$5,30 \times 10^4$	-27
FM2Cla-BSA	1.18×10^4	-23.2
FM3Cla-BSA	3.97×10^4	-26.3

Annexe IV : Les données de l'étude de l'activité antioxydante in vivo

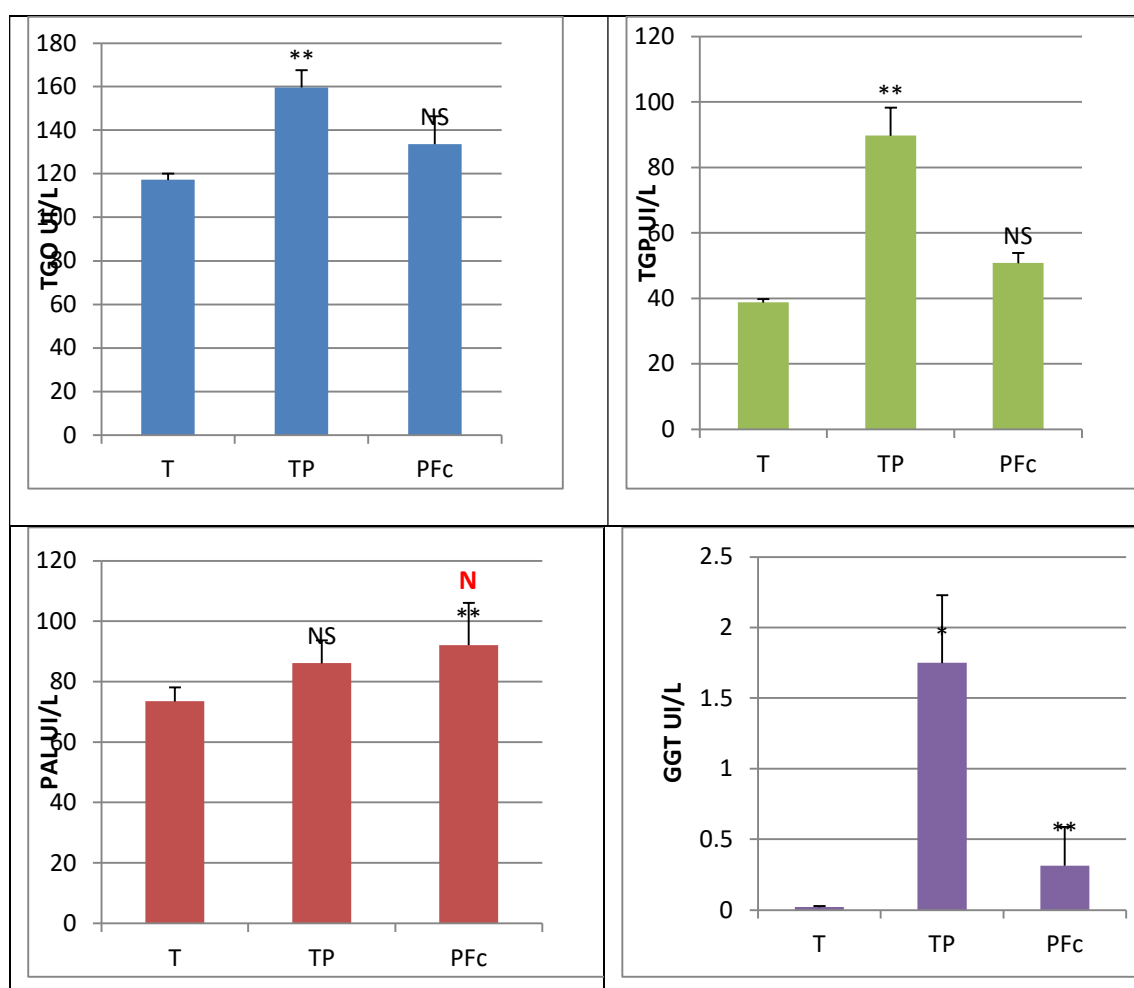
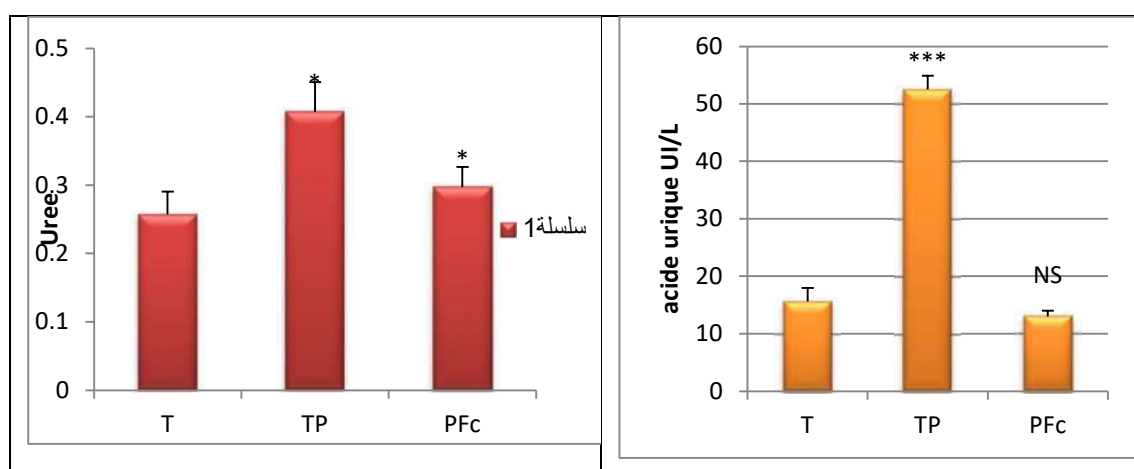


