

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre :

N° de série :

MÉMOIRE

En vue de l'obtention du

DIPLÔME DE MASTER

Spécialité: Analyse Protéomique et Santé

THÈME

***Purification, Caractérisation et Evaluation de
L'activité Antimicrobienne D'une Nouvelle Molécule
Bioactive Ferrocénique Synthétique Chirale***

Présenté par :

AZIZA NABILA et ABDICHE NADIA

Soutenu le : 25/06/2014

Devant la commission d'examen:

<i>Président</i>	<i>: Mme Mechakra A. professeur</i>	<i>Université Constantine 1</i>
<i>Encadreur</i>	<i>: Mme Mouas T. N. maitre de conférence B</i>	<i>Université Constantine 1</i>
<i>Examineur</i>	<i>: Mr Kitouni R. maitre assistant A</i>	<i>Université Constantine 1</i>

Année Universitaire

2013-2014

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier DIEU tout puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

Nous souhaitons remercier Madame le Docteur Mouas Toma Nardjes pour nous avoir accueilli au sein du Département de biochimie de l'Université Constantine1 pour effectuer ce travail de recherche et le valoriser au mieux.

Nous remercions les professeurs Mme Mechakra A. professeur à l'université Constantine 1 et M Kitouni R. maitre assistant à l'université Constantine 1 de nous faire l'honneur de juger ce travail.

Nous remercions l'Université Constantine1 pour son soutien financier.

Nous tenons à remercier M. D. Khelifi, professeur à l'université Constantine1, pour nous avoir accueillies dans son laboratoire.

Nous remercions tous les professeurs et maitres assistants qui nous ont guidé tout au long de nôt études, jusqu'à d'obtention du Diplôme de Master.

Nous finissons par remercier nôt parents pour l'aide qu'ils nous ont apporté tout au long de nôtre vie.

AZIZA NABILA
ABDICHE NADIA

Dédicace

Avec tout respect et amour je dédie ce modeste travail

A Dieu (ALLAH)

L'Unique, le Tout-Puissant, le Clément et le Miséricordieux,

« Qu'il nous couvre de sa bénédiction ».

AMEN!

Au Prophète Mouhamed

Notre guide et notre exemple bien-aimé.

Qu'il nous oriente dans le droit chemin.

A mon Très Chère Père « Salah Salem » ;

Qui a dépensé toute sa vie pour nous assurer une éducation exemplaire.

A ma Vaillante et Bonne Mère « Samira »,

Mon refuge permanent dans mes moments de faiblesse devant l'adversité.

A mon frère « Nasser eddine » et mes sœurs « Chaima » et « Yousra »

Plus que frère et sœurs, vous êtes mes amis, mes confidentes, et mes complices.

A tous ceux qui me sont chers

*« Non, je n'ai pas échoué, j'ai simplement découvert 2000
méthodes qui ne fonctionnent pas ! » Thomas Edison*

AZIZA NABILA 

Dédicace

Merci à Dieu, ma carrière a terminé l'enseignement.

Je dédie ce travail

A ma très chère mère qui m'a apportée son amour et son affection

A mon très cher père qui m'a toujours encouragé, conseillé et soutenu dans mon travail

A mon cher mari Mohamed, qui m'a beaucoup encouragé dans ce travail

A mes très chers grands parents

A mes très chers frères : Nadjib, Salim, Abdenacer, Billel, Abdelbasset et LouAI.

A mes chères belles sœurs : Khadidja, Mouna

Et à toutes les familles Abdiche et Khalfatni

A mes cher(es) ami(es) : mon binôme Nabila, Naïma, Nassima, Amel, Sarra, Kawther, Radia, Asma, Ratiba.

ABDICHE NADIA

SOMMAIRE

Sommaire

Sommaire	I
Abréviations.....	V
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux.....	XI
Introduction	1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La chiralité	
1.1. Historique	3
1.2. Définition	4
1.3. Enantiométrie	4
1.3.1. Nomenclature de Cahn Ingold prelog (CIP).....	4
1.3.2. Propriétés physico-chimiques	4
1.3.3. Propriétés biologiques.....	5
1.4. Types de chiralité	6
1.5. La chiralité planaire	6
2. Le ferrocène	
2.1. Historique	6
2.2. Structure	7
2.3. Synthèse	7
2.4. Propriétés physico-chimiques	7
2.5. Applications biologiques	8
3. La fonction Thio /Ditiophosphorique	
3.1. Historique.....	9
3.2. Structure	9
3.3. Synthèse	10
3.4. Applications biologiques	11
4. La molécule (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphi- natométhyl) ferrocène	
4.1. Structure	12
4.2. Synthèse	12
4.3. Caractérisation structurale	13
5. Méthode d'analyses chimiques	
5.1. Purification.....	18
5.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	18
5.1.2. Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	18
5.2. Caractérisation structurale.....	19
5.2.1. La spectroscopie UV.....	19
5.2.2. La spectroscopie IR.....	19
6. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne.....	20

6.1.	l'aromatogramme.....	20
6.2.	Méthode du puits ou cylindre.....	20
6.3.	Méthode de dilution.....	21
7.	les microorganismes testés	
7.1.	Bactéries Gram (+)	22
7.2.	Bactéries Gram (-)	22
7.3.	Champignons	23
8.	Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme	24

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1.	Matériel d'étude	
1.1.	Matériel chimique	26
1.2.	Matériel biologique	26
1.3.	Matériel de laboratoire	27
2.	Méthode d'étude	
2.1.	Purification du (R/S)-II.....	27
2.1.1.	Chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	27
2.1.2.	Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	27
2.2.	La recristallisation du (R/S)-II.....	27
2.3.	Caractérisation structurale du (R/S)-II	28
2.3.1.	La spectroscopie UV	28
2.3.2.	La spectroscopie IR	28
2.4.	Application biologique du (R/S)-II	28
2.4.1.	La technique d'étude de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II.....	28
2.4.2.	Préparation des souches	28
2.4.3.	Préparation des dilutions.....	29
2.4.4.	Protocole de l'étude de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II.....	29
2.4.4.1.	Première essai.....	29
2.4.4.2.	Deuxième essai.....	30
2.4.5.	L'antibiogramme	30

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

1.	Purification du (R/S)-II	
1.1.	Contrôle de la pureté du (R/S)-II par CCM.....	31
1.2.	La purification du (R/S)-II par CC	32
2.	La recristallisation du (R/S)-II	33
3.	Caractérisation structurale du (R/S)-II	
3.1.	L'analyse par la spectroscopie UV	33

3.2. L'analyse par la spectrophotométrie IR	34
4. L'évaluation de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II	
4.1. Résultat du premier essai	37
4.2. Optimisation du protocole de travail.....	38
4.3. Résultats du deuxième essai	39
5. L'antibiogramme	41

DISCUSSION

1. Purification	44
2. Caractérisation structurale.....	45
3. Activité antimicrobienne	46
4. Antibiogramme	47

CONCLUSION GENERALE	48
----------------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49
--	----

