



**Université Kasdi Merbah Ouargla**  
**FACULTÉ DES SCIENCES APPLIQUÉES**  
**DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES**

## **Thèse**

Présentée pour l'obtention du diplôme de

# **Doctorat ès sciences**

Spécialité : Génie des Procédés

Présentée par :

**Soulef BENABDESSELAM**

## **Thème**

**Synthèse, activité antioxydante et antibactérienne  
de quelques dérivés ferrocéniques obtenus par  
l'arylation de ferrocène**

**Soutenu publiquement le : 16 / 05 / 2017**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mr. M. Saidi</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Ouargla</b>	<b>Président</b>
<b>Mr. M.R.Ouahrani</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université d'El Oued</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. A.Meghazi</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Biskra</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. L.Sakhri</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Ouargla</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. A.A.Bebba</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Ouargla</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. T. Lanez</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université d'El Oued</b>	<b>Rapporteur</b>

*Année universitaire : 2016/2017*

## Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué au niveau du laboratoire de valorisation des ressources sahariennes (VPRS) à l'université d'Ouargla et au laboratoire de valorisation et technologies des ressources sahariennes (VTRS) à l'université d'El-Oued.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Touhami Lanez, pour m'avoir fait l'honneur de travailler avec lui durant ces années de recherche.

Je remercie vivement Mr Saidi Mokhtar et Mr Hedjaj Mohamed, respectivement ex-directeur et directeur de laboratoire de valorisation des ressources sahariennes pour m'avoir accepté au niveau de labo et appartenir à son groupe de recherche.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres du Jury. Merci au, Messieurs M.R. Ouahrani et A. Meghazi pour avoir accepté d'examiner mon mémoire.

Je remercie Messieurs L.Sekhri et F.Kehoul d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie Monsieur le professeur M. Saidi pour avoir accepté de présider et faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Docteur Rahim Oum Elkhir, docteur en chimie qui m'a beaucoup aidée au cours de ma thèse.

Mes remerciements vont également à Mr. Salem Atia, pour son aide précieuse comme ami, collègue et comme responsable.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Ali Douadi et Mr le professeur Gérard Audran pour m'avoir aidé à effectuer les analyses RMN en France et me donner l'opportunité de pratiquer l'analyse par RMN.

Pour ses encouragements, sa patience et son assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie mon marie Djamel.

Je remercie tous ceux qui m'ont soutenu pour établir cette thèse, Je pense ici en particulier à Ali Tliba, Hemmami Hadia et sa famille, Henni Meriem et Rebai Abdelkarim qui m'ont aidé et facilité mon travail au sein de laboratoire de VTRS et sans oublier Souhila Menaceur et son marie pour mon accueil dans leur domicile.

Je remercie mon amie et collègue Hidaya Izza pour son soutien durant mes années de recherche.

Merci aussi à tous mes collègues du laboratoire. Je leur exprime ma profonde sympathie et je leur souhaite une bonne continuation. Je remercie également chaleureusement Roukia Cherbi, Chaima Ben Sassi, Assia Belfar, kendour Zaouia, Khadidja Bouziane, Imène Raache, Wahiba Belaid, Mehdi Belguidoum et sans oublier Mme Nabiha Aloui.

Finalement, j'adresse un grand merci à mes enfants Akram, Roumaissa et Rami, à mon père et je lui dis merci pour ton soutien pendant mes études, à mes frères et mes sœurs.

J'oublie sûrement certaines personnes qui par un geste ou une discussion ont apporté bien plus que l'acte, qu'ils reçoivent encore une fois mes sincères remerciements

*Soulef*

## Résumé

Ce travail vise dans sa première partie à synthétiser cinq dérivés ferrocéniques à partir de diazotation de nitroaniline en position ortho, méta et para par nitrite de sodium et la formation des sels de diazonium correspondants, qui sont respectivement le chlorure de 2-nitrobenzodiazonium, sulfate de 3-nitrobenzodiazonium et chlorure de 4-nitrobenzodiazonium, ensuite chaque sel en solution est ajouté au ferrocène pour but d'y introduire le groupement nitrophényl (arylation) et la formation de 2-nitrophénylferrocène, 3-nitrophénylferrocène, bis-3-nitrophénylferrocène et 4-nitrophénylferrocène. Bis-3-nitrophénylferrocène est obtenu après une séparation sur colonne chromatographique du mélange avec un gradient de polarité ; Ether de pétrole/Ether di éthylique : 8/2.

3-nitrophénylferrocène est réduit par  $\text{NaBH}_4$  en présence de  $\text{Pd}/\text{charbon}$  actif pour donner 3-ferrocénylaniline comme un précipité jaunâtre.

Ces dérivés ont été identifiés par FT-IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques synthétisés en appliquant le test de piégeage de radical superoxyde par voltammétrie cyclique, le test de piégeage de radical libre DPPH par spectrophotométrie et le test de réduction de molybdate. Les résultats obtenus ont montré que 4-nitrophénylferrocène possède une activité inhibitrice élevée du radical superoxyde avec une  $\text{CI}_{50}$  égale à 1.178mg/ml et une capacité totale antioxydante avec un pourcentage d'inhibition du radical superoxyde égale à 19.44%, 2-nitrophénylferrocène possède la capacité de piégeage du radical DPPH la plus élevée avec une  $\text{CI}_{50}$  de 0.778mg/ml, et il constitue au même temps le plus fort réducteur de phosphomolybdène avec une  $\text{CI}_{50}$  de 26.323mg/ml.

La troisième partie est consacrée à l'étude de l'activité antibactérienne des composés synthétisés testés sur quatre souches de bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats obtenus montrent clairement que les composés ferrocéniques synthétisés ont des activités faibles sur les quatre souches bactériennes avec des diamètres des zones d'inhibition ne dépassant pas 17 mm pour des concentrations de 25mg/ml.

**Mots clés :** ferrocène, diazotation, arylation, activité antioxydante, voltammétrie cyclique, activité antibactérienne

## Abstract

This work aims in its first part to synthesize five ferrocene derivatives after diazotizing nitroaniline in the ortho, meta and para position by the sodium nitrite and the formation of the corresponding diazonium salts which are respectively: chloride, 2-nitrobenzediazonium sulfate, 3-nitrobenzediazonium and chloride 4-nitrobenzediazonium, then each salt in solution was added to the ferrocene for the purpose of introducing the nitrophenyl moiety thereon (arylation) and the formation of 2-nitrophenylferrocene, 3-nitrophenylferrocene, bis-3-nitrophenylferrocene and 4-nitrophenylferrocene. Bis-3-nitrophenylferrocene is obtained after separation by column chromatography of the mixture with a polarity gradient; Petroleum ether / diethyl ether: 8/2.

3 - nitrophenylferrocène is reduced by NaBH<sub>4</sub> in the presence of pd / charcoal to give 3 - ferrocénylaniline as a yellowish precipitate .

These derivatives were identified by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and DEPT.

The second part is devoted to the study of the antioxidant activity of synthesized ferrocene derivatives by applying the trapping test of superoxide radical by cyclic voltammetry, the free radical DPPH trapping test by spectrophotometry and molybdate reduction test. The results showed that 4 - nitrophénylferrocène has high inhibitory activity of the superoxide radical with IC<sub>50</sub> equal to 1.178mg / ml and total antioxidant capacity of the superoxide radical with a percentage of inhibition equal to 19.44 %. 2- nitrophénylferrocène has the highest trapping DPPH radical activity with IC<sub>50</sub> of 0.778mg / ml, and it constitutes at the same time the highest gear phosphomolybdenum with an IC<sub>50</sub> 26.323mg / ml.

The third part is devoted to the study of antibacterial activity of the synthesized compounds tested on four strains of bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumonia*. The results obtained clearly showed that the synthesized ferrocene compounds have low activities on the four bacterial strains with diameters of inhibition zones do not exceeding 17 mm at concentrations of 25mg / ml.

**Keywords: Ferrocene, diazotization, arylation, antioxidant activity, cyclic voltammetry antibacterial activity.**

## المخلص:

يهدف هذا العمل في جزئه الأول إلى تصنيع خمس مشتقات فيروسينية إنطلاقاً من ديازوتاسيون النتروأيلين في الوضعية أورثو ، ميتا و بارا بواسطة نيتريت الصوديوم و تشكيل أملاح الديازونيوم الموافقة وهم على التوالي كلورور-2-نيتروبنزين ديازونيوم، سولفات -3-نيتروبنزين ديازونيوم و كلورور-4-نيتروبنزين ديازونيوم، بعد ذلك كل محلول من محاليل هذه الأملاح يضاف إلى الفيروسين بهدف إدخال مجموعة النيتروفينيل (آريلاسيون) وتشكيل 2-نيتروفينيل فيروسين، 3-نيتروفينيل فيروسين، بيس-3 -نيتروفينيل فيروسين و 4-نيتروفينيل فيروسين. تحصلنا على بيس-3-نيتروفينيل فيروسين بعد فصل المزيج عن طريق كروماتوغرافيا العمود بواسطة تدرج في القطبية: إيثر البترول/إيثر: 2/8.

تم إرجاع 3 -نيتروفينيل فيروسين بواسطة بوروهيدريد الصوديوم بوجود البالاديوم/الفحم النشط ليعطينا 3 - فيروسينيل أنيلين كراسب مصفر. تم التعرف على المركبات المصنعة عن طريق الأشعة تحت الحمراء و طيف الرنين المغناطيسي.

خصص الجزء الثاني لدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمشتقات الفيروسينية المصنعة وذلك بتطبيق إختبار تثبيت جذر السوبروكسيد باستخدام تقنية الفولتامترية الحلقية، إختبار تثبيت الجذر الحر DPPH باستخدام التقنية الضوئية وإختبار إرجاع الموليبدات. بينت النتائج المتحصل عليها أن 4-نيتروفينيل فيروسان يملك فعالية عالية مثبطة لجذر السوبروكسيد ب IC50 مقدرة ب 1.178 مل/مغ وقدرة إجمالية مضادة للأكسدة بنسبة تثبيط جذر السوبروكسيد تقدر ب %19.44 . 2-نيتروفينيل فيروسان يملك الفعالية الأعلى لتثبيت جذر ال DPPH ب IC50 تقدر ب 0.778 مل/مغ، و هو يمثل في نفس الوقت أقوى مرجع للفوسفوموليبدان ب IC50 تقدر ب 26.323 مل/مغ.

خصص الجزء الثالث لدراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمركبات المصنعة باختبارها على أربع سلالات بكتيرية: الإشريكية القولونية، الزائفة الزنجارية، المكورات المعوية البرازية و الكليبيلا الرئوية. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن المركبات الفيروسينية المصنعة تمتلك فعاليات ضعيفة على السلالات البكتيرية الأربعة بأقطار مناطق التثبيط لا تتعدى 17 مم بالنسبة لتراكيز مقدرة ب 25 مل/مغ.

الكلمات المفتاحية: الفيروسين، ديازوتاسيون، آريلاسيون، الفعالية المضادة للأكسدة، الفولتامترية الحلقية، الفعالية المضادة للبكتيريا

## Liste des abréviations :

<b>Symbole :</b>	<b>Désignation</b>
<b>D</b>	: Distance
<b>A°</b>	: Anguechtrome
<b>D5d</b>	: Décaléé
<b>D5h</b>	: Eclipsée
<b>K</b>	: Kelvin
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>VIH</b>	: Virus de l'immunodéficiency humaine
<b>IC50</b>	: Concentration d'inhibition à 50%.
<b>HO·</b>	: Radical hydroxyl
<b>E.O.R</b>	: Espèces oxygénées réactives.
<b>CQ</b>	: Chloroquine
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>SEA(SEAr)</b>	: Substitution électrophile aromatique
<b>Pd/C</b>	: Palladium sur charbon actif
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	: Borohydrure de sodium
<b>Pf</b>	: Parcours frontal
<b>IR</b>	: Infrarouge
<b>UV</b>	: Ultraviolet
<b>ppm</b>	: Partie par million.
<b>RMN</b>	: Résonance magnétique nucléaire
<b>DEPT</b>	: Distortionless Enhanced Polarization Transfer
<b>E.A.R</b>	: Espèces azotées réactives.
<b>pKa</b>	: Constante d'acidité.
<b>pH</b>	: Potentiel d'hydrogène
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>LDL</b>	: Low density lypoproteins (Lipoprotéines à faible densité).
<b>SOD</b>	: Superoxyde dismutase

## Liste des schémas et figures

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
<b>Chapitre I : La chimie du ferrocène.</b>	
<b>Figure (I.1) :</b> Ferrocène sous forme de poudre orangée	<b>5</b>
<b>Figure (I.2) :</b> Structure de ferrocène	<b>6</b>
<b>Figure (I.3) :</b> Les deux conformations du ferrocène	<b>7</b>
<b>Figure (I.4) :</b> Structure de thiomorpholido amido methyferrocène et azalactone ferrocène	<b>9</b>
<b>Figure (I.5) :</b> Structures chimiques de l'hydroxytamoxifène et des hydroxyferrocifènes.	<b>10</b>
<b>Figure (I.6) :</b> Structures chimiques de la nilutamide et son dérivé ferrocénique	<b>11</b>
<b>Figure (I.7) :</b> Structures chimiques de la chloroquine et la ferroquine	<b>12</b>
<b>Figure (I.8) :</b> Molécules ferrocéniques antipaludiques	<b>12</b>
<b>Figure (I.9) :</b> Structures chimiques d'Ethambutol et son dérivé ferrocénique	<b>13</b>
<b>Figure (I.10) :</b> Structures chimiques d'Atovaquone et ses dérivés ferrocéniques	<b>14</b>
<b>Figure (I.11) :</b> Structure chimique de FC-KLVFF	<b>15</b>
<b>Figure (I.12) :</b> Structures chimiques de Pénicilline, Céphalosporine et les dérivés ferrocéniques correspondants	<b>16</b>
<b>Figure (I.13) :</b> Structures chimiques de molécules ferrocéniques à activité biologique	<b>17</b>
<b>Chapitre II : Synthèse des dérivés ferrocéniques.</b>	
<b>Figure (II.1) :</b> Le sel de diazonium	<b>24</b>
<b>Figure (II.2) :</b> Histoire des sels de diazonium d'aryldiazonium	<b>24</b>
<b>Figure (II.3) :</b> Mécanisme de formation de colorant « Para red »	<b>25</b>
<b>Figure (II.4) :</b> Mécanisme de formation du colorant « Orange II ».	<b>26</b>
<b>Figure (II.5) :</b> Mécanisme de formation du colorant « Bismark brownR »	<b>26</b>
<b>Figure (II.6) :</b> Mécanisme de formation du colorant « Alizarin yellow R »	<b>27</b>
<b>Figure (II.7) :</b> Structure de « Methyl red » et « Methyl orange »	<b>27</b>
<b>Schéma (II.1) :</b> Stratégie globale de synthèse des dérivés 1, 2, 3 et 4	<b>30</b>
<b>Schéma (II.2) :</b> Stratégie de synthèse de composé 5	<b>30</b>
<b>Figure (II.8) :</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de 2-nitrophenylferrocène	<b>32</b>
<b>Figure (II.9) :</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de 3-nitrophenylferrocène	<b>33</b>
<b>Figure (II.10) :</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de bis-3-nitrophenylferrocène	<b>35</b>
<b>Figure (II.11) :</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H de 4-nitrophenylferrocène	<b>36</b>



### Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante

<b>Figure (III.1)</b> : Sites de production intracellulaire des EOR	<b>51</b>
<b>Figure (III.2)</b> : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols	<b>57</b>
<b>Figure (III.3)</b> : La réaction entre les EOR et les antioxydants	<b>59</b>
<b>Figure (III.4)</b> : Structure chimique de DPPH	<b>61</b>
<b>Figure (III.5)</b> : Voltammogramme du système $O_2/O_2^{\cdot-}$ dans le DMF + 0.02 M Bu <sub>4</sub> NBF <sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à 28°C±1	<b>66</b>
<b>Figure (III.6)</b> : a-voltamogramme cyclique de l'O <sub>2</sub> en présence de différentes concentrations d'acide ascorbique.	<b>66</b>
b- l'intensité du courant en fonction de concentration de l'acide ascorbique	
<b>Figure (III.7)</b> : a-voltamogramme cyclique de l'O <sub>2</sub> en présence de différentes concentrations de α-tocophérol.	
b- l'intensité du courant en fonction de concentration de α-tocophérol	<b>67</b>
<b>Figure (III.8)</b> : Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction de concentration d'acide ascorbique	<b>68</b>
<b>Figure (III.9)</b> : Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction de concentration d'α-tocophérol	<b>69</b>
<b>Figure (III.10)</b> : A : Voltammogrammes de O <sub>2</sub> •- en présence de différentes concentrations de 2-NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu <sub>4</sub> NBF <sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à 28°C±1 avec une vitesse de balayage de 100mV/s.	<b>70</b>
B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 2-NPF	
C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 2-NPF	
<b>Figure (III.11)</b> : A : Voltammogrammes de O <sub>2</sub> •- en présence de différentes concentrations de 3-NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu <sub>4</sub> NBF <sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à 28°C±1 avec une vitesse de balayage de 100mV/s.	<b>71</b>
B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 2-NPF	
C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 2-NPF	
<b>Figure (III.12)</b> : A : Voltammogrammes de O <sub>2</sub> •- en présence de différentes concentrations de bis-3-NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu <sub>4</sub> NBF <sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à 28°C±1 avec une vitesse de balayage de 100mV/s	<b>72</b>
B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de bis-3-NPF	
C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de bis-3-NPF	

<b>Figure (III.13):</b> A : Voltammogrammes de $O_2^{\bullet-}$ en présence de différentes concentrations de 4-NPF, dans le DMF + 0.02 M $Bu_4NBF_4$ sur CV comme électrode de travail à $28^\circ C \pm 1$ avec une vitesse de balayage de 100mV/s. B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 4-NPF C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 4-NPF	<b>73</b>
<b>Figure (III.14):</b> A : Voltammogrammes de $O_2^{\bullet-}$ en présence de différentes concentrations de 3-FA, dans le DMF + 0.02 M $Bu_4NBF_4$ sur CV comme électrode de travail à $28^\circ C \pm 1$ avec une vitesse de balayage de 100mV/s. B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 3-FA C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 3-FA	<b>74</b>
<b>Figure (III.15) :</b> Classement des $IC_{50}$ des dérivés ferrocéniques	<b>76</b>
<b>Figure (III.16) :</b> Classement des TAC des dérivés ferrocéniques	<b>78</b>
<b>Figure (III.17) :</b> Réaction de radical DPPH avec l'antioxydant	<b>80</b>
<b>Figure (III.18) :</b> Classement des $IC_{50}$ des dérivés ferrocéniques (TAC)	<b>81</b>
<b>Figure (III.19) :</b> Activité antioxydante totale de 2-NPF à différentes concentrations	<b>84</b>
<b>Figure (III.20) :</b> Activité antioxydante totale de 3-NPF à différentes concentrations	<b>84</b>
<b>Figure (III.21) :</b> Activité antioxydante totale de bis-3-NPF à différentes concentrations	<b>85</b>
<b>Figure (III.22) :</b> Activité antioxydante totale de 4-NPF à différentes concentrations	<b>85</b>
<b>Figure (III.23) :</b> Activité antioxydante totale de 3-FA à différentes concentrations	<b>86</b>
 <b>Chapitre VI : Evaluation de l'activité antibactérienne</b>	
<b>Figure (VI.1) :</b> Test de 2-NPF sur les souches bactériennes étudiées	<b>98</b>
<b>Figure (VI.2) :</b> Test de 3-NPF sur les souches bactériennes étudiées	<b>100</b>
<b>Figure (VI.3) :</b> Test de 4-NPF sur les souches bactériennes étudiées	<b>102</b>
<b>Figure (VI.4) :</b> Test de 3-FA sur les souches bactériennes étudiées	<b>103</b>
 <b>Annexe 01 :</b>	
<b>Figure (01) :</b> Test des ATB sur <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<b>108</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Chapitre I : la chimie du ferrocène.</b>	
<b>Tableau (I.1):</b> Quelques propriétés de ferrocène	<b>08</b>
<b>Tableau (I.2):</b> Activité antifongique de 3-nitrophenylferrocène	<b>13</b>
<b>Tableau (I.3):</b> Activité antibactérienne de 3-Nitrophenylferrocène	<b>16</b>
<b>Chapitre III : évaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques.</b>	
<b>Tableau (III.1) :</b> Quelques espèces réactives oxygénées et azotés	<b>48</b>
<b>Tableau (III.2) :</b> Divers EOR et les antioxydants de neutralisation correspondants.	<b>55</b>
<b>Tableau (III.3) :</b> Le système protecteur antioxydant	<b>60</b>
<b>Tableau (III.4) :</b> Ipa et les pourcentages d'inhibition de superoxyde en fonction des concentrations des antioxydants standards	<b>68</b>
<b>Tableau (III.5) :</b> Les valeurs d'IC50 des antioxydants standards	<b>79</b>
<b>Tableau (III.6) :</b> Les valeurs d'IC50 des dérivés ferrocéniques synthétisés	<b>75</b>
<b>Tableau (III.7) :</b> Les paramètres obtenus à partir de voltamogrammes des composés testés	<b>78</b>
<b>Tableau (III.8) :</b> Les valeurs d'IC50 des composés ferrocéniques testés	<b>80</b>
<b>Tableau (III.9) :</b> Les valeurs d'absorbance et TAC en fonction des concentrations des dérivés ferrocéniques étudiés	<b>83</b>
<b>Tableau (III.10) :</b> IC50 des composés ferrocéniques (TAC)	<b>86</b>
<b>Chapitre VI : Evaluation de l'activité antibactérienne.</b>	
<b>Tableau (VI.1) :</b> Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes (2-NPF).	<b>99</b>
<b>Tableau (VI.2) :</b> Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes (3-NPF).	<b>100</b>
<b>Tableau (VI.3) :</b> Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes (4-NPF).	<b>101</b>
<b>Tableau (VI.4) :</b> Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes (3-FA).	<b>102</b>
<b>Annexe :</b>	
<b>Tableau (01) :</b> Diamètres des zones d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<b>108</b>
<b>Tableau (02) :</b> Diamètres des zones d'inhibition de <i>Klebsiella Pnenumonie</i> ATCC700603	<b>109</b>
<b>Tableau (03) :</b> Diamètres des zones d'inhibition d' <i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC29212	<b>110</b>
<b>Tableau (04) :</b> Diamètres des zones d'inhibition de <i>Pseudomonas aéruginosa</i>	<b>111</b>

## Sommaire :

<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Chimie du ferrocène</b>	
<b>Un peu d'histoire : 1950-1960 :</b>	<b>4</b>
<b>La découverte du ferrocène et l'explosion.</b>	
<b>I.1. Le ferrocène</b>	<b>5</b>
<b>I.1.1. Présentation</b>	<b>5</b>
<b>I.1.2. Structure</b>	<b>5</b>
<b>I.1.3. Propriétés</b>	<b>6</b>
<b>I.2. La chimie médicinale du ferrocène</b>	<b>8</b>
<b>I.2.1. Anti-HIV</b>	<b>8</b>
<b>I.2.2. Anti-tumorale</b>	<b>9</b>
<b>I.2.3. Antipaludique</b>	<b>11</b>
<b>I.2.4. Antifongique</b>	<b>12</b>
<b>I.2.5. Anti-tuberculose</b>	<b>13</b>
<b>I.2.6. Anti-toxoplasmosse</b>	<b>14</b>
<b>I.2.7. Anti-Alzheimer</b>	<b>14</b>
<b>I.2.8. Antibactériens</b>	<b>15</b>
<b>I.2.9. Antioxydants</b>	<b>17</b>
<b>Références bibliographiques.</b>	<b>18-22</b>
<b>Chapitre II : Synthèse des dérivés ferrocéniques</b>	
<b>Partie A : Partie théorique.</b>	<b>.</b>
<b>II.A.1. Généralités sur la réaction de diazotation.</b>	<b>23</b>
<b>II.A.2. Les sels de diazonium.</b>	<b>23</b>
<b>II.A.3. L'arylation.</b>	<b>28</b>
<b>II.A.4. La réduction.</b>	<b>29</b>
<b>Partie B : Discussion des résultats.</b>	
<b>Introduction.</b>	<b>30</b>
<b>II.B.1. Synthèse de 2-nitrophénylferrocène.</b>	<b>31</b>
<b>II.B.2. Synthèse de 3-nitrophénylferrocène.</b>	<b>33</b>
<b>II.B.3. Synthèse de bis-3-nitrophénylferrocène.</b>	<b>35</b>
<b>II.B.4. Synthèse de 4-nitrophénylferrocène.</b>	<b>36</b>
<b>II.B.5. Synthèse de 3-ferrocénylaniline</b>	<b>37</b>
<b>Partie C : Partie expérimentale.</b>	
<b>II.C.1. Conditions générales du travail.</b>	<b>39</b>
<b>II.C.2. Protocoles expérimentaux.</b>	<b>41</b>

Références bibliographiques.	45-46
------------------------------	-------

## Chapitre III: Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques.

### Partie A: Partie théorique

Introduction	47
III.A.1. Les espèces réactives et le stress oxydant	47
III.A.1.1. Définition	47
III.A.1.2. Production des espèces réactives (EOR) et (EAR)	51
• Production intracellulaire.	51
• Production extracellulaire.	52
III.A.1.4. Effets des EOR et EAR sur les systèmes biologiques.	52
• Oxydation des lipides.	52
• Oxydation des acides nucléiques.	52
• Oxydation des protéines.	53
• Oxydation des lipoprotéines.	53
III.A.2. Le stress oxydant et les maladies humaines.	53
III.A.3. Pouvoir antioxydant.	54
III.A.3.1. Définition d'un antioxydant.	54
III.A.3.2. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes.	55
III.A.3.3. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.	57
III.A.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.	61
III.A.4.1. Test de piégeage du radical DPPH.	61
III.A.4.2. Test de piégeage du radical superoxyde.	61
III.A.4.3. Test de phosphomolybdène.	62
Partie B : Résultats et discussions	
Introduction	64
III.B.1. Le test d'inhibition du radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	64
III.B.1.1. Matériels et méthodes	64
III.B.1.2. Résultats	65
1. Voltamogramme cycliques de l'oxygène	65
2. Voltamogrammes cycliques des antioxydants standards	66
3. Voltamogrammes cycliques des produits synthétisés	69
III.B.1.3. Discussion et interprétation des résultats	75
III.B.2. Le test de diminution de l'intensité du courant du pic anodique de l'oxygène	77
III.B.2.1. Principe	77
III.B.2.2. Discussion des résultats	78
III.B.3. Le test de piégeage de radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) :	79
III.B.3.1. Matériels et méthodes	79

<b>III.B.3.2. Résultats</b>	<b>80</b>
<b>III.B.3.3. Discussion des résultats et interprétation</b>	<b>80</b>
<b>III.B.4. Le test de phosphomolybdate</b>	<b>82</b>
<b>III.B.4.1. Matériels et méthodes</b>	<b>82</b>
<b>III.B.4.2. Résultats</b>	<b>82</b>
<b>III.B.4.3. Discussion des résultats et interprétation</b>	<b>86</b>
<b>Conclusion</b>	<b>87</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>88-89</b>
	<b>81</b>
<b>Chapitre VI : Evaluation de l'activité antibactérienne</b>	
<b>Partie A : Partie théorique</b>	
<b>Introduction</b>	
<b>VI.A.1. La découverte du monde microbien</b>	<b>90</b>
<b>VI.A.2. L'anatomie des bactéries</b>	<b>91</b>
<b>VI.A.3. Les antibiotiques</b>	<b>91</b>
<b>VI.A.3.1. Définition</b>	<b>91</b>
<b>VI.A.3.2. Mode d'action des antibiotiques.</b>	<b>91</b>
<b>VI.A.3.3. Paramètres d'activité d'un antibiotique</b>	<b>92</b>
<b>VI.A.4. Méthodes de détermination de l'efficacité d'un antibiotique</b>	<b>93</b>
<b>VI.A.1. Méthode de dilution.</b>	<b>93</b>
<b>VI.A.2. Méthode de diffusion.</b>	<b>93</b>
<b>VI.A.5. Les bactéries étudiées</b>	<b>94</b>
<b>Partie B : Résultats et discussion</b>	<b>94</b>
<b>VI.B.1. Objectif</b>	<b>96</b>
<b>VI.B.2. Procédure opératoire</b>	<b>96</b>
<b>VI.B.3. Discussion des résultats</b>	<b>97</b>
<b>VI.B.4. Interprétation des résultats et conclusion.</b>	<b>103</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>104</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>105</b>
<b>Annexes</b>	

---

---

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

---

## Introduction générale

La chimie organométallique moderne a été fortement influencée par la découverte accidentelle du ferrocène en 1951. En fait, le ferrocène ( $\text{Cp}_2\text{Fe}$ ) a été l'espèce organométallique la plus étudiée. La stabilité thermique, le caractère inerte en solutions d'acide et de base concentrées, ainsi que les propriétés redox de ferrocène rendent ce métallocène un composé impliqué dans de nombreux domaines de recherche.

Jusqu'en 1979, les propriétés biologiques de métallocènes sont inexplorées. La découverte de dichlorure de titanocène ( $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ ) comme le premier métallocène possédant une activité anti-tumorale a ouvert un nouveau domaine de recherche, la chimie bio organométallique, qui a été développé rapidement dans les dernières années [01]

Eve I. Edwards et al ont publié dans le volume 85 du *Journal of Organometallic Chemistry* en février 1975, les dérivés ferrocéniques de pénicilline et céphalosporine, des antibiotiques préparés par le remplacement du groupe phényle ou le groupe hétéroaromatique par un groupement ferrocène, ils ont trouvé qu'ils possèdent une activité antibiotique élevée [02,03].

En 1984, Kopf-Maier et al ont prouvé l'activité anticancéreuse de complexe de ferrocénium contre la tumeur ascitique d'Ehrlich. Depuis lors, le ferrocène a été étudié pour des applications biologiques et médicinales potentielles. À l'origine, l'espèce oxydée de ferrocène, ferrocénium ( $\text{Cp}_2\text{Fe}^+$ ) était rapporté à être le responsable des propriétés cytotoxiques sur ADN médiée à sa capacité de générer des espèces radicalaires oxygénées. En conséquence, de nombreux ferrocènes fonctionnalisés ont été préparés et testés contre des cellules cancéreuses.

Conçue en 1994 à l'Université de Lille 1, la ferroquine (FQ), ce solide jaune cristallin, résulte de l'incorporation d'un motif ferrocénique dans le squelette de base de la chloroquine (CQ), l'antipaludéen le plus utilisé et qui connaît de graves problèmes de résistance [04]. Des essais effectués au Gabon, au Sénégal, au Cambodge, en Thaïlande et à Madagascar ont montré la remarquable activité de la FQ sur tous les isolats de terrain. La ferroquine est entrée en développement clinique de phase I chez Sanofi-Aventis en 2003. Le développement de la ferroquine s'est poursuivi et les essais cliniques de phase II chez l'homme adulte ont débuté fin 2007 [05].



En se basant sur les applications du ferrocène citées précédemment, on a proposé un sujet de recherche intitulé : « Synthèse, évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques dérivés ferrocéniques obtenus à partir de l'arylation de ferrocène », donc l'objectif de ce travail a été de synthétiser quelques dérivés ferrocéniques à partir d'arylation de ferrocène tout en passant par la diazotation de nitroaniline en position ortho, méta et para pour former des dérivés nitrophénylferrocéniques, un de ces dérivés a été ensuite réduit par  $\text{NaBH}_4$  en milieu méthanolique et en présence de  $\text{Pd/C10}$  comme catalyseur pour former une amine : 3-ferrocénylaniline.

La deuxième partie de notre travail sert à évaluer l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques synthétisés en les testant comme des piègeurs du radical libre superoxyde en utilisant une technique électrochimique « la voltamétrie cyclique », du radical libre DPPH en utilisant une technique spectrophotométrique et comme réducteurs de phosphomolybdate.

La troisième partie sert à évaluer l'activité antibactérienne de ces dérivés en les testant sur quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est un état de l'art sur la chimie de ferrocène, dans lequel on a rassemblé quelques généralités concernant la structure et les propriétés du ferrocène ainsi que ses applications en chimie médicinale.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse des dérivés ferrocéniques, dans sa première partie, on a abordé théoriquement la réaction de diazotation et les sels de diazonium, la réaction d'arylation et la réaction de réduction, tandis que la deuxième partie est une discussion des résultats. Dans la troisième partie, on a rassemblé les protocoles expérimentaux de synthèse des dérivés ferrocéniques à étudier.

Le troisième chapitre est intitulé « Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques synthétisés », il est à son tour subdivisé en deux parties, la première est une synthèse bibliographique sur le stress oxydant et l'activité antioxydante : les différents radicaux libres et leur action sur les systèmes biologiques ainsi que les maladies résultantes de l'agressivité de ces radicaux libres, les divers antioxydants endogènes et exogènes ainsi que quelques méthodes d'évaluation pratique du pouvoir antioxydant. La deuxième partie est une discussion et interprétation des résultats obtenus après l'évaluation de l'activité antioxydante

des dérivés ferrocéniques en question par des tests électrochimiques « test de piégeage de radical superoxyde » et des tests chimiques spectrophotométriques citant le test de piégeage du radical libre DPPH et le test de réduction de phosphomolybdate.

Le quatrième chapitre est intitulé « Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés ferrocéniques », ce chapitre contient deux parties, une partie théorique, dans laquelle on a donné quelques notions sur les antibiotiques et leurs modes d'action sur la cellule bactérienne, les bactéries et les différents types étudiés dans notre travail. La deuxième partie sert à récapituler les différents résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des dérivés ferrocéniques étudiés vis-à-vis quatre souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC25922 *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

Et enfin, on termine par une conclusion générale.

#### **Références bibliographiques :**

[01]: L.M. Gao, R. Hernandez, J. Matta and E. Melendez, Synthesis, structure, electrochemistry, and cytotoxic properties of ferrocenyl ester derivatives, *Metal-Based Drugs*, 10: 8 pages, (2009).

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

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

[04]:C. Biot , G. Glorian , L. A. Maciejewski and J. S. Brocard, Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene–Chloroquine Analogue, *J. Med. Chem* , 40: 3715–3718, (1997).