Figure IV.1: Evaluation des enzymes hépatique (TGO, TGP) et le taux de PAL et γ Gt chez les ratte exposées au métribuzine et traités par le FC



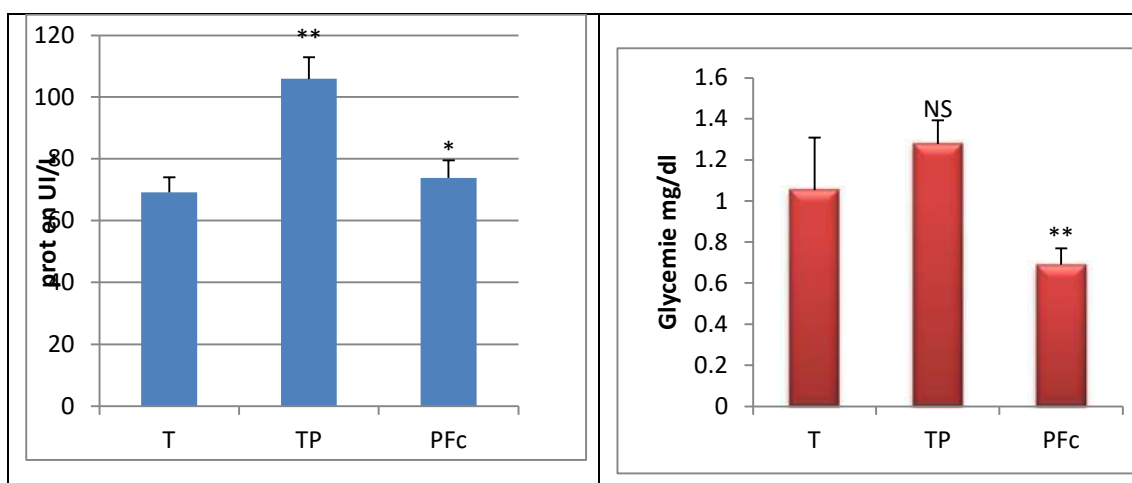


Figure IV.2: Effet de traitement par le FM3FMA sur le bilan rénal (urée, acide urique et protéine totaux) et la concentration sérique en glycémie chez les rattes exposées au métribuzine.

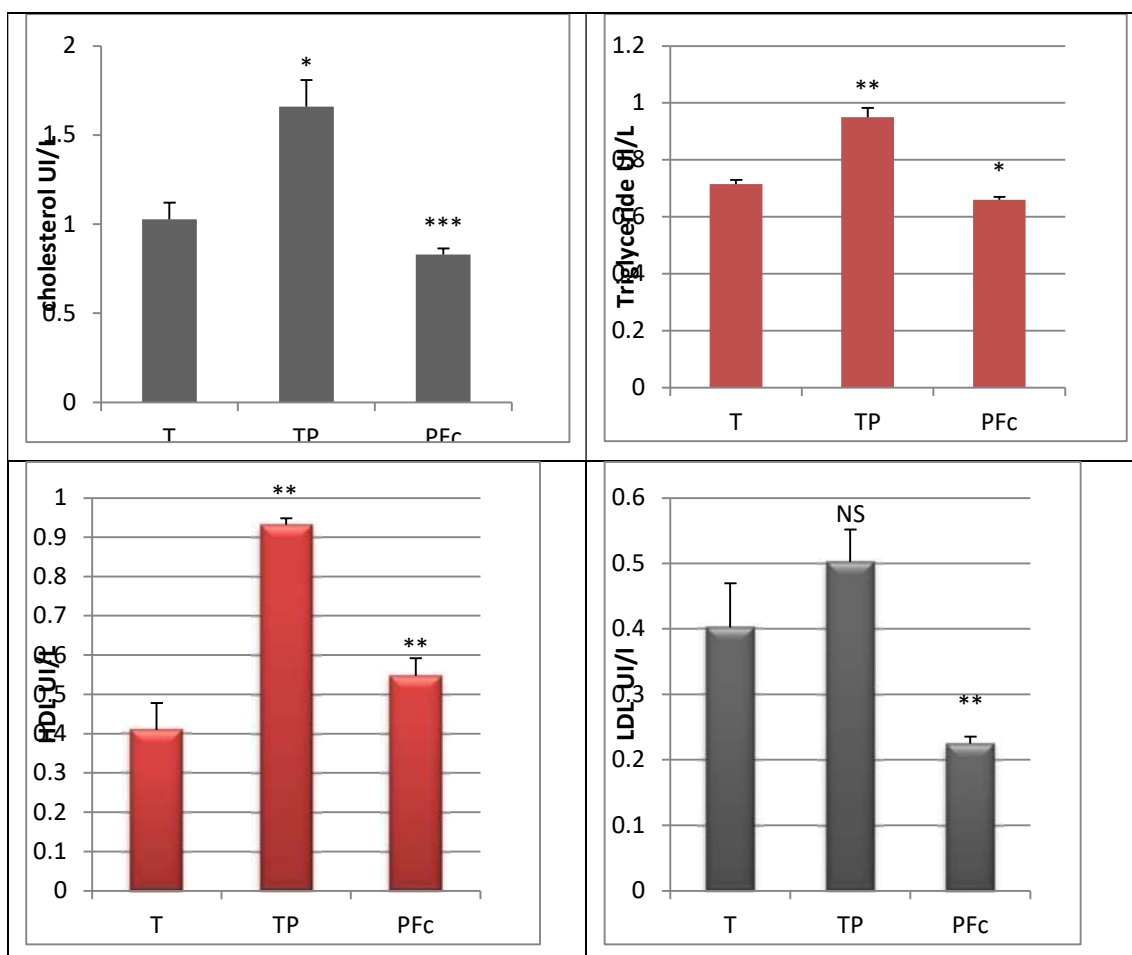


Figure IV.3: Effet de traitement par la FM3FMA sur le cholestérol, TG, HDL et LDL sur les rattes exposées au métribuzine.