ANNEXES	58
----------------------	----

المخلص	64
---------------------	----

Abstract	65
-----------------------	----

RESUME	
---------------	--

Abréviations

(R/S)-I	(R/S)(2-diphénylthiophosphoryl) ferrocenyl methyl diméthylammonium diphenyldithiophosphinate [Fe(C ₅ H ₅)(C ₂₀ H ₂₂ NPS)]-(C ₁₂ H ₁₀ PS ₂)
(R/S)-II	(R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinatométhyl) ferrocène C ₃₅ H ₃₀ FeP ₂ S ₃
AMC	Amoxicillin
B	Bacillus
C ₂ H ₅	Ethyl
C ₆ H ₆	Benzène
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie préparative sur couche mince
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CH ₂ SPSPPh ₂	méthylthiodiphénylphosphine sulfide
CH ₃	Methyl
CH ₃ OH	Méthanol
CIP	Cahn Ingold Prelog
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Cp	Cyclopentadiène
CTX	Cefotaxime
DCM	Dichlorométhane
DMAF	Dimethyle Amine Ferrocène
DMSO	Diméthylsulfoxyde

Do	Densité optique
E. coli	Escherichia coli
Fc	Ferrocène
GN	Gentamicines
h	Heure
IPM	Imipenème
IR	Infrarouge
J	jours
LC3	Laboratoire de Ligands Chiraux, Complexes et Catalyse
M	Morganella
MH	Mueller Hinton
MS	Spectrométrie de masse
NA	Nalidixique
P	Proteus
P(S) Ph ₂	thiophosphine
Ph	Phényle
R	Radical
R ₃ P=S	Sulfures de phosphines tertiaires
R _f	Le rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Sp	Species
-S-P(S) Ph ₂	Dithionophosphorique
Sr	Spiromycine
TBP	Tributylphosphatè

TBPO	Tributylphosphine oxide
TOPO	Trioctylphosphine
UV	Ultraviolet
Y ₃ P	Phosphore tri-coordonnés
Y ₄ P	Phosphore tétra-coordonnés

Liste des figures

Schéma 1 : Les différents types d'isomères.....	3
Figure 1 : Représentation de la 'chiralité'.....	4
Figure 2 : Composés organiques pour lesquels quatre substituants différents ($R^1 - R^2$) sont liés à un carbone tétraédrique	4
Figure 3 : Propriétés biologiques des énantiomères	5
Figure 4 : Type d'interactions des (-/+) épinéphrine avec le récepteur α -adrénergique....	5
Figure 5: Sélectivité enzymatique de l'enzyme acide lactique déshydrogénase	5
Figure 6 : La thalidomide (R/S)	5
Figure 7 : Exemples de composés présentant une chiralité planaire	6
Figure 8 : Représentations du ferrocène.....	7
Schéma 2 : Synthèse du ferrocène.....	7
Figure 9 : Représentation de la chiralité planaire dans les dérivés ferrocéniques	7
Figure 10: La molécule Fc- pénicilline et la molécule Fc- céphalosporine	8
Figure 11 : le ferrocénone.....	8
Figure 12 : La chloroquine et le ferroquine.....	8
Figure 13 : Les sulfures de phosphines tertiaires.....	10
Figure 14 : Disulfures de phosphines secondaires	10
Figure 15 : La structure du composé (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophonatométhyl) ferrocène	12
Figure 16 : Vue globale d'une rampe à vide.....	12
Figure 17: Synthèse sous atmosphère inerte du (R/S)-II ; techniques Schlenk.....	12
Figure 18 : Filtration du produit final; le (R/S)-II.....	13
Schéma 3 : Synthèse du (R/S)-II	13
Figure 19 : Spectre RMN 1H du composé (R/S)-II.....	14
Figure 20 : Spectre RMN ^{31}P du composé (R/S)-II.....	15

Figure 21:	Spectre de fragmentation en spectroscopie de masse à haute résolution ESI+ du composé (R/S)-II.....	16
Figure 22:	Vue ORTEP de l'unité asymétrique du (R/S)-II.	17
Figure 23:	La plaque CCM après développement, avant et après visualisation par la lampe UV.....	31
Figure 24 :	Purification du (R/S)-II par chromatographie CC.....	32
Figure 25 :	La recristallisation du composé R/S-II.....	33
Figure 26 a :	Concentration du composé dans l'échantillon analysé, calculée par l'appareil UV.....	33
Figure 26 b :	Spectre de l'analyse spectroscopique UV du (R/S)-II.....	34
Figure 27 :	Spectre de l'analyse spectroscopique IR du (R/S)-II.....	35
Figure 28 :	Action du (R/S) II sur le <i>Bacillus Sp</i> au premier essai	37
Figure 29:	Action du (R/S) II sur <i>E. coli</i> au premier essai.....	37
Figure 30 :	Teste de vitesse de diffusion du Dichlorométhane avec différents solvants...38	
Figure 31-35 : Activité antimicrobienne du (R/S)-II pour le deuxième essai :		
Figure 31:	<i>P. aeruginosa</i>	40
Figure 32:	<i>Proteus Sp</i>	40
Figure 33:	<i>K.pneumonia</i>	40
Figure 34:	<i>A.Niger</i>	40
Figure 35:	<i>F. oxysprium</i>	40
Figure 36-38 : Les résultats de l'antibiogramme pour les bactéries Gramme positif :		
Figure 36:	<i>S. aureus</i>	42
Figure 37:	<i>S. aureus 2S</i>	42
Figure 38:	<i>Bacillus Sp</i>	42
Figure 39-43 : les résultats de l'antibiogramme pour les bactéries Gramme négatif :		
Figure 39:	<i>E. coli</i>	43

Figure 40:	<i>K. pneumonia</i>	43
Figure 41:	<i>P. aeruginosa</i>	43
Figure 42:	<i>Proteus Sp</i>	43
Figure 43:	<i>M. marganii</i>	43
Figure 44 :	Chromatogramme CCM après développement, observé sous UV.....	44
Figure 45 :	Elution du (R/S)-II par Chromatographie CC	44
Figure 46 :	La lampe d'UV de type UVSL-58	62
Figure 47:	le spectromètre UV BIOWAVE biochrom	62
Figure 48 :	le spectromètre IR type FTIR -8201 PC Shimadzu	63
Figure 49 :	Rotavapor BUTCHI de type R II.....	63

Liste des tableaux

Tableau 1 : Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H , du composé (R/S)-II.....	14
Tableau 2 : Identification des longueurs d'ondes d'absorption dans le domaine UV des groupements fonctionnels du (R/S)-II	34
Tableau 3 : Fréquences de vibration dans le domaine IR des groupements fonctionnels du (R/S)-II.....	36
Tableau 4 : Teste de miscibilité du Dichlorométhane avec différents solvants	38
Tableau 5 : Teste de miscibilité du mélange (Dichlorométhane/DMSO) avec l'eau	38
Tableau 6 : Activité antimicrobienne du (R/S)-II pour le deuxième essai	39
Tableau 7 : Les résultats de l'antibiogramme	41
Tableau 8 : Données cristallographiques et résultats de l'affinement du composé $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{FeP}_2\text{S}_3$	59

INTRODUCTION

La découverte de molécules à finalité thérapeutique, implique une approche pluridisciplinaire et complexe, associant de manière interactive des compétences en biologie, en pharmacologie et en chimie. Dans cette approche, la chimie de synthèse occupe une position centrale pour fournir des produits naturels peu abondants et explorer de nouvelles structures moléculaires, ainsi que pour développer des molécules actives à partir de données obtenues par la biologie structurale.

Le besoin croissant en principes actifs plus performants, a conduit au développement de nombreuses nouvelles technologies dans l'industrie pharmaceutique. Notamment, les récentes avancées de la génomique, des techniques de criblage et combinatoires, et de la miniaturisation de ces procédés, ouvrent désormais des perspectives inédites pour le développement d'approches thérapeutiques innovantes. Ce potentiel ne sera pleinement exploité que si des molécules sont conçues et sélectionnées pour agir spécifiquement sur les cibles (gènes ou protéines) dont l'activation ou l'inhibition conduira à un effet thérapeutique.