[05]: [http/ fr.wikipedia.org/ wiki/ ferroquine](http://fr.wikipedia.org/wiki/ferroquine). Consulté le 06/12/2015



---

---

**CHAPITRE I :**  
**CHIMIE DU FERROCÈNE**

---

---

## Un peu d'histoire :

### 1950-1960 : la découverte du ferrocène et l'explosion :

En Angleterre, plusieurs chimistes avaient remarqué, au tournant des années 50 et même avant, cette poudre orangée très stable qui se formait quand on faisait circuler le cyclopentadiène dans des tuyaux en fer ; certains en avaient même rempli des pots dans leurs laboratoires. Keally, Pauson et Miller publient le produit en 1951. Dans un article au journal *nature*, Pauson reporte la structure  $[\text{Fe}(\sigma\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$ . Ce faisant, il commet à peu près la même erreur que Hein avec le polyphénylchrome, 32 ans plus tôt. Mais, entre-temps, son compatriote Sidgwick a publié la règle des 18 électrons pour les complexes de transition dans son ouvrage «The Electronic Theory of Valency» ( Cornell University, Ithaca,1927). La structure du bis-cyclopentadiényle-fer de Pauson ne comporte que 10 électrons de valence sur le fer : elle ne fera pas long feu. A Harvard, Wilkinson et Woodward ne semble pas ignorer la règle de Sidgwick et ont tout de suite compris que cette formulation n'était pas la bonne. Quelques mois plus tard, ils publient, peu avant Fischer à Munich, la première structure sandwich : le di-cyclopentadiényl-fer est le ferrocène, un complexe à 18 électrons dans lequel les deux cycles sont parfaitement parallèles,  $\pi$ -liés au fer et possèdent des propriétés aromatiques (1952) [1].

## Chapitre I : La chimie du ferrocène

### I.1. Le ferrocène :

#### I.1.1. Présentation :

Le ferrocène est un composé organométallique de formule  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ . Il se présente sous forme d'un solide orange (**figure I.1**). Il appartient à la famille des métallocènes.



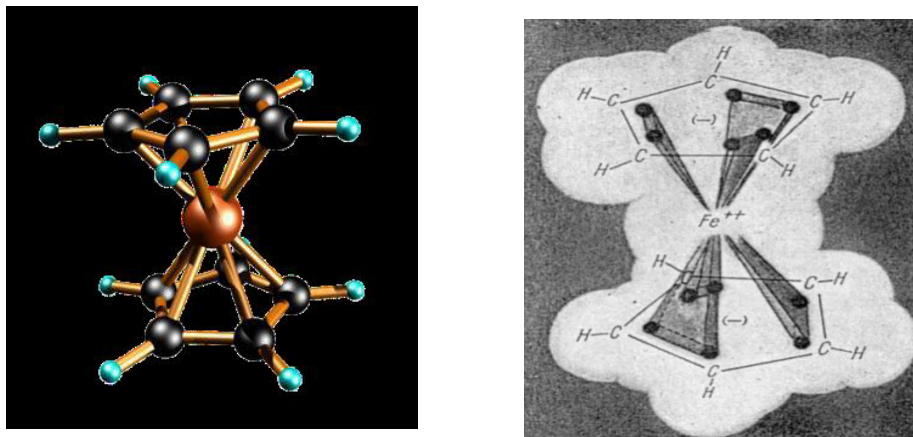
**Figure (I.1) : ferrocène sous forme de poudre orange.**

L'histoire du ferrocène commence il y'a un siècle, en 1951[02], avec la tentative de synthèse de fulvalène par Keally et Pauson alors que Miller, Tebboth et Tremain essaient de synthétiser le  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ . Puis sur des résultats d'analyses aux rayons- X, Fischer proposa en 1952 une structure en double cône [03]. Wilkinson et Woodward proposèrent la structure « sandwich » sur la base de données infrarouge et de mesures de polarité [04] donnant ainsi naissance à une nouvelle discipline : la chimie organométallique. Fischer et Wilkinson furent alors récompensés pour leurs travaux pionniers sur les complexes «sandwichs» par le prix Nobel de chimie en 1973 [05].

#### I.1.2. Structure :

Le ferrocène est constitué de deux anions cyclopentadiényles parallèles complexant un ion  $\text{Fe}^{2+}$ . L'anion cyclopentadiényle est un ligand qui fournit 6 électrons au complexe métallique ce qui lui confère une grande stabilité. En effet, le fer qui possède déjà 6 électrons, se retrouve

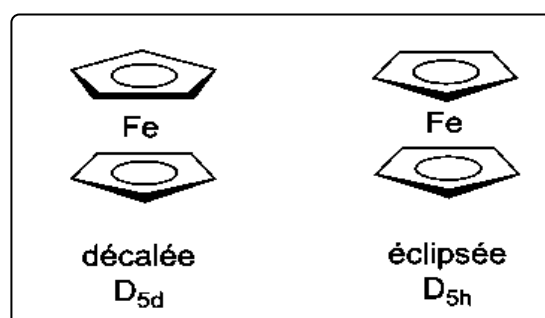
entouré de 18 électrons. Les distances  $D$  suivantes ont été observées dans le complexe:  $D_{(Cp-Cp)}$ :  $3,40\text{Å}$  ;  $D_{(M-C)}$ :  $2,07\text{Å}$  ;  $D_{(C-C)}$ :  $1,40\text{Å}$  (**figure I.2**) [06].



**Figure (I.2) : la structure de ferrocène.**

### I.1.3. Propriétés :

Le ferrocène possède une masse molaire de  $186,04\text{ g/mol}$ , un point de fusion de  $174\text{ °C}$ , un point d'ébullition de  $249\text{ °C}$  et une densité de  $2,69\text{ g/cm}^3$  (à  $20\text{ °C}$ ). Il sublime à une température supérieure à  $100\text{ °C}$ . Les deux cycles peuvent tourner librement et par conséquent deux conformations peuvent être adoptées, décalée ( $D_{5d}$ ) et éclipsee ( $D_{5h}$ ) (**Figure I.3**) [07]



A température ambiante, le ferrocène se cristallise sous une forme monoclinique, à  $T < 164\text{K}$  sous une forme triclinique et dans une forme orthorhombique à  $T < 110\text{K}$ . Dans la forme monoclinique, les phénomènes de désordre simulent une conformation décalée ( $D_{5d}$ ) de molécules sandwich. Dans la forme triclinique, les molécules écartent de la conformation éclipsee par  $9^\circ$  tandis que dans l'orthorhombique, les anneaux sont totalement éclipseés ( $D_{5h}$ ). En phase gazeuse, le ferrocène adopte également une conformation éclipsee. [09].

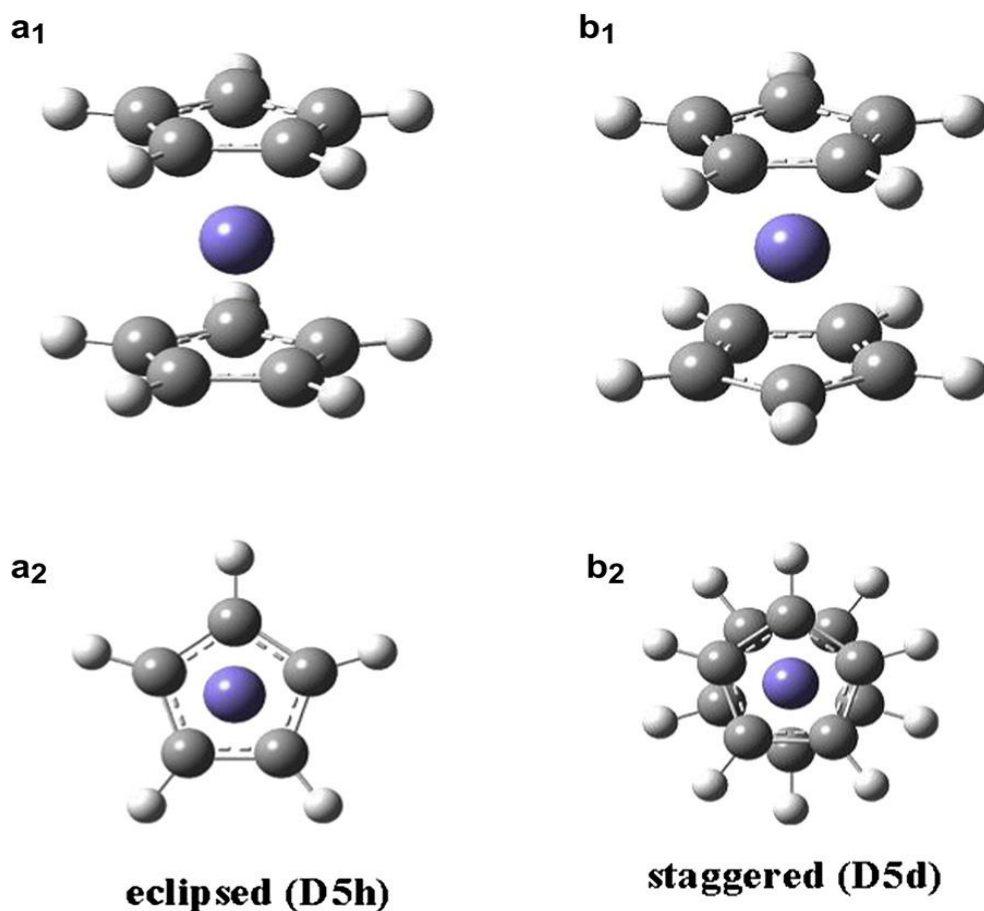


Figure (I. 3) : les deux conformations du ferrocène [08]

Le ferrocène est insoluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques. Il est très stable thermiquement et peut être facilement fonctionnalisé de manière très variée. Dès lors, des nouveaux dérivés organométalliques ont trouvé des applications pratiques en domaine de photovoltaïques [10], domaine de corrosion [11] et plus récemment en chimie biomédicale [12]. En effet, ses propriétés d'oxydo-réduction font du ferrocène un bon donneur d'électrons, caractère qui s'amplifie avec l'alkylation du cyclopentadiène [06].

Les paramètres de solvation du ferrocène ont permis l'estimation de certaines propriétés du ferrocène telles que sa lipophilicité, sa capacité de distribution entre le sang et le cerveau et sa toxicité de vapeur à travers le seuil d'irritation nasale (**tableau I.1**) [13]



Tableau (I.1) : quelques propriétés de ferrocène.

Propriété	Valeur
Lipophilicité	3.54
Partage entre sang /cerveau	0.64
Pérméation à travers la peau	$- 3.40 \text{ (cm.s}^{-1}\text{)}$
Seuil d'irritation nasale	37ppm

## I.2. La chimie médicinale du ferrocène :

La découverte du ferrocène et l'élucidation de sa structure chimique remarquable est considéré comme le début de la chimie organométallique moderne. Depuis lors, ce métallocène a été utilisé pour de nombreuses applications, parmi celles-ci, la chimie médicinale [14].

Le ferrocène possède des propriétés physico-chimiques particulières. Parmi les propriétés exploitées pour la création de composés à activités biologiques on peut citer : son diversité structurale, la possibilité d'échange de ses ligands, ses propriétés catalytiques et leurs propriétés redox. A l'aide d'exemples représentatifs, nous allons illustrer quelques applications du ferrocène. Citons par exemple, des espèces efficaces comme agents antitumorales [15-18], antivirales [19], antibactériens [20-22], antiparasitaires [23,24 ], antifongiques [25 ] et antioxydants [26-32].

### I.2.1. Anti-VIH :

Les topoisomérases sont des enzymes qui contrôlent la structure topologique de l'ADN (de VIH), par une découpe d'un (topoisomérase I) ou les deux (la topoisomérase II) des brins d'ADN. Ils jouent un rôle central dans la division cellulaire et la transcription. L'inhibition de topoisomérases est une cible importante dans la découverte des médicaments anticancéreux, ainsi que dans la thérapie anti- VIH.

En effet, il a également été montré que l'activité de la topoisomérase II est nécessaire pour la réplication du VIH-1.

Kondapi et ses collaborateurs ont étudié l'impact d'azalactone ferrocène et du thiomorpholide amidométhyle ferrocène sur la prolifération cellulaire et aussi de divers phénomènes du cycle de réplication de VIH - 1, ils ont prouvé que ces composés sont des inhibiteurs sélectifs de la

topoisomérase I, et montrent des valeurs de CI50 pour l'inhibition de l'activité catalytique respectivement de 50 et 100  $\mu\text{M}$ .

Les deux inhibiteurs de la topoisomérase II ont montré une activité anti-VIH significative avec inhibition de la synthèse de l'ADN proviral, ainsi que la formation de complexes de pré-intégration [33].

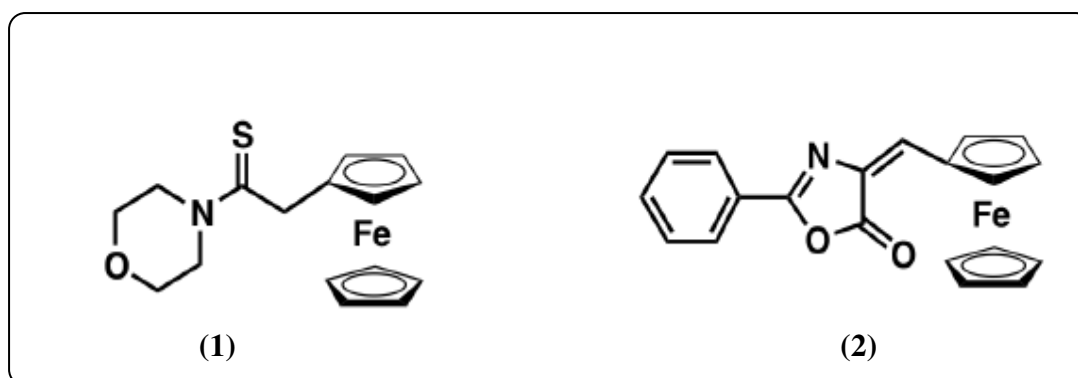


Figure (I.4): structure de thiomorpholide amidométhyl ferrocène (1) et azalactone ferrocène .

### I.2.2. Anti-tumorale:

L'intérêt du ferrocène pour la chimie médicinale débute vers l'année 1984, quand certains sels du ferrocénium ont révélé des effets antitumoraux [34-35]. 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.

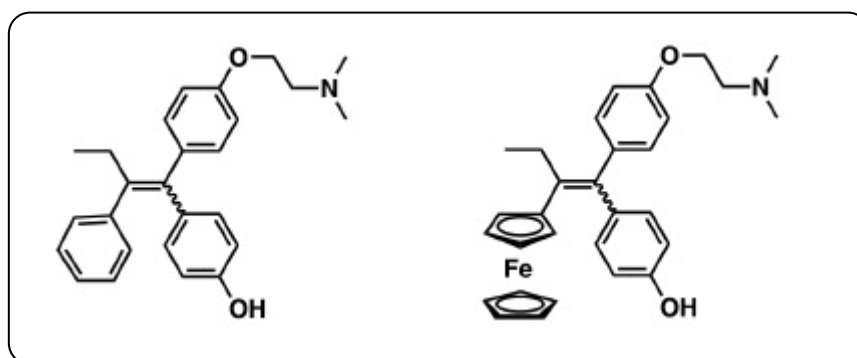
Par ailleurs, il a été proposé que l'activité des dérivés de l'ion ferricénium ne puisse pas être liée à l'intercalation directe à l'ADN. En revanche, il a été observé que ces espèces étaient capables d'engendrer des radicaux  $\text{HO}\cdot$  dans les cellules cancéreuses et d'endommager rapidement leur ADN. Des études ultérieures ont confirmé la capacité des sels de ferrocénium de produire des espèces oxygénées réactives (EOR) comme conséquence de leur dégradation dans l'eau en présence d'oxygène [36]. De cette manière, la toxicité de ce type d'espèces conduit à l'endommagement oxydatif de l'ADN par la production de ROS simultanée à leur dégradation. [37]

- **Les ferrocifènes et hydroxyferrocifènes :**

Le tamoxifène, un modulateur des récepteurs œstrogène, est le médicament le plus utilisé chez les patientes atteintes du cancer du sein hormono-dépendant.

Les patientes peuvent au départ traitées par le tamoxifène. La forme active du tamoxifène est en réalité son métabolite, l'hydroxytamoxifène, mais pour des raisons de biodisponibilité, c'est le tamoxifène qui est administré.

Malheureusement, les cellules tumorales peuvent se changer sous la thérapie de telle sorte que la prise de tamoxifène n'a plus d'effet. Il semble donc important de trouver une nouvelle molécule.

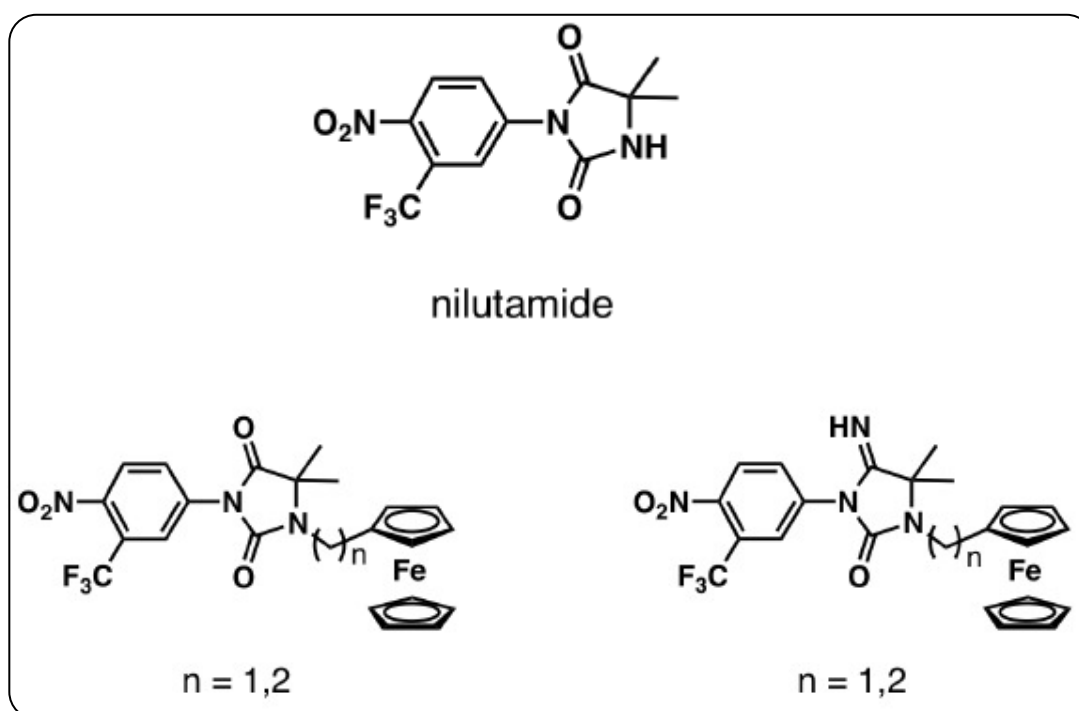


**Figure (I.5) : structures chimiques de l'hydroxytamoxifène et des hydroxyferrocifènes**

Ainsi, le simple remplacement du groupe phényle par le ferrocényle et l'homologation de la chaîne alkyle de la molécule du tamoxifène ou de son métabolite actif l'hydroxytamoxifène, a produit respectivement les dérivés ferrocifène et hydroxyferrocifène ; les premiers composés organométalliques montrant des effets antiprolifératives remarquables particulièrement contre le cancer du sein et qui sont synthétisés par le groupe du Pr Jaouen. (l'hydroxytamoxifène a une IC50 de 30  $\mu$ M alors que le complexe hydroxyferrocifène correspondant à une IC50 de 0.5  $\mu$ M) [38].

Depuis la découverte des propriétés cytotoxiques des « ferrocifènes », le groupe s'est intéressé par la synthèse de nombreux dérivés organométalliques en modifiant la longueur de la chaîne alkyle[39], l'unité organométallique[40,41], la conjugaison [42] et la nature des substituants aromatiques.[43,44,45] .

Un dérivé de l'antiandrogène non-stéroïdien nilutamide portant le groupement ferrocényle (**Figure I.6**) montre une activité cytotoxique significative contre des lignées cellulaires de cancer de la prostate hormono-dépendant et hormono-indépendant [46].



**Figure (I.6) : structures chimiques de la nilutamide et son dérivé ferrocénique.**

Les effets de la nilutamide ferrocénique sur les cellules cancéreuses de la prostate et des ferrocifènes sur les cellules de cancer du sein, en sont des exemples.

### I.2.3. Antipaludique:

La chloroquine CQ est l'une des plus anciennes molécules antipaludiques de synthèse dont la première utilisation date des années 40. Elle fût synthétisée pour la première fois en 1934 en Allemagne par la société Bayer [47]. Elle présente de nombreux avantages, notamment un faible coût et peu d'effets secondaires (toxicité uniquement en cas de surdosage) et peut être utilisée aussi bien en prophylaxie qu'en chimiothérapie. Elle était à l'origine efficace sur toutes les formes de paludisme mais, malheureusement, *P. falciparum* a développé une résistance à la CQ.

Pour pallier aux problèmes de résistance de *P. falciparum*, l'équipe de Pr. Brocard a synthétisé de nombreux analogues et dérivés ferrocéniques de molécules antipaludiques. Ces travaux de recherche ont conduit à la synthèse de la ferroquine qui résulte de l'introduction d'un groupement ferrocénique dans la structure de la chloroquine. C'est l'un des premiers antipaludiques organométalliques qui a été synthétisé. [48]

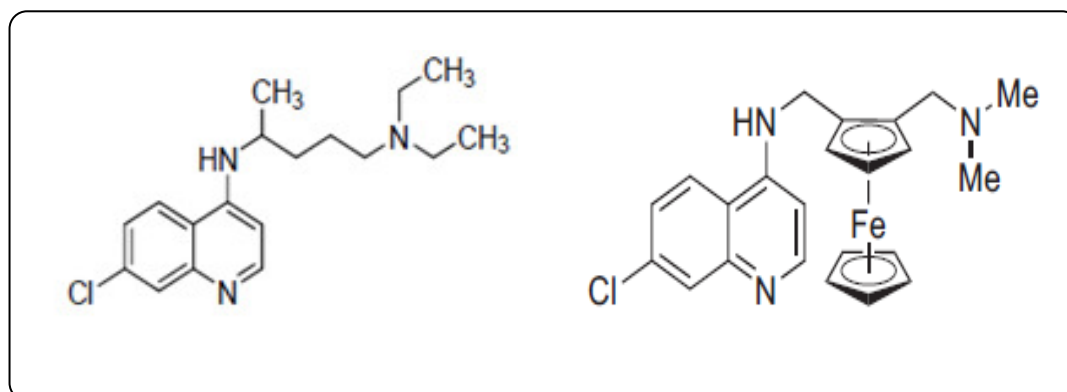


Figure (I.7) : structures chimiques de la Chloroquine et la Ferroquine.

De nouvelles molécules antipaludiques ont été synthétisées dans le but de préparer un « back up », c'est-à-dire une molécule de remplacement de la ferroquine. Les molécules peuvent être regroupées dans deux grandes catégories en fonction de la nature de l'hétérocycle, quinoléine ou acridine. Dans chacune de celles-ci, la modification de la longueur de la chaîne alkyle ou de la nature de l'amine (secondaire ou tertiaire) a été réalisée. Cependant, les tests biologiques pour certaines des molécules ont donné des résultats intéressants mais ceux-ci restent moins actifs que la ferroquine. [49]

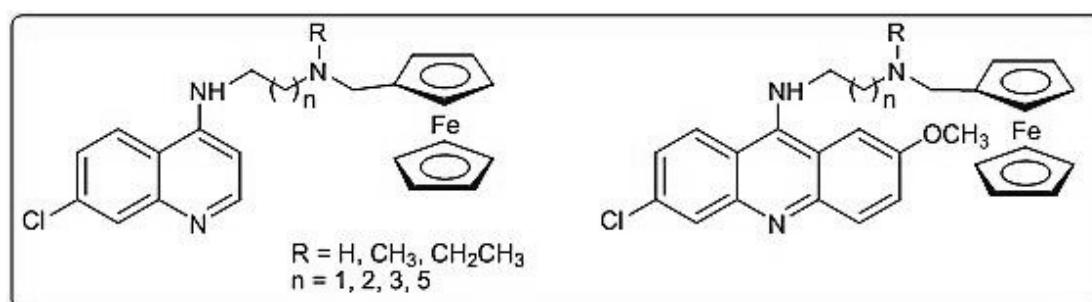


Figure (I.8) : Molécules ferrocéniques antipaludiques

#### I.2.4. Antifongique :

Le tableau (I.2) résume les résultats d'évaluation 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 étudiées [50].

Tableau (I.2) : activité antifongique de 3-nitrophénylferrocène.

Fungal Type	Concentration (Mg/100ml)	Negative control growth DMSO	Culture length (cm)	Fungal growth length (cm)	% Inhibition of fungal growth
<i>Aspergillus niger</i>	3.00	11.00	12.50	7.50	40.00
	5.00	11.50	12.50	6.30	49.60
	20.00	11.00	12.50	2.20	82.40
<i>Aspergillus flavus</i>	3.00	10.00	12.50	7.00	50.70
	5.00	10.00	12.50	5.40	65.50
	20.00	10.00	12.50	1.50	89.50

Médicament standard= turbinafine

### I.2.5. Anti-Tuberculose :

L'objectif était la synthèse de nouvelles molécules antituberculeuses à partir d'une molécule modèle connue comme antituberculeuse : l'éthambutol, afin d'en augmenter l'activité, de diminuer la toxicité et d'améliorer son facteur thérapeutique [49]

L'éthambutol, représenté ci-dessous, se présente sous deux formes optiquement actives. Seule la forme dextrogyre (+) présente une activité thérapeutique. Trois stratégies de synthèse ont été réalisées : soit intercaler un groupement ferrocénique entre les deux fonctions amines, soit remplacer les deux groupements éthyles par un ferrocène ou remplacer la fonction alcool et le groupement éthyle par un ferrocène.

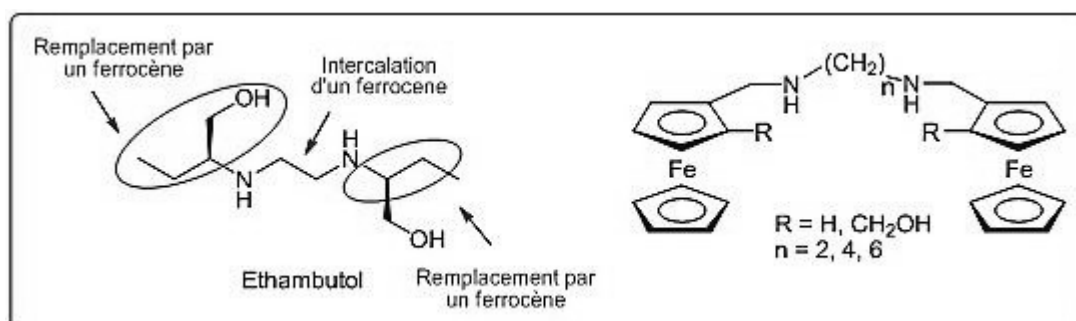


Figure (I.9) : structure chimique d'Ethambutol et son dérivé ferrocénique.

La sensibilité des composés ferrocéniques vis à vis des souches de *Mycobacterium. Tuberculosis* a été étudiée. Il apparaît que les diamino alcools ferrocéniques ne présentent aucune activité vis-à-vis de *M. Tuberculosis*. Par contre, les diamines ferrocéniques, en particulier pour une chaîne alkyle de deux à trois carbones, possèdent une très bonne activité antituberculeuse. L'absence d'activité biologique pour les diamines benzéniques montre l'importance de la présence du ferrocène sur la molécule.

### I.2.6. Anti-Toxoplasmose :

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

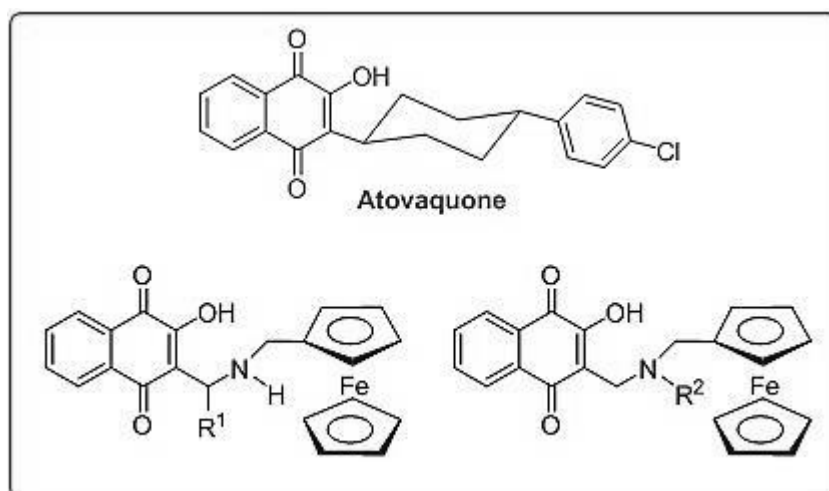


Figure (I.10) : structures chimiques d'Atovaquone et ses dérivés ferrocéniques[49]

### I.2.7. Anti- Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer est une démence dégénérative grave débutant le plus souvent par des troubles de la mémoire accompagnés d'états dépressifs. Apparaissent ensuite des désordres de la motricité, des troubles de la perception des informations du monde extérieur et de l'utilisation du langage qui aboutissent à un état grabataire. Elle est caractérisée par des dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires et des plaques séniles extracellulaires [51]

L'agrégation et la formation de fibrilles de peptides  $\beta$  - amyloïdes ( $A\beta$ ) est un phénomène clé dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. De nombreux efforts ont été déployés sur le développement d'inhibiteurs efficaces pour empêcher la formation de fibrilles d' $A\beta$  ou démonter les fibrilles  $A\beta$  préformées. Des inhibiteurs peptidiques ayant des séquences homologues aux segments hydrophobes de  $A\beta$  peuvent modifier la voie d'agrégation de  $A\beta$ , avec diminution de la toxicité cellulaire. Le Fc – KLVFF ; une combinaison de ferrocenyl (Fc) avec pentapeptide KLVFF montre l'effet inhibiteur de haute sélectivité de la formation de fibrilles de  $A\beta$  1-42 [52]

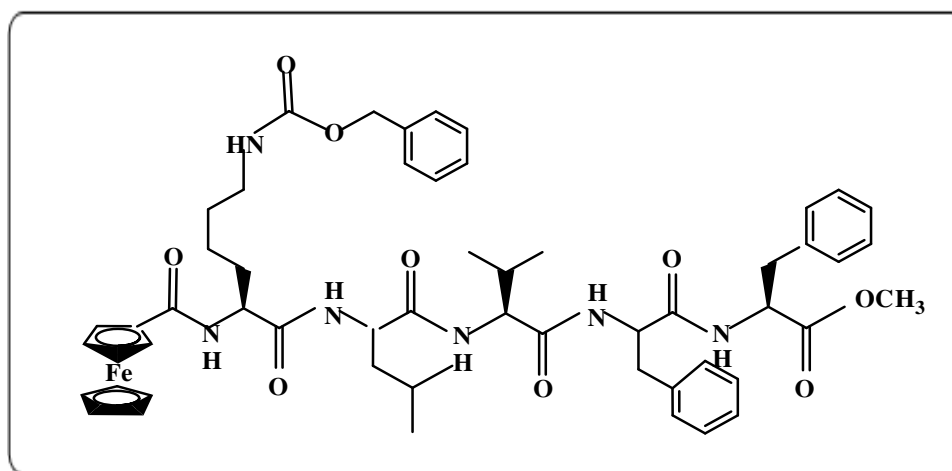
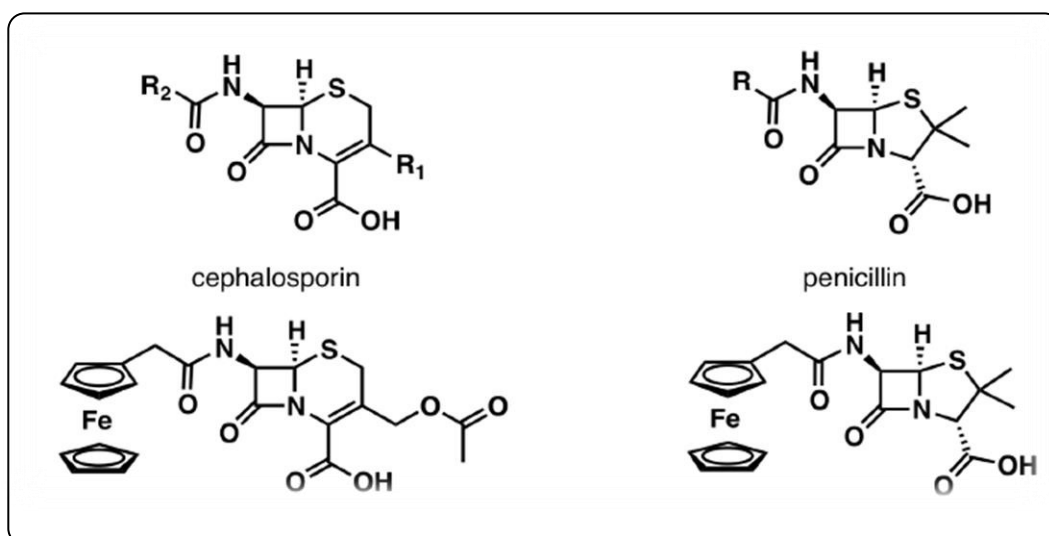


Figure (I. 11) : Structure de Fc-KLVFF

### I.2.8. Antibactériens :

Quelques antibiotiques connus ont été modifiés par l'insertion d'un groupement ferrocényle dans leurs structures, il s'agit des dérivés ferrocéniques de pénicilline et céphalosporine créés en 1970. [53]





**Figure (I. 12) : structures de pénicilline, céphalosporine et les dérivés ferrocéniques correspondants.**

Un carborane dérivé du ferrocène substitué a été synthétisé et utilisé comme agent thérapeutique prometteur antibactérien contre des infections bactériennes multirésistantes. Les résultats montrent l'effet antibactérien significatif contre deux agents pathogènes cliniques (Gram positif *Staphylococcus aureus* et Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*), à la fois in vitro et in vivo, sans / ou peu de toxicité pour les cellules normales et des tissus. [54]

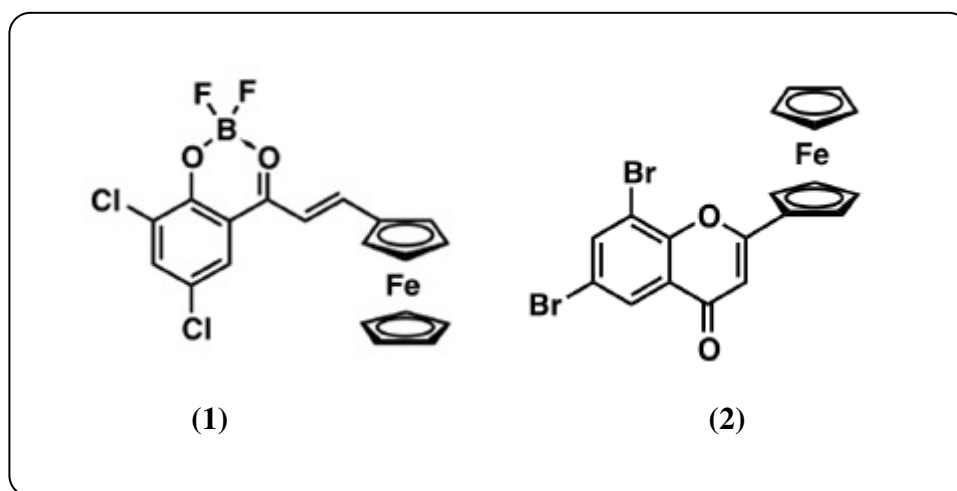
Shafqat Ali et al ont synthétisé et évalué le pouvoir antibactérien de 3-nitrophénylferrocène, les résultats sont résumés dans le tableau (I.3) [50].