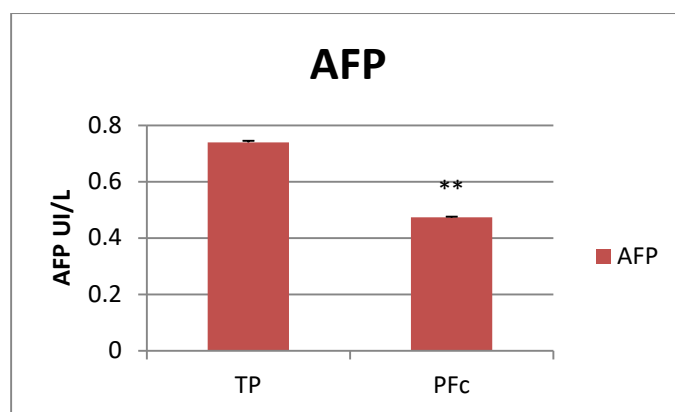


Figure IV.4: Effet de traitement par FM3FMA sur AFP chez les rattes exposées au

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 ; NS P > 0.05 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05; b p < 0.01; c p < 0.001 ; NS' P > 0.05 comparaison avec le lot témoin pesticide.

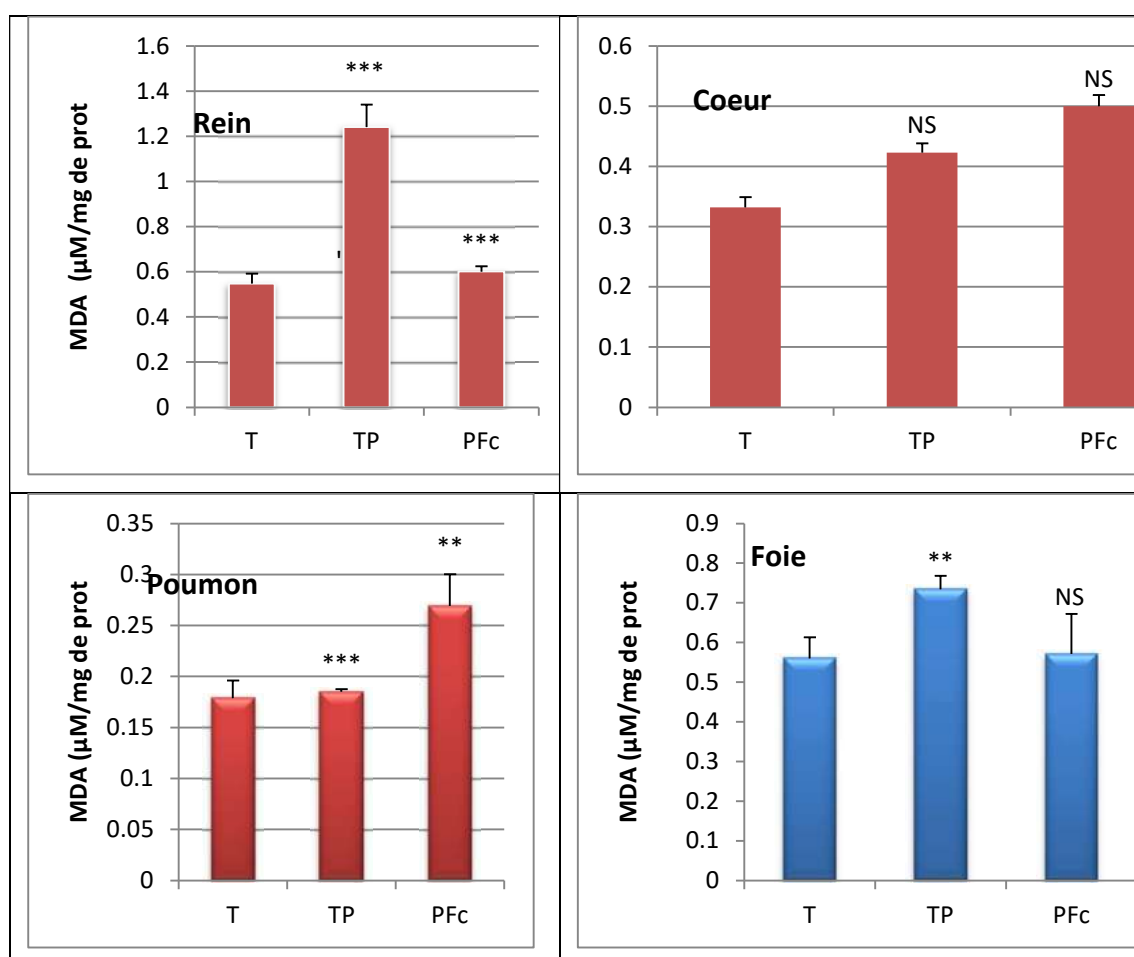


Figure IV.5: Concentration de malondialdéhyde (MDA) hépatique, pulmonaire, rénal et cardiaque chez les différents groupes expérimentaux,