Un effort important doit être fait dans la recherche de nouvelles méthodes efficaces et pertinentes du point de vue économique et écologique, permettant la synthèse de molécules complexes. Néanmoins, cet effort ne peut être réellement profitable que s'il est fait en concertation d'une part avec les autres secteurs académiques (biochimie, biologie...) mais aussi en concertation étroite avec les entreprises innovantes et les industriels de la pharmacie, non seulement pour le choix de cibles pertinentes, mais aussi pour l'évaluation et la valorisation. La coordination de ces efforts doit permettre la montée en puissance des recherches et en augmenter fortement la visibilité.

Pour pallier à la problématique posée, notre effort portera dans un premier temps sur la conception de nouvelles méthodologies de synthèses organiques qui visent à appliquer les principes d'économie d'étapes, et l'économie d'atomes par l'utilisation de réactions en cascades, catalysée par des métaux de transition. Ce concept permet d'aller de la simplicité réactionnelle, à la complexité d'édifices moléculaires en un minimum d'étapes, avec une grande efficacité. Par conséquent, Nos objectifs seront les suivants :

- Identifier des classes originales d'agents thérapeutiques
- Développer de nouvelles méthodologies de synthèse rapides et sélectives, afin d'accéder aux molécules ayant des activités biologiques significatives dans le domaine des anticancéreux, des antibiotiques et des antibactériens, que nous ciblons de la manière la plus efficace possible, selon le principe de la Synthèse Orientée par la Fonction biologique.

- Etudier en concertation avec des équipes de biologie cellulaire, cancérologie et cardiologie, le mode d'action de nos composés et chercher à définir le potentiel thérapeutique de nos molécules afin de les valoriser.

Pour mener à bien nos objectifs, nous nous sommes consacrées dans ce mémoire à présenter une nouvelle méthode de synthèse d'une molécule bioactive à chiralité planaire originale, sa caractérisation par différentes méthodes spectroscopiques, ainsi que l'évaluation de son potentiel antimicrobien, comme première approche biologique de son activité, et pour se faire nous avons divisé notre mémoire en trois grandes parties :

- Une première partie bibliographique qui portera sur les notions de : chiralité, l'édifice ferrocénique, les fonctions organiques cibles, les principes des méthodes de caractérisation structurales utilisées, les souches microbiennes testées et les spectres des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.

- Une deuxième partie matériel et méthodes où nous établirons les différents protocoles nécessaires à : la purification, la caractérisation structurale et l'évaluation du spectre antimicrobien comparé à celui d'un antibiogramme de notre nouvelle molécule bioactive.

- Une troisième partie qui discutera les résultats obtenus, tout en les commentant, afin d'aboutir à une conclusion générale sur cette première approche de l'élaboration de molécules bioactives, et de leurs valorisation, tout en projetant d'autres perspectives de recherche pour l'avenir.

CHAPITRE I

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

2. La chiralité

2.1. Historique

Louis Pasteur (**C. Andréet et al, 2006, a**), en résolvant l'énigme de l'isomérisie des acides tartrique et racémique 1848, a levé le voile sur la structure tridimensionnelle de certaines molécules, dont l'action sur la lumière polarisée lui faisait penser qu'elles devaient être non superposables à leur image dans un miroir. Le concept pastorien de dissymétrie moléculaire (ou de **chiralité**, comme on dit aujourd'hui) a été matérialisé un quart de siècle plus tard par le carbone asymétrique de Le Bel et van't Hoff; il a constitué l'une des pièces du puzzle qui a conduit les savants du XIX^e siècle à adopter définitivement la théorie atomique et à établir sur cette base les principes structuraux qui gouvernent la construction des molécules, selon une vision guère différente de celle que nous connaissons aujourd'hui. C'est ainsi qu'est née la chimie dans l'espace, alias stéréochimie, ainsi nommée par Victor Meyer en 1888 (**C. Andréet et al, 2006, b**).

La **stéréochimie** est le domaine de la chimie qui étudie les représentations tridimensionnelles des molécules, ainsi que les mécanismes de réaction en trois dimensions. La **stéréoisomérisie** (ou isomérisie stérique) se rapporte donc aux molécules, dont la structure est en deux dimensions (l'enchaînement des atomes est identique, mais l'arrangement spatiale est différent). Ces molécules sont appelées des stéréoisomères (**G. Stéphane et al, 2008**).

L'analyse conformationnelle cherche à connaître le degré de flexibilité ou de rigidité de l'édifice, et à établir quelles sont ses formes — ou conformations — les plus stables (**J. Brettar, 2004**).

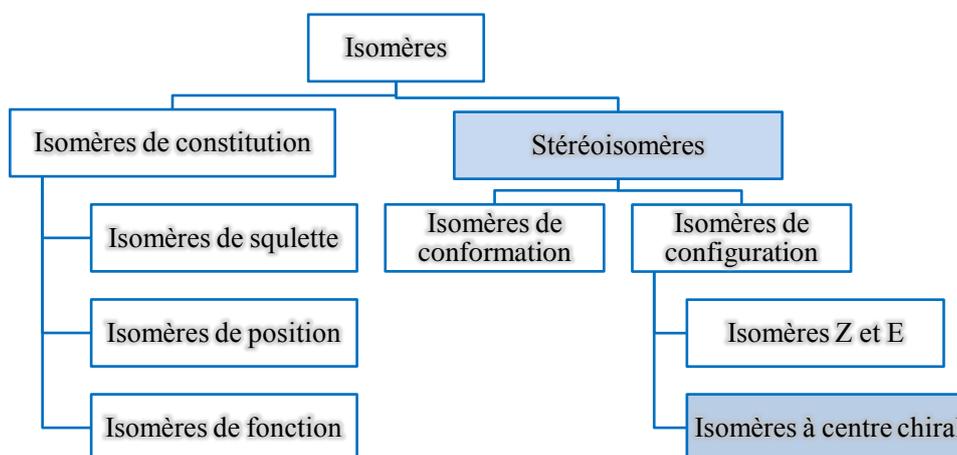


Schéma 1 : Les différents types d'isomères

2.2. Définition

Le mot **chiral** vient du grec "kheir" qui signifie « main » (**G. Stéphane et al, 2008**), il est défini pour la première fois en 1893 par Lord Kelvin (**M. Fayna et al, 2011**). Il qualifie une structure dépourvue de tout élément de symétrie et qui, par voie de conséquence, n'est pas superposable à son image dans un miroir. L'exemple le plus immédiat, est donné par le couple main gauche/main droite (**Q. Françoise et al, 2011**) (figure 1).

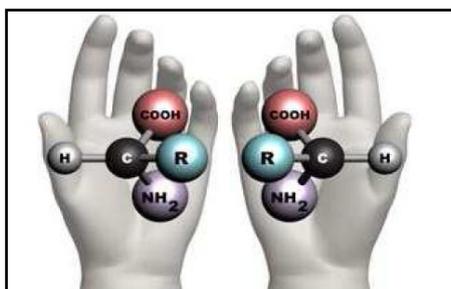


Figure 1 : Représentation de la 'chiralité'.

Les molécules chirales sont très courantes en chimie organique et biologique, et cette particularité est liée à la présence d'un atome de "carbone asymétrique", où quatre substituants différents sont liés à un carbone tétraédrique (figure 2), appelé centre chiral asymétrique. La chiralité au carbone est la plus connue, mais ce n'est pas la seule (**M. Fayna et al, 2011; T. N. Mouas, 2013**).