**Tableau (I.3) : activité antibactérienne de 3-nitrophénylferrocène.**

Chemical (code)	<i>Staphylococcus Aurus</i> (G+ve)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (G-ve)		<i>Micrococcus lutus</i> (G+ve)		<i>Escherichia coli</i> (G-ve)	
MIC	500		2000		1000		1000	
	Radius (mm)	% Value	Radius (mm)	% Value	Radius (mm)	% value	Radius (mm)	% value
1	12	66	07	35	14	78	15	75
Imipenem standard drug	18	100	20	100	18	100	20	100

### I.2.9. Antioxydants :

La combinaison de molécules bioactifs avec une entité ferrocénique est connue en chimie médicinale pour augmenter aussi bien leur activité que leur spectre thérapeutique. C'est cette stratégie qui a conduit à la synthèse des premiers dérivés aurones et flavones ferrocéniques sachant que les flavonoïdes forment une des familles d'antioxydants les plus étendues. Ils présentent une incroyable diversité de propriétés biologiques. Du fait de leur caractère antioxydant, ils protègent l'organisme contre toute sorte d'agressions et de maladies. Parmi les composés synthétisés, (1) et (2) présentent une activité biologique significative comme étant :



**Figure (I. 13) : Structures chimiques de molécules ferrocéniques à activité biologique.**

1 : possède d'intéressantes propriétés en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme VIH-intégrase.

2: agent antibactérien prometteur, efficace contre la souche résistante *Staphylococcus aureus* [55].

**Références bibliographiques :**

- [01] : Chimie organométallique, Didier ASTRUC, collection Grenoble sciences 2000.
- [02]: T.L Kealy et P.L Pauson, A new type of organo-Iron compound, *Nature*, 168: 1039-1040, (1951).
- [03]: E. O. Fischer, W. Pfab "Zur Kristallstruktur der Di Cyclopentadienyl-Verbindungen des zweiwertigen Eisens, Kobalts und Nickels". *Z. Naturforsch.* 7: 377–379, (1952).
- [04] :G.Wilkinson, M. Rosenblum, M.C.Whiting, R.B. Woodward, *J.Am.Chem.Soc.*,74: 2125, (1952).
- [05]:E. O. Fischer and R. Jira *J. Organomet. Chem.***637–639**, 7–12 (2001).
- [06] : C. Kopp, Conception de matériaux dendritiques chiraux mésomorphes pour l'élaboration de commutateurs électro actifs basés sur le couple « ferrocène-ferrocénium », *thèse de doctorat, université de Neuchatel, faculté des sciences*, (Mai 2010).
- [07]: S.coriani, A.Haaland, T.Helgaber, P.Jorgensen, The equilibrium structure of ferrocene, *chem.phys.chem*,7(1) :245-249, (2006)
- [08] : N. Mohammadi, A. Ganesan, C.T. Chantler , F. Wang, Differentiation of ferrocene D5d and D5h conformers using IR spectroscopy, *Journal of Organometallic Chemistry* 713: 51-59, (2012).
- [09]: N. Behera, Synthesis and characterization of ferrocene containing organometallic compounds, Roll NO.409CY2005, Department of chemistry, national institute of technology, Rourkela – 769008, Orissa
- [10] : R. A. Afre, Y. Hayashi, T. Soga, Improved open circuit voltage of the photovoltaic device using ferrocene as a donor material, *Synthetic Metals* 160: 779–782, (2010).
- [11]: M.S. Morad , A.A.O. Sarhan, Application of some ferrocene derivatives in the field of corrosion inhibition, *Corrosion Science*, 50: 744–753, (2008).
- [12] : A Mooney, A. J. Corry, C.N Ruairc, T. Mahgoub, D. O'Sullivan, N. O'Donovan, J. Crown, S.Varughese, S.M. Draper, D. K. Raie and P. T. M. Kenny, Synthesis, characterisation and biological evaluation of *N*-(ferrocenyl) naphthoyl amino acid esters as anticancer agents, *The Royal Society of Chemistry* 39: 8228–8239, (2010).
- [13]: M. H Abraham, N. Benjelloun-Dakhama, J.M.R. Gola, W. E. Acree, Jr., W S. Cain and J. E. Cometto-Muniz, Solvation descriptors for ferrocene and the estimation of some physicochemical and biochemical properties, *New J. Chem*, 24: 825-829, (2000).
- [14]: J. de J. Cázares-Marinero, Synthèse, caractérisation et évaluation des effets biologiques des hybrides « FcTAM-SAHA » et composés dérivés, *Thèse de doctorat de l'Université Paris VI « Université Pierre et Marie Curie »*, (2013).

- [15]: T. Sarkar, S. Banarjee, S. Mukherjeeb and A. Hussain, Mitochondrial selectivity and remarkable photocytotoxicity of a ferrocenyl neodymium (II) complex of terpyridine and curcumin in cancer cells, *Dalton trans*, 45: 6424–6424, (2016).
- [16]: J. Vera, L. M. Gao, A. Santana, J. Mattab and E. Melendez , Vectorized ferrocenes with estrogens and vitamin D2: synthesis, cytotoxic activity and docking studies, *The Royal Society of Chemistry*, 40: 9557–9565, (2011).
- [17]: B. I. Károlyi, S. Bősze, E. Orbán, P.Sohár, L. Drahos, E. Gál and A. Csámpai, Acylated mono-, bis- and tris- Cinchona-Based Amines Containing Ferrocene or Organic Residues: Synthesis, Structure and in Vitro Antitumor Activity on Selected Human Cancer Cell Lines, *Molecules*, 17: 2316-2329, (2012).
- [18]: R. Iacovino, J. Valentina Caso, F. Rapuano , A. Russo , M. Isidori, M.Lavorgna, G. Malgieri and C. Isernia, Physicochemical Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation of Hydroxymethylferrocene:β Cyclodextrin Inclusion Complex, *Molecules*, 17: 6056-6070,(2012)
- [19]: Wang PH, Kecki JG: *J. Med. Chem* , 33: 608, (1990).
- [20]: K.N .Tiwari, J.P. Monserrat, A. Hequet, C. Ganem-Elbaz, T. Cresteil, G. Jaouen, A Vessières, E.A. Hillard, C. Jolival, In vitro inhibitory properties of ferrocene substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. *Dalton Trans*, 41: 6451–6457, (2012)
- [21]: S. Yavuz and H.Yildirim, Ferrocene Derivatives Carrying Urea, Thiourea, and Sulfonamide Moieties, Synthesis and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activities, *Journal of Chemistry*, 86: 759-768, (2014).
- [22]: Y-T. Liu, G-D .Lian, D-W.Yin, B-J. Su, Synthesis and antimicrobial activity of some novel ferrocene-based Schiff bases containing a ferrocene unit, *Res Chem Intermed*, 38:1043–1053, (2012).
- [23]: P. M. García-Barrantes, G. V. Lamoureux, A.L. Pérez, R. N. García-Sánchez , A.R. Martínez , A. San Feliciano, Synthesis and biological evaluation of novel ferroceneenaphthoquinones as antiplasmodial agent, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70: 548-557, (2013).
- [24]: N. Chavain , Conception, synthèse, analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de la ferroquine, *thèse de doctorat en chimie organique et macromoléculaire, université de Lille*, 29 septembre 2008.
- [25]: S. Yavuz and H. Yildirim: Ferrocene Derivatives Carrying Urea, Thiourea, and Sulfonamide Moieties, Synthesis and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activities, *Journal of Chemistry*, 86: 759-768, (2014).

- [26]: G-L. Xi, Z-Q. Liu, Solvent-free Povarov reaction for synthesizing ferrocenyl quinolines: Antioxidant abilities deriving from ferrocene moiety, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86: 759-768, (2014).
- [27]: G. Nabi, Z-Q. Liu, Radical-scavenging properties of ferrocenyl chalcones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 944–946, (2011).
- [28]: R. Azadar Hussain, A. Badshah, M. Sohail, B. Lal, A. A. Altaf, Synthesis, chemical characterization, DNA interaction and antioxidant studies of ortho, meta and para fluoro substituted ferrocene incorporated selenoureas, *Inorganica Chimica Acta*, 402 133–139, (2013).
- [29]: E. R. Milaeva, S. I. Filimonova, N. N. Meleshonkova, L. G. Dubova, E. F. Shevtsova, S. O. Bachurin, and N. S. Zefirov, Antioxidative Activity of Ferrocenes Bearing 2,6-Di-Tert – Butylphenol Moieties, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Volume 2010, Article ID 165482, 6 pages.
- [30]: J. Zhang and R. Liu, Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Ferrocenylhydrazones, *J.Chem.Soc.Pak*, 33, No. 3, (2011).
- [31]: F. Asghar , A. Badshah , A. Shah, M. Khawar Rauf , M. Irshad Ali, M. Nawaz Tahir, E. Nosheen , Z-ur-Rehman, R. Qureshi, Synthesis, characterization and DNA binding studies of organoantimony(V) ferrocenyl benzoates, *Journal of Organometallic Chemistry*, 717: 1-8, (2012).
- [32]: M. Zaheer, A. Shah, Z. Akhter, R. Qureshi, B. Mirza, M. Tauseef and M. Bolte, Synthesis, characterization, electrochemistry and evaluation of biological activities of some ferrocenyl Schiff bases, *Appl. Organometal. Chem*, 25: 61–69, (2011).
- [33]: A. K. Kondapi, N. S. Rayana, A.D. Saikrishna, A study of the topoisomerase II activity in HIV-1 replication using the ferrocene derivatives as probes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 450 (2006), 123-132.
- [34]: P. Köpf-Meyer, H. Köpf, W. Neuse. Ferricenium complexes: a new type of water soluble antitumor agent. *J Cancer Res Clin Oncol*, 108: 336–340, (1984)
- [35]: D Osella, M Ferrali, P Zanello, F Laschi, M Fontani, C Nervi, G Cavigiolo, On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivative. *Inorg Chim Acta*, 306: 42–48, (2000)
- [36]: C. Y. Acevedo-Morantes, E. Meléndez, S. P Singh and J. E Ramírez-Vick, Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines, *J Cancer Sci Ther*, 4.9, (2012).

- [37]: G. Tabbi, C. Cassino, G. Caviglioglio, D. Colangelo, A. Ghiglia, I. Vivano, D. Osella. 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*, 45: 5786–5796, (2002).
- [38]: M. Auzias, complexes mono- et dinucléaires de ruthénium à ligands ferrocéniques et porphyriniques : synthèse, structures moléculaires, propriétés redox et applications biologiques, thèse de doctorat, université de Neuchâtel, soutenue le 23 septembre 2008.
- [39]: A. Nguyen, S. Top, P. Pigeon, A. Vessières, E.A. Hillard, M.A. Plamont, M. Huché, C. Rigamonti, G. Jaouen, Synthesis and structure-activity relationships of ferrocenyl tamoxifen derivatives with modified side chains. *Chem Eur J*, 15: 684–696, (2009).
- [40]: A. Vessières, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen, Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators), the influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects. *Dalton Trans*, 529–541, (2006).
- [41]: E.A. Hillard, A. Vessières, S. Top, P. Pigeon, K. Kowalski, M. Huché, G. Jaouen, Organometallic diphenols: the importance of organometallic moiety on the expression of a cytotoxic effect on breast cancer cells. *J Organomet Chem*, 692: 1315–1326, (2007)
- [42]: E.A. Hillard, A. Vessières, F. Le Bideau, D. Plažuk, D. Spera, M. Huché, G. Jaouen, A series of unconjugated ferrocenyl phenols: prospects as anticancer agents. *ChemMedChem*, 1: 551–559, (2006)
- [43]: P. Pigeon, S. Top, O. Zekri, E.A. Hillard, A. Vessières, M.A. Plamont, O. Buriez, E. Labbe, M. Huché, S. Boutamine, C. Amatore, G. Jaouen, The replacement of a phenol group by an aniline or acetanilide group enhances the cytotoxicity of 2-ferrocenyl-1,1-diphenyl-but-1-ene compounds against breast cancer cells. *J Organomet Chem*, 694: 895–901, (2009).
- [44]: O. Zekri, E.A. Hillard, S. Top, A. Vessières, P. Pigeon, M. Plamont, M. Huché, S. Boutamine, M.J. McGlinchey, H. Müller-Bunz, G. Jaouen, Role of aromatic substituents on the antiproliferative effects of diphenyl ferrocenyl butene compounds. *Dalton Trans*, 22: 4318–4326, (2009).
- [45]: A. Vessières, S. Top, P. Pigeon, E.A. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen, Modification of the estrogenic properties of diphenols by the incorporation of ferrocene. Generation of antiproliferative effects *in vitro*. *J Med Chem*, 48: 3937–3940, (2005).
- [46]: O. Payen, S. Top, A. Vessières, E. Brulé, M.A. Plamont, M.J. McGlinchey, H. Müller-Bunz, G. Jaouen, Synthesis and structure-activity relationships of the first ferrocenyl-aryl-

hydantoin derivatives of the nonsteroidal antiandrogen nilutamide. *J Med Chem*, 51: 1791–1799, (2008).

[47]: F. Dubar, J. Khalife, J. Brocard, D. Dive and C. Biot, Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug –Thoughts on the Mechanism of Action, *Molecules*, 13: 2900-2907, (2008).

[48]: P. Beagley, M.A. L. Blackie, K. Chibale, C. Clarkson, R. Meijboom, J.R. Moss, P. J. Smith and H.Su, Synthesis and antiplasmodial activity *in vitro* of new ferrocene–chloroquine analogues, the royal society of chemistry, 3046-3051, (2003).

[49]: A. Barameea, A. Coppinc, M. Mortuairec, L. Pelinskia, S. Tomavoc, J. Brocarda, Synthesis and *in vitro* activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 1294–1302, (2006).

[50]: S. Ali, A.A. Altaf, A. Badshah, I-ud-din, B. Lal, S. Kamal and S. Ullah, DNA interaction, Antibacterial and Antifungal studies of 3-nitrophenylferrocene, *J. Chem. Soc. Pak* 35, (2013).

[51]: A.Prado Jean, Spécificité de la dépression dans les démences, *thèse de doctorat de l'université de Limoges*, soutenue le 30 juin 2010.

[52]: C-W. Wei, Y. Peng, L. Zhang, Q. Huang, M. Cheng, Y-N. Liu, J. Li, Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as an inhibitor of Alzheimer's A $\beta$ <sub>1-42</sub> fibril formation *in vitro*, *Inorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 5818–5821, (2011).

[53]: J-P. Monserrat, Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocéniques des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols, *Thèse de doctorat en Chimie Bioorganométallique*, 23 Septembre 2011.

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





**CHAPITRE II :**  
**SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS**  
**FERROCÈNIQUES**

---

## Chapitre II: Synthèse des dérivés ferrocéniques

### Partie A : Partie théorique.

#### II.A.1. Généralités sur la réaction de diazotation [01-04]:

La diazotation est l'une des plus anciennes et des plus utilisées des réactions en chimie organique, elle permet la formation des sels de diazonium. Presque toutes les amines aromatiques primaires peuvent être converties en leurs sels de diazonium.

Les sels de diazonium aromatiques ont été découverts en 1858 par Johann Peter Griess (1828-1886) et leur usage en synthèse s'est rapidement démocratisé. Ils sont communément préparés à partir de l'arylamine en présence d'une source de nitrite (**équation II.1**). Lorsque la réaction est effectuée en milieu aqueux, le sel de diazonium est généralement préparé en employant le nitrite de sodium en milieu acide fort.



La méthode la plus utilisée pour la réalisation la plus simple de la réaction de diazotation consiste à traiter l'amine dissout dans une solution aqueuse d'acide minéral avec un nitrite de métal alcalin (le plus souvent  $\text{NaNO}_2$ ) à basse température ( $0-5^\circ\text{C}$ ). Un milieu acide est essentiel lors de diazotation.

La proportion molaire de l'acide habituellement utilisé ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) est de 2,5 à 3.

#### II.A.2. Les sels de diazonium :

Les sels d'aryldiazonium (**figure II.1**) constituent une importante série de composés d'utilisation majeure en chimie organique parce que le groupe diazonium permet des substitutions aromatiques nucléophiles et fournit une manière générale pour introduire les halogènes, CN, OH, H, etc., dans un cycle aromatique pour former une large gamme de composés. En outre, la réaction de sels de diazonium avec les molécules aromatiques ( $\text{Ar}'\text{OH}$ ,  $\text{Ar}'\text{NR}_2$ ) donne des composés azoïques, de formule générale  $\text{Ar-N}=\text{N-Ar}'$ , qui sont d'énormes importance en tant que colorants [05-07]

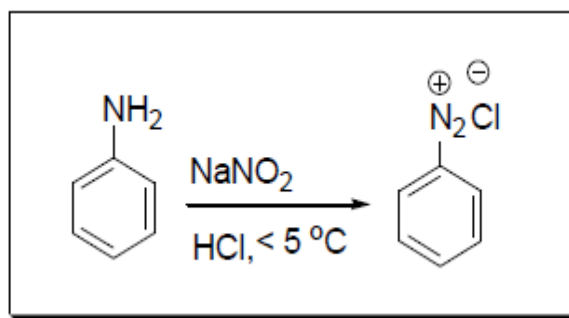


Figure (II.1) : le sel de diazonium

### II.A.2.1. Brève histoire des sels de diazonium [08]:

Depuis leur première découverte en 1858 par Griess, plusieurs réactions associées aux sels d'arènediazonium ont évolué tout au long de plus d'un siècle (**schéma II.1**).

En 1884, Sandmeyer a révélé que par le traitement avec le chlorure de cuivre (I), le sel de benzènediazonium a été converti en chlorobenzène.

12 ans plus tard, Pschorr a rapporté un procédé pour la préparation de biaryltricycliques par substitution intramoléculaire d'une arène avec un radical aryle, qui est généré in situ à partir d'un sel d'aryle diazonium par catalyse par cuivre.

En 1924, Gomberg et Bachmann ont développé la synthèse intermoléculaire du radical biaryle de Pschorr, qui est connu maintenant sous le nom de réaction de Gomberg – Bachmann.

Seulement trois ans plus tard, une découverte importante a été réalisée par Balz et Schiemann, qui ont déclaré la décomposition thermique de tétrafluoroborates de diazonium aromatiques, la réaction conduit à la formation de fluorures aromatiques, qui ne peuvent être accédées par la réaction de Sandmeyer.

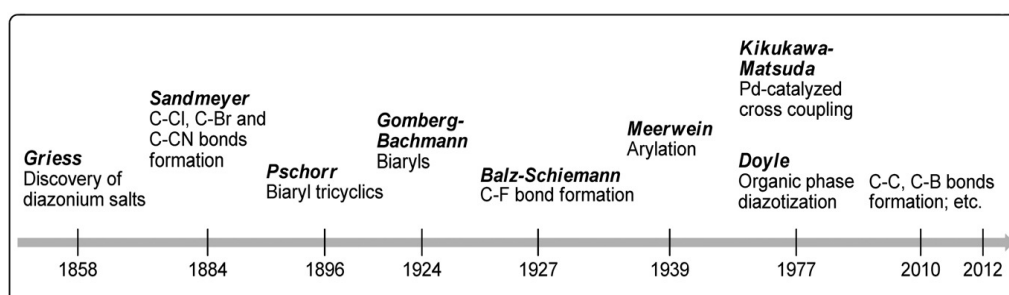


Figure (II.2) : histoire des sels de diazonium

En 1939, Meerwein et ses collègues ont effectué une étude vaste sur la réaction de sels de diazonium aromatiques avec des composés carbonyles insaturés. La réaction a été plus tard connue sous le nom de l'arylation de Meerwein, dans laquelle le groupe aryle est ajouté sur la double liaison.

En 1977, Doyle et ses collaborateurs ont rapporté une méthode différente pour la production de sels de diazonium dans laquelle la solution aqueuse acide n'était plus nécessaire.

En plus des réactions classiques mentionnés ci-dessus, les sels de diazonium ont également servis comme substitués halogénure d'aryle, qui ont été utilisée dans catalyse par Pd des réactions de couplage croisé de liaison carbone-carbone et formation d'une liaison carbone-hétéroatome. Ces réactions de couplage ont été bien établies au cours de la dernière 40 années depuis les travaux pionniers de Kikukawa et Matsuda en 1977, et sont complètement documenté dans une série d'excellentes revues. En outre, les sels de diazonium sont également très utiles dans l'industrie des colorants et de pigments pour la préparation des composés azoïques.

### II.A.2.2. La valeur synthétique de copulation diazoïque [09] :

#### 1. Les colorants :

Les composés azo- aromatiques sont colorés. Plusieurs de ces composés synthétisés par la copulation diazoïque sont utilisés comme matières colorantes.

Ces composés peuvent être classés en trois groupes.

- Un premier groupe de composés azoïques sont neutres, un exemple est le para rouge qui est préparé par couplage de 2 – naphтол avec le sel de p nitrobenzènedazonium.

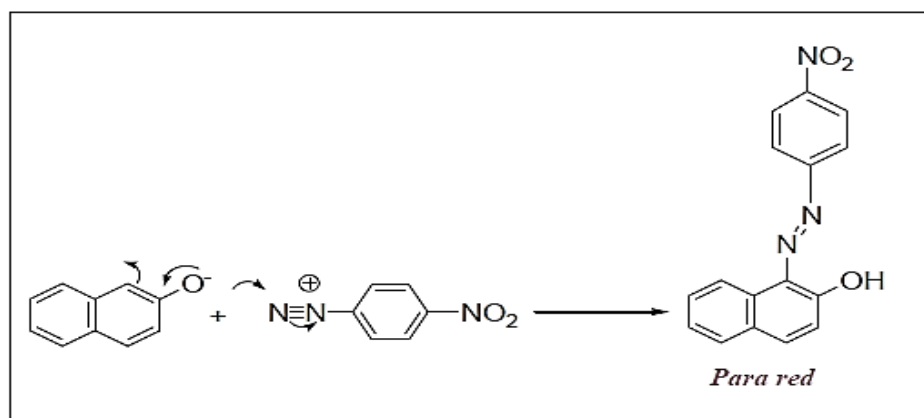


Figure (II.3) : mécanisme de formation du colorant « Para red »

- Le second groupe de composés azoïques possèdent soit un groupe acide sulfonique ou un groupe amine qui sont généralement adsorbés directement sur la fibre à partir de solution aqueuse. Les exemples sont l'orange II (un colorant acide) et de brun Bismarck R (un colorant basique).

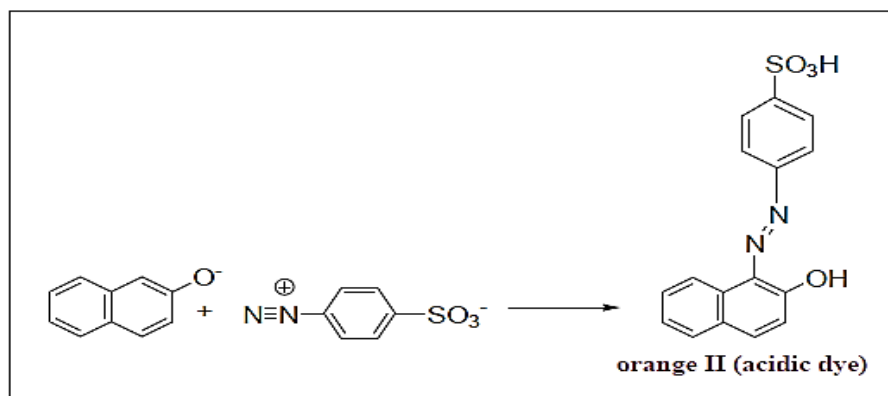


Figure (II.4) : mécanisme de formation du colorant « Orange II »

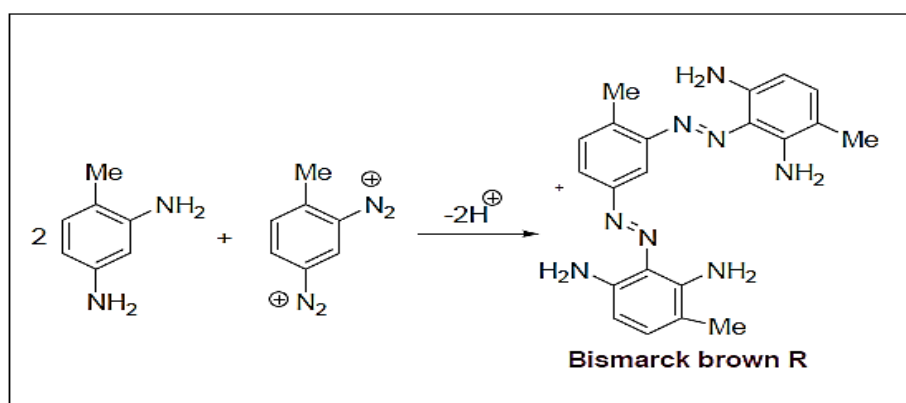


Figure (II.5) : mécanisme de formation du colorant « Bismarck brownR »

- Composés azoïques qui contiennent des groupes chélateurs capables de se lier avec des ions métalliques tels que Al (III). Un exemple est le jaune d'alizarine R,

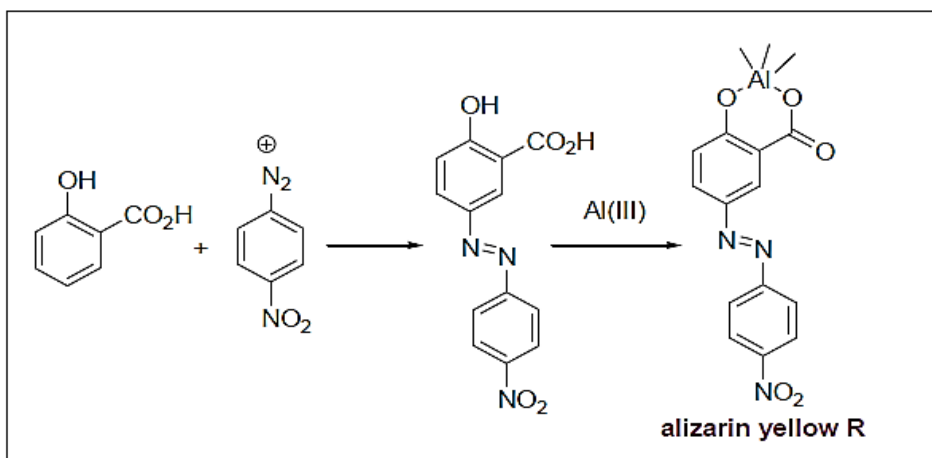


Figure (II.6) : mécanisme de formation du colorant « Alizarin yellow R »

## 2. Les indicateurs :

Les composés azoïques qui contiennent à la fois un groupe acide et un groupe basique peuvent être utilisés en tant qu'indicateurs depuis les couleurs de l'acide et la base conjuguée sont différentes.

Des exemples sont le méthyle orange et le rouge de méthyle, qui sont préparés par couplage de diméthylaniline respectivement avec l'acide sulfanilique diazoté et d'acide anthranilique diazoté.

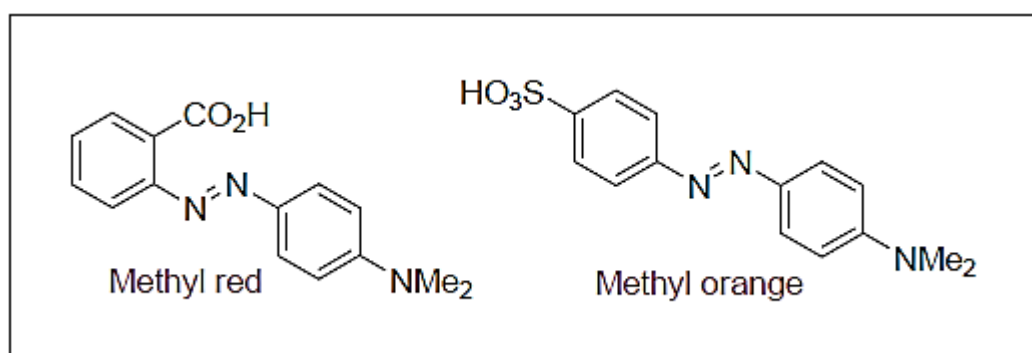


Figure (II.7) : structure de « Methyl red » et « Methyl orange »

### II.A.3. L'arylation :

L'arylation est une substitution électrophile aromatique -dans une molécule- d'un atome d'hydrogène par un radical aryle.

La substitution électrophile aromatique (ou **SEA**, voire **SEAr**) est une réaction organique au cours de laquelle un atome, en règle générale d'hydrogène, ou un groupe d'atome, fixé à un cycle aromatique est substitué par un groupement électrophile. Cette réaction, la principale dans le groupe des substitutions électrophiles, est très importante en chimie organique, tant dans l'industrie qu'en laboratoire. Elle permet de préparer des composés aromatiques substitués par une grande variété de groupements fonctionnels suivant le bilan :

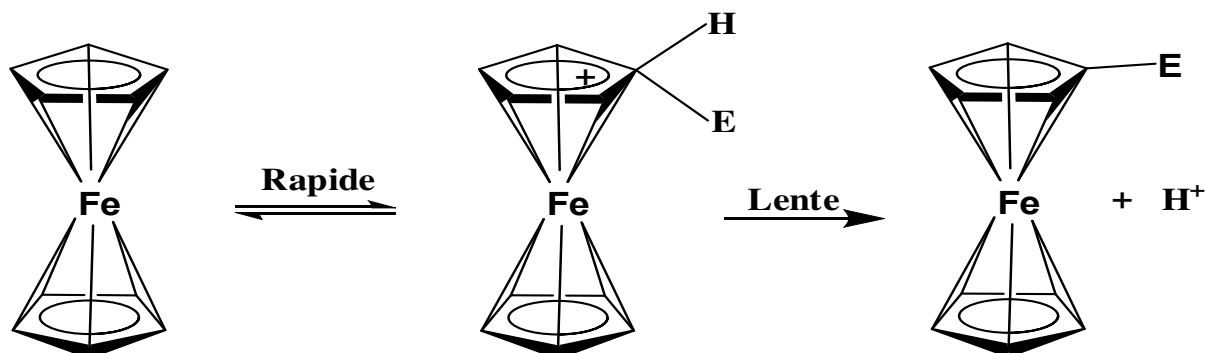


Avec Ar un composé aromatique et E un groupement électrophile.

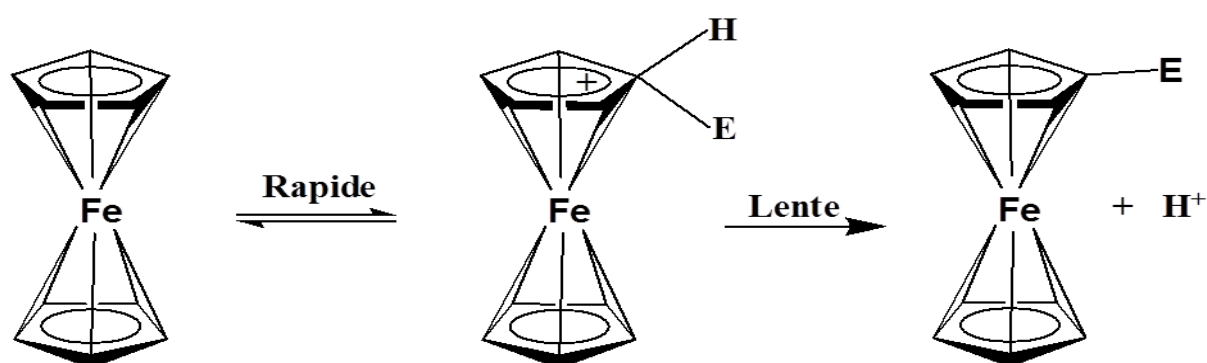
#### Arylation de ferrocène :

Le mécanisme des réactions de substitution sur le cycle pentadiényle du ferrocène repose sur la formation directe d'un complexe sigma sans participation du métal. Deux mécanismes sont proposés [10] :

Mécanisme (I) : il comporte un processus en deux étapes. La première est une étape rapide où l'électrophile E détruit la liaison métal-carbone dans une réaction de  $\text{SE}^2$  avec la conservation de configuration, suivie d'une limitation de vitesse d'enlèvement du proton à partir de l'extérieur de la molécule, la deuxième étape est une réaction d'inversion  $\text{SE}^2$ .



Mécanisme (II) : ce mécanisme comporte une limitation de vitesse de l'attaque par l'électrophile à partir de l'extérieur dans un déplacement  $\text{SE}^2$  avec une inversion de la configuration, suivie du départ rapide d'un proton de l'intérieur, avec la conservation de la configuration.



#### II.A.4. La réduction :

La réduction des composés nitrés aromatiques en amines correspondantes est une transformation chimique importante en chimie organique de synthèse. En effet, les amines aromatiques sont importants intermédiaires pour un certain nombre de précieux composés tels que les produits pharmaceutiques, agrochimiques et colorants. Diverses méthodes ont jusqu'à présent été signalés pour cette transformation, dont beaucoup emploient des agents métalliques [11].