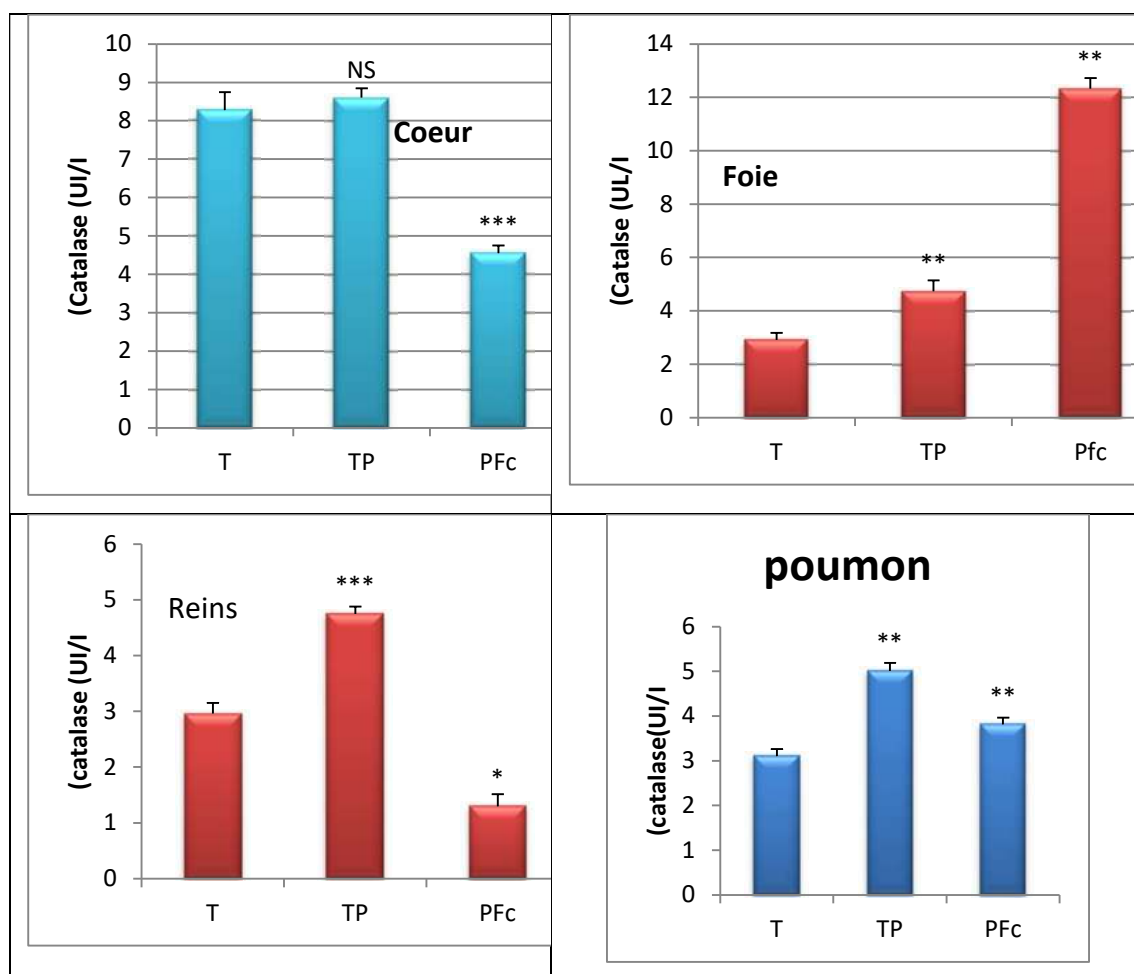
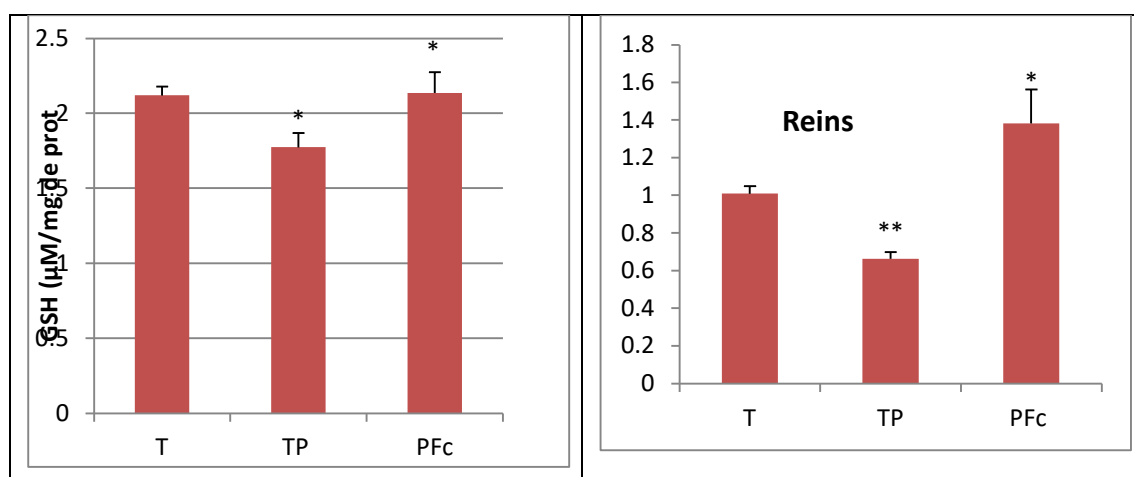


Figure IV.6: Concentrations tissulaires de catalase chez les différents groupes expérimentaux.