2.3. L'énantiométrie

Les énantiomères sont des molécules stéréoisomères qui sont l'image spéculaire l'une de l'autre dans un miroir plan: toute molécule chirale existe sous deux formes énantiomères R et S.

2.3.1. Nomenclature de Cahn Ingold prelog (CIP)

En 1856, Richard Cahn, Christopher Ingold et Vladimir Prelog ont défini les règles de nomenclature des énantiomère (**M. Fayna et al, 2011**). On exprime la configuration absolue d'une molécule chirale par R ou S, en appliquant les règles séquentielles, qui permettent de classer tous les substituants selon un ordre décroissant de priorité. A la suite de l'orientation des structures de manière à ce que le groupe de masse moléculaire la plus basse soit le moins prioritaire et pointe par conséquent vers l'arrière,

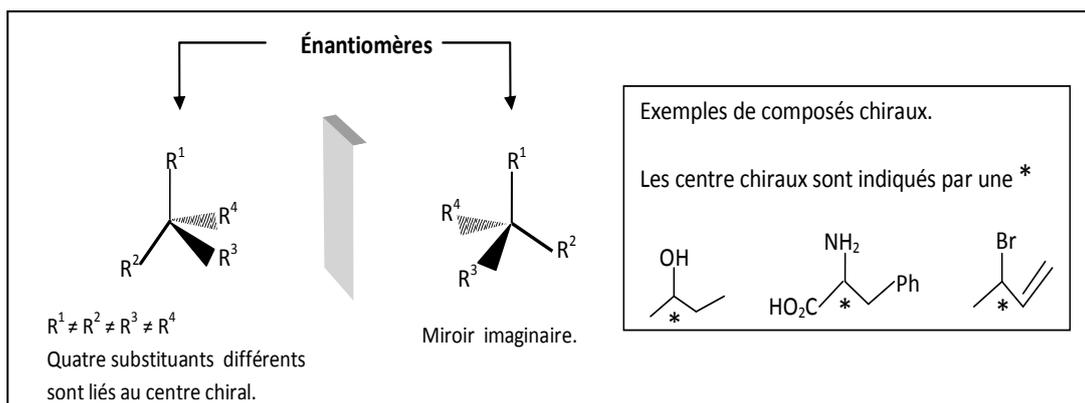


Figure 2 : Composés organiques pour lesquels quatre substituents différents ($R^1 - R^2$) sont liés à un carbone tétraédrique.

on provoque l'apparition des substituant restants selon les deux seule façons possibles: leur arrangement séquentiel est, soit dextrorse (R), soit sinistrose (S).

2.3.2. Propriétés physico-chimiques

A l'exception du pouvoir rotatoire ou l'activité optique, ils ont des propriétés physiques identiques tel que: masse volumique, divers types de spectres, point de fusion, température d'ébullition, solubilité dans l'eau, et dans les solvants ordinaires,... etc. Les énantiomères ont également des propriétés chimiques identiques, sauf lorsque la notion de chiralité intervient c'est-à-dire lorsqu'ils rencontrent une autre molécule chirale (**G. Stéphane et al, 2008; M. Fayna et al, 2011**).

2.3.3. Propriétés biologiques

Les énantiomères ont des propriétés biologiques différentes, prenons l'exemple du corps humain, qui est constitué de molécules et de biomolécules énantiomériquement pures telles que les protéines, qui sont elles même formées à partir d'énantiomères pur d'acide aminées. Ainsi, dans le corps humain, un énantiomère se trouve dans un environnement chiral qui entraîne une stéréosélectivité des interactions. Les différents énantiomères d'une même molécule, réagiront différemment avec des composés chiraux tels que les protéines. Les sites actifs des enzymes et les récepteurs protéiques des membranes, sont également tous chiraux. Exemple (figure 3) (**M. Fayna et al, 2011**).

Le modèle (figure 4), explique bien pourquoi l'énantiomère (-) de l'épinéphrine (adrénaline), se fixe plus fortement que l'énantiomère (+) à une protéine du corps humain, appelée récepteur α -adrénergique. Quand la (-)-épinéphrine se fixe au récepteur α -adrénergique, elle induit des effets multiples, dont par exemple une augmentation de la pression artérielle (**M. Fayna et al, 2011**).

Le modèle (figure 5), est un autre exemple qui montre la sélectivité réactionnelle; l'enzyme acide lactique déshydrogénase, oxyde l'acide (+)-lactique en acide pyruvique, mais elle n'oxyde pas l'acide (-)-lactique (**G. Stéphane et al, 2008**).

Les énantiomères peuvent provoquer une gamme étendue de réactions biologiques lorsqu'ils sont ingérés par des organismes vivants, et donc, ils se différencient dans de nombreuses activités biologiques. Le goût, l'odeur, la toxicité, les propriétés notamment médicinales, bactéricides, fongicides, insecticides de ces derniers différent souvent considérablement. En voici quelques exemples:

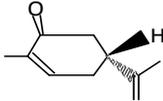
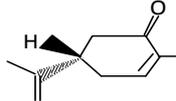
			
	L-(-) carvone	D-(+) carvone	
Température d'ébullition.	227-230°C	227-230°C	Même propriété physique.
Observation de la rotation optique du plan de polarisation.	- 61°	+ 61°	Rotation optique opposée.
Activité biologique (odeur/goût).	Menthe verte.	Carvi, graine de fenouil.	Activité biologique différente (car les récepteurs du goût dans le corps humain sont chiraux).

Figure 3 : Propriétés biologiques des énantiomères.

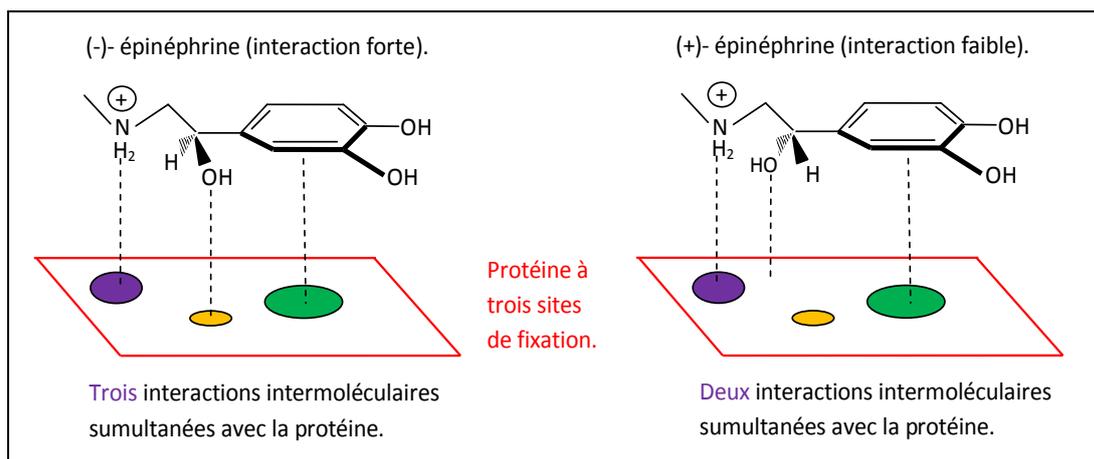


Figure 4 : Type d'interactions des (+/-) épinéphrine avec le récepteur α -adrénergique.