Une grande variété de réactifs a été utilisée pour la réduction des composés nitroaromatiques en amines correspondantes. Parmi eux, le fer en présence de l'acide chlorhydrique ou acétique, qui reste toujours une méthode importante et traditionnelle. Autre métaux comme le zinc et Sn en présence de l'acide chlorhydrique, ainsi que Zn/NH<sub>3</sub>, In, le fer activé, Zn/NaOH/EtOH, Al/NH<sub>4</sub>Cl/MeOH, CaCl<sub>2</sub>/Zn/EtOH, Co<sub>2</sub>(CO)<sub>8</sub>/H<sub>2</sub>O, Mo(CO)<sub>6</sub> et d'autres réactifs tels que SnCl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, SnCl<sub>2</sub>/ liquide ionique, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/FeCl<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/Zn, TiCl<sub>3</sub>, NaHPO<sub>2</sub>/FeSO<sub>4</sub>, B<sub>10</sub>H<sub>14</sub>/Pd/C, FeCl<sub>3</sub>/Zn/DMF/H<sub>2</sub>O, HCOONa/K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/AlH<sub>3</sub>/AlCl<sub>3</sub>, nickel généré électrochimiquement, HCOONH<sub>4</sub>/Ni [P (OPh)<sub>3</sub>]<sub>4</sub>, l'hydrogénation catalytique utilisant l'hydrogène moléculaire et les catalyseurs tels que Pd/C et, très récemment, Zn en présence de poly [N-(2-aminoéthyl) acrylamido]-chlorure et Na<sub>2</sub>S/NEt<sub>4</sub>Br ont également été utilisés ainsi que les hydrures NaBH<sub>4</sub> et LiAlH<sub>4</sub> en présence de Pd/C [12].



## Partie B: Résultats et discussions :

### Introduction :

La synthèse des composés ferrocéniques est effectuée suivant la méthode de Lanez [13] avec quelques modifications.

La stratégie globale de synthèse des dérivés 1, 2, 3,4 est présentée par le schéma (II.1). Elle est commune et consiste en une réaction de diazotation de l'amine primaire nitroaniline en position ortho, méta et para suivie par une arylation de ferrocène « réaction de couplage » avec le sel de diazonium formé.

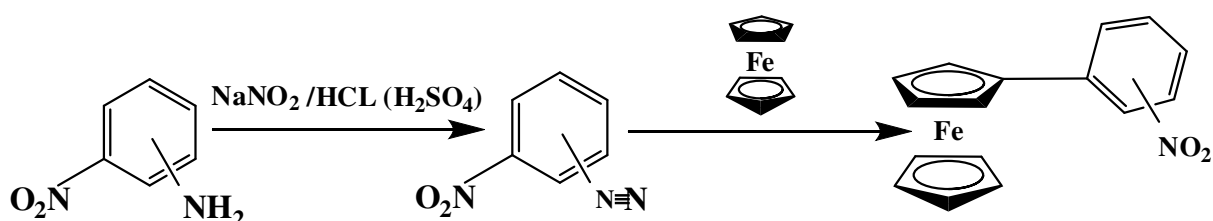


Schéma (II.1) : stratégie globale de synthèse des dérivés 1, 2, 3 et 4.

Le composé 5 est une amine, il est produit par la réduction de 3-nitrophenylferrocène par  $\text{NaBH}_4$  en présence de palladium sur charbon actif (Pd/C) comme catalyseur, suivant le schéma (II.2) :

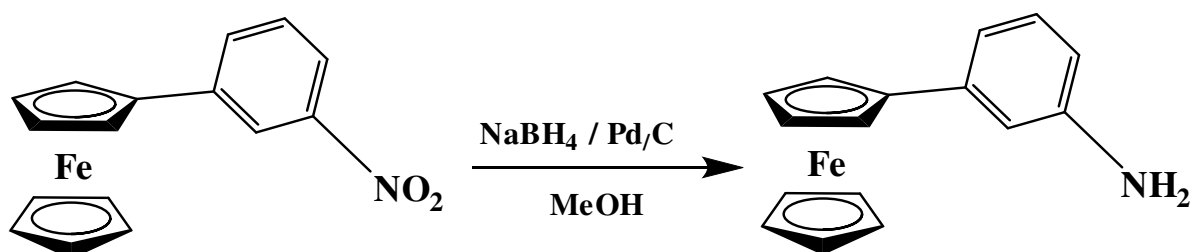
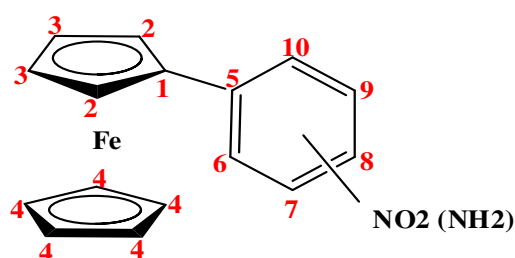


Schéma (II.2) : stratégie de synthèse de composé 5.

L'interprétation des spectres RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT) est basée sur la numérotation suivante :



**II.B.1 : Synthèse de 2-nitrophénylferrocène (2-NPF : 1):**

La synthèse de 2-nitrophénylferrocène se déroule en deux étapes, la première étape est une diazotation de 2-nitroaniline par nitrite de sodium, et la deuxième est une arylation de ferrocène qui a pour objectif l'introduction de groupement nitrophényl sur ce dernier par l'intermédiaire de sel de diazonium ; chlorure de nitrobenzènediazonium formé dans la première étape.

**II.B.1.1 : Diazotation de 2-nitroaniline : Formation de chlorure 2-nitrobenzènediazonium :**

Pour former le chlorure de 2-nitrobenzènediazonium, on a procédé au diazotation de 2-nitroaniline (15.2g ) par le nitrite de sodium (8g) en milieu acide (HCl) à une température inférieure à 5°C (3°), 2-nitroaniline est dissout dans une solution aqueuse de HCl et plus exactement 100ml d'eau + 107,5 ml de HCl, avec un chauffage pour la dissolution complète de l'amine. La solution de nitrite de sodium est ajoutée goutte à goutte tout en surveillant la température à l'intérieur de ballon et qu'elle ne dépasse pas 5°C, l'augmentation de la température plus de 5°C favorise la dissociation l'acide nitreux et le dégagement de N<sub>2</sub>. Après l'ajout de nitrite de sodium, la solution est agitée à 3°C pendant 1h.

**II.B.1.2. Arylation de ferrocène :**

Après la filtration du mélange réactionnel, le ferrocène (18.6g) dans l'éther (450 ml ) est ajouté brusquement au filtrat et le mélange est agité à la température de la salle pendant 3h.

Le produit est extrait par l'éther diéthylique, puis la phase organique est lavée par l'eau distillée, séchée et évaporée, le brut récupéré est un solide marron noirâtre.

La chromatographie sur colonne est réalisée pour séparer les constituants du mélange, un gradient d'éther de pétrole/ éther : (8/2) permet de récupérer le produit de couleur marron noirâtre avec un point de fusion Pf égale à 113°C.

**Spectre IR :** L'analyse spectrale par spectroscopie IR nous a permis de donner une information préliminaire sur le premier produit, le spectre présent des pics avec bandes 3098, 1600, 1510, 1345, 960 cm<sup>-1</sup>

**Spectre RMN <sup>1</sup>H :** Le spectre RMN <sup>1</sup>H du ferrocène présente un seul pic correspond aux dix protons de deux cycles de cyclopentadiényles à 4.15ppm, tandis que la figure (08) montre

clairement l'apparition d'autres pics caractéristiques de la substitution du ferrocène, un pic à 4.02ppm correspond à 5H liés au C4 (suivant la numérotation c'est le cycle pentadiényle inférieur de ferrocène), à 4.28ppm correspond à deux protons de l'atome C2 ou C3 de cycle de pentadiényle ( $C_5H_4$ ), 4.40 ppm correspond à deux protons de l'atome de carbone C3 ou C2, un pic à 7.21ppm correspond à un proton lié à l'atome C10, un multiplet à 7.42ppm qui correspond à deux protons liés aux atomes C8 et C9, un doublet à 7.72ppm correspondant à un proton lié à C7.

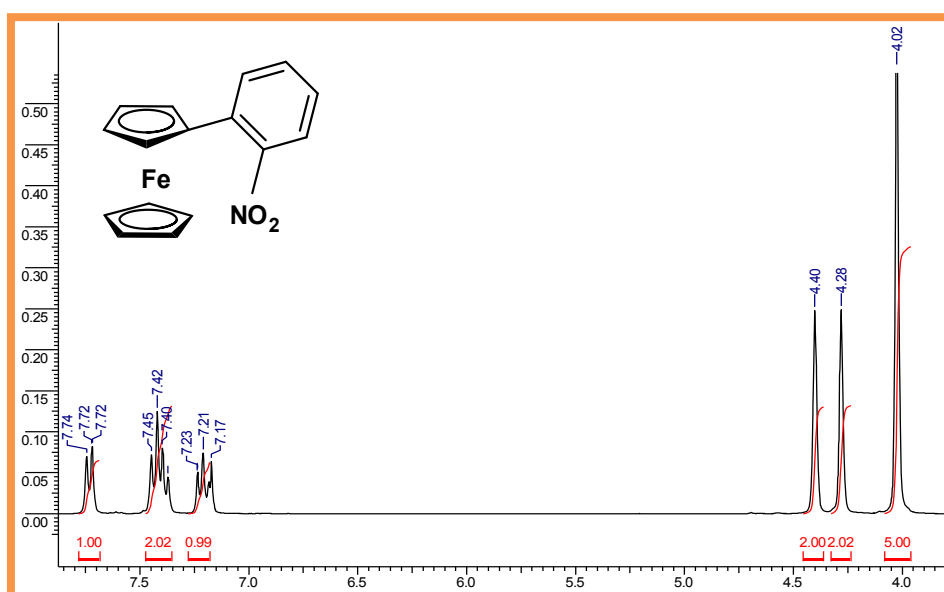


Figure (II.8) : Spectre RMN  $^1H$  de 2-nitrophenylferrocène.

### Spectres $^{13}C$ et DEPT :

A partir des spectres  $^{13}C$  et DEPT du composé 1, on peut tirer les informations suivantes :

$^{13}C$	DEPT	Interprétation
68.83ppm	68.83ppm	CH
69.39ppm	69.39ppm	CH
69.97ppm	69.97ppm	CH
81.33ppm	Disparu	C
123.26ppm	123.27ppm	CH
126.56ppm	126.56ppm	CH
130.97ppm	130.97ppm	CH
132.11ppm	132.27ppm	CH
133.27ppm	Disparu	C
149.82ppm	Disparu	C

On comparant les spectres  $^{13}C$  RMN et DEPT du composé (1) avec celui du proton, on peut conclure que :

- La molécule ne contient pas de CH<sub>2</sub>
- La molécule ne contient pas de CH<sub>3</sub>
- La molécule contient 7(CH) et 3(C).
- La molécule contient 13H.

### II.B.2. Synthèse de 3-nitrophénylferrocène (3-NPF : 2)

Ce composé a été synthétisé en suivant la même procédure, 10,7g de 3-nitroaniline dissout dans 22,90 ml d'eau + 16,7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) ml et diazoté par 5,5 g de nitrite de sodium. 13,08g de ferrocène dans 316,45ml d'éther est ajouté au filtrat (sulfate de 3-nitrobenzènediazonium). Après 3heures d'agitation sous la température de la salle, la phase organique est récupérée, lavée par l'eau, séchée et évaporée pour obtenir le brut réactionnel. Une chromatographie sur colonne permet de récupérer deux produits qui sont de couleur rouge orangé.

(2) : de R<sub>f</sub> = 0,73 ; de point de fusion de 123°C, son spectre IR (KBr disques) :1521,7 et 1346,2 : NO<sub>2</sub>, 1456,2-1635,5 : C=C aromatique, 1652,9 : C=C,

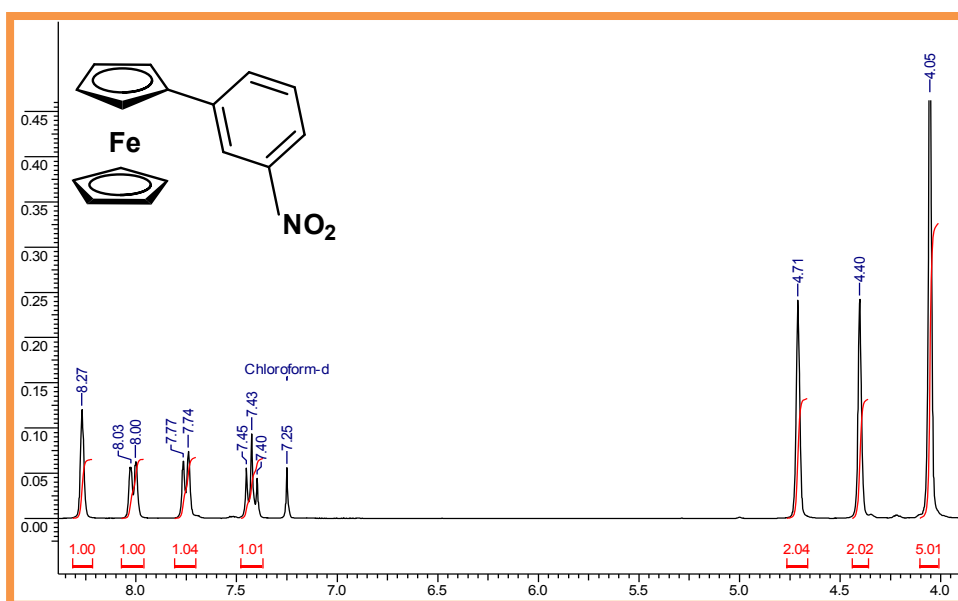


Figure (II.9) : Spectre de RMN <sup>1</sup>H de 3- nitrophenylferrocène.

**Spectre RMN  $^1\text{H}$**  : Son spectre RMN de proton montre différents pics, un pic à 4.05ppm correspondant à 5H du cycle pentadiényle ( $\text{C}_5\text{H}_5$ ) de ferrocène, un pic à 4.40ppm correspond à 2H liés à l'atome C2 ou C3, un pic à 4.71ppm correspondant à 2H liés à l'atome C3 ou l'atome C2, un triplet à 7.43 ppm correspond à un proton lié à l'atome C9 avec un coefficient de couplage  $j$  égale à 7.98Hz, un doublet à 7.74ppm correspond à un proton lié à l'atome C10 avec un coefficient de couplage égale à 7.70Hz, un doublet à 8.00ppm correspond à un proton lié à l'atome C8 avec un coefficient de couplage égale à 8.34Hz et un pic singulet correspond à un proton lié à l'atome C6.

**Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT** : A partir des spectres  $^{13}\text{C}$  et DEPT du composé 2, on peut tirer les informations suivantes :

$^{13}\text{C}$	DEPT	Interprétation
66.82 ppm	66.83ppm	CH
69.84 ppm	69.84 ppm	CH
69.90 ppm	69.80 ppm	CH
82.49 ppm	Disparu	C
120.38 ppm	120.38 ppm	CH
120.49 ppm	120.50 ppm	CH
129.24 ppm	129.24 ppm	CH
131.68 ppm	131.68 ppm	CH
142.17 ppm	Disparu	C
148.36 ppm	Disparu	C

En combinant entre les informations extraites des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT avec ceux issues du spectre de proton de composé 2, on peut déduire :

- Le composé 2 ne contient pas des  $\text{CH}_2$ .
- Le composé 2 ne contient pas de  $\text{CH}_3$ .
- Le composé 2 contient 7(CH) et 3 (C).
- Le composé 2 contient 13H.

### II.B.3. Synthèse de bis-3-nitrophenylferrocène (bis-3-NPF :3):

Le composé 3 est le deuxième composé récupéré- après 3-nitrophenylferrocène- obtenu par la séparation chromatographique sur colonne de produit de réaction en augmentant le gradient de polarité à 8/2 (éther de pétrole/éther).

(3) : de point de fusion de 145°, son spectre IR (KBr disques) montre : 723,3 et 806,2 : Csp<sup>2</sup>-H aromatique m-disubstitué, 1625,9 : C=C, 1523,7 et 1342,4 : NO<sub>2</sub>

**Spectre RMN<sup>1</sup>H :** Le spectre RMN <sup>1</sup>H de composé 3 présente des pics à 4.03ppm qui correspond à 4H liés au Cp (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>) du ferrocène, un pic à 4.38ppm correspondant à 2H liés à l'atome C2 ou C3, un pic à 4.66 ppm correspondant à 2H liés à l'atome C3 ou l'atome C2, un multiplet à 7.18ppm correspondant à , un multipet à 7.54ppm correspond à , un singulet à 7.94ppm correspondant à et un multiplet à 8.16ppm correspondant à

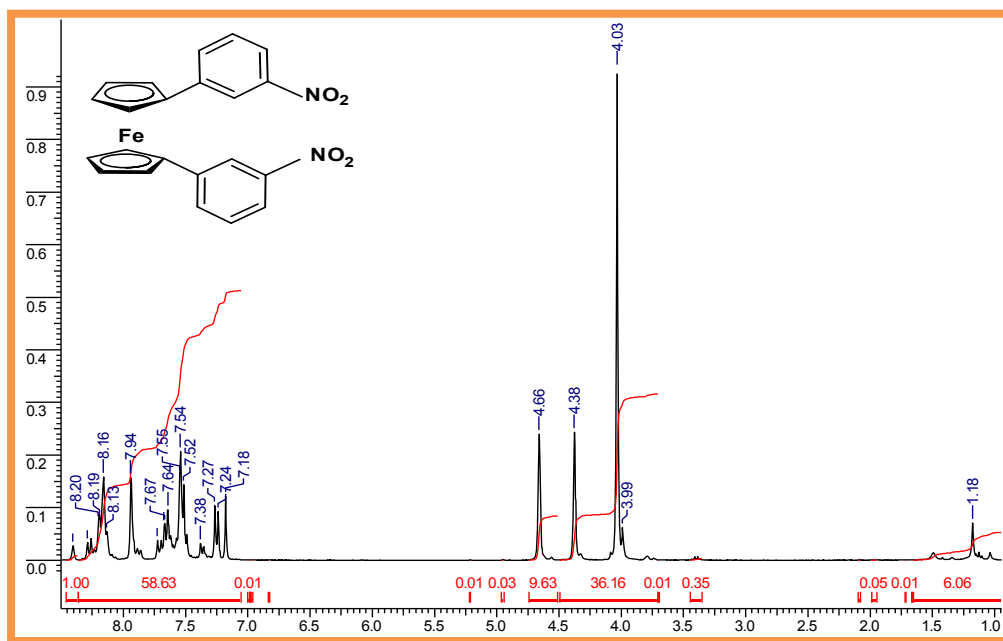


Figure (II.10) : Spectre de RMN <sup>1</sup>H de bis-3- nitrophenylferrocène.

#### Spectres RMN<sup>13</sup>C et DEPT :

En combinant entre les trois spectres RMN<sup>13</sup>C, DEPT et RMN <sup>1</sup>H, on peut déduire :

- Le spectre de <sup>13</sup>C présente des pics à 81.62, 130.83, 139.52, 142.76, 148.37 et 148.84ppm qui sont disparus dans le spectre DEPT, donc, la molécule de produit 3 contient 6C quaternaires.

- D'après le spectre DEPT de composé 3, on peut voir qu'il n'y a pas des pics négatifs, donc y pas de CH<sub>2</sub>.

### II.B.3. Synthèse de 4-nitrophénylferrocène (4-NPF : 4) :

La même procédure a été suivie, 10g de 4-nitroaniline dissout dans 21 ml de HCl 37% est diazoté par 5,2g de nitrite de sodium. 11,7g de ferrocène dans 285 ml d'éther est ajouté au filtrat (chlorure de 3-nitrobenzènediazonium). Après 3heures d'agitation sous la température de la salle, la phase organique est récupéré, lavée par l'eau, séchée et évaporée pour obtenir le brut réactionnel. Une chromatographie sur colonne permet de récupérer le produit sous forme de palettes violette de point de fusion Pf égale à 169°C.

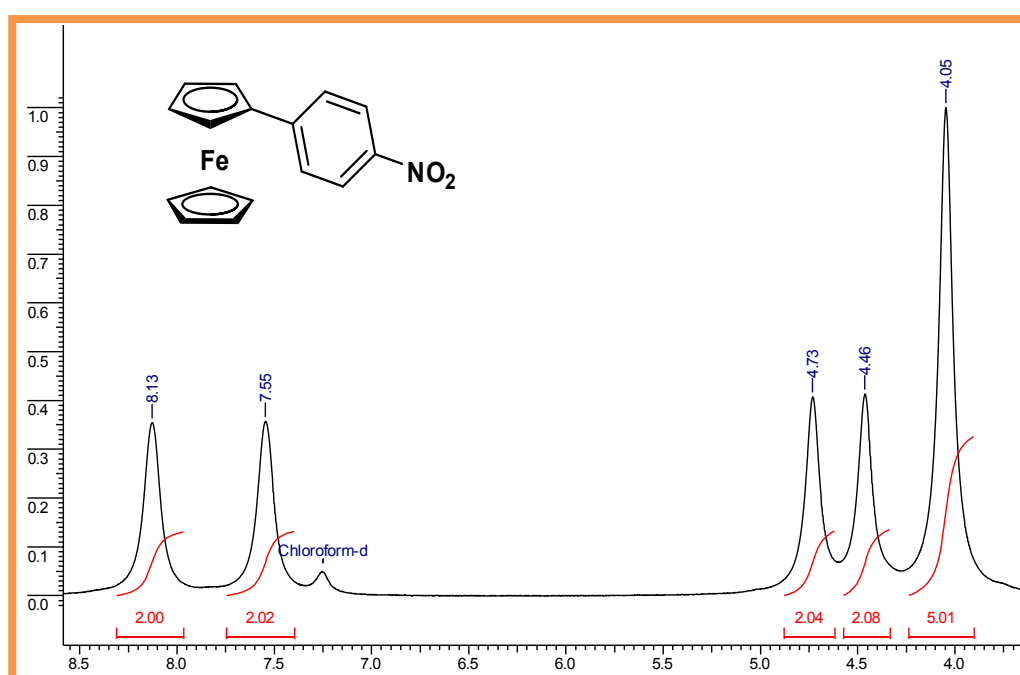


Figure (II.11) : Spectre de RMN <sup>1</sup>H de 4- nitrophenylferrocène.

**Spectre RMN<sup>1</sup>H :** son spectre présente un pic à 4.05ppm correspond à 5H liés à l'atome C4 du cycle pentadiényle inférieur du ferrocène, un pic à 4.46ppm correspond à 2H liés à l'atome C2 ou C3 du cycle pentadiényle supérieur de ferrocène, un pic à 4.73ppm correspond à 2H liés à l'atome C2 ou C3, un pic à 7.55ppm correspond à 2H liés aux atomes C6 et C10, un pic à 8.13ppm correspond à 2H liés aux atomes C7 et C9.

**Spectres  $^{13}\text{C}$  et DEPT :**

$^{13}\text{C}$	DEPT	Interprétation
67.26 ppm	67.26 ppm	CH
70.07 ppm	70.07 ppm	CH
70.64 ppm	70.64 ppm	CH
81.75 ppm	Disparu	C
123.84 ppm	123.84 ppm	CH
125.96 ppm	126.96 ppm	CH
145.55 ppm	Disparu	C
148.23 ppm	Disparu	C

En combinant entre les informations extraites des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT avec ceux issues de spectre de proton de composé 4, on peut déduire :

- Le composé 2 ne contient pas des  $\text{CH}_2$ .
- Le composé 2 ne contient pas de  $\text{CH}_3$ .
- Le composé 2 contient 5(CH) et 3 (C).
- Le composé 2 contient 13H.

D'après les spectres UV des composés (1), (2), (3) et (4), on observe que tous les spectres présentent un  $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$  correspond à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  et qui montre la présence des insaturations des molécules cyclique ou acyclique.

**II.B.4. Synthèse de 3- ferrocénylaniline (3-FA : 5) :**

3-ferrocénylaniline est obtenu par réduction de 0.5g de 3-nitrophénylferrocène par  $\text{NaBH}_4$  en présence de Pd/C (10%) comme catalyseur, le produit à réduire est dissout dans du méthanol et mis dans une ampoule à décanter, une suspension de pd/C est mise dans le ballon, et on lui ajoute une suspension de  $\text{NaBH}_4$ . Le produit à réduire est introduit dans le ballon goutte à goutte. Après l'addition, le mélange est agité à la température de la salle encore pour 15min. Ensuite, on le filtre et le filtrat est acidifié par une solution de HCl 2M puis neutralisé par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 2M. Un précipité jaunâtre se forme immédiatement dès l'ajout de NaOH. On filtre le mélange et on récupère 0.26g du produit synthétisé sur le filtre. Une analyse par CCM nous a permis de déduire que le produit initial a disparu alors qu'il se forme un nouveau produit avec un  $R_f$  égale à 0,16 et un rendement égal à 52%.

**Spectre RMN  $^1\text{H}$  :** son spectre RMN de proton montre différents pics, un pic à 1.303ppm correspond à 2H de la fonction amine ( $\text{NH}_2$ ), un pic à 4.127ppm correspond au 5H du cycle



pentadiényle du ferrocène ( $C_5H_5$ ), un pic à 4.367 ppm correspond à 2H liés à C2 ou C3, un pic à 4.683 ppm correspond à 2H liés à l'atome C3 ou l'atome C2, un singulet à 6.577 ppm correspond à 1H lié à l'atome C10, un doublet à 6.848 ppm correspond à un proton lié à C6, un singulet à 7.134 ppm correspond à un proton lié à C8, un singulet à 7.300 ppm correspond à 1H lié l'atome C9.

**Spectre RMN<sup>13</sup>C :** le spectre de <sup>13</sup>C du composé montre différents pics, un pic à 29.69ppm correspondant au carbone lié à la fonction amine ( $NH_2$ ), des pics à 67.12, 69.55 et 70.55ppm correspondants respectivement aux 4 carbones du Cp substitué du ferrocène et 5 carbones du Cp non substitué, un pic à 87.24 ppm correspond au carbone du ferrocène substitué par l'aniline, des pics à 113.46, 117.40, 128, 98, 140.24 et 146.10 ppm correspondants aux 5 carbones du cycle benzénique.

## Partie C : Partie expérimentale

### II.C.1. Conditions générales du travail :

Toutes les manipulations de synthèse et de séparation sur colonne chromatographique ont été effectuées au niveau de laboratoire de valorisation et promotion des ressources sahariennes (VPRS) à l'université Kasdi Merbah- ouargla.

#### II.C.1.1. Réactifs et solvants :

Les réactifs et les solvants utilisés proviennent essentiellement des compagnies : Merck, Alfa Aesar, Prolabo, Sigma Alrich.

#### II.C.1.2. Atmosphère réactionnelle :

Toutes les manipulations de synthèse sont effectuées sous atmosphère inerte (azote).

#### II.C.1.3. Techniques analytiques et appareillage :

##### 1. Chromatographie :

- La chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice. La révélation des plaques est effectuée par les vapeurs d'iode puis séchage par un séchoir.
- La chromatographie sur colonne a été réalisée avec de gel de silice Merck 60 (230 mesh ASTM) comme phase stationnaire, le solvant d'élution est un gradient éther de pétrole/ éther.

##### 2. Point de fusion :

Les températures de fusion sont mesurées en tube capillaire sur un appareil à point de fusion GallenKamp, les valeurs obtenues sans correction.

##### 3. Spectroscopie Infra-rouge :

Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil à transformée de Fourier (FT-IR 830 marque SHIMADZU, les produits solides sont analysés sous forme de pastilles de KBr. Les nombre d'ondes sont exprimés par  $\text{cm}^{-1}$

#### 4. Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN sont établis au laboratoire de réactivité organique sélective (ROS), institut de chimie radicalaire de l'université D'aix-Marseille, (France) et à l'institut national de recherche et d'analyse physico-chimique (INRAP) de Sidi Thabet-Tunisie.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT 135 ont été enregistrés sur spectromètres Bruker AM-300 avec une fréquence de 300MHz pour le proton et de 75MHz pour le carbone 13 et DEPT. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés en partie par million (ppm) en utilisant le  $\text{CDCl}_3$  comme référence interne qui est caractérisé par 7,26 ppm pour le proton, et 77,16 pour le  $^{13}\text{C}$  et les constantes de couplages ( $J$ ) en Hertz (Hz).

On utilise comme abréviation pour l'interprétation des spectres RMN :

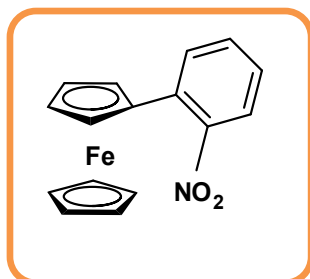
(s) : singulet, (d) : doublet, (t) : triplet, (m) : multiplet.

#### Autres remarques :

- Les phases organiques sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre.
- L'évaporation des solvants des phases organiques est réalisée par un évaporateur rotatif (**Janke et kankel RV 05- ST**)

**II.C.2. Protocoles expérimentaux :**

- **Synthesis of 2-nitrophenylferrocene (2-NPF: 1) :**



15,2 g (0.11mol ) of 2-nitroaniline was dissolved in a warm mixture of 108ml of concentrated hydrochloric acid and 100 ml of water contained in a 500 ml beaker. The beaker is placed in an ice- salt bath and cooled to 0-5°C. A cold solution of 8g (0.119 mol) of sodium nitrite in 38ml of water was slowly added, maintaining the temperature below 5°C. The cold solution of O-nitrobenzenediazonium chloride was filtered and the filtrate was added at once to a solution of 18,6g (0.1mol) of ferrocene in 450ml of ether. The mixture was stirred for a further 3 h at room temperature. The product was extracted with ether and the organic layer was washed with water, dried with magnesium sulfate and evaporated on the rotary evaporator, column chromatography (silica gel) of the residue gave compound **1** as brown solid.

**Pf=** 113°C.

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3098, 1600, 1510, 1345, 960 cm<sup>-1</sup>

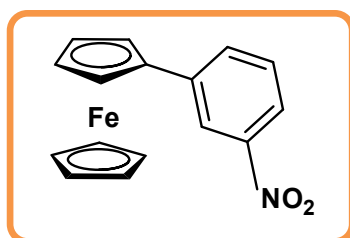
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 4.02(5H, s, C 4); 4.28 (2H, s, C2 ou C3), 4.40(2H, s, C3 ou C2 ), 7.21(1H, t(J= 8.295Hz, C 10), 7.42 (2H,m , C8 etC9) , 7.72 (1H.d(J=7.80Hz) ,C7).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :** 29.71 (1C, C1) ; 68.83 (5C, C4) ; 69.39 (2C, C2 ou C3) ; 69.97 (2C, C3 ou C2) ; 81.33 (1C, C5) ; 123.26 (1C, C7) ; 126.56 (1C, C8) ; 130.97 (1C, C10) ; 132.27 (1C, C9).

- **Synthesis of 3-nitrophenylferrocene (3-NPF: 2) and bis-3-nitrophenylferrocene (Bis-3-NPF : 3)**

A mixture of 10.7g (0.077mol ) of 3- nitroaniline, 16.7 ml of concentrated sulfuric acid and 22.90 ml of water was stirred for 1 hour then it was cooled to 0-5°C, diazotized with a solution of 5.5g (0.08 mol) of sodium nitrite in 12.25 ml of water. The cold solution was filtered and the filtrate was added with stirring to a solution of 13.08g (0.070mol) of ferrocene in 316.45 ml of ether. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The two layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O, and then the organic layer washed with water, dried with MgSO<sub>4</sub>. Concentration in vacuo and purification by column chromatography gave (2) as an orange plates and (3) as an orange red fillets.

- **3-nitrophenylferrocene (3-NPF: 2)**



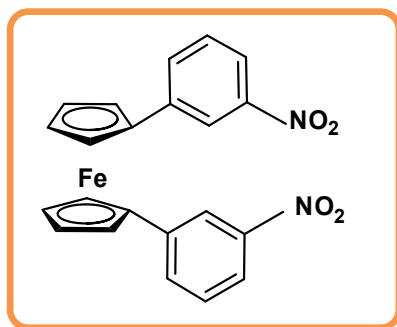
**Pf**= 123°C.

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 1652.9, 1635.5, 1521.7, 1456.2, 1346.2 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz ):** 4.05(5H,s, C 4) ; 4.40 (2H,s, C2 ou C3 ), 4.71(2H,s, C3ou C2 ), 7.43(1H, t(J= 7.98Hz, C 9), 7.74 (1H,d (J= 7.70Hz , C10) , 8.00(1H.d(J=8.34Hz) ,C8 ), 8.27(1H,s, C6).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz ):** 66.82 (2C, C2 ou C3) ; 69.84 (5C, C4) ; 69.90 (2C, C3 ou C2) ; 82.49 (1C, C1) ; 120.38 (1C, C8) ; 120.49 (1C, C9) ; 129.24 (1C, C10) ; 131.68 (1C, C6) ; 142.17 (1C, C5) ; 148.63 (1C, C7).

○ **bis-3-nitrophenylferrocene (Bis-3-NPF : 3)**



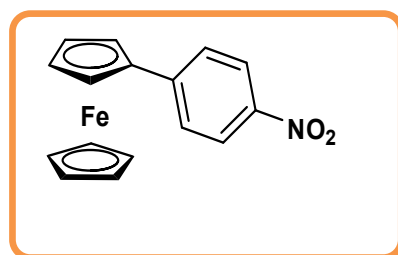
Pf= 145°C.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1625.9, 1523.7, 1342.4, 806.2, 723.3 $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz ): 4.05(5H,s, C<sub>4</sub>) ; 4.40 (2H,s, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>), 4.71(2H,s, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>), 7.43(1H, t(J= 7.98Hz, C<sub>9</sub>), 7.74 (1H,d (J= 7.70Hz, C<sub>10</sub>), 8.00(1H,d(J=8.34Hz), C<sub>8</sub>), 8.27(1H,s, C<sub>6</sub>).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) : 66.82 (2C, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>) ; 69.84 (5C, C<sub>4</sub>) ; 69.90 (2C, C<sub>3</sub> ou C<sub>2</sub>) ; 82.49 (1C, C<sub>1</sub>) ; 120.38 (1C, C<sub>8</sub>) ; 120.49 (1C, C<sub>9</sub>) ; 129.24 (1C, C<sub>10</sub>) ; 131.68 (1C, C<sub>6</sub>) ; 142.17 (1C, C<sub>5</sub>) ; 148.63 (1C, C<sub>7</sub>).