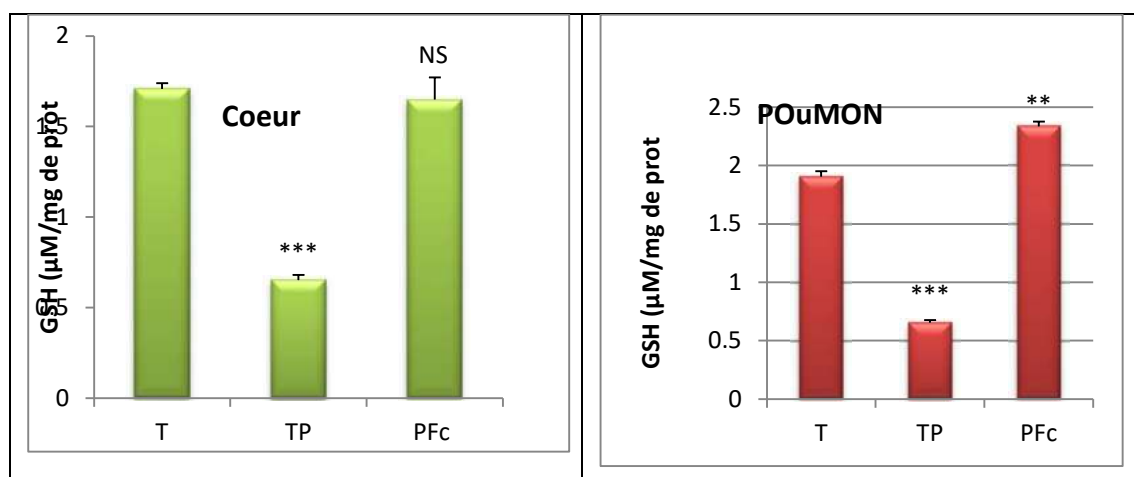


Figure IV.7: Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.

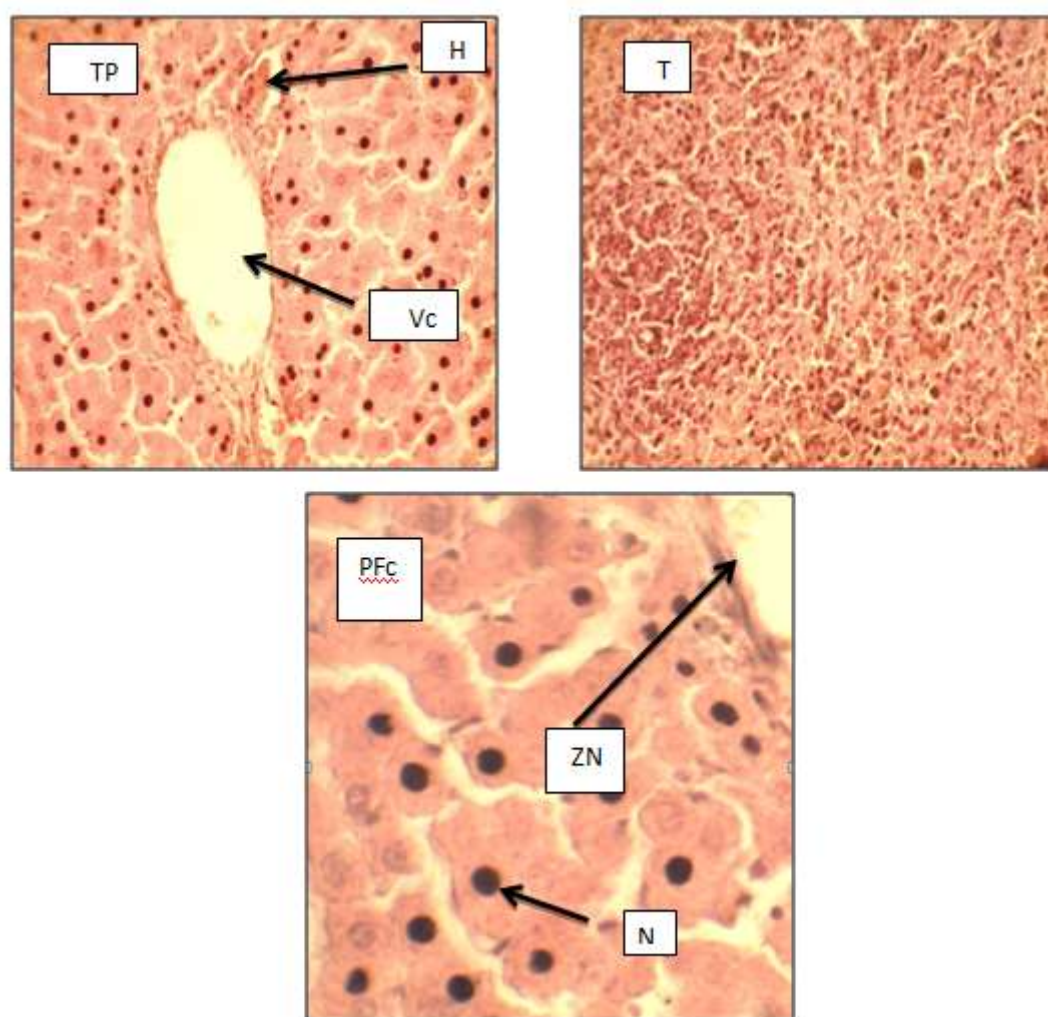


Figure IV.8: Observation microscopique d'une coupe histologique du foie chez les rattes de différents lots (x40). T: Témoin sain, TP: Témoin Pesticide, PFC: ratte exposée au

metribuzine et traite par FM3FMA **Vc**: Veine Centro-lobulaire, **N**: Noyau, **S**: Sinusoïde hépatique, **ZN**: Zone de nécrose avec inflammation, **H**: hémorragie, **Cv**: congestion vasculaire.