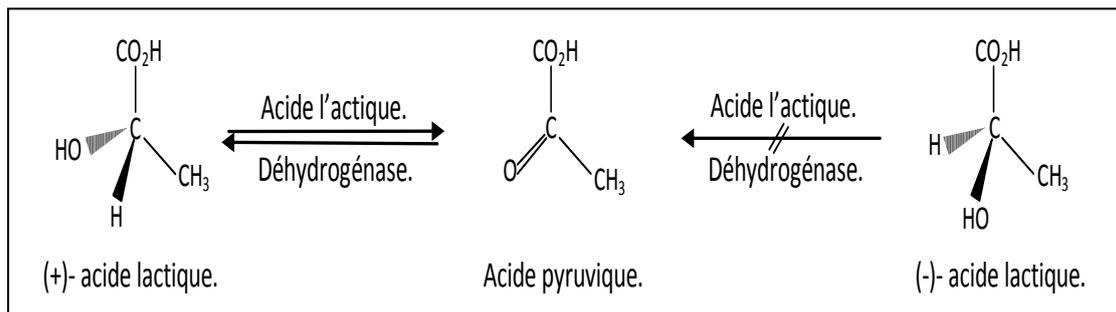
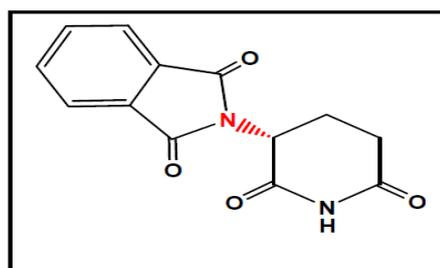
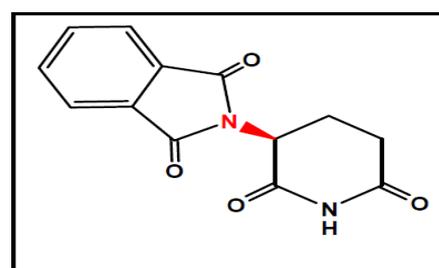


Figure 5 : Sélectivité enzymatique de l'enzyme acide lactique déshydrogénase.



(R)-Thalidomide
Analgésique



(S)-Thalidomide
Tératogène

Figure 6 : La thalidomide (R/S)

l'acide aminé (R)-asparagine a une saveur sucrée, alors que la (S)-asparagine est amère; la (R)-carvone sent la menthe verte, tandis que la (S)-carvone est à l'origine du parfum du carvi; le (S)-naproxène est un important anti-inflammatoire, mais son énantiomère est hépatotoxique ; le (R,R)-chloramphénicol est un antibiotique utile, à l'inverse de son énantiomère qui est sans effet sur les bactéries; le (R,R)-paclobutrazol est un fongicide, alors que son énantiomère est une hormone de croissance végétale; et la (R)-thalidomide est un sédatif et un somnifère, tandis que son énantiomère est un tératogène potentiel, ce dernier, est en effet, un cas dramatique (figure 6), car la thalidomide, est un médicament qui était dans les années 50 donné aux femmes enceintes dans les premiers mois de grossesse pour traiter les nausées et si sa forme (R) est un excellent analgésique, la forme (S) est un poison qui entraînait des malformations de l'enfant qui naissait sans jambe ou sans bras. Ce médicament était donné sous forme racémique d'où les conséquences désastreuses qui ont suivi. Cet exemple pertinent montre qu'il est impératif de pouvoir isoler le bon énantiomère, et c'est tout le principe de la synthèse et de la catalyse asymétrique.

Par conséquent, il est de plus en plus important que les composés chiraux pharmaceutiques, et agrochimiques mis sur le marché, soient des énantiomères individuels plutôt qu'un mélange racémique. Ce besoin a récemment stimulé le développement de nouvelles techniques de synthèse, qui n'aboutissent qu'à un seul énantiomère, un procédé appelé synthèse asymétrique et a aussi mené au développement de nouvelles techniques de séparation des énantiomères provenant des mélanges racémiques, un procédé appelé résolution. **(G. Stéphane et al, 2008)**

2.4. Types de chiralité

On distingue quatre grands types de chiralité : centrée, axiale, planaire et hélicoïdale. Si la molécule présente un arrangement dissymétrique de ses atomes autour d'un centre, d'un axe ou d'un plan, alors celle-ci possède respectivement, une chiralité centrée, axiale ou planaire. Une molécule est à chiralité hélicoïdale, lorsque celle-ci présente une structure en hélice se déroulant soit dans le sens des aiguilles d'une montre soit en sens inverse. **(M. Auge, 2013)**

2.5. La chiralité planaire

La chiralité planaire est engendrée par la présence de plans chiraux dans les molécules. Les plans chiraux doivent contenir le maximum d'atomes possibles de la

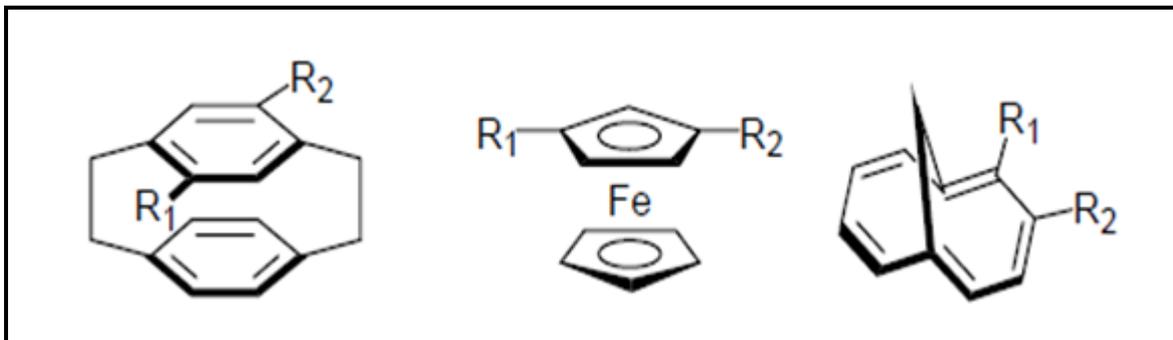


Figure 7 : Exemples de composés présentant une chiralité planaire

molécule, mais il doit y avoir au moins un coordinaat hors de ce plan. Les composés présentant une chiralité planaire, sont essentiellement, des paracyclophanes, des metallocènes et des anulènes pontés. (figure 7) (**J. Brettar, 2004**)

3. Le ferrocène

8.1. Historique

Le ferrocène est un composé organique synthétique. Il a été découvert accidentellement en 1951 par Kealy et Pauson. En effet, il est apparu pour la première fois dans un article célèbre de Kealy et Pauson publié par la revue Nature, le bis-(cyclopentadiényl) fer ou ferrocène (**T. J. Kealy et al , 1951**). Toutefois, sa structure ne fut établie que l'année suivante, par Wilkinson et Woodward (**G. wilkinson, 1952**).