● **Synthesis of 4-nitrophenylferrocene (4-NPF : 04) :**



A mixture of (10 g, 0.072 mol ) of 4- nitroaniline, 21 ml of concentrated hydrochloric acid and 21ml of water was stirred for 1 hour then it was cooled to 0-5°C, diazotized with a solution of (5.2g, 0.075 mol) of sodium nitrite in 12 ml of water. The cold solution was filtered and the filtrate was added with stirring to a solution of (11.7g, 0.063 mol) of ferrocene in 285 ml of ether. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The two layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O, and then the organic layer washed with water, dried with MgSO<sub>4</sub>. Concentration in vacuo and purification by column chromatography gave (4) as violet pallets.

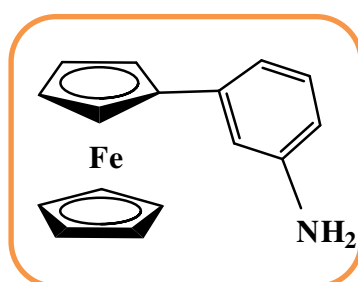
**Pf**= 169°C.

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3075, 3100, 1596, 1507, 1341, 1106, 1011 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 4.05(5H,s, C 4) ; 4.43 (2H,s, C2 ou C3 ), 4.73 (2H,s, C2 ou C3 ), 7.55 (2H,s, C5), 8.13 (2H,s, C6)

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :** 67.26 (2C, C2 ou C3) ; 70.07 (5C, C4) ; 70.64 (2C, C3 ou C2) ; 81.75 (1C, C1) ; 123.84 (2C, C7 et C9) ; 125.96 (2C, C6 et C10) ; 145.55 (1C, C8) ; 148.23 (1C, C5).

- **3-ferrocenylaniline (3-FA: 5) :**



A suspension of 0,05 g of 10% palladium- on- charcoal in 10ml of water was placed in a conical flask and (0.12 g, 0.003mol) of sodium borohydride in 2.5ml of water was added, a magnetic follower bar was introduced and a slow stream of nitrogen was passed through the stirred mixture. A solution of 0.5 g of 3-nitrophenylferrocene in methanol was added dropwise from a separatory funnel during 15 min. The mixture was stirred for further 20 min then it was filtered. The filtrate was acidified with 2M hydrochloric acid to destroy excess of borohydride and then neutralised with dilute sodium hydroxide, a yellow precipitate was formed. The solution was filtered and the product was recovered as a yellow powder.

**Pf**= 152°C.

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 696.3, 790.6, 1469.2, 1504.2, 1583.4, 1602.7, 3399.3cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** 1.303(2H, s, NH<sub>2</sub>); 4.127 (5H, s, C<sub>4</sub>); 4.367 (2H, s, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>), 4.683 (2H, s, C<sub>3</sub> ou C<sub>2</sub>); 6.577 (1H, s, C<sub>10</sub>); 6.848 (1H, d, C<sub>6</sub>); 7.134(1H, S, C<sub>8</sub>), 7.300(1H, S, C<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :** 29.69 (1C, C<sub>7</sub>) ; 67.12 (2C, C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>) ; 69.55 (5C, C<sub>4</sub>) ; 70.55 (2C, C<sub>3</sub> ou C<sub>2</sub>) ; 87.24 (1C, C<sub>1</sub>) ; 113.46 (1C, C<sub>8</sub>) ; 117.40 (1C, C<sub>9</sub>) ; 128.98 (1C, C<sub>10</sub>) ; 140.24 (1C, C<sub>6</sub>) ; 146.10 (1C, C<sub>5</sub>).

**Références bibliographiques:**

- [01]: N. Ngoc Hoa, Etude de la réactivité d'électrodes de carbone modifiées par des unités catéchols introduites par réduction de sels de diazonium, *thèse de doctorat en chimie et physicochimie des polymères*, (2010).
- [02] : X. Wang, Y. Xu, F. Mo, G. Ji, D. Qiu, J. Feng, Y. Ye, S. Zhang, Y. Zhang and J. Wang, Silver-Mediated Trifluoromethylation of Aryldiazonium Salts: Conversion of Amino Group into Trifluoromethyl Group, *J. Am. Chem. Soc.*, 135: 10330–10333, (2013).
- [03]: S. Mahouche-Chergui, S. Gam-Derouich, C. Mangeney and M.M. Chehimi, Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 4143–4166, (2011).
- [04]: B. Schmidt, R. Berger and F. Holter, Functionalized alkoxy arene diazonium salts from paracetamol, *Org. Biomol. Chem.*, 8: 1406–1414, (2010).
- [05]: F. Mo, G. Dong, Y. Zhanga and J. Wang, Recent applications of arene diazonium salts in organic synthesis, *Org. Biomol. Chem.*, 11: 1582–1593, (2013).
- [06]: The direct introduction of the diazonium group into aromatic nuclei, *Tetrahedron*, 1: 270-27
- [07]: C. Verrier, P. Lassalas, L. Théveau, G. Quéguiner, F. Trécourt, F. Marsais and C. Hoarau, Recent advances in direct C–H arylation: Methodology, selectivity and mechanism in oxazole series, *Beilstein J. Org. Chem.*, 7: 1584–1601, (2011).
- [08]: E. G. Perevalova, N. A. Simukova, T. V. Nikitina, P. D. Reshetov, and A. N. Nesmeyanov, The reaction of ferrocene derivatives with aryldiazoniums, *Otdelente Khimicheskikh Nauk*, 1: 77-83, (1961).
- [09]: NPTEL – Chemistry – Aromatic Diazonium Salts, Principles of Organic Synthesis . Page 1 of 12, Lecture 16. 1, (1957).
- [10]: B. Terki, Synthèse, cyclisation, étude électrochimique et structurale de quelques n-acyl-n-alkylferrocenyl méthyle hydrazide, *thèse de doctorat en sciences, université de Batna*, soutenue le 29/06/2007.



[11]: J. S. Dileep Kumar, M. M. Ho and T. Toyokuni, Simple and chemoselective reduction of aromatic nitro compounds to aromatic amines: reduction with hydriodic acid revisited, *Tetrahedron Letters*, 42: 5601–5603, (2001).

[12]: I. Pogorelic, M. Filipan-Litvic, S. Merkas, G. Ljubic, I. Cepanec and M. Litvic, Rapid, efficient and selective reduction of aromatic nitrocompounds with sodium borohydride and Raney nickel, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 274: 202–207, (2007).

[13]: T. Lanez, Synthesis of pyridine and cyclopent[c] azepine derivatives by photochemical and acid- catalyzed degradation of substituted ferrocenes, *thèse de doctorat, university of Strathclyde*, (1989).

**CHAPITRE III :**

**EVALUATION DE L'ACTIVITÉ  
ANTIOXYDANTE DES DÉRIVÉS  
FERROCÉNIQUES**

---

## Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante

### Partie A : Partie théorique.

#### Introduction :

L'oxydation est un processus dans lequel une perte d'électrons ou un gain d'oxygène se produit, elle s'accompagne toujours d'un processus de réduction dans lequel se trouve généralement une perte de l'oxygène. Ces réactions, qui sont appelées réactions d'oxydoréduction, sont à la base de nombreuses réactions biochimiques dans la chimie cellulaire, la biosynthèse et la régulation de la croissance cellulaire. Elles sont également importantes pour la compréhension de l'oxydation biologique et les effets radicaux /anti oxydants. Alors que réducteur et oxydant sont des termes chimiques, dans les milieux biologiques, ils sont appelés respectivement antioxydants et pro-oxydants [01]

Les pro-oxydants dérivés de l'oxygène, peuvent causer des dommages aux systèmes biologiques tels que les lipides, l'ADN et les protéines, ainsi qu'aux systèmes de défense de la cellule, qui sont composés des enzymes et des antioxydants. En général, ces pro-oxydants sont appelés espèces oxygénées réactives (EOR) qui peuvent être classées en deux groupes de composés, des espèces radicalaires et des espèces non radicalaires. Le tableau (01) rassemble quelques EOR produits dans la cellule vivante [02].

#### III.A.1. Les espèces réactives et le stress oxydant :

##### III.A.1.1. Définition :

Un radical libre peut être défini comme une molécule ou des fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans son orbital atomique ou moléculaire externe.

Les espèces réactives de l'oxygène (EOR) et les espèces réactives de l'azote (EAR) sont décrites comme des radicaux libres avec d'autres dérivés réactifs non radicalaires.

La réactivité des radicaux est généralement plus forte que celle des espèces non radicalaires, et les radicaux sont moins stables. Les radicaux libres sont formés à partir de molécules par le clivage homolytique d'une liaison chimique et des réactions d'oxydo-réduction. Une fois formés, ces radicaux hautement réactifs peuvent démarrer une réaction en chaîne [03] qui est une série de réactions conduit à régénérer le radical qui peut commencer un nouveau cycle de réactions.

Les réactions des radicaux libres comprennent trois étapes distinctes identifiables :

**L'étape d'initiation:** formation des radicaux.

**L'étape de propagation :** dans cette étape, les radicaux libres sont régénérés à la suite de la réaction en chaîne, ce qui prendrait la réaction à son achèvement.

**L'étape de terminaison:** destruction des radicaux [04]

L'appellation ROS en anglais ou EOR en français inclut les radicaux libres de l'oxygène (**Tableau III.1**) : anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) et aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). A côté des EOR, il existe des EAR (espèces azotées réactives) dont le représentant majeur est le  $NO^{\bullet}$ . Le  $NO^{\bullet}$  est un radical peu réactif mais peut se lier aux radicaux libres oxygénés pour former des molécules plus toxiques comme les peroxy-nitrites [05].

**Tableau (III.1):** Quelques espèces réactives oxygénées (EOR) et azotées (EAR).

Espèces réactives oxygénées		Espèces azotées réactives	
Radicalaires	Non radicalaires	Radicalaires	Non radicalaires
Superoxyde	Peroxyde d'hydrogène	Monoxyde d'azote	Acide nitreux
Hydroxyl	Acide hypochloreux	Dioxyde d'azote	Cation nitrosyl
Peroxyl	Acide hypobromure		Anion nitrosyl
Alkoxy	Ozone		Peroxy-nitrite
hydroxyperoxyl	Oxygène singulet		Cation nitronium
			Peroxy-nitryte alkyl

- **L'ion radical superoxyde ( $HO_2^{\bullet} / O_2^{\bullet-}$ ) [02-07] :**

De pKa de 4,8, le superoxyde peut exister sous la forme soit d' $O_2^{\bullet-}$  ou, à faible pH sous forme d'hydroperoxyde ( $HO_2^{\bullet}$ ). Le superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène, il est considéré relativement stable et a une vitesse de réaction relativement faible sur les composantes biologiques.

Le radical perhydroxyle  $HO_2^{\bullet}$ , peut s'affranchir plus facilement les membranes biologiques que la forme chargée donc il est plus réactif que le précédent.

$O_2^{\cdot-}$  et  $HO_2^{\cdot}$  peuvent agir comme des agents réducteurs capables, par exemple, de réduire le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) au fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ); cependant, la capacité réductrice de  $HO_2^{\cdot}$  est plus élevée et  $O_2^{\cdot-}$  joue le rôle d'un agent oxydant qui peut réagir avec des composés capables de donner H, par exemple, l'ascorbate et tocophérol. La réaction la plus importante des radicaux superoxydes est la dismutation; dans cette réaction, il réagit avec un autre radical superoxyde. L'un est oxydé en oxygène, et l'autre est réduit en peroxyde d'hydrogène.

Bien que la constante de vitesse de cette réaction spontanée soit faible, elle peut devenir beaucoup plus élevée dans un pH acide, où le radical hydroperoxyde est formé.

- **Le radical hydroxyl ( $HO^{\cdot}$ ) :**

La réactivité des radicaux hydroxyles est extrêmement élevée, contrairement aux radicaux superoxydes, les radicaux hydroxyles sont des espèces à vie courte possédant une grande affinité envers les autres molécules. Ils sont des agents oxydants puissants qui peuvent réagir à une vitesse élevée avec la plupart des molécules organiques et inorganiques dans la cellule, y compris l'ADN, les protéines, les lipides, les acides aminés, les sucres, et les métaux.

$HO^{\cdot}$  est considéré comme le radical le plus réactif dans les systèmes biologiques; en raison de sa réactivité élevée, il interagit sur le site de sa production avec les molécules qui l'entourent.

- **Le radical peroxyde  $RO_2^{\cdot}$  :**

Est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur le radical  $R^{\cdot}$ . Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

- **Le radical secondaire alkoxydes  $RO^{\cdot}$  :**

Est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde  $RO_2H$ , issu de l'oxydation de substrat RH, par des cations métalliques.

- **L'oxygène singulet  $^1O_2$ ,**

Qui est la forme diamagnétique de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge

- **Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) :**

Le résultat de la dismutation des radicaux superoxydes est la production de  $H_2O_2$ . Il existe des enzymes qui peuvent produire aussi  $H_2O_2$  directement ou indirectement. Bien que les

molécules de  $H_2O_2$  soient considérées comme métabolites réactifs de l'oxygène, ils ne sont pas, par définition des radicaux; ils peuvent toutefois endommager la cellule à une concentration relativement faible ( $10 \mu M$ ). Leurs effets chimiques peuvent être incluses dans les catégories de l'activité directe, provenant de leurs propriétés oxydantes, et de l'activité indirecte dans laquelle ils servent en tant que source pour les espèces plus nuisibles, tels que  $HO^\bullet$  ou  $HClO^\bullet$ . Les activités directes de  $H_2O_2$  mènent à la dégradation de l'hème des protéines; libération du fer; l'inactivation des enzymes; et l'oxydation de l'ADN, des lipides, des groupes SH, et les cétoacides.

- **Le monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ), Peroxynitrite ( $ONOO$ ) et d'autres membres de la famille :**

L'oxyde nitrique, ou le monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ), est un radical produit par l'oxydation de l'un des terminaux guanidine d'atomes d'azote de la L-arginine. Dans cette réaction, catalysée par le groupe d'enzymes appelées oxyde nitrique synthase (NOS), la L-arginine est converti en oxyde nitrique et L-citrulline. Trois types d'enzymes existent: NOS neuronale, NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). L'oxydation donne le cation nitrosonium ( $NO^+$ ), alors la réduction conduit à l'anion nitroxyle ( $NO^-$ ), qui peut subir d'autres réactions, telles que l'interaction avec  $NO^\bullet$  pour obtenir  $N_2O$  et  $HO^\bullet$ .

$NO^\bullet$  peut réagir avec une variété de radicaux et de substances. Par exemple, il peut réagir avec  $H_2O_2$  et  $HClO$  pour donner une gamme de produits dérivés tels que  $N_2O_3$ ,  $NO_2^-$ , et  $NO_3^-$ . L'une des réactions les plus importantes, est celle dans laquelle le superoxyde et le radical d'oxyde nitrique interagissent pour donner les radicaux peroxynitrite.

La forme protonée de peroxynitrite ( $ONOOH$ ) est un agent oxydant puissant qui pourraient provoquer l'épuisement des sulfhydryle (SH) et l'oxydation de nombreuses molécules causant des dommages similaires à ceux observés lorsque  $OH^\bullet$  est impliqué. Il peut aussi causer des dommages de l'ADN.

### III.A.1.2. Production des espèces réactives (EOR) et (EAR) :

- **Production intracellulaire :**

La production de EOR et EAR se fait de manière continue, elles ont un rôle essentiel à jouer dans le corps humain, elles ont des fonctions biologiques telles que la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire. La production de ces espèces réactives dans les cellules découle de plusieurs sources possibles mais est essentiellement d'origine enzymatique donc, la principale source de EOR et EAR est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire.

D'autres facteurs peuvent être responsables de l'augmentation des radicaux libres dans l'organisme sont appelés facteurs oxydants, ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes. Il existe de nombreuses autres sources parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, les cyclooxygénases et lipooxygénases, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (**figure (III.1)**). L'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neuro-dégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson.

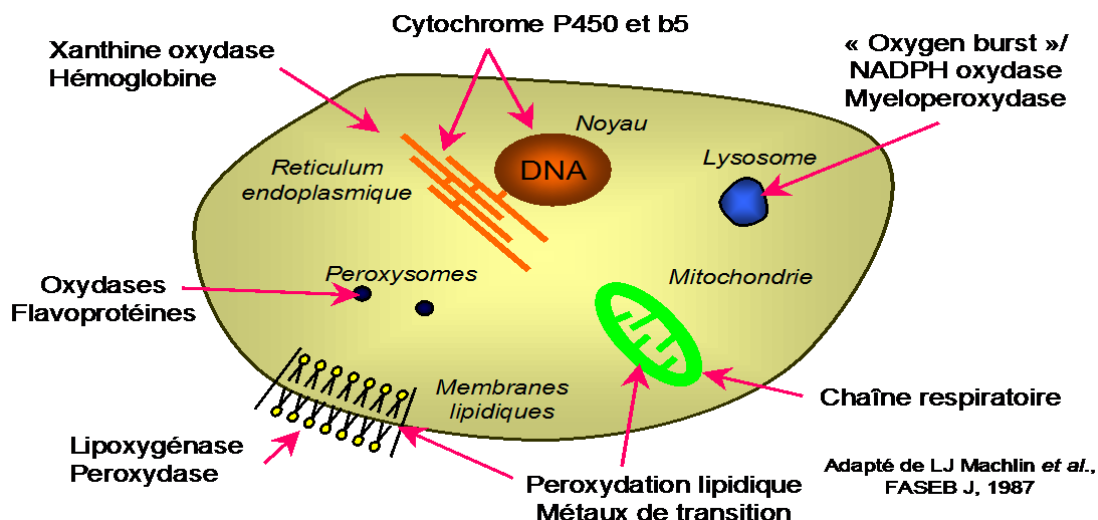


Figure (III.1): Sites de production intracellulaire des EOR.

- **Production extracellulaire [08] :**

- Les radiations UV, les rayons X, les rayons gamma et le rayonnement de micro-ondes.
- Radicaux libres d'oxygène dans l'atmosphère considérés comme polluants
- Interaction avec des produits chimiques, des émanations d'automobile, de fumés de cigarettes, cigares.
- La combustion de la matière organique lors de la cuisson, les incendies de forêts, les activités volcaniques.
- Les effluents industriels, les produits chimiques excédentaires, l'apport d'alcool, certains médicaments, l'amiante, certains pesticides et herbicides, certains ions métalliques, des toxines et des xénobiotiques fongiques.

### III.A.1.3. Effets des EOR et EAR sur les systèmes biologiques [09] :

Les composantes biologiques : protéines, lipides, glucides et l'ADN constituent des cibles d'attaque radicalaire, provoquant ainsi un dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies.

- **Oxydation des lipides**

La peroxydation des lipides membranaires altère la fluidité et les propriétés biologiques de la membrane et peut mener à l'inactivation d'enzymes et de récepteurs liés à la membrane, ce qui risque d'affecter le fonctionnement cellulaire normal et d'augmenter la perméabilité.

La peroxydation lipidique contribue également au phénomène du vieillissement et semble responsable du développement de nombreuses maladies liées à l'âge, donc de diverses maladies chroniques.

- **Oxydation des acides nucléiques :**

L'ADN est plus vulnérable aux dégâts oxydatifs, les EOR peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' déoxyguanosine qui est capable d'induire des mutations spécifiques. Les dégâts sur l'ADN peuvent résulter en des cassures de brins, des enchainements croisés protéines-ADN et des modifications de bases. L'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN risque de développer un cancer au cours de la vie. Les mécanismes oxydatifs ont été reconnus pour avoir un rôle important à jouer dans les principales étapes de la carcinogenèse, soit l'initiation, la promotion et la progression du cancer.



- **Oxydation des protéines :**

Les modifications de structure des protéines par les EOR sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. Une série de rapports montrant une relation entre l'accumulation de protéines oxydées et le processus du vieillissement. Cette accumulation présente le risque de développer une maladie chronique. C'est d'ailleurs le cas de la maladie d'Alzheimer pour laquelle il a été suggéré que les dommages oxydatifs aux protéines soient responsables de la formation des dégénérescences neurofibrillaires, des plaques séniles et de la mort de nombreux neurones au cours du développement de la maladie.

- **Oxydation des lipoprotéines :**

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont riches en acides gras polyinsaturés. La peroxydation induite dans les LDL par les EOR provoque la formation d'aldéhydes, qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. Les LDL oxydées peuvent nuire au bon fonctionnement cardio-vasculaire de deux façons: soit en s'attaquant au cœur, soit en s'attaquant aux vaisseaux sanguins.

### **III.A.2. Le stress oxydant et les maladies humaines [06] :**

Les radicaux libres d'oxygène ont été impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines, y compris :

- Maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, la sclérose latérale, la perte de mémoire et la dépression amyotrophique
- Les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, une maladie cardiaque ischémique, l'hypertrophie cardiaque, hypertension, choc et traumatisme.
- De troubles pulmonaires comme les maladies pulmonaires inflammatoires telles que l'asthme.
- Les maladies associées aux nourrissons prématurés, y compris les broncho-pulmonaire, dysplasie, leucomalacie périventriculaire, hémorragie intraventriculaire, la rétinopathie du prématuré et entérocolite nécrosante.
- Maladie auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde.
- Affections du rein comme la glomérulonéphrite et la néphrite tubulo-interstitielle, insuffisance rénale chronique, protéinurie, l'urémie.

- Les maladies gastro-intestinales comme l'ulcère gastro-duodéal, la maladie inflammatoire de l'intestin et la colite.
- Des tumeurs et des cancers comme le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, les cancers du rectum, etc.
- Les maladies oculaires comme la cataracte liée à l'âge et de ratina, maculopathie
- Processus de vieillissement.
- Diabète, les lésions cutanées, Immunodépression, les maladies du foie, la pancréatite, Sida, Infertilité.

### **III.A.3. Pouvoir antioxydant :**

Pour protéger les cellules et les organes contre les espèces réactives de l'oxygène, le corps humain peut évoluer un système de protection antioxydant très sophistiquée et complexe. Il s'agit d'une variété de composants, à la fois endogènes et exogènes à l'origine, qui fonctionnent de façon interactive et en synergie pour neutraliser les radicaux libres.

#### **III.A.3.1. Définition d'un antioxydant :**

Un antioxydant concerne toute substance qui retarde ou inhibe les dommages oxydatifs à une molécule cible. Une molécule antioxydante peut réagir avec le radical libre et capable de le neutraliser en donnant un de leurs électrons, tout en empêchant les dommages cellulaires et tissulaires.

Les cellules se défendent contre les radicaux libres excessifs par leurs mécanismes de prévention, mécanismes de réparation et défenses antioxydants. Ces composants incluent:

- Antioxydants alimentaires : tels que l'acide ascorbique (Vitamine C), les tocophérols et les tocotriénols (Vitamine E), les caroténoïdes, et d'autres composés de faible poids moléculaire tels que le glutathion et l'acide lipoïque.
- Enzymes antioxydantes, par exemple, le superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glutathion réductase, qui catalysent les réactions d'inhibition de radicaux libres.
- Des protéines de liaison métalliques, tels que la ferritine, la lactoferrine, l'albumine et la céruloplasmine qui séquestrent des ions de fer et de cuivre libres qui sont capables de catalyser les réactions d'oxydation.
- De nombreux autres antioxydants phytonutriments présents dans une grande variété d'aliments végétaux.

Un bon antioxydant doit respecter quelques critères :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- Chélater des ions de métaux de transition ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ) 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.
- 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

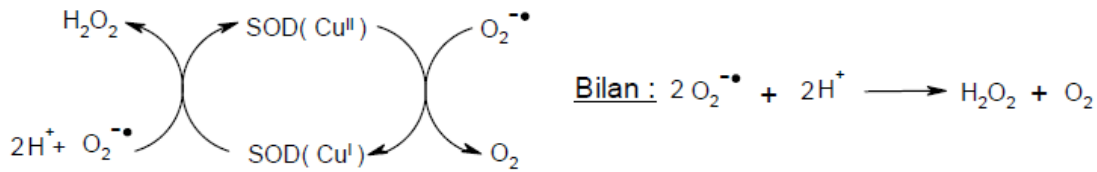
**Tableau (III. 2): Divers EOR et les antioxydants de neutralisation correspondants [7]**

ROS	NEUTRALIZING ANTIOXIDANTS
Hydroxyl radical	vitamin C, glutathione, flavonoids, lipoic acid
Superoxide radical	vitamin C, glutathione, flavonoids, SOD
Hydrogen peroxide	vitamin C, glutathione, beta carotene, vitamin E, CoQ10, flavonoids, lipoic acid
Lipid peroxides	beta carotene, vitamin E, ubiquinone, flavonoids, glutathione peroxidase

### III.A.3.2. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes :

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase.

**Superoxyde dismutase** ou **SOD** : son rôle majeur est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire [08,10].

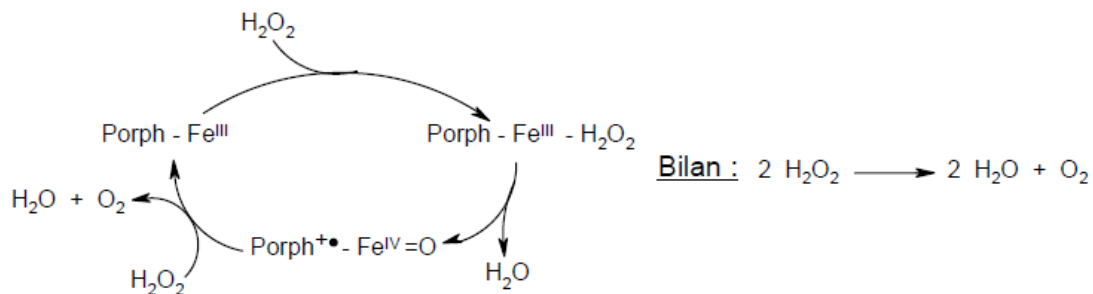


Ces enzymes assurent donc l'élimination de l'anion radical superoxyde et contribuent à éviter la coexistence de celui-ci avec le peroxyde de l'hydrogène empêchant ainsi les réactions de type Haber-Weiss.

Deux formes de SOD ont été isolées :

- Une enzyme à cuivre et zinc (Cu, Zn-SOD), située dans le cytosol. Le rôle catalytique est assuré par  $\text{Cu}^{2+}$ , l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  ayant une fonction stabilisante.
- Une enzyme à manganèse (Mn-SOD), située dans les mitochondries. Le rôle catalytique est assuré par l'ion  $\text{Mn}^{2+}$ .

La **catalase**, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, sont des enzymes protéiques hémiques dans lesquelles l'hème catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.



Elles permettent donc d'éviter la formation du radical hydroxyle en présence de  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces enzymes sont très sensibles à l'irradiation UV.

**Glutathion peroxydase**, ou **GPx**, assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant le glutathion réduit comme donneur d'hydrogène. Cette enzyme sélénodépendante se situe essentiellement dans le cytosol.

D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion transferase...

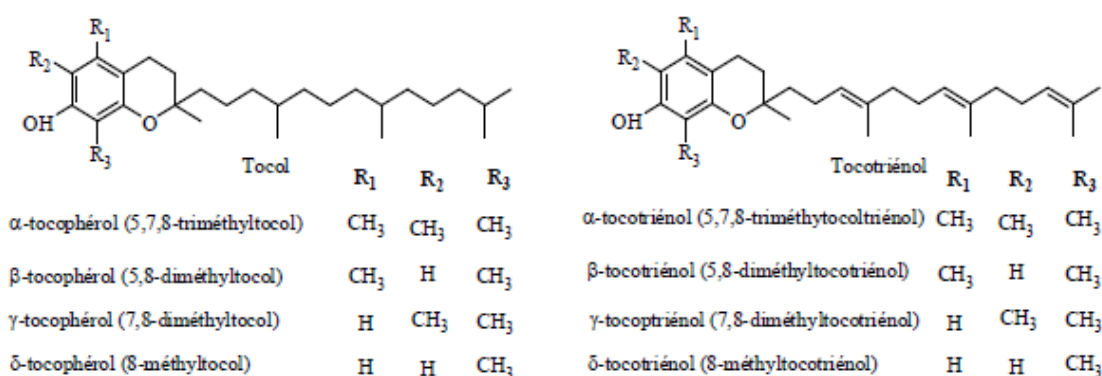
### III.A.3.3. Systèmes antioxydants non-enzymatiques:

- **Antioxydants exogènes:**

La vitamine C, la vitamine E et le bêta-carotène sont parmi les antioxydants alimentaires les plus étudiés.

La vitamine C ou acide ascorbique est considérée comme l'antioxydant soluble dans l'eau le plus important dans les fluides extra cellulaires. Il est capable de neutraliser EOR dans la phase aqueuse avant que la peroxydation lipidique est initiée. La vitamine C a été considérée comme étant capable de régénérer la vitamine E. On retrouve la vitamine C principalement dans le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée.

La vitamine E ou tocophérol, un antioxydant liposoluble très important, est l'antioxydant de rupture de chaîne le plus efficace au sein de la membrane cellulaire où il protège les acides gras de la membrane contre la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxy, alkyle et alkoxy ( $\text{ROO}\cdot$ ). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' $\alpha$ -tocophérol cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical  $\text{RO}_2$ . La vitamine E est présente dans les huiles végétales : huile de palme, d'arachide, de soja, de maïs, de charbon, d'olive pressé à froid et de tournesol, ainsi que dans les graines, les noix, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes et les amandes.



**Figure (III.2): Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols**

Le bêta-carotène (provitamine A) et d'autres caroténoïdes sont également soupçonnés de fournir une protection antioxydante aux tissus riches en lipides. La recherche suggère que le bêta-carotène peut travailler en synergie avec la vitamine E. Le  $\beta$ -carotène possède la capacité

de capter l'oxygène singulet et se trouve dans les légumes verts, la salade, les carottes, les épinards, l'abricot, la papaye, le melon et d'autres fruits jaunes.

Un régime alimentaire qui est excessivement faible en teneur en gras peut affecter négativement l'absorption de bêta-carotène et de vitamine E, ainsi que d'autres nutriments liposolubles. Donc les fruits et les légumes sont les principales sources de vitamine C et les caroténoïdes, tandis que les grains entiers, extraits et huiles végétales protégées sont les principales sources de vitamine E.

- **Phytonutriments :**

De nombreuses substances diététiques d'origine végétale, généralement appelés «phytonutriments» sont de plus en plus connus pour leur activité antioxydante.

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes sont omniprésents dans le règne végétal. Chez les plantes, les flavonoïdes servent de protecteurs contre une grande variété de stress environnementaux. Les flavonoïdes se sont révélées avoir des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-virales, anti-vieillessement et anti-carcinogène. Les grands effets thérapeutiques de flavonoïdes sont attribués à leurs propriétés antioxydantes. En plus d'un effet antioxydant, les composés flavonoïdes peuvent protéger contre les maladies cardiaques par l'inhibition des activités lipoxygénase et de la cyclooxygénase dans les plaquettes et les macrophages. La meilleure façon d'assurer un apport adéquat de phytonutriments est de manger une alimentation riche en une grande variété de fruits et légumes frais

- **Antioxydants 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<sup>•</sup>, RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl. Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité enzymatique et détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes.

Les deux formes, oxydée et réduite, de l'**acide lipoïque**, autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les HO<sup>•</sup>, RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, l'HOCl et l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. **La figure (III.3)** présente la relation entre les radicaux libres et les antioxydants.

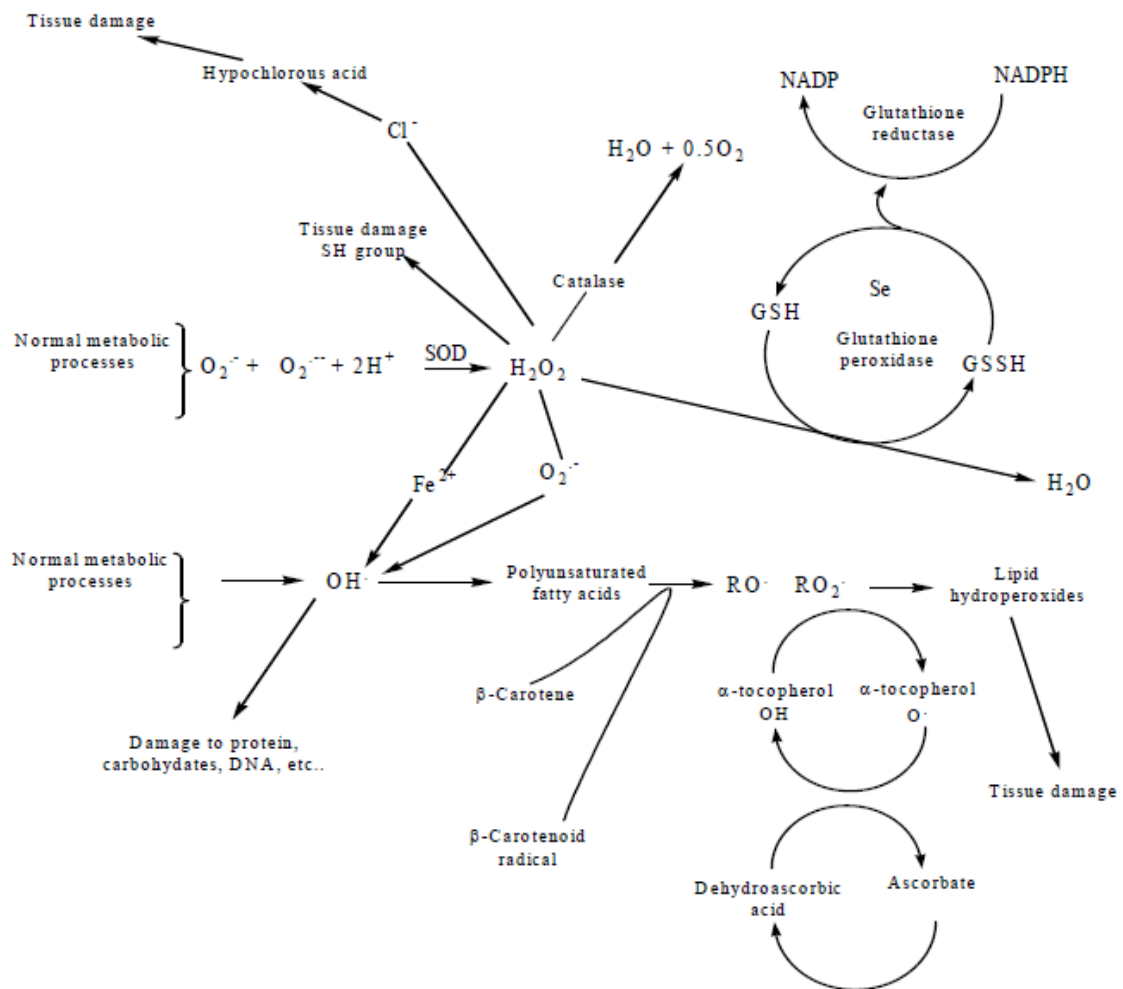


Figure (III. 3): La relation entre les ERO et antioxydants.