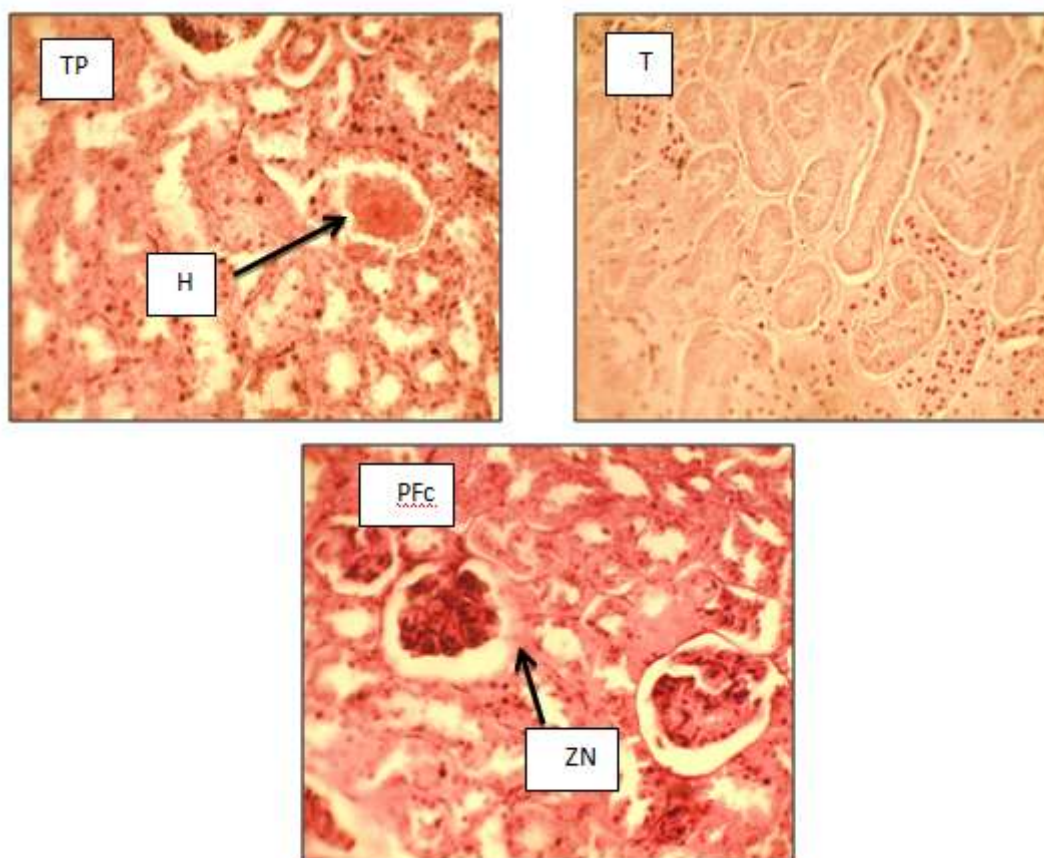


Figure IV.9: Observation microscopique d'une coupe histologique du rein chez les rattes de différents lots (x40)