La découverte du ferrocène stimula formidablement le développement de la chimie moléculaire des métaux de transition, car pour la première fois, il devenait évident que ces métaux pouvaient donner des types de liaisons totalement inconnus en chimie organique classique. La simple idée de prendre en sandwich un métal de transition entre deux tranches de molécules organiques aromatiques, était en elle-même tout à fait neuve. (**F. Mathey el al, 2000**)

8.2. Structure

Il a la formule chimique: **Fe(C₅H₅)₂** donc il fait partie de la famille des metallocènes; un type de composés organométalliques, composé de deux cycles pentadiényle, entourant un centre métallique. Ils sont aussi appelés composés sandwich (**R. Dagani, et al, 2001**), sa structure est d'une "remarquable stabilité" (**T. J. Kealy et al, 1951**), due au caractère aromatique du cyclopentadiényle. (figure 8)

8.3. Synthèse

Il est facilement obtenu par réaction du cyclopentadiénure de sodium sur le chlorure de fer anhydre, en milieu étheré. (**T. N. Mouas, 2013**)



Schéma 2 : Synthèse du ferrocène

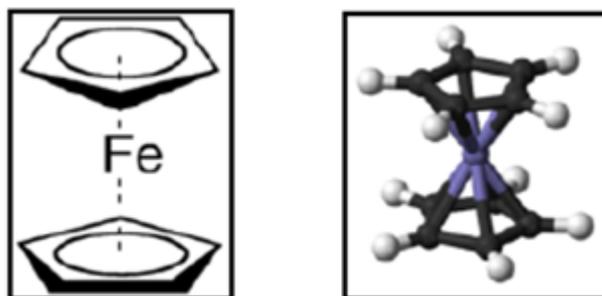


Figure 8 : Représentations du ferrocène

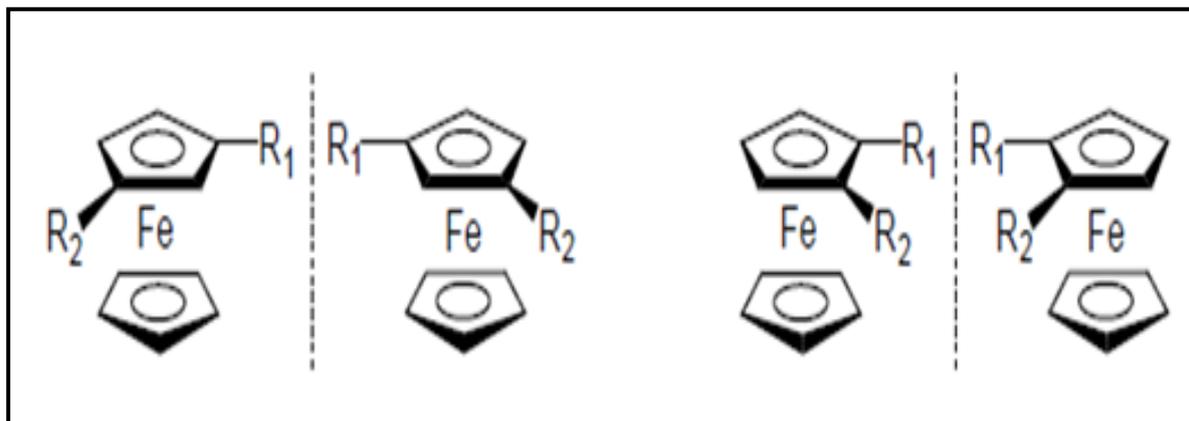


Figure 9 : Représentation de la chiralité planaire dans les dérivés ferrocéniques

8.4. Propriétés physico-chimiques

Le ferrocène, est un solide cristallin, orange, diamagnétique, d'une grande stabilité même à plus de 500°C, qui a été largement utilisé comme matière première dans la synthèse de dérivés ferrocéniques polyvalents. **(L. F. Tang, 2001)**

Le Ferrocène, avec ses 18 électrons de valence, est le membre le plus stable en série de métallocène. Il sublime facilement et n'est pas attaqué par l'air ou l'eau, mais peut être oxydé réversiblement **(M .Bochmann, 1994)**. A l'état solide; il ne réagit pas facilement avec les acides ou les bases; Cependant, il est sensible aux agents oxydants. En outre, il a été constaté que le ferrocène se comporte comme un composé organique aromatique riche en électrons, qui est activé vers les réactions électrophiles .

L'atome de fer dans le ferrocène est à l'état d'oxydation +2. Chaque cycle pentadiényle est donc chargé une fois négativement, amenant le nombre d'électrons π à six sur chaque cycles. Ils sont donc aromatiques. Lorsque le ferrocène est substitué en positions 1,2 ou 1,3 par deux substituant différents, il présente une chiralité planaire (figure 9) dont on remarque deux énantiomères (*R*) et (*S*), selon que le sens de la rotation est positif ou négatif. **(T. N. Mouas, 2013)**

8.5. Applications biologiques

La chimie du ferrocène, a eu un impact énorme dans de nombreux domaines, tel que la catalyse, la chimie des matériaux ou encore la conception de sondes électrochimiques. Sa grande stabilité en milieu aqueux et aérobie, l'accès aisé à un grand nombre de dérivés, ainsi que ses propriétés redox, ont fait du ferrocène et de ses dérivés, des éléments clés pour des applications biologiques, notamment grâce à leurs associations à des molécules bioactives, par substitution d'un groupement aromatique par un dérivé du ferrocène. **(M. Auzias, 2008)**

Une des premières applications de cette approche, fut le développement de dérivés ferrocéniques d'antibiotiques (les ferrocényl-pénicilline et ferrocényl-céphalosporine) (figure 10) par Edwards et ces collaborateurs pour lutter contre