Le tableau (III.3) présente les différents antioxydants protecteurs contre les radicaux libres.

**Tableau (III. 3) : Le système protecteur antioxydant.**

**Endogenous Antioxidants :**

- Bilirubin
- Thiols, e.g, glutathione, lipoic acid, N-acetyl cysteine.
- NADPH and NADH.
- Ubiquinone (coenzyme Q10).
- Uric acid.
- Enzymes:
  - Copper/zinc and manganese- dependent superoxide dismutase (SOD).
  - Iron- dependent catalase.
  - Selenium- dependent glutathione peroxidase.

**Dietary Antioxidants:**

- Vitamin C
- Vitamin E
- Beta carotene and other carotenoids and oxycarotenoids, e.g, lycopene and lutein.
- Polyphenols, e.g, flavonoids, flavones, flavonols and proanthocyanidins.
- Metal Binding Proteins:
  - Albumin (copper).
  - Ceruloplasmin (copper)
  - Metallothionein (copper)
  - Ferritin (iron)
  - Myoglobin (iron)
  - Transferrin (iron)



### III.A.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Cette partie se focalisera sur les méthodes utilisées dans notre partie expérimentale pour évaluer d'activité antioxydante des composés synthétisés.

#### III.A.4.1. Test de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> :

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

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une réduction des radicaux DPPH<sup>•</sup> vers le jaune pâle correspondant de l'hydrazine, mesurable par spectrophotométrie à 515-518nm [11].

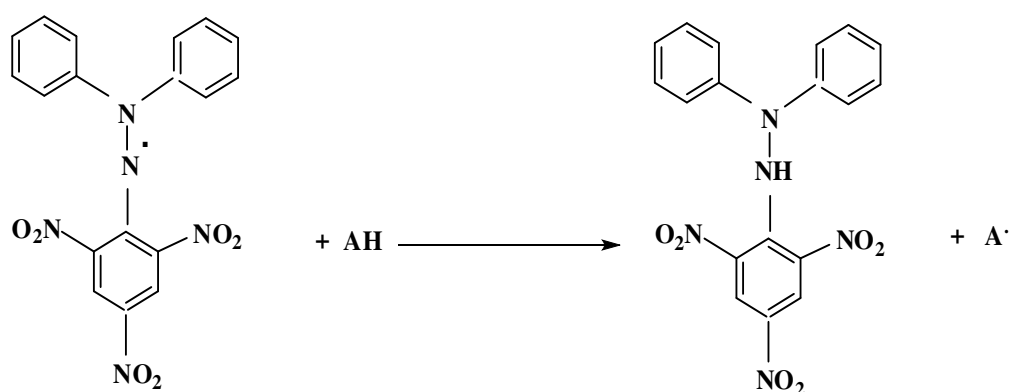


Figure (III. 4) : Structure de radical DPPH<sup>•</sup> [12].

#### III.A.4.2. Test de piégeage de radical superoxyde :

Les techniques électrochimiques utilisées pour produire de  $O_2^{\bullet-}$  par réduction de l'oxygène dissous dans les solvants aprotiques sont également des procédés commodes suite à la facilité du procédé en plus aucun sous-produit est généré.  $O_2^{\bullet-}$  est une espèce à longue vie dans les milieux aprotiques. En outre, la voltamétrie cyclique est adéquate à suivre la réaction de l' $O_2^{\bullet-}$  électrogénéré avec le substrat. Cela a déjà été décrit pour certains acides aminés soufrés, esters, des agents antioxydants et les médicaments. Les approches électrochimiques ont également des avantages particuliers pour l'évaluation des propriétés antioxydantes en mesurant le potentiel d'oxydation des substrats.

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 du DMF. La présence du radical  $O_2^{\bullet-}$  est facilement

détectée 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, elle 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 [13].

#### III.A.4.3. Test de phosphomolybdène :

Le test de capacité antioxydante totale est une méthode spectroscopique permet de déterminer quantitativement la capacité antioxydante, par la formation de complexe phosphomolybdène. Le dosage est basé sur la réduction de Mo (III) en Mo (V) par l'échantillon et la formation subséquente d'un complexe de phosphate/Mo (V) vert à un pH acide. La capacité antioxydante totale est calculée par la méthode décrite par Prieto et al [14].

La formation du complexe de phosphate / Mo (V) a été présentée par Fiske et Subbarow en tant qu'un principe d'une méthode spectrophotométrique pour déterminer le phosphate inorganique. Cette méthode a été ensuite réalisée et modifiée par Chen et al.

Une étude préliminaire a été réalisée afin d'optimiser la formation et la détermination du complexe phosphomolybdène vert avec  $\alpha$ -tocophérol comme les espèces réductrices, le spectre UV / visible du complexe phosphomolybdène avait un maximum caractéristique à 695 nm. Ce maximum d'absorbance a été ensuite utilisé pour les mesures spectrophotométriques.

Un temps de réaction d'environ 90 min été suffisant pour atteindre un maximum dans la production du complexe de phosphomolybdène. Bien que la formation du complexe vert puisse procéder à la température ambiante, la réaction a montré une dépendance positive de la température, de sorte qu'une augmentation significative de rendement a été observée à des températures plus élevées.

Plusieurs solvants organiques sont compatibles avec la formation du complexe de phospholybdenum. Le méthanol, l'éthanol, le diméthylsulfoxyde, et l'hexane, des solvants typiquement utilisés dans l'extraction de l' $\alpha$ -tocophérol et d'autres antioxydants solubles dans les lipides. Même un solvant non miscible comme l'hexane pourrait être utilisé comme support de l'espèce réductrice. Dans ce cas, la seule exigence est une vigoureuse agitation pour faciliter le transfert de l'espèce réductrice dans la phase aqueuse et la formation subséquente du complexe vert.

## Partie B : Résultats et discussions

### Introduction :

L'évaluation de l'activité antioxydante des produits synthétisés est effectuée par une méthode électrochimique (voltammétrie cyclique) et des méthodes chimiques basées sur des mesures spectrophotométriques de l'absorbance citant le test de piégeage de radical libre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) et le test de formation du complexe phosphomolybdène de couleur verte.

Les composés étudiés sont : 2-nitrophenylferrocène (2-NPF), 3-nitrophenylferrocène (3-NPF), bis-3-nitrophenylferrocène (bis-3-NPF), 4-nitrophenylferrocène (4-NPF) et 3-ferrocénylaniline (3-FA).

### III.B.1. Le test d'inhibition du radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:

#### III.B.1.1. Matériels et méthodes :

##### 1. Produits chimiques :

Chlorure de Potassium (99.8%), Diméthylformamide (99.9%) sont acquis de Biochem Chemopharma Co(Canada), Tetrafluoroborate de tetrabutylammonium (99%) de Sigma-Aldrich, acide ascorbique (99.7%),  $\alpha$ -tocophérol (97%) de Merck.

##### 2. Instruments :

Un potentiostat PGZ301 avec Voltmaster 4, version 7.08 software (radiometer analytical SAS).

##### 3. Principe :

L'activité inhibitrice de l'anion radical superoxide est déterminée par voltammétrie cyclique, ce test est basé sur la méthode de Bourvellec et al avec quelques modifications [13].

Les mesures voltampérométriques sont effectuées par l'utilisation de Voltalab 40 modèle PGZ301 (Radiometer Analytical SAS) dans une cellule électrochimique de volume V=25 ml et un système à trois électrodes. Une électrode de calomel saturé (ECS) est utilisée comme électrode de référence, un fil de platine comme électrode auxiliaire, et une électrode de carbone vitreux ayant une section de 0.013cm<sup>2</sup> comme électrode de travail. L'acquisition des données est réalisée par un computer pentium IV (CPU 3.0GHZ and RAM 1Gb) en utilisant le logiciel VoltaMaster 4 software, version 7.08 (radiometer analytical SAS).

Avant son utilisation, l'électrode de travail est polie, rincé par l'eau distillée, et séchée par du papier absorbant. Cette procédure de nettoyage est appliquée toujours avant chaque mesure électrochimique. L'anion radical superoxyde est généré par l'oxygène moléculaire commercial dissout dans le DMF qui contient 0.02M de  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$  à la température de la salle ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ). La vitesse de balayage est maintenue à 100mV/s. La gamme de potentiel appliquée été de -1.6V à 0.0V par rapport à ECS.

Les dérivés ferrocéniques étudiés sont ajoutés au radical superoxyde dissout dans le DMF et les voltammogrammes ont été enregistrés.

La capacité de produit testé pour piéger les radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Capacité inhibitrice du superoxyde (\%)} = \frac{I_{p0} - I_{ps}}{I_{p0}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

Où:  $I_{p0}$  et  $I_{ps}$  sont l'intensité du courant de pic anodique de l'oxygène respectivement sans et avec composé à tester.

### III.B.1.2. Résultats :

#### 1. Voltammogrammes cycliques de l'oxygène :

25ml de DMF sont mis dans la cellule électrochimique avec 0.16mg de  $\text{Na}_4\text{BuF}_4$ , les trois électrodes ; de travail, auxiliaire et de référence nettoyés sont mis en place et la cellule a été bien fermée. Ensuite le mélange est barboté par l'azote pour chasser les autres gaz qui peuvent se trouver. Après 5minutes, le système doit être alimenté par l'oxygène commercial pendant 10minutes pour but de générer le radical superoxyde dans la cellule.

On fixe les conditions électrochimiques opératoires, et on met l'appareil en marche.

Les voltammogrammes de l'oxygène sont ensuite enregistrés. **Figure (III.5)**

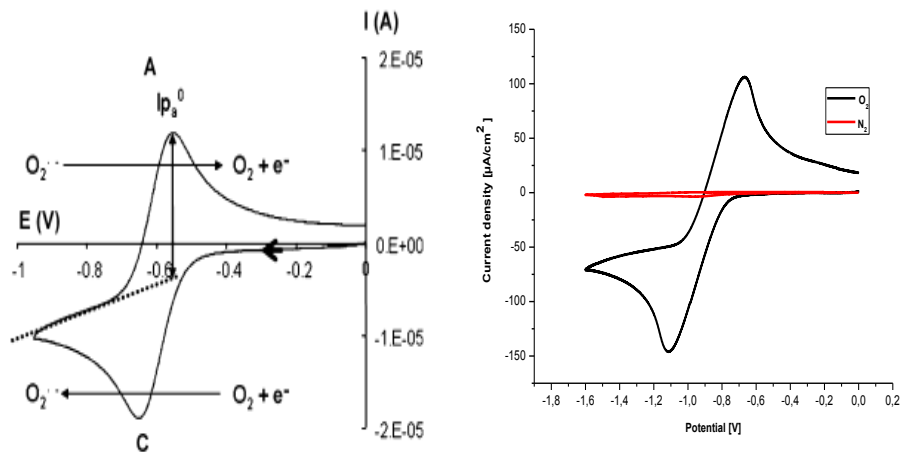


Figure (III.5) : Voltammogramme cyclique d'oxygène.

## 2. Voltammogrammes des antioxydants standards :

Chaque antioxydant standard avec différentes quantités est dissout dans le DMF, pour obtenir des concentrations différentes à chaque injection dans la cellule avec lesquelles on peut tracer leurs courbes d'étalonnage. Ensuite, les voltammogrammes de chaque standard ont été enregistrés.

- Acide ascorbique :

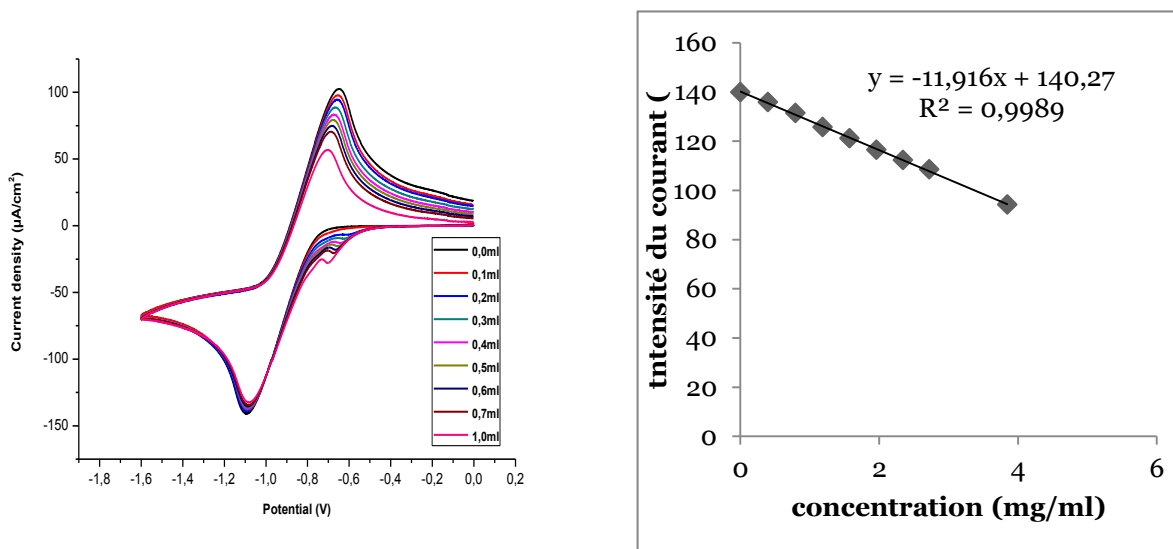
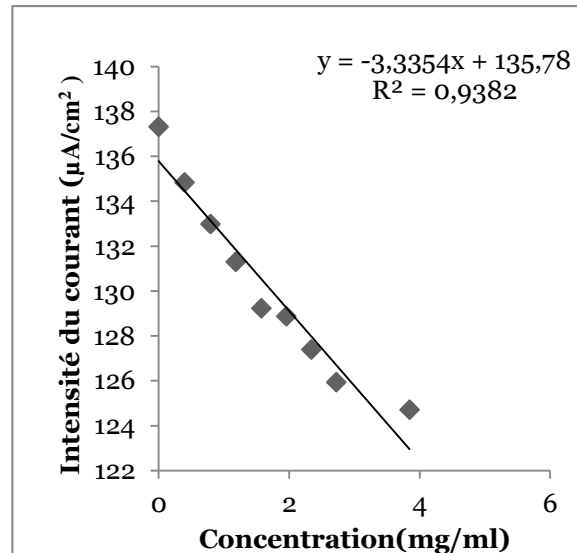
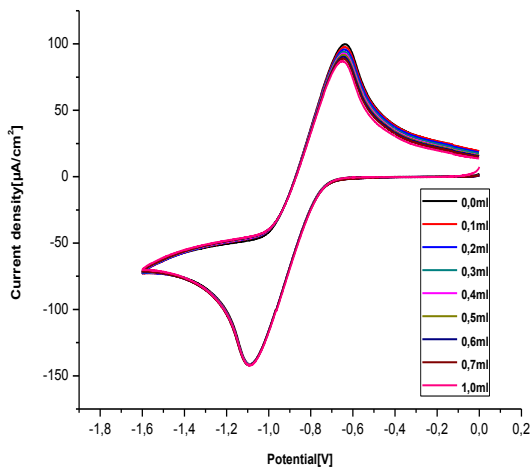


Figure (III.6). (a) : Voltammogrammes de  $O_2^{\bullet-}$  en présence de différentes concentrations d'acide ascorbique, dans le DMF + 0.02 M  $Bu_4NBF_4$  sur CV comme électrode de travail à  $28^\circ C \pm 1$

(b) : L'intensité du courant anodique en fonction de la concentration.

- $\alpha$ -tocophérol :



**Figure (III.7). (a) : Voltammogrammes de  $O_2^{\bullet-}$  en présence de différentes concentrations d'  $\alpha$  - tocophérol dans le DMF + 0.02 M Bu4NBF4 sur CV comme électrode de travail à  $28^\circ C \pm 1$**

**(b) : L'intensité du courant anodique en fonction de la concentration.**

En se basant sur l'équation (III.1), on peut calculer les pourcentages d'inhibition du superoxyde dans la cellule par les antioxydants standards ainsi que par les produits étudiés.

Le tableau (III.4) rassemble les intensités du courant d'oxydation ( $I_{pa}$ ) de l'oxygène et les concentrations des antioxydants standards dans la cellule ainsi que les pourcentages d'inhibition de superoxyde.

Tableau (III.4): Ipa et pourcentages d'inhibition de superoxyde en fonction des concentrations des antioxydants standard

Antioxydant standard	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intensité du courant du pic anodique ( $I_{p_a}$ ) ( $\mu\text{A/cm}^2$ )	Pourcentage d'inhibition (%) de $\text{O}_2^{\bullet-}$
Acide ascorbique	0	139.9	/
	0.398	135.91	2.85
	0.793	131.5	5.95
	1.185	125.66	10.17
	1.574	121.21	13.35
	1.96	116.51	16.72
	2.343	112.29	19.73
	2.723	108.58	22.38
	3.846	94.24	32.63
$\alpha$ -tocophérol	0	137.32	/
	0.398	134.84	1.80
	0.793	132.99	3.15
	1.185	131.3	4.38
	1.574	129.24	5.88
	1.96	128.88	6.14
	2.343	127.39	7.23
	2.723	125.94	8.29
	3.846	124.72	9.17

On peut tracer les courbes qui représentent les pourcentages d'inhibition de superoxyde en fonction des concentrations des antioxydants standards dans la cellule.

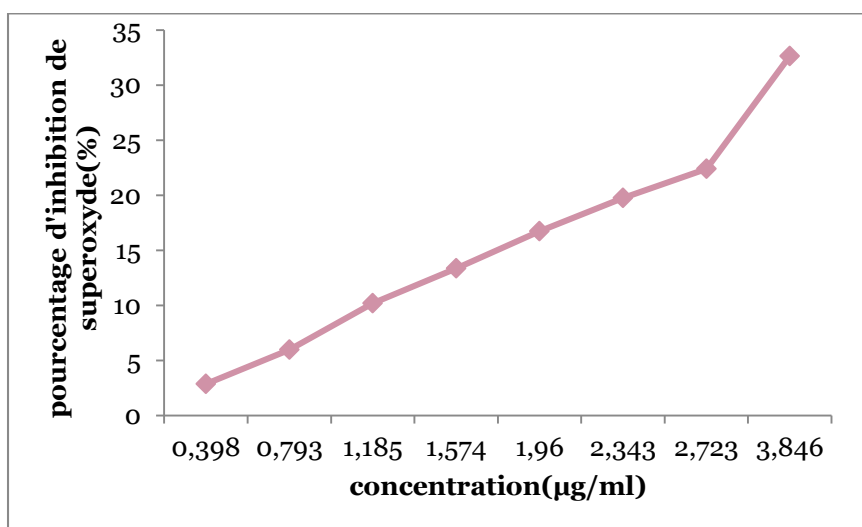


Figure (III.8): Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction du concentration de l'acide ascorbique.

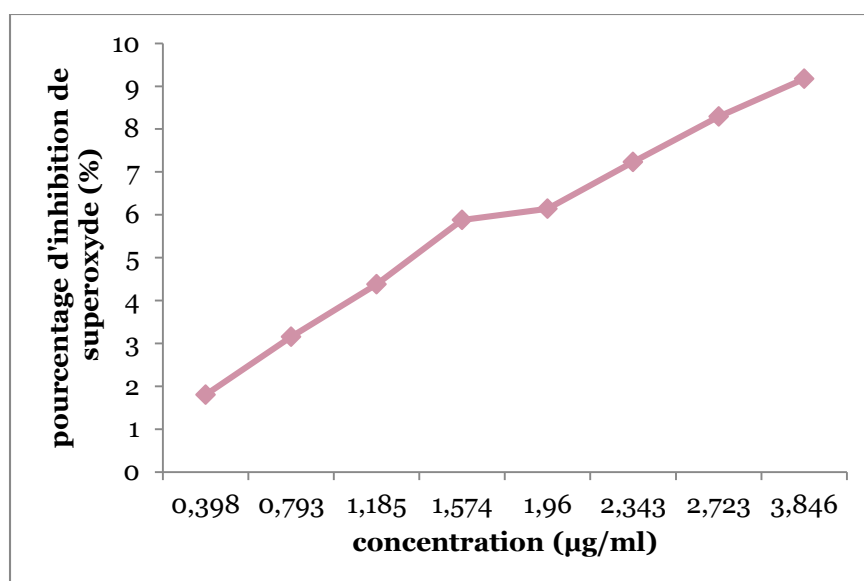


Figure (III.9) : Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction du concentration de  $\alpha$ -tocophérol.

A partir d'équation linéaire de chaque antioxydant standard, on peut calculer les IC50 en mg/ml (tableau III.5).

Tableau (III. 5) : Les valeurs de IC50 des antioxydants standards.

Antioxydant standard	Equation	IC50 (mg/ml)
Acide ascorbique	$8.578x-0.420$	0.00587
$\alpha$ -tocophérol	$2.192x+1.692$	0.02203

### 3. Voltamogrammes des produits étudiés (testés) :

Chaque produit est dissout dans le DMF pour obtenir une concentration égale à 2.6mg/ml. On injecte des volumes de chaque produit allant de 0.1ml, 0.3ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml à 2ml.

Pour chaque dose, les voltamogrammes des produits sont enregistrés.



- 2-nitrophenylferrocène :

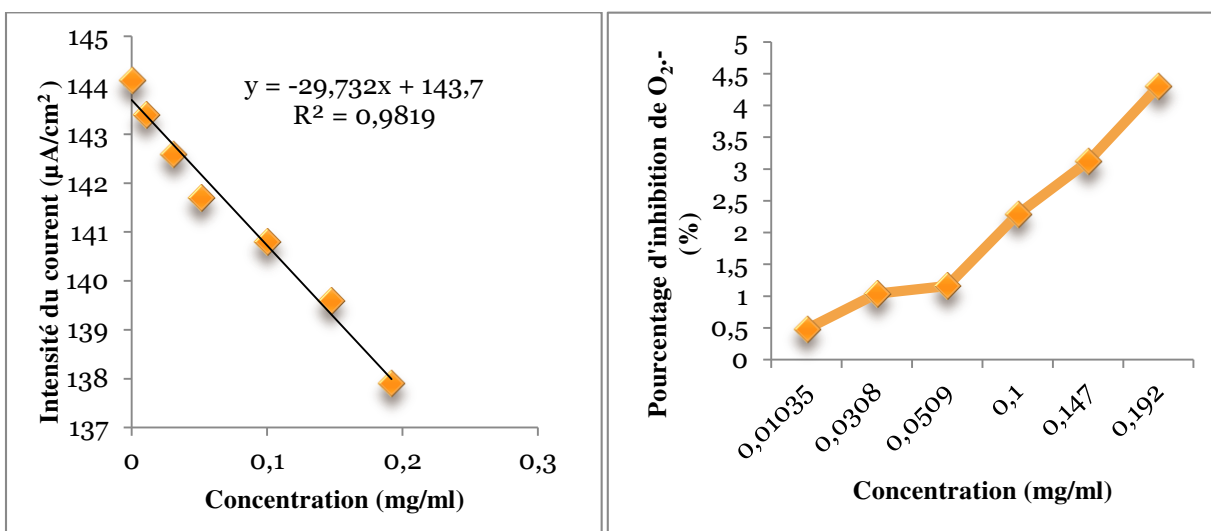
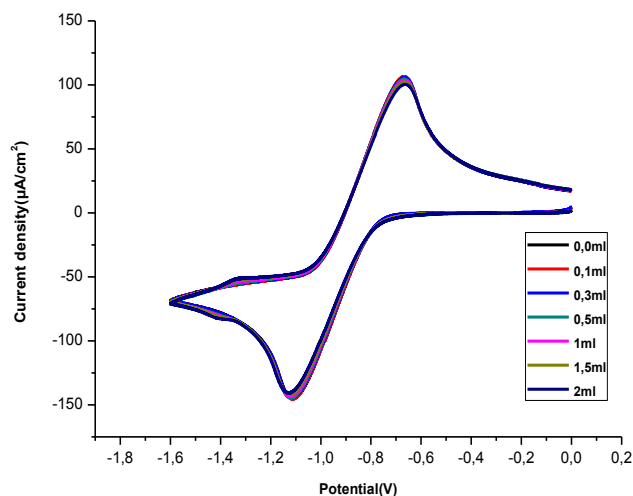


Figure (III.10):A : Voltammogrammes de  $O_2^-$  en présence de différentes concentrations de 2-NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à 28°C±1 avec une vitesse de balayage de 100mV/s.

**B :** Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 2-NPF

**C :** Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 2-NPF

- 3-nitrophenylferrocène :

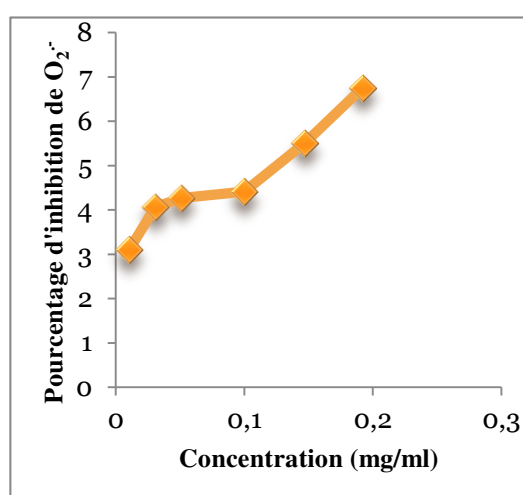
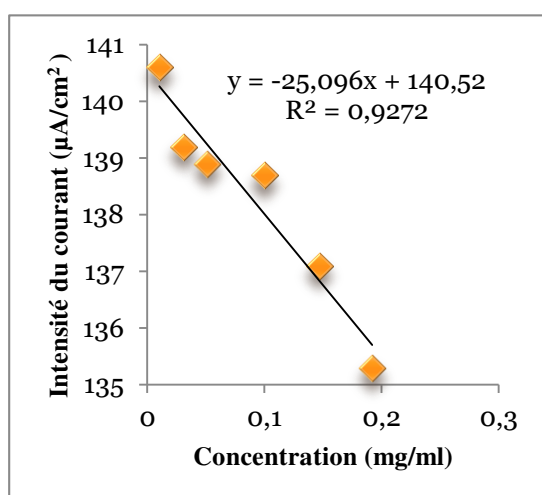
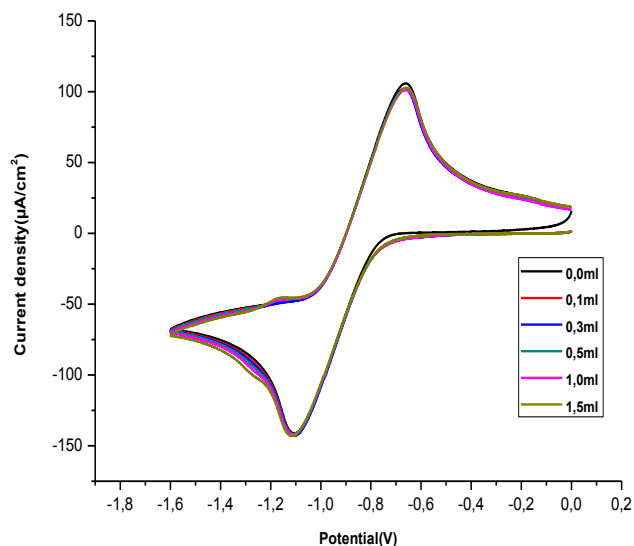


Figure (III.11): A : Voltammogrammes de  $O_2^{\cdot-}$  en présence de différentes concentrations de 3- NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à  $28^{\circ}C \pm 1$  avec une vitesse de balayage de 100mV/s.

B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 3-NPF

C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 3-NPF

- Bis-3-nitrophenylferrocène :

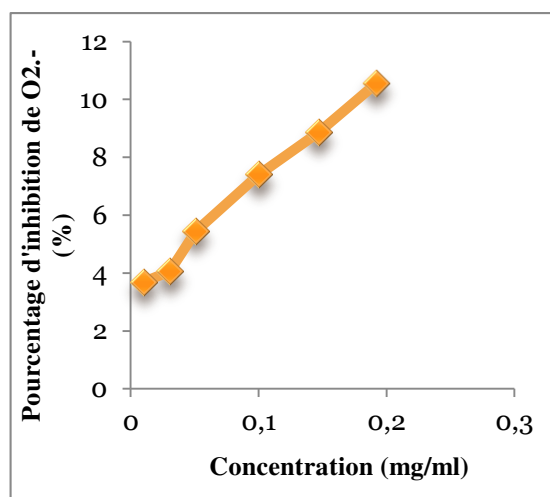
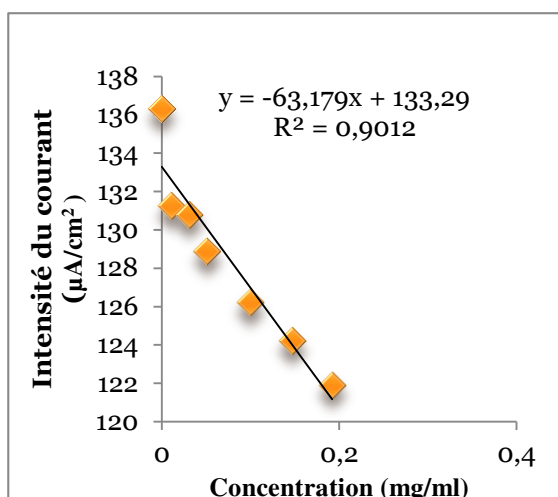
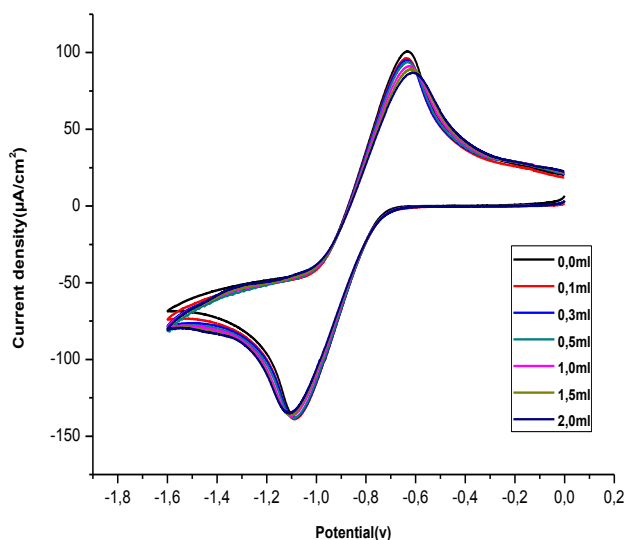


Figure (III.12) : A : Voltammogrammes de  $\text{O}_2^-$  en présence de différentes concentrations de bis-3- NPF, dans le DMF + 0.02 M  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$  sur CV comme électrode de travail à  $28^\circ\text{C} \pm 1$  avec une vitesse de balayage de 100mV/s.

B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de bis-3-NPF

C : Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de bis-3-NPF

- 4-nitrophenylferrocène :

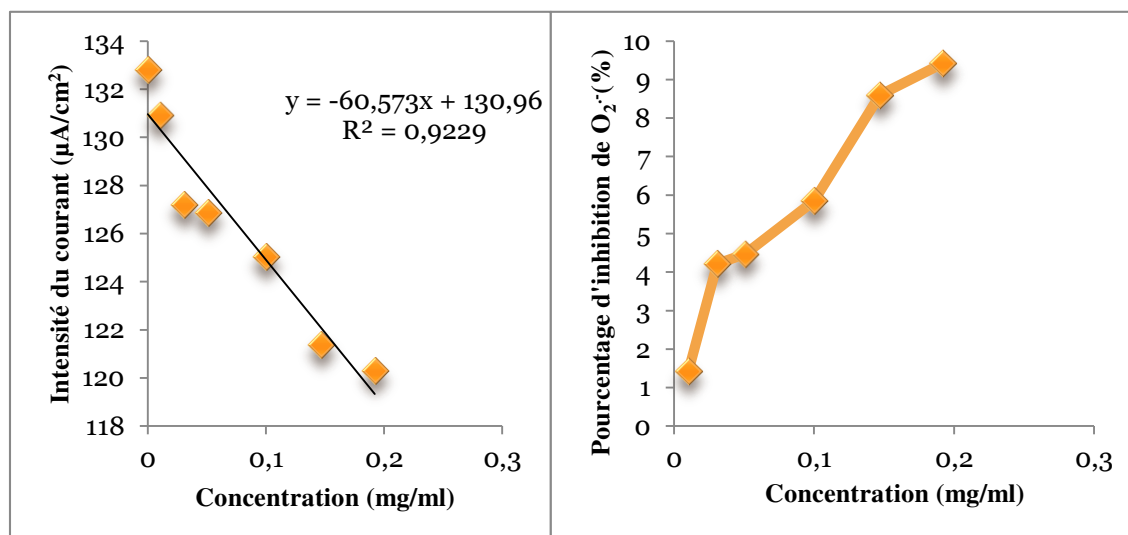
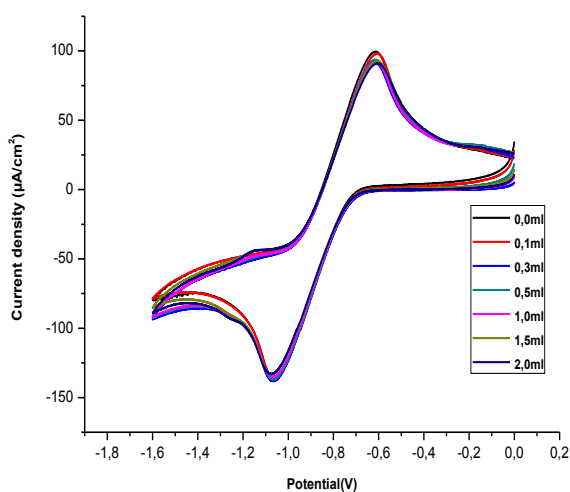


Figure (III.13): A : Voltammogrammes de  $O_2^{\cdot-}$  en présence de différentes concentrations de 4-NPF, dans le DMF + 0.02 M Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> sur CV comme électrode de travail à  $28^{\circ}C \pm 1$  avec une vitesse de balayage de 100mV/s.