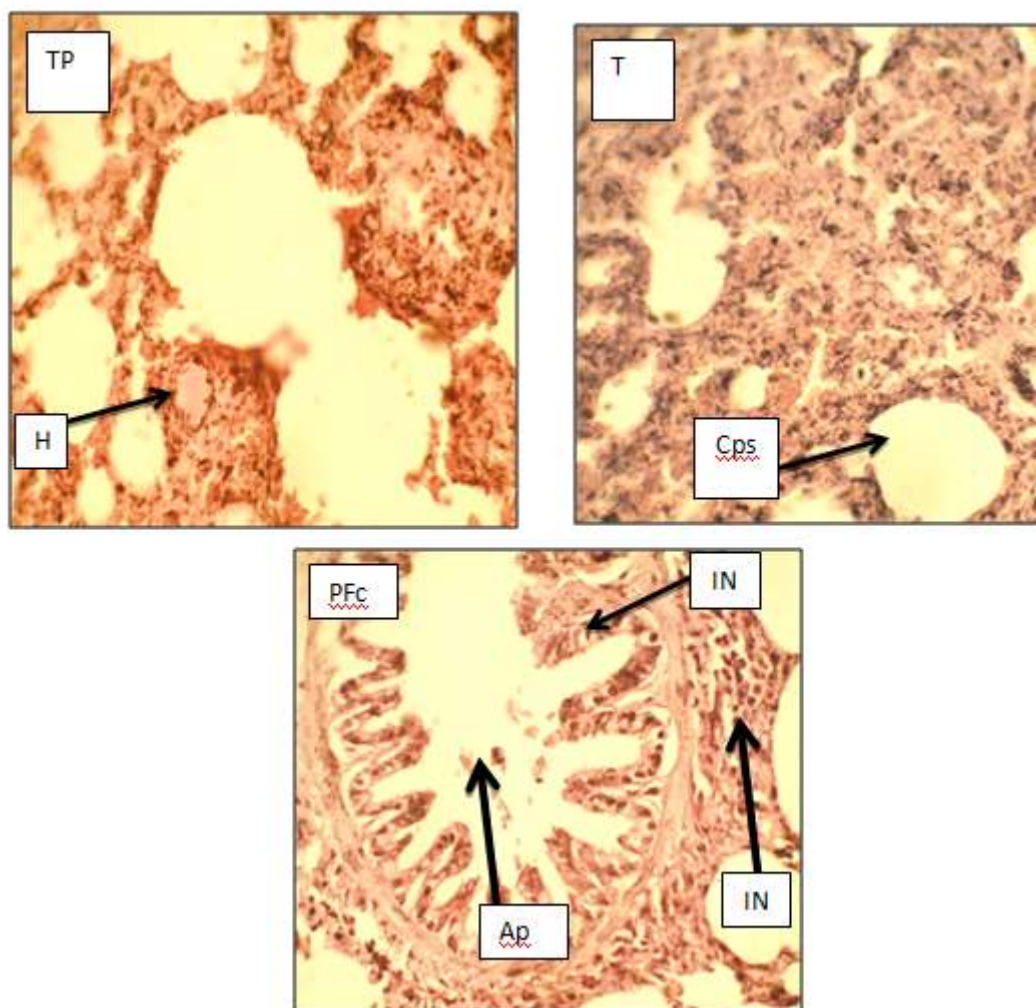


Figure IV.10: Observation microscopique d'une coupe histologique du poumon chez les rattes de différents lots (x40). **AP** : Alvéoles pulmonaires, **Cps** : Capillaires sanguins pulmonaires, **IN** : inflammation, **H** : hémorragie.

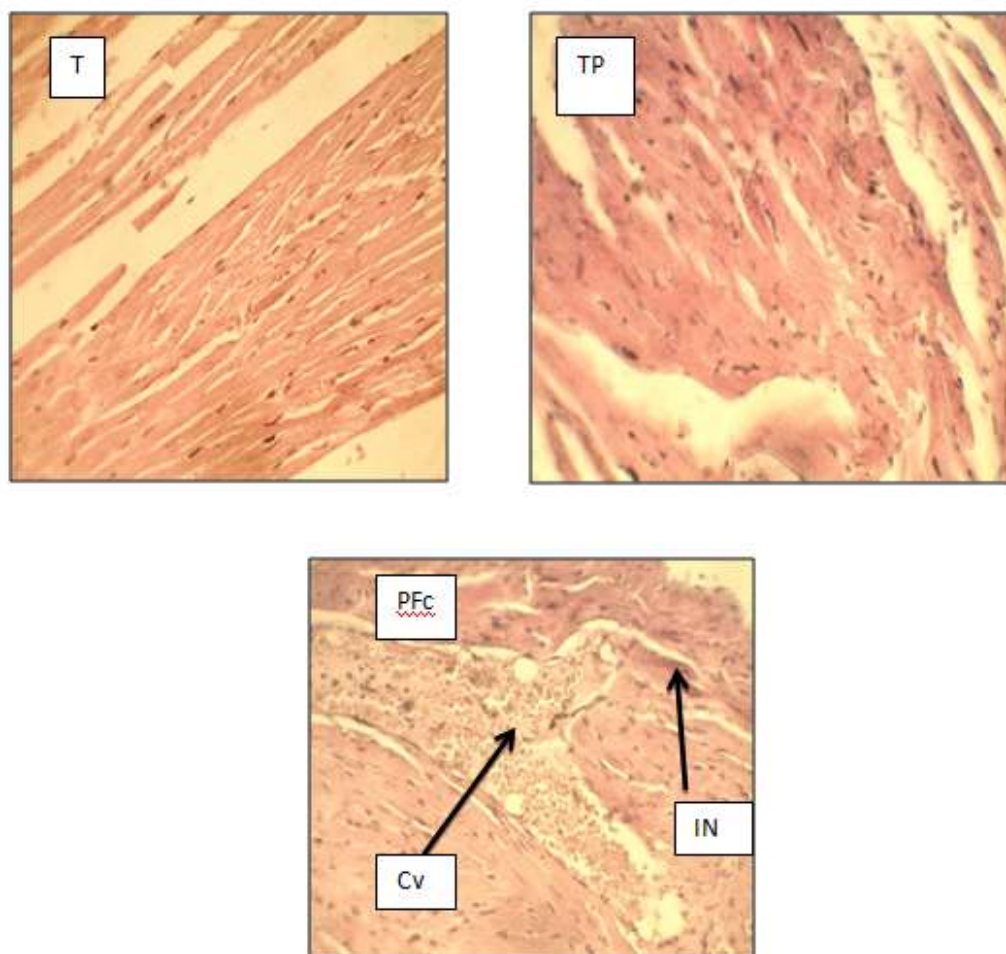


Figure IV.11: Observation microscopique d'une coupe histologique du cœur chez les rattes de différents lots (x40) **IN** : inflammation, **Cv**: congestion vasculaire.



Figure IV.12: Injection intrapéritonéal de dérivé ferrocéanique chez les rats



Figure IV.13: Sacrifice, prélèvement du sang



Figure IV.14: Dissection et prélèvement des organes.

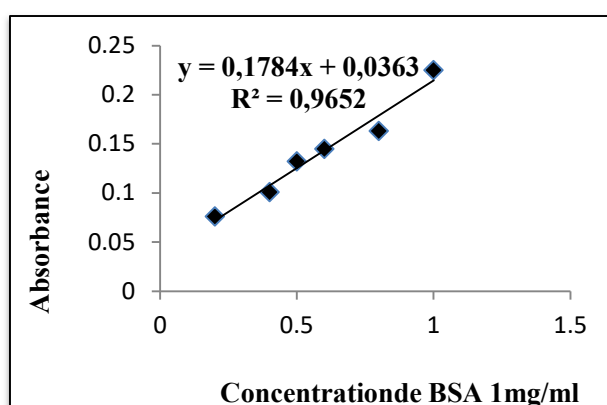


Figure IV.15: Courbe d'étalonnage de dosage protéique tissulaire.