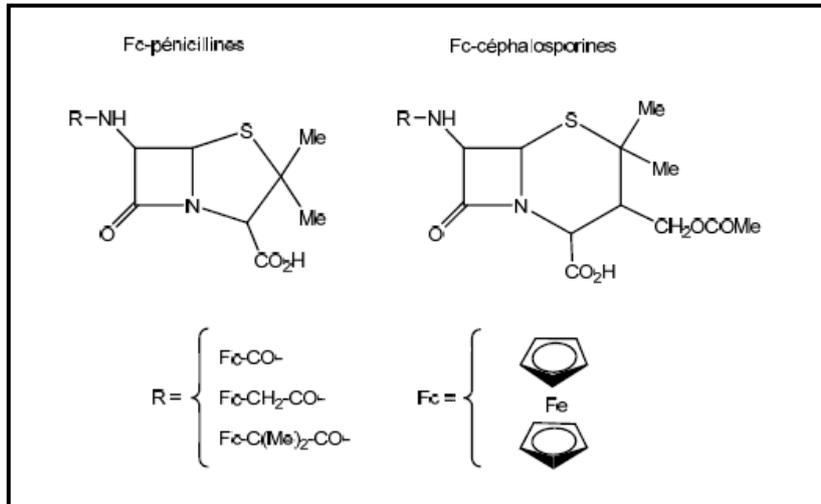


Figure 10 : La molécule Fc- pénicilline et la molécule Fc- céphalosporine

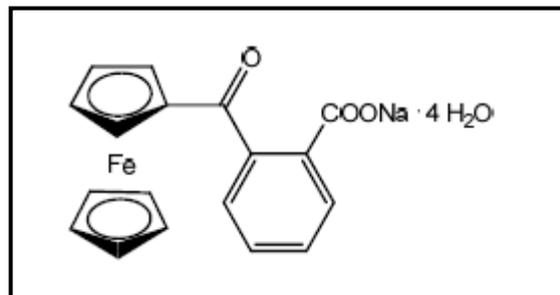


Figure 11 : Le ferrocène

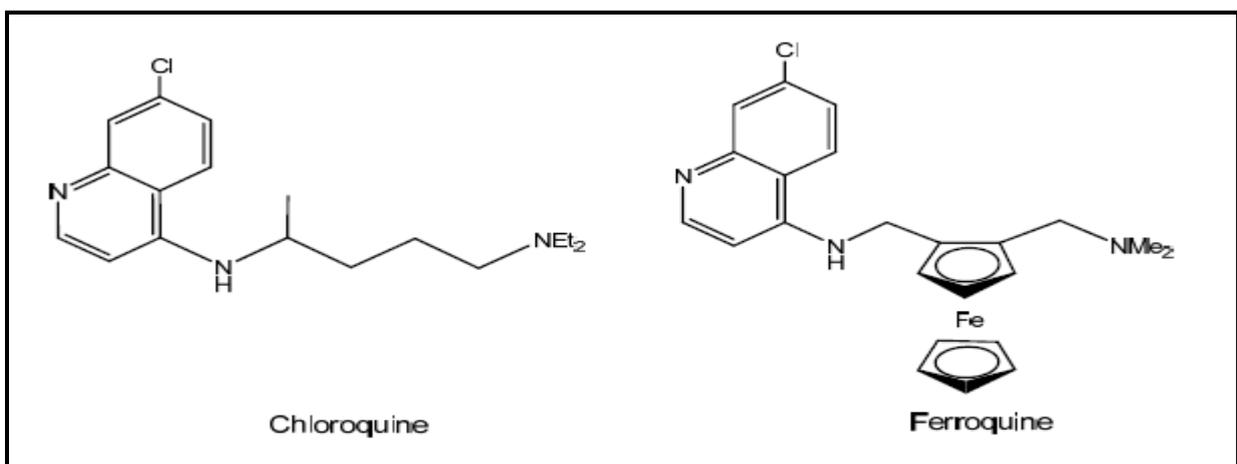


Figure12 : La chloroquine et le ferroquine

certaines bactéries (**E. I. Edwards et al, 1975**). Ces travaux ont été suivis par de nombreuses tentatives d'introduction du ferrocène sur des antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, rifamycines), certains de ces composés ont montré une bonne activité et une sélectivité pour les bactéries gram-positif (**D. Scutaru et al, 1991**). Un autre exemple de dérivé du ferrocène à potentiel médical fut le ferrocérone, (**A. N. Nesmeyanov et al, 1971**) (figure 11) un sel de sodium de carboxybenzoyl ferrocène, qui était utilisé en URSS dans les années 70 pour le traitement des anémies et des gingivites. En 1997, Brocard et ses collaborateurs. Ont repris la stratégie d'Edwards, consistant à modifier la structure d'une molécule biologiquement active par l'introduction du ferrocène, pour aboutir à la synthèse de la ferroquine. (**C. Biot et al, 1997**) La ferroquine est un analogue ferrocénique de la chloroquine, composé très utilisé dans le traitement du paludisme.

Grâce à l'addition du motif ferrocène, la ferroquine est non seulement active sur les bactéries sensibles à la chloroquine, mais également sur les souches résistantes (figure12). La molécule est actuellement en phase II du développement clinique. (<http://www.sanofiaventis.>)

Grâce à sa lipophilie qui lui permet de franchir aisément les membranes cellulaires, le ferrocène peut être considéré comme une alternative à l'utilisation des sels de Fe(II) en médecine. Pour cette raison un certain nombre d'études toxicologiques *in vivo*, ont été menées sur les dérivés du ferrocène, (**R. A. Yeary et al, 1999**), la plupart de ces recherches ont mis en évidence la faible toxicité de ces composés, en dépit de certains problèmes hépatiques.

L'application des dérivés du ferrocène dans la thérapeutique du cancer, est un domaine de recherche actif, et de nombreux rapports ont démontré que certains composés ferrocényles sont hautement cytotoxiques *in vitro* contre plusieurs lignées de cellules de cancer, notamment du sein, de la prostate, du poumon, du colon et des cellules cancéreuses de la leucémie. Cependant, seuls quelques-uns ont été testés *in vivo*. Ajouter à cela, qu'une importante inhibition de la croissance tumorale *in vivo*, a été obtenue pour les sels de ferricénium (inhibition de la croissance jusqu'à 83%) (**P. Maier et al, 1984**).

9. La fonction Thio /Dithionophosphorique

9.1. Historique

Après la découverte des recherches effectuées par G. Schrader sur la synthèse des composés phosphor- et thiophosphororganique toxiques et la découverte des possibilités d'applications pratiques multilatérales de ces composés (insecticides, fongicides, plastifiants, antioxydants...), un développement impétueux prend naissance dans le monde entier. **(E. P. Newallis, 1962)**

Dans le cas des composés organophosphorés il est important de noter encore un autre facteur qui a contribué au développement de ce domaine, il s'agit des recherches biochimiques, qui ont mis en évidence le rôle clef joué par les dérivés du phosphore dans les processus vitaux de l'organisme **(L. Almasi, 1976)**. Il convient de noter que la presque totalité des constituants biologiques, sont des dérivé de l'acide phosphoreux **(L. Almasi, 1976, a)**.

Le rôle biochimique si important des dérivés organiques de l'acide phosphorique, a incité beaucoup de recherches de modèles, qui ont conduit tant à la synthèse de nombreux composés à structure compliquée qu'à l'étude de leur réactivité. **(L. Almasi, 1976, b-e)**

9.2. Structure

Les composés thiophosphororganiques à phosphore tétra-coordonné sont composés d'un atome de phosphore sur lequel quatre substituants sont fixés selon une symétrie tétraédrique plus ou moins régulière, il est dit tétracoordonné.

Les composés du phosphore tétracoordonné sont les plus nombreux. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories:

- Les composés dont quatre substituants neutres, sont fixés à l'atome de phosphore, [un électron doit être nécessairement écarté par ionisation $Y_4\overset{\oplus}{P}$ (les dérivés de phosphonium et quasiphosphonium)].
- Les composés dont trois substituant neutres, et un substituant accepteur sont rattachés à l'atome de phosphore $Y_3P \rightarrow Z$ (formulé le plus souvent comme $Y_3P = Z$ (où Z peut être O, S, Se, Cr₂); sont appelés les dérivés de l'Acide dithiophosphinique **(A. Kirrmann et al, 1976)**

Dans notre cas, les dérivés étudiés, sont les sulfures de phosphines tertiaires $R_3P=S$ (figure 13) , dont l'édifice moléculaire se compose de trois liaisons phosphore-

carbone (P—C) du type σ et d'une liaison isolée phosphore-soufre (P=S) du type ($\sigma + \pi$), ou bien des disulfures de phosphine secondaire (S)R₂P=S (figure14)



Figure 13 : Les sulfures de phosphines tertiaires
secondaires

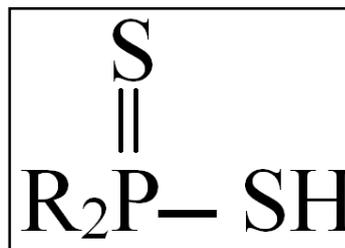


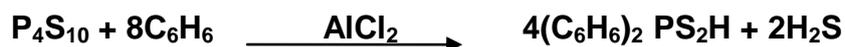
Figure 14 : Les disulfures de phosphines

9.3. Synthèse

Très peu de travaux sur les méthodes de préparation des composés phosphinodithioiques, ont été reportés dans la littérature chimique (**E. Nwallis et al, 1962**). Nous en citerons au moins deux qui ont donné un haut rendement de ces produits en utilisant des produits de départ accessibles:

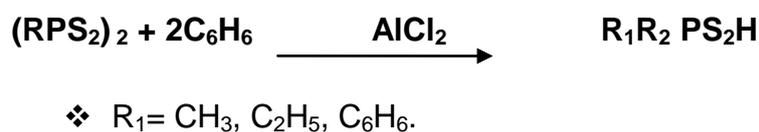
a) Synthèse décrite par Higgins et ces collaborateurs

Elle donne l'accès à un acide phosphinodithioique symétrique avec un assez bon rendement (70-90%). Le produit est obtenu en mélangeant le benzène et le phosphore pentasulfide en présence de chlorure d'aluminium anhydre (8 :1) et le tout est mis au reflux pendant huit heures (**W. Higgins, 1955**)



b) Synthèse décrite par Peter et ces collaborateurs

Bien que plus fastidieuse à accomplir que la précédente, à cause de la longue préparation du produit de départ le thionophosphine sulfide, elle donne un meilleur rendement (95%) et utilise une quantité moindre de chlorure d'aluminium anhydre (2 :1), et ceci en partant d'un mélange de benzène et de thionophosphine sulfide traité par du chlorure d'aluminium anhydre et mis au reflux huit heures. (**E. P. Newallis, 1962**)



9.4. Applications biologiques

Le développement actuel considérable de la chimie du phosphore, aussi bien au point de vue des recherches théoriques qu'au point de vue des applications industrielles, est dû essentiellement à la découverte des possibilités d'applications pratiques multilatérales de ces composés. **(Shrader, 1963)**.