**B :** Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 4-NPF

**C :** Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de 4-NPF

- 3-ferrocénylaniline :

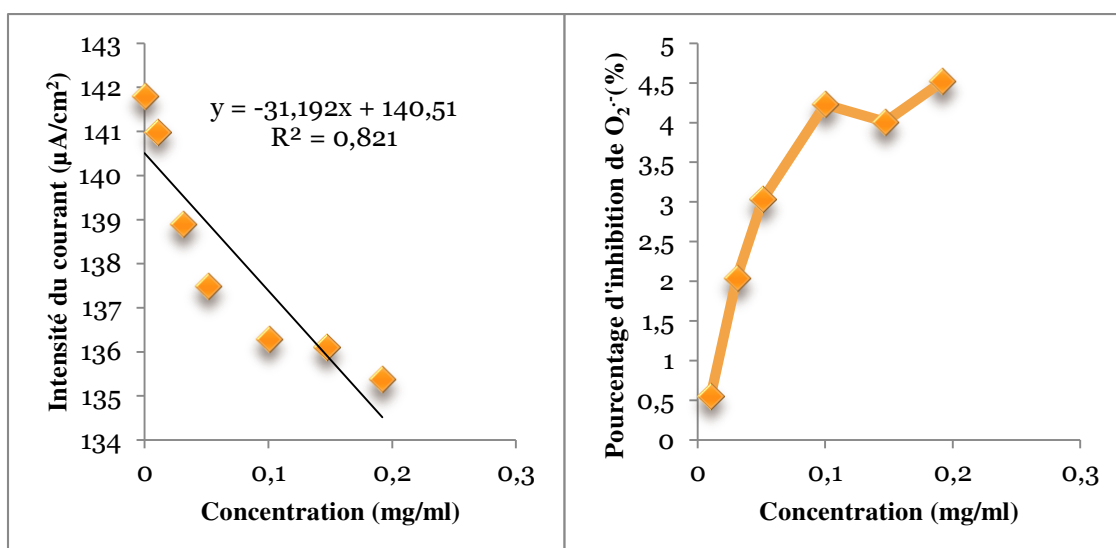
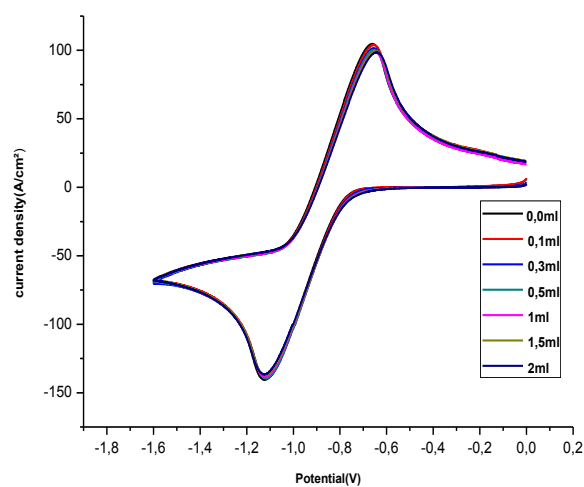


Figure (III.14): A : Voltammogrammes de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en présence de différentes concentrations de 3-FA, dans le DMF + 0.02 M  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$  sur CV comme électrode de travail à  $28^\circ\text{C} \pm 1$  avec une vitesse de balayage de 100mV/s.

B : Evolution de l'intensité du courant en fonction de la concentration de 3-FA

C : Evolution du pourcentage d'inhibition de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en fonction de la concentration de 3-FA

A partir des voltamogrammes et les équations linéaires, on peut déduire les IC<sub>50</sub> de chaque composé ferrocénique étudié.

**Tableau (III.6) : Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des dérivés ferrocéniques.**

Produit	Equation linéaire I(%)=f(C)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (mg/ml).
<b>2-NPF</b>	20.40x+0.258	0.992	2.438
<b>3-NPF</b>	17.29x+3.153	0.927	2.709
<b>Bis-3-NPF</b>	38.56x+3.258	0.991	1.212
<b>4-NPF</b>	40.67x+2.065	0.940	1.178
<b>3-FA</b>	19.16x+1.282	0.813	2.542

### III.B.1.3. Discussion et interprétation des résultats :

A partir des voltamogrammes cycliques de d'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, 4-nitrophenylferrocène possède la plus petite des IC<sub>50</sub> avec une valeur de 1.178mg/ml, c'est-à-dire l'activité antioxydante la plus élevée tandis que 3-nitrophenylferrocène possède la plus mauvaise capacité de piégeage du radical superoxyde avec un IC<sub>50</sub> de 2.709mg/ml. 2-nitrophenylferrocène, bis-3-nitrophenylferrocène et 3-ferrocénylaniline possèdent respectivement des IC<sub>50</sub> de 2.438mg/ml, 1.212mg/ml et 2.542mg/ml, sachant que ces valeurs d'IC<sub>50</sub> sont loins à ceux des antioxydants standards.

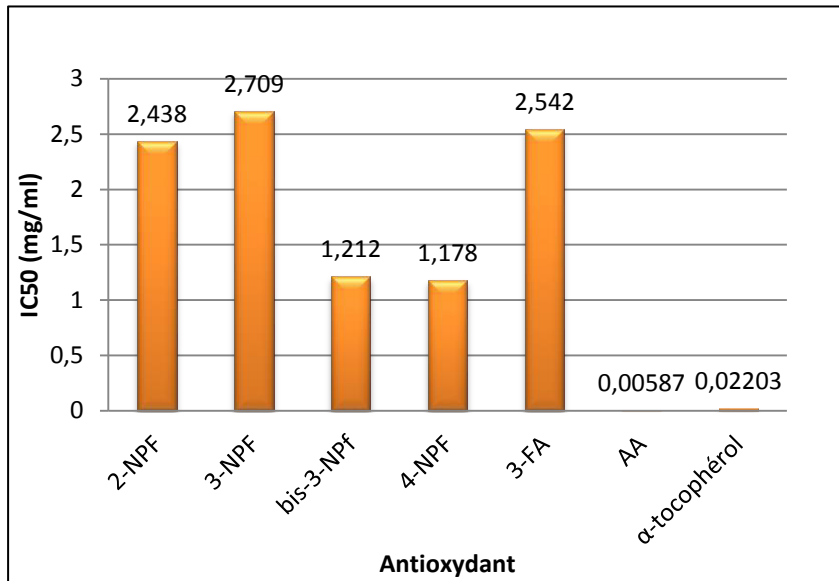
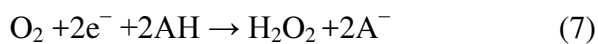
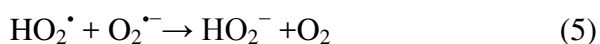
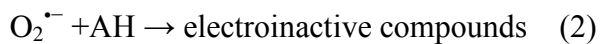


Figure (III.15) : Classement des IC50 des dérivés ferrocéniques.

L'augmentation de la concentration en substrat antioxydant (dérivés ferrocéniques et antioxydants standards) conduit à une diminution de courant de pic anodique de  $O_2^{\bullet-}$  ( $I_{pa}$ ), cette diminution de l'intensité du courant anodique de  $O_2^{\bullet-}$  suggère que le dérivé ferrocénique réagit de manière irréversible avec  $O_2^{\bullet-}$ . Pour chaque composé ferrocénique antioxydant, une série de valeurs de  $I_p$  est déterminée à partir des voltammogrammes cycliques enregistrés en augmentant les concentrations des dérivés étudiés..

Le comportement électrochimique de l'oxygène peut être résumée par les équations suivantes [13] :



Où : AH représente l'antioxydant.

### III.B.2. Le test de diminution de l'intensité du courant du pic anodique de l'oxygène :

#### III.B.2.1. Principe :

Cette méthode est une variante de la technique électrochimique de mesure de capacité inhibitrice du radical superoxyde effectuée par voltammétrie cyclique citée au paravent. L'avantage de cette technique qu'elle ne nécessite pas le calcul de IC50 pour évaluer l'activité antioxydante, seulement on mesure la diminution de l'intensité du courant d'oxydation de l'oxygène tout en le comparant avec celui d'antioxydant standard.

L'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques testés est estimée par la méthode de Lanez et Rebiai [15]. 1 ml de chaque composé dans le DMF est injecté dans la cellule contenant la solution de DMF+l'électrolyte support  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$  saturée avec l'oxygène moléculaire commercial. Ensuite, les voltammogrammes de chaque composé ont été enregistrés dans l'intervalle de potentiel de -1.6 V à 0.0V. La diminution de l'intensité du courant du pic d'oxydation de l'oxygène est mesurée à partir des voltammogrammes de l'oxygène enregistrés en absence et en présence de dérivé ferrocénique étudié, la capacité antioxydante totale est évaluée par l'équation suivante :

$$\text{Capacité antioxydante totale TAC (\%)} = \frac{I_{p_0} - I_p}{I_{p_0} - I_{p_{res}}} \times 100 \quad (\text{III.2})$$

Où :  $I_{p_0}$ -  $I_p$  est le changement dans l'intensité du courant anodique provoqué par l'ajout d'échantillon étudié.

$I_{p_0}$ -  $I_{p_{res}}$  est la différence entre l'intensité du courant anodique de l'oxygène avant l'ajout du produit étudié dans la cellule et l'intensité du courant résiduel de l'oxygène.



Tableau (III.7) : Les paramètres obtenus à partir des voltamogrammes

Composé	Ip0- <i>Ip</i>	<i>Ip</i> - <i>Ip</i> res	TAC (%)
2-NPF	2.3	105.07	2.078±1.0040
3-NPF	1.9	105.07	1.8±1.7061
Bis-3-NPF	20.43	105.07	19.444±1.97157
4-NPF	11.46	105.07	10.907±1.74979
3-FA	6.52	105.07	6.205
Acide ascorbique	48.86	105.07	46.502±1.03164
Tocophérol	18.38	105.07	17.493±0.50595

### II.B.2.2. Discussion des résultats :

Les capacités antioxydante totales des dérivés ferrocéniques étudiés varient entre 1.8% et 19.44%, ces valeurs montrent une activité totale de piégeage du radical superoxyde plus ou moins importante.

En comparant ces valeurs avec ceux des IC<sub>50</sub> des mêmes composés ferrocéniques étudiés obtenues par la technique précédente, on peut clairement voir que les composés qui ont les plus petites des IC<sub>50</sub> ayant les TAC les plus élevées et les composés ayant les IC<sub>50</sub> les plus élevées (2.438 ; 2.709) ont les TAC les plus petites ( 2.078 ; 1.8).

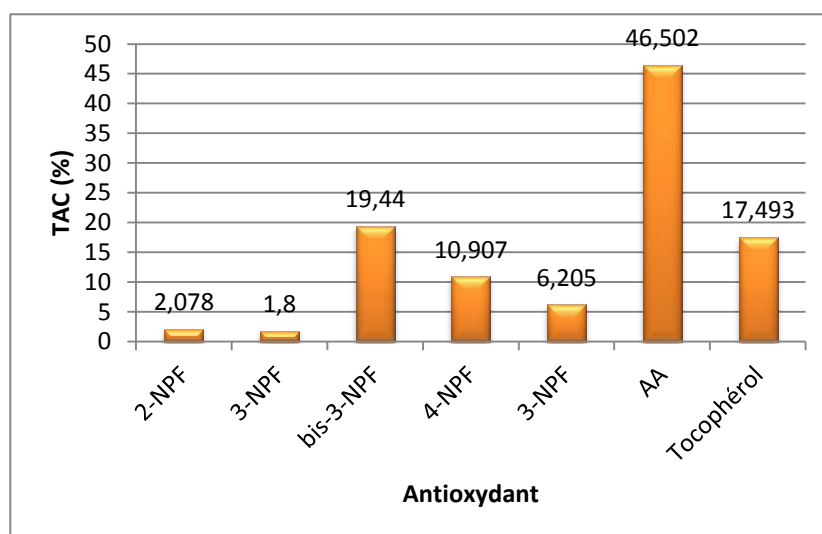


Figure (III.16) : Classement des TAC des dérivés ferrocéniques.

### III.B.3. Le test de piégeage de radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) :

#### III.B.3.1. Matériels et méthodes :

##### 1. Produits chimiques:

Méthanol (99%) est acquis de Biochem chemopharma, Dimeyhulsulfoxide (99.9% de Sigma Aldrich et 1,1-Diphényl-2-picryl hydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) (99%) de Merck.

##### 2. Instruments :

Spectrophotomètre UV-visible (PRIM Advanced SCHOTT instruments GmbH).

##### 3. Principe

Ce test est basé sur le principe de la méthode décrite par Brand-williams avec quelques modifications [16].

On prépare une solution de DPPH<sup>•</sup> par la dissolution de 0.985mg de DPPH<sup>•</sup> dans 25ml de méthanol.

On prépare une solution mère pour chaque produit étudié en dissolvant 1.5mg dans 1ml de DMSO. Et on procède à une dilution de chaque solution mère pour obtenir des solutions « filles » de concentrations allant de 0.1 jusqu'au 0.7 mg/ml. 0.1 mL de chaque concentration de chaque produit (standard ou produit à tester) est ajouté à 1.9 mL de solution de DPPH<sup>•</sup> dans des tubes [17]. Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 30minutes. Après, la diminution de l'absorbance est enregistrée à 517nm à la température de la salle (28°±1).

Les absorbances prises ainsi que les concentrations sont exploitées pour établir les courbes d'étalonnage des antioxydants standards et pour calculer les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH<sup>•</sup> en appliquant l'équation (III.3) :

$$\text{Pourcentage de piégeage de DPPH}^{\bullet} = (\text{Absorbance du control-absorbance du test/absorbance de control}) \times 100. \quad (\text{III.3})$$

### III.B.3.2. Résultats :

Le tableau (III.8) rassemble les IC50 des composés testés.

Tableau (III.8) : Les valeurs d'IC50 des composés ferrocéniques étudiés.

Produit	Equation linéaire	r <sup>2</sup>	IC50 (mg/ml).
2-NPF	29.64x+4.844	0.951	0.48
3-NPF	36.30x-2.481	0.983	1.44
Bis-3-NPF	58.22x+4.955	0.998	0.773
4-NPF	30.77x+1.414	0.988	1.57
3-FA	60.555x-4.159	0.945	0.89
Acide Ascorbique	1.19x+42.4	0.960	0.0063
$\alpha$ -tocophérol	1.56x+29.093	0.995	0.0134

### III.B.3.3. Discussion des résultats et interprétation :

1,1-diphényl - 2 - picrylhydrazyl est un radical stable qui présente une forte absorption à 517nm. L'absorbance à 517 nm diminue proportionnellement avec la perte du radical d'un proton en l'échangeant avec l'antioxydant RH, ce qui entraîne un changement de couleur du violet au jaune (**figure III.17**) [18]. DPPH<sup>•</sup> peut être utilisé pour estimer la capacité antioxydante des molécules naturelles ou synthétisés.

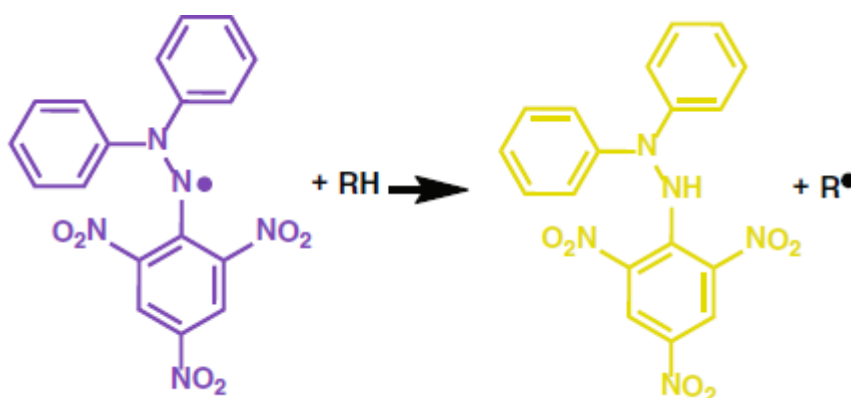


Figure (III.17) : Réaction du radical libre DPPH<sup>•</sup> avec l'antioxydant RH.

D'après le changement des couleurs des solutions de DPPH<sup>•</sup> de violet au jaune après un certain temps et la diminution de l'absorbance tout au long de 30 minutes, on peut constater que tous ces dérivés présentent une activité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> plus ou moins importante.

Les capacités d'inhibition de radical DPPH<sup>•</sup> est dans l'ordre de 2-NPF>bis-3-NPF>3-NPF>4-NPF avec des IC<sub>50</sub> respectivement de 0.48mg/ml, 0.778mg/ml, 1/44mg/ml et 1.58mg/ml.

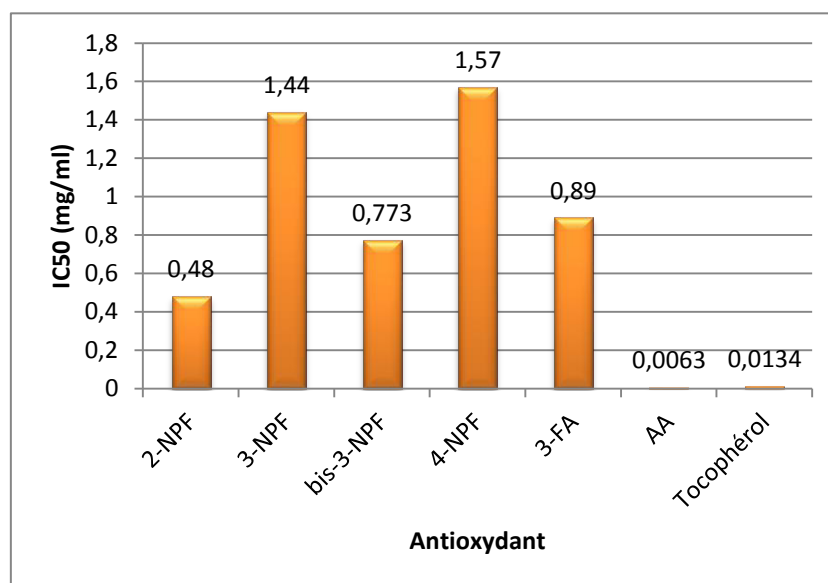


Figure (III.18) : Classement des IC<sub>50</sub> des dérivés ferrocéniques (test de DPPH<sup>•</sup>)

Gao-Li et col [18] ont trouvé lors d'estimation des capacités antioxydantes- de quelques quinolines ferrocéniques- découlant du groupement ferrocène que l'effet anti-oxydant contre le DPPH<sup>•</sup> généré par le groupe ferrocényle peut être encore augmentée par des groupements donneurs d'électrons tels que le furanne, le N (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, et le groupe ferrocényle, tandis que le groupe attracteur d'électrons tels que NO<sub>2</sub> (notre cas) et Cl diminuent cet effet et par conséquent ils ne sont pas bénéfiques pour les quinoléines pour qu'elles soient des antioxydants. Le groupe ferrocényle dans la quinoléine présente une activité antioxydante plus élevée que le groupe hydroxyle dans Trolox.

Gul Nabi et ZAI-QUN LIU [19] ont conclu lors d'évaluation des propriétés antiradicalaires de quelques chalcones ferrocéniques que l'atome de fer dans le ferrocène et le groupe hydroxyle phénolique jouent le rôle d'inhibiteurs des radicaux, et la capacité antiradicalaire d'atome de fer dans le ferrocène est même supérieure à celle du groupe hydroxyle phénolique.

Les chalcones ferrocéniques contenant un groupement hydroxyl ou non sont capables de piéger DPPH<sup>•</sup> ce qui justifie que le couple redox Fe(II)/Fe(II)<sup>+</sup> dans le ferrocène et le groupement hydroxyle phénolique jouent le rôle d'inhibiteurs des radicaux. Donc, l'efficacité de piégeage des radicaux par les chalcones ferrocéniques est supérieure à celle des chalcones seuls.

Donc, d'après la littérature, on peut conclure que l'activité de piégeage de DPPH<sup>•</sup> par nos dérivés ferrocéniques est due au ferrocène lui-même et non pas au NO<sub>2</sub> et NH<sub>2</sub> qui sont les deux des groupes attracteurs d'électrons.

### III.B.4. Le test de phosphomolybdate :

#### III.B.4.1. Matériels et méthodes :

##### 1. Produits chimiques :

L'acide sulfurique (98%), molybdate d'ammonium et phosphate d'ammonium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

##### 2. Instruments

Spectrophotomètre UV-Visible (PRIM Advanced SCHOTT instruments GmbH), Evaporateur rotatif (

##### 3. Principe

Le test phosphomolybdate (PPM) a été réalisé selon la méthode décrite par Prieto et al [14]. Elle consiste à introduire dans des tubes 100 µL de chaque produit mélangé à 0.1 ml de réactif composé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes ont été ensuite bien fermés puis incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante est exprimée en mg équivalent Vitamine E par ml (mg VEE/ml) en utilisant l'équation linéaire :  $y=2.2533x+0.0977$  où y représente l'absorbance et x la concentration de l'équivalent vitamine E mg/ml.

Pour chaque produit, on trace la fonction **Equi VE=f(C de composé)**, on trouve des équations linéaires avec lesquelles on calcule les IC<sub>50</sub> de l'activité antioxydante totale.

#### III.B.4.2. Résultats :

Les résultats d'absorbance et de TAC en fonction des concentrations sont récapitulés dans le tableau (III.9).

Tableau (III.9) : les valeurs d'absorbance et TAC en fonction des concentrations des dérivés ferrocéniques étudiés.

<b>Composé</b>	<b>2-NPF</b>				
<b>Concentration</b>	<b>0,1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,2</b>	<b>0,25</b>	
<b>Absorbance</b>	0,289	0,463	0,61	0,955	
<b>TAC (equiVE/ml)</b>	0.0849	0.1621	0.2273	0.3805	
<b>Composé</b>	<b>3-NPF</b>				
<b>Concentration</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	
<b>Absorbance</b>	0,201	0,301	0,61	0,899	
<b>TAC (equiVE/ml)</b>	0.0454	0.0902	0.2273	0.3556	
<b>Composé</b>	<b>bis-3-NPF</b>				
<b>Concentration</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	
<b>Absorbance</b>	0,208	0,267	0,8	0,962	
<b>TAC (equiVE/ml)</b>	0.0489	0.0751	0.3116	0.3835	
<b>Composé</b>	<b>4-NPF</b>				
<b>Concentration</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>1</b>
<b>Absorbance</b>	0,143	0,411	0,605	0,820	0,94
<b>TAC (equiVE/ml)</b>	0.0201	0.1390	0.2251	0.3205	0.3738
<b>Composé</b>	<b>3-FA</b>				
<b>Concentration</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>	
<b>Absorbance</b>	0,52	0,871	0,901	0,94	
<b>TAC (equiVE/ml)</b>	0.1874	0.3432	0.3565	0.3738	

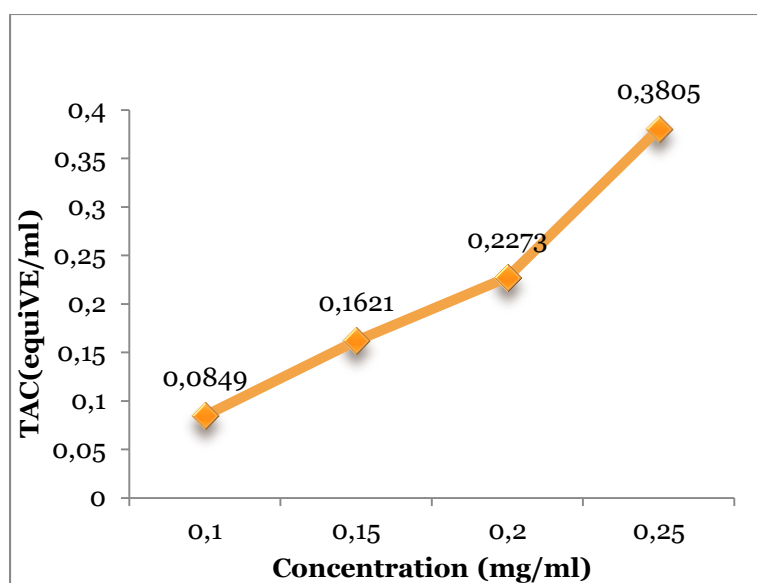


Figure (III.19) : Activité antioxydante totale de 2-NPF à différentes concentrations.

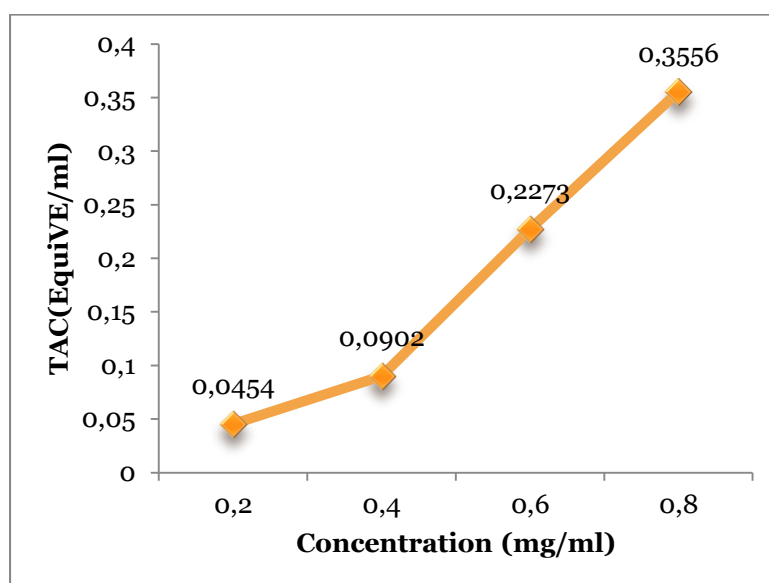


Figure (III. 20) : Activité antioxydante totale de 3-NPF à différentes concentrations.

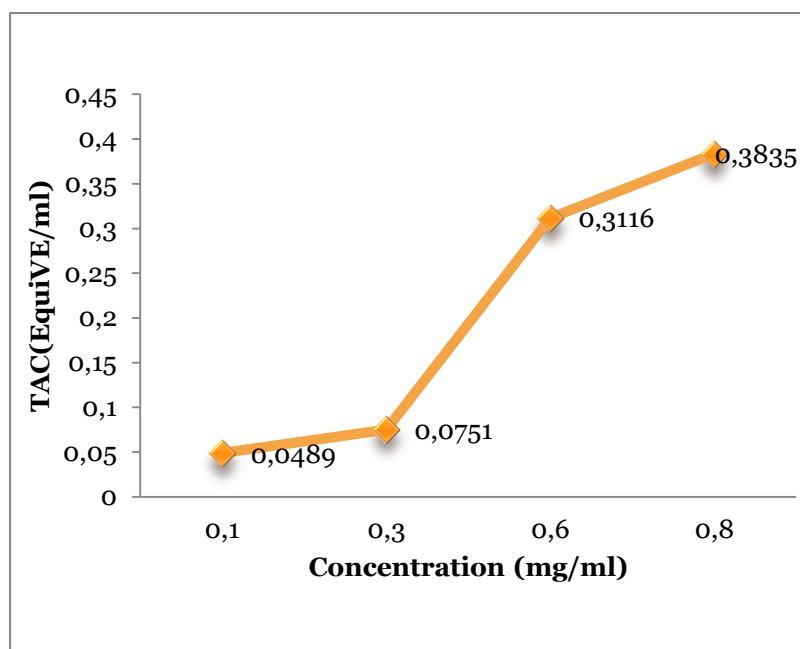


Figure (III.21) : Activité antioxydante totale de bis-3-NPF à différentes concentrations.

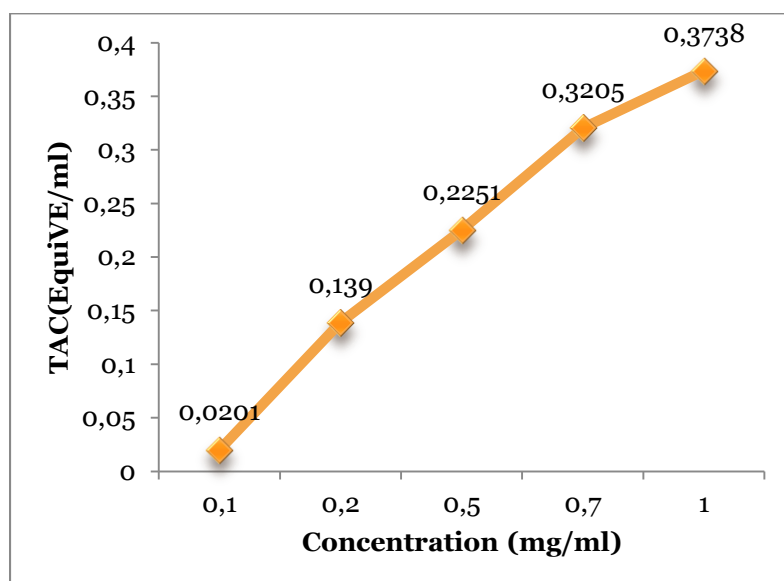


Figure (III.22) : Activité antioxydante totale de 4-NPF à différentes concentrations.



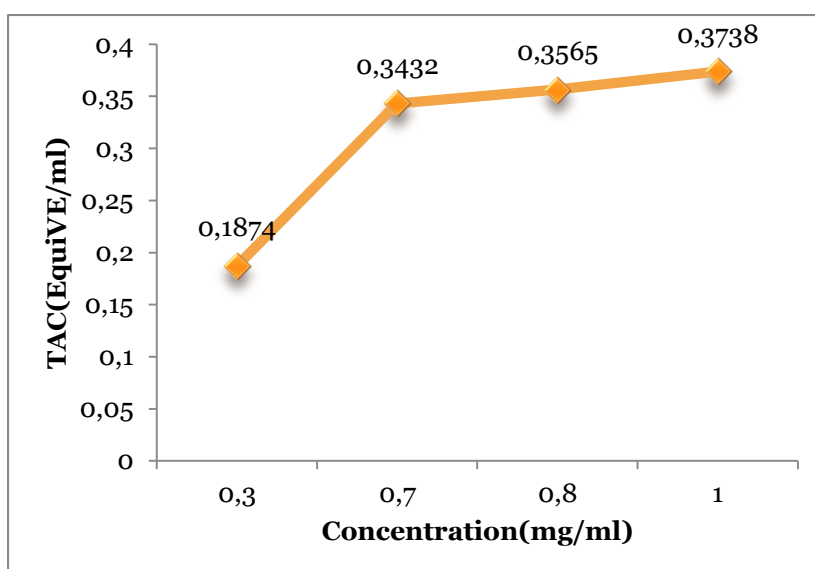


Figure (III.23) : Activité antioxydante totale de 3-FA à différentes concentrations.

A partir des valeurs de TAC, on peut obtenir les équations linéaires  $TAC=f(C)$ , qui servent à déduire les  $IC_{50}$  de chaque dérivé ferrocénique.

Tableau (III.10) :  $IC_{50}$  des composés ferrocéniques (TAC).

Produit	Equation linéaire	$r^2$	$IC_{50}$ (mg/ml).
2-NPF	$Y=1.904x-0.1195$	0.9589	26.323
3-NPF	$Y=0.5338x-0.0873$	0.962	93.831
Bis-3-NPF	$Y=0.5262x-0.032$	0.9505	95.081
4-NPF	$Y=0.4497x+0.0074$	0.942	111.168
3-FA	$Y=0.2801x+0.1191$	0.9166	178.082

#### III.B.4.3. Discussion des résultats et interprétation :

La méthode de phosphomolybdène est basée sur la réduction de Mo (III) à Mo (V) par les composés antioxydants et la formation de complexe de phosphate / Mo (V) de couleur verte avec une absorption maximale à 695 nm. Parmi les divers produits évalués, 2-nitrophénylferrocène constitue le plus fort réducteur de phosphomolybdène [ $IC_{50}$  de

26.323mg/ml]. Les autres dérivés présentent une faible capacité de réduction de phosphomolybdate.

**Conclusion :**

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques synthétisés : 2-NPF, 3-NPF, bis-3-NPF, 4-NPF et 3-FA montrent que 4-nitrophénylferrocène possède une activité inhibitrice élevée du radical superoxyde avec un IC50 égale à 1.178mg/ml et une capacité totale antioxydante avec un pourcentage d'inhibition du radical superoxyde égale à 19.44%, 2-nitrophénylferrocène possède la capacité de piégeage du radical DPPH• la plus élevée avec un IC50 de 0.778mg/ml, et il constitue au même temps le plus fort réducteur de phosphomolybdate avec un IC50 de 26.323mg/ml.

**Références bibliographiques :**

- [01]: R. Kohen and A. Nyska, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicologic Pathology*, 30: 620–650, (2002).
- [02]: N. J. Temple, Antioxidants and disease: More questions than answers, *Nutrition Research*, 20.
- [03]: B. Halliwell, Antioxidants in human health and disease, *Anna Rev. Nutr*, 16:33-50, (1996).
- [04]: B. Halliwell, Free Radicals and other reactive species in Disease, *Encyclopedia of life sciences*, 1-7, (2001).
- [05]: S. Sen, R. Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, B. De, Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3: 91-100, (2010).
- [06]: M. Percival, Antioxidants, Clinical Nutrition Insights, *Advanced Nutrition Publications*, 10, (1998).
- [07]: T. Baborun, MA. Soobrattee, V. Luximon-Ramma, OI. Aruoma, Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease, *Internet Journal of Medical Update*, 1, (2006).
- [08]: A. Rezaire, Activité anti-oxydante et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), *Thèse de doctorat en Phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane*, (2012).
- [09] : Z. Mohammedi, Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, *thèse de doctorat en biologie, Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen*, (2012-2013).
- [10] : D. Harbant, synthèse et caractérisation de nouveaux antioxydants, dérivés mono-aromatiques d'acides fulviques, pour des applications en dermo-cosmétique, *thèse de doctorat, Université Louis Pasteur- STRASBOURG I*, (2008).