Résumé

L'objectif de notre étude est l'évaluation *in silico*, *in vitro* et *in vivo* de l'activité antioxydante et antimutagénique de dérivés du ferrocène synthétisés au laboratoire. L'activité antimutagénique des composés synthétisés a été évalué par l'interaction de ces composés avec de l'acide désoxyribonucléique et le sérum albumine de vache *in vitro* par deux méthodes : spectroscopique et électrochimique, *in silico* par l'amarrage moléculaire en utilisant l'Autodock Tools. Les résultats de l'amarrage moléculaire et *in vitro* montrent qu'il y a une interaction spontanée entre ces dérivés et l'ADN ainsi que la BSA qui se lie par intercalation ou par liaisons hydrogènes, traduite par les paramètres d'interaction K et ΔG , les résultats montrent aussi que la forme réduite de dérivé ferrocénique réagit avec l'ADN plus que celle de la forme oxydée. En effet cette interaction est confirmée par la valeur de coefficient de diffusion D et la taille de site de liaison qui confirme davantage la formation du complexe Fc-ADN. En revanche, l'étude de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques a été évalué par la méthode électrochimique en utilisant le test de piégeage de radical superoxyde, les résultats ont montré que ces dérivés possèdent une activité inhibitrice du radical superoxyde anion comparé au standard acide gallique et la BHA. En fin, L'analyse *in vivo* chez les rats Wistar, montre des changements notables dans les paramètres biochimiques. Cependant, le traitement par le Fc-Tris normalise les paramètres biochimiques en diminuant l'état de stress. L'étude histologique des foies des rats montre que le Fc-Tris provoquent une protection contre la nécrose tumorale.

Mots clés : ADN, BSA, ferrocène, l'amarrage moléculaire, constante de liaison et énergie libre de liaison, paramètres biochimiques, stress oxydatif, Rats Wistar.

Summary

The objective of our study is evaluation *in silico*, *in vitro* and *in vivo* of the antimutagenic and antioxydant activities of ferrocene derivatives synthesized in the laboratory. The antimutagenic activity of the synthesized compounds were evaluated from the interaction between the synthesized compounds with deoxyribonucleic acid and Bovine serum albumin by two methods: spectroscopic and electrochemic, *in silico* by Docking using *Autodock tools*. The *docking study* and *in vitro* results show that there is a spontaneous interaction between these derivatives and the DNA as well as BSA which binds by intercalation or hydrogen bonds, translated by the interaction parameters K and ΔG , the results also show that the reduced form of ferrocene derivative reacts with DNA more than the oxidized form. Indeed, this interaction is confirmed by the diffusion coefficient value D and the size of the binding site, which further confirms the formation of the Fc-DNA complex. The antioxydant activity of all synthesized compounds were evaluated by electrochemical methods using the superoxide anion radical scavenging test. The results showed that this compounds have inhibitory activity of the anion superoxide radical compared to the gallic acid standard and BHA. *In vivo* analysis in rats shows significant changes in biochemical parameters. However, treatment with Fc-Tris normalizes biochemical parameters by reducing stress. The histological study of the livers shows that Fc-Tris induces protection against tumor necrosis.

Key words: DNA, BSA, ferrocene, docking, binding constant and free binding energy, biochemical parameters, oxidative stress, Rats

ملخص:

تهدف الدراسة الحالية إلى تقدير افتراضي في الكمبيوتر، في المختبر وفي الجسم الحي للفعالية المضادة للتطفر والفعالية المضادة للأكسدة للمشتقات التي تم تصنيعها في المختبر. حيث تم تقدير الفعالية المضادة للتطفر عن طريق تفاعل المركبات المحضرة مع الحمض النووي منقوص الأوكسجين وبروتين ألبومين مصل البقر في المختبر باستعمال طريقتين: المطيافية والكهروكيميائية؛ وفي الافتراضي عن طريق الارساء الجزيئي باستخدام برنامج AutodockTools وأظهرت النتائج في Docking وفي المختبر أن هناك تفاعلاً تلقائياً بين هذه المشتقات والحمض النووي وكذلك BSA الذي يرتبط عن طريق التقاطع أو عن طريق روابط الهيدروجين، وترجمتها بواسطة معامل الارتباط K و ΔG للتفاعل، والنتائج تبين أيضاً أن الشكل المنخفض لمشتقات الفيروسين يتفاعل مع الحمض النووي أكثر من الشكل المؤكسد؛ حيث يتم تأكيد هذا التفاعل من خلال قيمة معامل الانتشار D وحجم موقع الربط الذي يؤكد أيضاً على تكوين مجمع Fc-DNA.

من جهة أخرى تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لجميع لمركبات المحضرة باستخدام الطريقة الكهروكيميائية باستعمال اختبار جذر فوق الأوكسيد؛ أظهرت النتائج أن هذه المشتقات لها نشاط مثبط أنيون فوق الأوكسيد مقارنة مع الأحماض القياسية حمض الغاليك و BHA. أخيراً؛ أظهرت النتائج عند الفئران حدوث تغييرات كبيرة في المعايير البيوكيميائية، حيث أن العلاج بواسطة Fc-Tris يعمل على تعديل المعايير البيوكيميائية عن طريق تقليل حالة الإجهاد. كما أظهرت الدراسة النسيجية للكبد أن Fc-Tris يوفر الحماية ضد نخر الورم.

الكلمات المفتاحية: الحمض النووي، بروتين مصل البقر، الفيروسين، الارساء الجزيئي، ثابت الارتباط والطاقة الحرة، المعايير البيوكيميائية، الإجهاد التأكسدي. **فئران التجارب.**