- [11]: C. Popovici, I. Saykova, B. Tylkowski, Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH<sup>\*</sup>, *Revue de génie industriel*, 4: 25-39, (2009).
- [12] : Md. Nur Alam, N. J. Bristi, Md. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal* 21: 143–152, (2013).
- [13]: C. Le Bourvellec, D. Hauchard, A. Darchen , J-L. Burgot, M-L. Abasq, Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids, *Talanta*, 75: 1098–1103, (2008).
- [14]: P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific Application to the determination of vitamin E, *Anal. Biochem*, 269: 337-341, (1999).
- [15]: T. Lanez, A.Rebiai, 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: 46-54, (2013).
- [16]: W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 28: 25-30 (1995).
- [17]: J. B. Behrendorff, C. E Vickers, P. Chrysanthopoulos and L. K. Nielsen, 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis, *Microbial Cell Factories*, 12:76, (2013).
- [18]: G-L. Xi, Zi-Q Liu, Solvent-free Povarov reaction for synthesizing ferrocenyl quinolines: Antioxidant abilities deriving from ferrocene moiety, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86 : 759-768, (2014).
- [19]: G. Nabi, Z-Q. Liu, Radical-scavenging properties of ferrocenyl chalcones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21: 944–946, (2011).

**CHAPITRE VI :**

**EVALUATION DE L'ACTIVITÉ  
ANTIBACTÉRIENNE DES DÉRIVÉS  
FERROCÉNIQUES**

---

## Chapitre VI : Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés synthétisés.

### Partie A : Partie théorique

#### Introduction :

Les maladies infectieuses, provoqués par les virus, les bactéries et les eucaryotes parasites, constituent un problème de santé publique qui se présente, depuis ces dernières décennies, avec une ampleur et des caractéristiques nouvelles.

L'hygiène et les antibiotiques ont constitué des armes d'une remarquable efficacité dans la maîtrise de ces maladies infectieuses [01].

#### VI.A.1. La découverte du monde microbien :

Anton VAN LEEUWENHOEK (1632-1723), drapier hollandais et grand amateur de loupes et instruments d'optique, découvre et décrit entre 1674 et 1687 le monde microbien « les animalcules ». Mais celui-ci n'est véritablement reconnu qu'à partir du milieu du XIXe siècle à la suite des travaux de Louis PASTEUR et de ses élèves.

En 1866, HAECKEL crée le terme de **protistes** pour désigner, entre le monde animal et le monde végétal, les êtres unicellulaires et les êtres pluricellulaires sans tissus différenciés. Les protistes sont classés en deux catégories :

- Les protistes supérieurs ou **eucaryotes** qui possèdent un noyau entouré d'une membrane, des chromosomes, un appareil de mitose et une structure cellulaire complexe (mitochondries notamment).
- Les protistes inférieurs ou **procaryotes** qui ont un chromosome unique sans membrane nucléaire et sans appareil de mitose, et une structure cellulaire élémentaire (pas de mitochondries). Les bactéries font partie des protistes procaryotes.

En 1878, SEDILLOT crée le terme de *microbes* parmi lesquels on distinguera ensuite les bactéries proprement dites et les virus. Le terme virus, qui au début désignait tout agent infectieux, est maintenant réservé à la catégorie bien particulière de microbes qui ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique et qui sont incapables d'assurer à eux-seuls la synthèse de leurs propres constituants [02]

### VI.A.2. L'anatomie des bactéries :

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires, d'une taille de l'ordre du micron. Elles sont omniprésentes dans notre environnement, et nous hébergeons nous mêmes (à la surface de notre peau, de nos muqueuses et de notre intestin), dix fois plus de bactéries que de cellules humaines nous constituant. Ces bactéries naturellement présentes dans l'organisme, appelées "flores commensales", ne provoquent pas de maladie dans des circonstances normales et constituent même une barrière naturelle contre les bactéries pathogènes. Les bactéries ont des capacités particulièrement importantes à s'adapter à leur environnement et dans la nature, certaines possèdent des mécanismes de résistance "naturelle" aux antibiotiques [03].

Les bactéries sont des êtres unicellulaires qui possèdent les éléments essentiels à la vie cellulaire. Leur taille varie de 1 à 10 microns ( $\mu\text{m}$ ). Elles ne sont donc visibles qu'au microscope optique ( $\times 10^3$ ) ou au microscope électronique ( $\times 10^6$ ).

Quelques chiffres concernant une bactérie-type, *Escherichia coli* :

Poids d'une cellule :  $10^{-12}\text{g}$

Eau : 70 %

Poids sec d'une cellule :  $3 \times 10^{-13}\text{g}$  ? [02]

.

### VI.A.3. Les antibiotiques :

L'antibiothérapie est l'un des plus grands succès médicaux du siècle passé. À la suite de la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 et de son utilisation à partir de la Seconde Guerre mondiale, de nombreuses familles d'antibiotiques ont été découvertes, permettant de faire considérablement reculer la mortalité par maladie infectieuse au cours du XXe siècle. Combinés à certains vaccins antibactériens, les antibiotiques se sont révélés efficaces pour lutter contre les grandes maladies épidémiques : tuberculose, lèpre, peste, etc. [03].

#### VI.A.3.1. Définition :

Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal. Ce qui caractérise l'ensemble de ces agents antimicrobiens, c'est leur mécanisme d'action qui est le support de leur toxicité sélective.

Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la

première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne.

Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, ces substances ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation résumés comme suit:

- Effets secondaires et toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité.
- Tolérance et résistance croissante des germes infectieux aux antibiotiques.
- Difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (patients immunodéprimés).

#### **VI.A.3.2. Mode d'action des antibiotiques :**

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des micro-organismes. Il existe ainsi quelques mécanismes d'action pour les antibiotiques :

- **Action sur la synthèse du peptidoglycane :**

Les antibiotiques interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane n'auront aucune action sur les bactéries naturellement dépourvues de paroi, sur les protoplastes, les sphéroplastes et les formes L.

Le peptidoglycane (PG) est un polymère qui constitue un réseau tridimensionnel entourant complètement la bactérie. Il constitue un caractère original et constant du monde bactérien.

- **Action sur la membrane cytoplasmique :**

La membrane cytoplasmique est constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle se trouvent insérées de nombreuses molécules (protéines, glycoprotéines, glycophospholipides...). Par leur extrémité hydrophobe, les antibiotiques notamment les polymyxines pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique alors que l'extrémité hydrophile reste orientée vers l'extérieur

- **Action sur la synthèse des protéines :**

Le ribosome bactérien, est une organelle formée de 2 sous unités (30S et 50S) sur lesquelles peuvent se fixer des antibiotiques. Différentes étapes de la synthèse protéique peuvent être perturbées par les antibiotiques



- **Action sur l'ADN :**

La réplication ou la transcription de l'ADN constituent une cible d'action pour des antibiotiques dont certains, comme les Quinolones, sont largement utilisés en thérapie.

*Les Quinolones* : sont des agents antibactériens de synthèse traversent la paroi des bactéries à Gram négatif grâce aux porines, pénètrent dans le cytoplasme par diffusion passive et agissent sur l'ADN gyrase (ou topoisoméraseII) et sur la topo-isomérase IV.

### **VI.A.3.3. Paramètres d'activité d'un antibiotique :**

L'analyse de l'activité d'un antibiotique donné sur une bactérie a conduit à définir un certain nombre de paramètres qualitatifs et quantitatifs, pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition en mm et en déduit la sensibilité ou la résistance. On définit deux concentrations critiques d'antibiotique :

- **CMI** : concentration minimale inhibitrice ou CMI (en anglais MIC : Minimal inhibitory concentration). Dans la pratique, on définit la CMI comme la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber (bactériostase) totalement la multiplication bactérienne, après 18 à 24 heures de contact à 37 °C.

- **CMB** : la concentration minimale bactéricide, qui est la plus faible concentration permettant de détruire ou de tuer (bactéricidie) 99,99 % des bactéries après 18 à 24 heures de contact avec l'antibiotique.

### **VI.A.4. Méthodes de détermination de l'efficacité d'un antibiotique:**

Parmi les méthodes de détermination de l'efficacité d'antibiotique (ATB), deux techniques sont utilisées :

#### **VI.A.4.1. Méthode de dilution :**

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide.

- **En milieu liquide**

Préparation d'une série de tubes d'une gamme de concentrations d'antibiotique à tester, (par exemple 0.5mg/l, 1, 2, 4, 6, 8 mg/l) puis addition d'une même quantité de germes. Après incubation à 37 °C pendant 18 heures, on détermine la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne visible à l'œil nu.

- **En milieu solide**

L'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

#### **VI.A.4.2. Méthode de diffusion :**

La méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant les bactéries à croissance lente ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier [04].

Des disques à papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester à une certaine concentration sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Après incubation d'une nuit à 37°C, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Chaque zone peut être mesurée selon divers moyens en mm, puis il sera possible de calculer la CMI de l'antibiotique pour la souche examinée en reportant ce diamètre sur une courbe de concordance.

#### **VI.A.5. Les bactéries étudiées [02] :**

- *Escherichia coli* : (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole.

*E.coli* est un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de  $10^8$  par gramme de fécès (flore totale :  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme).

- *Pseudomonas aeruginosa* :

Les *Pseudomonas* sont *aérobies stricts*, *oxydase positif*, mobiles, produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistants à de très nombreux antibiotiques.

Saprophytes, on les trouve essentiellement dans l'eau. Ils peuvent contaminer des solutés pour perfusion, des solutions antiseptiques, des préparations médicamenteuses liquides.

L'espèce principale, *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique), a les caractères suivants :

- protéolytique,
- production de deux pigments : la pyocyanine (pigment bleu), qui est spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*, et la pyoverdine ou fluorescéine qui est présente chez d'autres *Pseudomonas*.
- production d'une exotoxine nécrosante par certaines souches.

*Pseudomonas aeruginosa* exprime son potentiel pathogène lorsqu'il est introduit dans des zones aux défenses immunitaires diminuées. Opportuniste majeur, il est ainsi responsable :

- des suppurations à « pus bleu » des blessures et des brûlures,
- d'infections locales iatrogènes après manœuvre instrumentale : urinaires après cathétérisme, broncho-pulmonaires chez des sujets sous respirateurs, oculaires sur lentille de contact,
- de septicémies chez les brûlés, les granulopéniques (aplasies toxiques ou thérapeutiques),
- de surinfection des bronches dans la mucoviscidose, grâce à la production d'élastase.

▪ ***Enterococcus* :**

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif, disposés en diplocoques, commensaux du tube digestif. Ils sont responsables d'infections urinaires et d'endocardites. Les plus fréquemment isolés sont *Enterococcus faecalis* et à un moindre degré *Enterococcus faecium*.

Les entérocoques poussent sur milieu ordinaire, sur milieu hostile (NaCl 6,5 %, bile) et appartiennent au groupe D de Lancefield. Ils sont bien moins sensibles aux antibiotiques que les autres streptocoques et en 1986 les premières souches d'entérocoques résistant aux glycopeptides (vancomycine, téicoplanine) ont été isolés.

▪ ***Klebsiella* :**

Ce sont des entérobactéries qui ont un métabolisme fermentaire particulier, c'est-à-dire qui produisent de l'acétoïne. Espèce commensale des voies aériennes supérieures et du tube digestif, *Klebsiella* provoque des infections urinaires et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques, voire des abcès du poumon. *Klebsiella* est naturellement résistante à l'ampicilline par production de pénicillinase chromosomique.

## Partie B : Résultats et discussions :

### VI.B.1. Objectif :

Notre travail consiste à étudier l'activité de nos composés synthétisés : 2-NPF, 3-NPF, 4-NPF et 3-FA vis-à-vis quatre souches bactériennes multi-résistantes responsables des maladies nosocomiales :

- *Escherichia coli* ATCC25922.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603.
- *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

Cette étude est effectuée au niveau de laboratoire des analyses bactériologiques de l'hôpital Mohamed Boudiaf-Ouargla.

### VI.B.2. Procédure opératoire :

La procédure opératoire est résumée dans les étapes suivantes :

- **Préparation des produits à tester :**

Les dérivés ferrocéniques synthétisés (2-NPF, 3-NPF, bis-3-NPF, 4-NPF et 3-FA) sont dissous dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations de 0,2, 2, 10,20 et 25mg/ml.

- **Préparation des disques de papier**

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

- **Préparation du milieu de culture**

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

- **Préparation de la suspension microbienne**

On frotte à chaque fois à l'aide de pipette pasteur les quatre souches bactériennes et on les dépose dans des tubes à essai contenant un bouillon nutritif (10ml), en agitant bien.

Puis à l'aide de pipette pasteur, on prend 10 gouttes de chaque tube et on les met dans des tubes contenant l'eau physiologique.

On disperse la suspension dans les boites de pétri et on les met dans l'étuve à 37 °C durant 15 minutes.

### ▪ Préparation des inoculums

On prépare 5 tubes à essai pour chaque composé contenant les dilutions déjà préparées, les disques de papier filtre de 5mm de diamètre sont immergés dans les tubes et sont imprégnés d'une faible quantité de produit, puis à l'aide d'une pince, on les dépose à la surface des boîtes pétri préalablement ensemencées par la suspension microbienne.

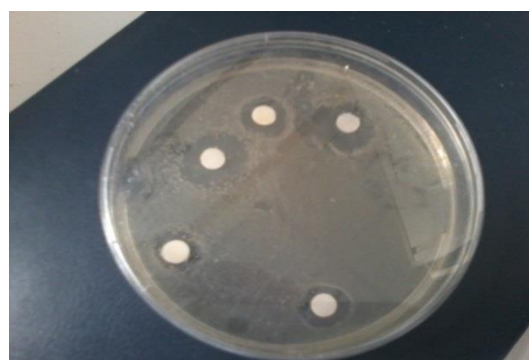
Après l'incubation dans l'étuve pendant 24 heures à 37 °C, on déduit les résultats en mesurant les diamètres d'inhibition pour chaque souche en mm.

### VI.B.3. Discussion des résultats :

- 2-nitrophenylferrocène :



**Escherichia coli**



**Pseudomonas**



**Entrococcus**



**Klebsiella**

**Figure (VI.1) : Test de 2-NPF sur les souches bactériennes étudiées**

Le tableau (VI.1) présente les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour chaque souche bactérienne et chaque concentration.

**Tableau (VI.1) : Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes.**

Concentration (mg/ml)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella</i>
25	14.6	16.2	08	09
20	12.2	13.4	07.2	07.2
10	09	09.9	06.5	07
2	07	07.1	06	05.8
0.2	06.3	06.2	00	05.6

On remarque d'après le tableau, que les quatre souches bactériennes sont sensibles en vers 2-nitrophenylferrocène :

***Escherichia coli*** : 2-NPF possède une activité antibactérienne vis-à-vis *Echerichia coli*, qui peut être considérée comme étant la plus importante après celle vis-à vis *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de zone d'inhibition de 14.6 mm pour 25mg/ml et 6.3mm pour 0.2mg/ml.

***Pseudomonas aeruginosa*** : 2-NPF possède une activité antibactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa* relativement élevée par rapport à celle des autres souches bactériennes ; les zones d'inhibition ont des diamètres égaux respectivement à 16.2 mm, 13.4mm, 9.9mm, 7.1 mm, et 6.2 mm pour les concentrations suivantes : 25mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 2mg/ml et 0.2mg/ml.

***Enterococcus faecalis*** : 2-NPF est actif sur *Enterococcus faecalis* à partir de concentration égale à 2 mg/ml avec un diamètre de zone d'inhibition de 6mm. Avec une concentration de 0.2mg/ml, aucune activité n'est signalée.

***Klebsiella pneumoniae*** : 2-NPF possède des zones d'inhibition de croissance de *Klebsiella pneumoniae* de diamètres diminuant avec la diminution de concentration ; 9mm pour une concentration de 25mg/ml et 5.6mm pour une concentration de 0.2mg/ml.

- 3-Nitrophenylferrocène :



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Enterococcus



Klebsiella

**Figure (VI.2) : Test de 3-NPF sur les souches bactériennes étudiées**

Le tableau (VI.2) présente les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour chaque souche bactérienne.

**Tableau (VI.2) : Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes.**

Concentration (mg/ml)	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Klebsiella
25	15.45	16.2	07.5	07
20	12.5	12	06	06.2
10	09	08.8	05.1	06
2	07.6	07.5	00	05.2
0.2	05.7	06	00	05

On remarque du tableau que les quatre souches bactériennes sont peu sensibles envers 3-nitrophenylferrocène :

**Echerichia coli** : 3-NPF a une importante activité sur *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 15.45 mm pour 25mg/ml et 5.7 mm pour 0.2mg/ml.

**Pseudomonas aeruginosa** : 3-NPF a une activité antibactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa* proche à celle obtenue avec *Escherichia coli*, et ça se traduit par les mêmes diamètres de zone d'inhibition pour toutes les concentrations.

**Enterococcus faecalis et Klebsiella pneumoniae** : 3-NPF a une activité négligeable sur *Enterococcus faecalis* et sur *Klebsiella pneumoniae*.

- **4-Nitrophenylferrocène** :

Le tableau (VI.3) présente les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour chaque souche bactérienne.

**Tableau (VI.3) : Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes.**

Concentration (mg/ml)	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Klebsiella
25	14.8	15.6	06.2	06
20	12.2	13.5	06	05
10	08	09.7	00	00
2	07	07	00	00
0.2	06	06	00	00

On remarque dans le tableau que :

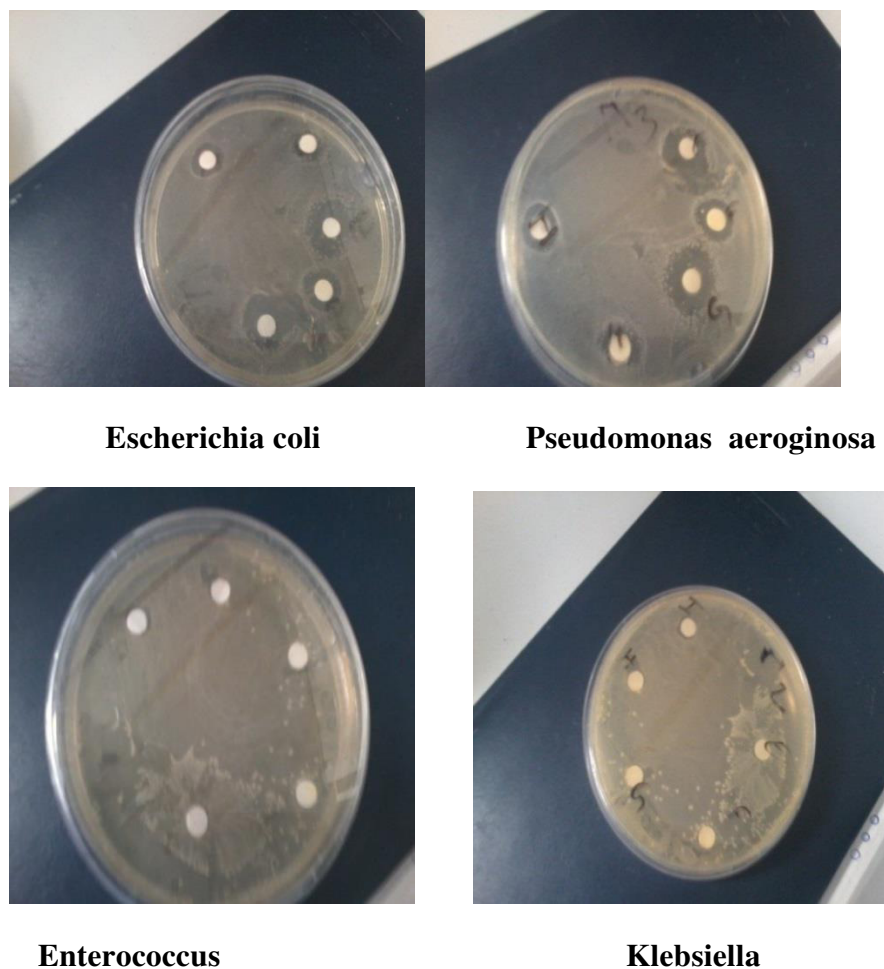
**Echerichia coli** : 4-NPF est actif sur *Escherichia coli*.

**Pseudomonas aeruginosa** : 4-NPF possède une activité importante vis-à-vis *pseudomonas aeruginosa*.

**Enterococcus faecalis** : 4-NPF est actif sur *Enterococcus faecalis* à partir de concentration égale à 20 mg/ml avec un diamètre de zone d'inhibition de 6mm. Avec les concentrations de 10 mg/ml, 2 mg/ml et 0.2mg/ml, aucune activité n'est signalée.

**Klebsiella pneumoniae** : 4-NPF possède une activité sur *Klebsiella pneumoniae* négligeable avec des diamètres de zones d'inhibition de 6 mm pour une concentration de 25mg/ml et 5mm pour une concentration de 20 mg/ml, pour les autres concentrations, pas de zones d'inhibition.





**Figure (VI.3) : Test de 4-NPF sur les souches bactériennes étudiées.**

- **3-ferrocénylaniline :**

Le tableau (VI.4) présente les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour chaque souche bactérienne.

**Tableau (VI.4) : Diamètres des zones d'inhibition des quatre souches bactériennes.**

<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>Escherichia coli</b>	<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	<b>Enterococcus faecalis</b>	<b>Klebsiella</b>
<b>20</b>	13.6	08	08.9	08
<b>10</b>	11.8	07	07.2	07.2
<b>2</b>	08.6	06	06.5	07
<b>0.2</b>	07	00	06	05.8

On remarque du tableau, que les quatre souches bactériennes sont peu sensibles envers 3-ferrocénylaniline :

**Escherichia coli** : 3-FA a une activité remarquable sur *Escherichia coli* ; les diamètres des zones d'inhibition allant de 13.6 mm au 7mm pour des concentrations respectivement allant de 20mg/ml à 0.2mg/ml.

**Pseudomonas aeruginosa**, **Enterococcus faecalis** et **Klebsiella pneumoniae** : 3-FA possède une faible inhibition de croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*.



**Escherichia coli**



**Pseudomonas aeruginosa**



**Enterococcus**



**Klebsiella**

**Figure (VI.4) : Test de 3-FA sur les souches bactériennes étudiées.**

**VI.B.4. Interprétation des résultats et conclusion :**

A partir des valeurs des diamètres des zones d'inhibition de croissance des souches bactériennes étudiées, ainsi que les concentrations correspondantes des produits testés comme antibactériens, on peut dire que, les composés testés n'ont montré aucune activité significative contre les quatre souches bactériennes testées. Cela peut être attribué au faible caractère de lipophilie des composés, qui ne favorise pas leur perméation à travers la couche lipidique de membranes bactériennes [06], donc 2-NPF, 3-NPF, 4-NPF et 3-FA ne peuvent pas utilisés comme antibiotiques pour inhiber les souches étudiées : *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Entérocooccus faecalis* ATCC29212 comparés aux antibiotiques standard (annexe 02).

**Références bibliographiques:**

[01]: Académie des sciences, la maîtrise des maladies infectieuses. Un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique, sous la direction de Gérard Orth et Philippe Sansonetti, (2006).

[02]: Bactériologie, Niveau DCEM1, service de bactériologie, *Faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie*, (2002-2003).

[03]: Les bactéries résistantes aux antibiotiques, la note d'analyse n°299, Novembre, *Centre d'analyse stratégique, France*, (2012).

[04] : Comité de l'antibiogramme de la société française, Membres : Richard Bonnet, Jean-Pierre Bru, François Caron..., coordonnateur : François Jehl, *Hôpitaux universitaires de Strasbourg*, (2015).

[05] : A. Brouqui, Antibiothérapie : principes généraux (173), Faculté de médecine de Marseille, ( 2005).

[05] : K. Rhayour, Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, *thèse de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, -Fès-Maroc*, (2002).

[06]: M.Zaheer, A. Shah, Zareen Akhter, R. Qureshi, B. Mirza, M. Tauseef and M.Bolte, Synthesis, characterization, electrochemistry and evaluation of biological activities of some ferrocenyl Schiff bases, *Appl. Organometal. Chem.*, 25 : 61–69, (2011).

## Conclusion générale

Le but de notre travail était de synthétiser des molécules ferrocéniques à partir de l'arylation de ferrocène et d'évaluer leurs activités antioxydante et antibactérienne.

La première partie de ce mémoire a été consacrée à la synthèse de cinq dérivés ferrocéniques : 2-nitrophenylferrocène (2-NPF), 3-nitrophénylferrocène (3-NPF), bis-3-nitrophenylferrocène, 4-nitrophenylferrocène et 3-ferrocénylaniline.

Dans la seconde partie, nous avons testé l'ensemble de ces composés en tant qu'antioxydants par des tests de piégeage des radicaux libres en solution : le radical anion superoxyde par voltammétrie cyclique, le radical DPPH par spectrophotométrie ainsi que le test de phosphomolybdate et en tant qu'antibactériens en suivant l'inhibition de la croissance de quatre souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC25922 *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons résumer les conclusions issues de cette étude comme suit :

- L'arylation de ferrocène est une voie promotrice conduit à la conception d'une diversité de molécules ferrocéniques qui trouvent leurs applications dans des domaines multiples.
- L'évaluation de l'activité antioxydante des dérivés ferrocéniques a montré un effet antioxydant pour le radical superoxyde ainsi que pour le radical DPPH : 4-nitrophénylferrocène possède une activité inhibitrice élevée du radical superoxyde avec une CI50 égale à 1.178mg/ml et une capacité totale antioxydante avec un pourcentage d'inhibition du radical superoxyde égale à 19.44%, 2-nitrophénylferrocène possède la capacité de piégeage du radical DPPH la plus élevée avec une CI50 de 0.778mg/ml, et il constitue au même temps le plus fort réducteur de phosphomolybdène avec une CI50 de 26.323mg/ml.
- L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne des dérivés ferrocéniques étudiées a montré un effet antibactérien plus ou moins négligeable par rapport aux antibiotiques standards utilisés.

Les résultats obtenus peuvent nous orienter vers d'autres voies de synthèse, on va s'intéresser par la synthèse de nombreux dérivés en modifiant la nature des substituants du ferrocène : aromatiques, groupe attracteurs d'électrons, nombre de ferrocènes dans la molécule en vue d'augmenter leur activité biologique

## **ANNEXES**

---

---

**ANNEXE 01 : Spectres RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT).**

**ANNEXE 02 : Test de quelques antibiotiques standards sur les souches bactériennes étudiées.**

## Test de quelques antibiotiques (ATB) standards pour les souches bactériennes d'étude :

➤ *Escherichia coli* ATCC25922 :

Tableau (01) : Diamètres des zones d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC25922.

ATB	Code ATB	Concentration d'ATB ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Diamètre de zone d'inhibition (mm)
Colistine	CZ	10	20
Cotrimoxazol	SXT	25	0
Chloramphenicol	C	30	30
Ofoxacine	OFX	5	31
Amikacine	AN	30	25
Cefotaxime	CTX	30	29
Amoxicilline	AML	25	25
Gentamicine	CN	10	23
Imipenem	IPM	10	33

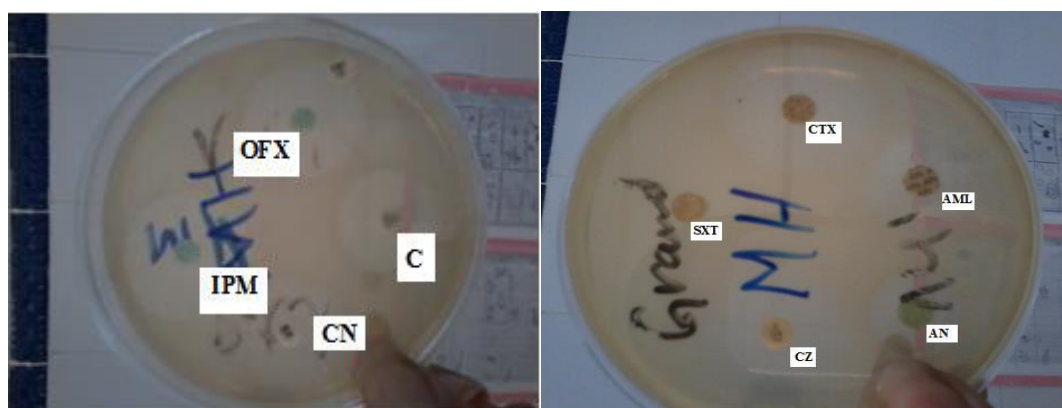


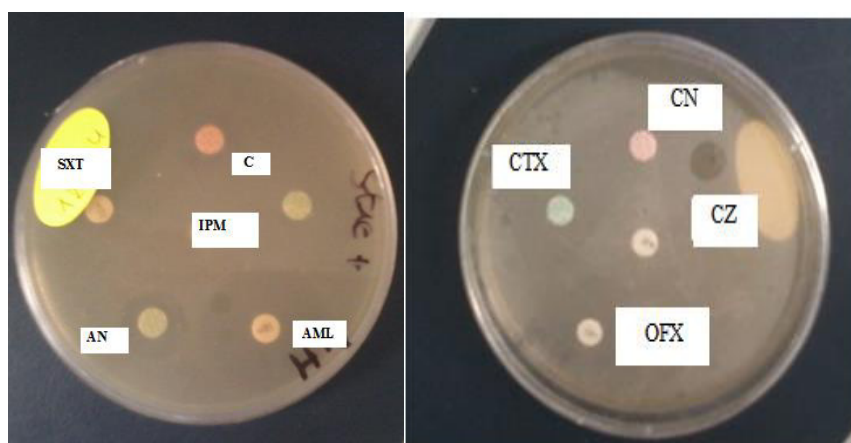
Figure (01) : Test des ATB sur *Escherichia coli* ATCC25922.

➤ *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 :



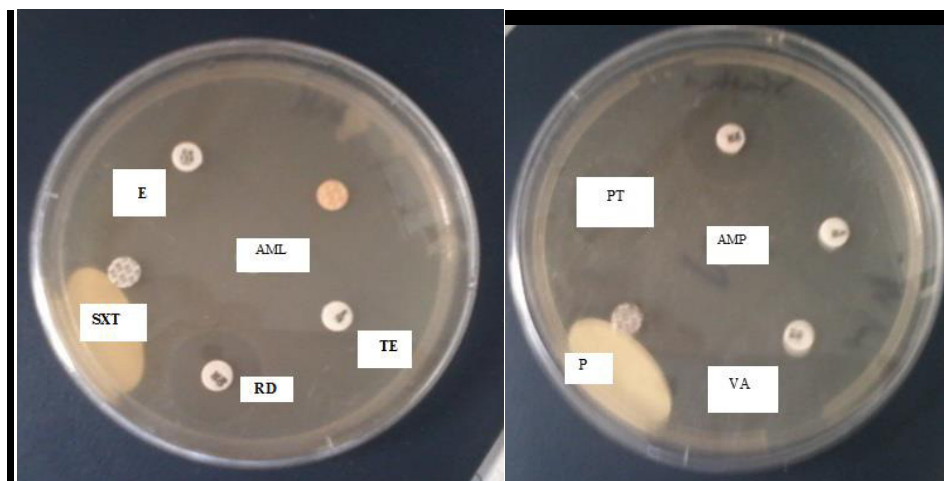
Tableau(02) : Diamètres des zones d'inhibition de *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603

ATB	Code ATB	Concentration d'ATB ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Diamètre de zone d'inhibition (mm)
Chloramphenicol	C	30	19
Cotrimoxazol	SXT	25	0
Ofoxacine	OFX	5	18
Imipenem	IPM	10	28
Amikacine	AN	30	27
cefotaxime	CTX	30	24
Gentamicine	CN	10	20
Amoxicilline	AML	30	30
Colistine	CZ	10	22

Figure (02) : Test des ATB sur *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603.

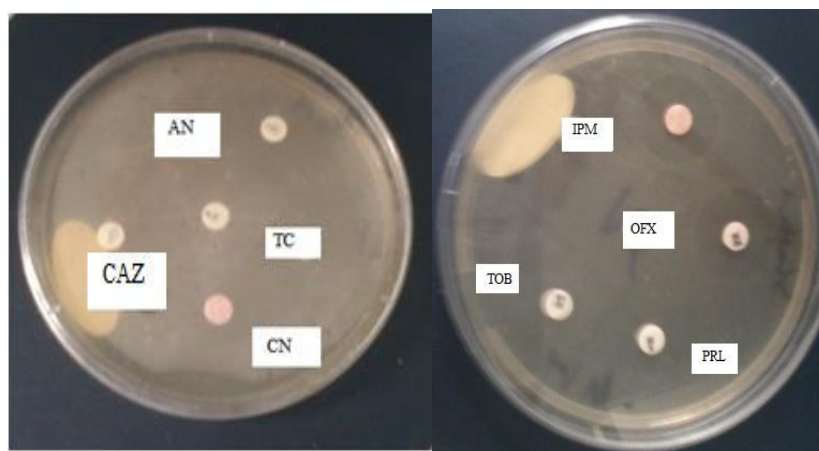
➤ *Entérocooccus faecalis* ATCC29212 :Tableau (03) : Diamètre d'inhibition d'*Entérocooccus faecalis* ATCC29212

ATB	Code ATB	Concentration d'ATB ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Diamètre de zone d'inhibition (mm)
Penicilline	P	10	17
Ampicilline	AMP	10	21
Erythromycine	E	15	0
Pristinamycin	PT	15	16
Cotrimoxazol	SXT	25	24
Vancomycine	VA	30	19
Rifampicine	RD	5	20
Tétracycline	TE	30	17
Amoxicilline	AML	25	22

Figure (03) : Test des ATB sur *Entérocooccus faecalis* ATCC29212.

➤ *Pseudomonas aeruginosa* :Tableau (04) : Diamètres des zones d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa*

ATB	Code ATB	Concentration d'ATB ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Diamètre dzond'inhibition (mm)
Ticarcilline	TC	75	21
Piperacilline	PRL	100	15
Ceftazidime	CAZ	30	0
Imipenem	IPM	10	23
Gentamicine	CN	30	18
Tobramycine	TOB	10	0
Amikacine	AN	30	21
Ofoxacine	OFX	5	19

Figure (04) : Test des ATB sur *Pseudomonas aeruginosa*.