L'activité biologique et pharmacologique plus récemment explorées, confère la possibilité de les utiliser comme insecticides, chimio stérilisants, fongicides, herbicides, et dans la thérapeutique **(L. Almasi, 1976)**.

À côté du rôle statique du radical phosphorique (composant des intermédiaires du métabolisme des glucides, lipides, composant des coenzymes, des acides nucléiques) son rôle dynamique (qui se base sur sa réactivité), est d'importance primordiale dans le métabolisme de tous les êtres vivants **(Polonovski, 1966; Khorana, 1961; Cheymol, 1970)**. Les grandes voies métaboliques, comme le cycle de la glycolyse, le cycle de phospholipides, et celui de la photosynthèse, peuvent être regardés comme des cycles de l'acide phosphorique.

Les plus importantes applications des composés phosphororganiques dans la thérapeutique, se basent sur leurs propriétés d'inhiber la cholinestérase, ce qui se traduit par un effet myolitique très recherché en ophtalmologie dans le traitement du glaucome, le Pyrofos, le Sulfotep, le Thiofosfène et en neuropathologie pour le traitement de la paralysie, son effet ocytocique est mis à profit en obstétrique dans la thérapie de la myasthénie atonie l'iodure de phospholine et de la parésie intestinale, la Fozarbine, qui présente aussi une activité radioprotectrice, les composés phosphororganiques manifestent également des propriétés anti-infectieuses bactéricides et antiparasitaires : Le Malathion, le Diazinon qu'on peut exploiter aussi en médecine vétérinaire : Le Bromophos, le Ronnel. Leurs propriétés antimitotiques les rendent utilisables en chimiothérapie : le Thio-Tepa **(T. N. Mouas, 2013)**

Ils ont également, une activité anti-polluante, la séparation du Ln(III)/An(III) (**K. L. Nach et al, 1993**) est envisageable avec une sélectivité élevée, même en milieu fortement acide, en utilisant l'acides dithiophosphiniques aromatiques en présence d'un mélange synergique de l'acide bischlorodithiophosphinique et tributylphosphatè (TBP) / l'oxyde trioctylphosphine (TOPO) ou tributylphosphine oxide (TBPO) (**G. Modolo et al, 1998**) ; afin de réduire le danger potentiel des déchets radioactifs contenant des éléments transitoires à demi-vie longue, en les transmutant en nucléides à demi-vie courte ou même stables (**E. Merz, 1993**).

10. La molécule (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphi-natométhyl) ferrocène

10.1. Structure

C'est un nouveau composé synthétique ferrocénique bidenté à chiralité planaire. Il possède deux fonctions en position 1,2 : - Une fonction thiophosphine **P(S) Ph₂** ;
- Et une deuxième fonction dithionophosphorique –**S-P(S) Ph₂**.

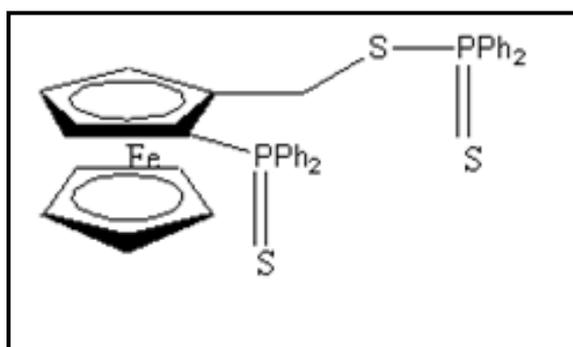


Figure 15 : La structure du composé (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphi-natométhyl) ferrocène

10.2. Synthèse

La molécule bioactive a été synthétisé à partir de la DMAF (diméthyle amine ferrocène) commerciale, en présence de n-butyllitium et d'un excès de chlorure de phosphine et de soufre, en utilisant les techniques de synthèse sous atmosphère inerte combinées (vide-Argon) Schlenk. Le composé (R/S)-II, a été obtenu en passant par un produit intermédiaire le (R/S)-I (**T. N. Mouas et al, 2012**), sous forme d'une poudre cristalline racémique orange. (figure 16 et 17)

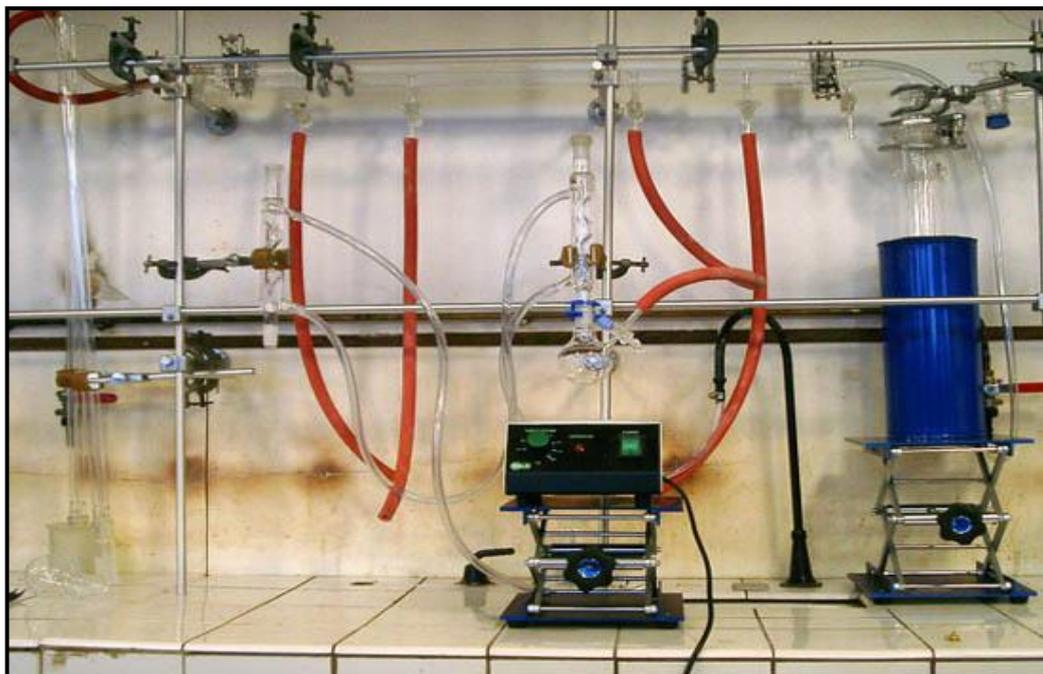


Figure 16 : Vue globale d'une rampe à vide



Figure 17: Synthèse sous atmosphère inerte du (R/S)-II ; techniques Schlenk.



Figure18 : Filtration du produit final; le (R/S)-II

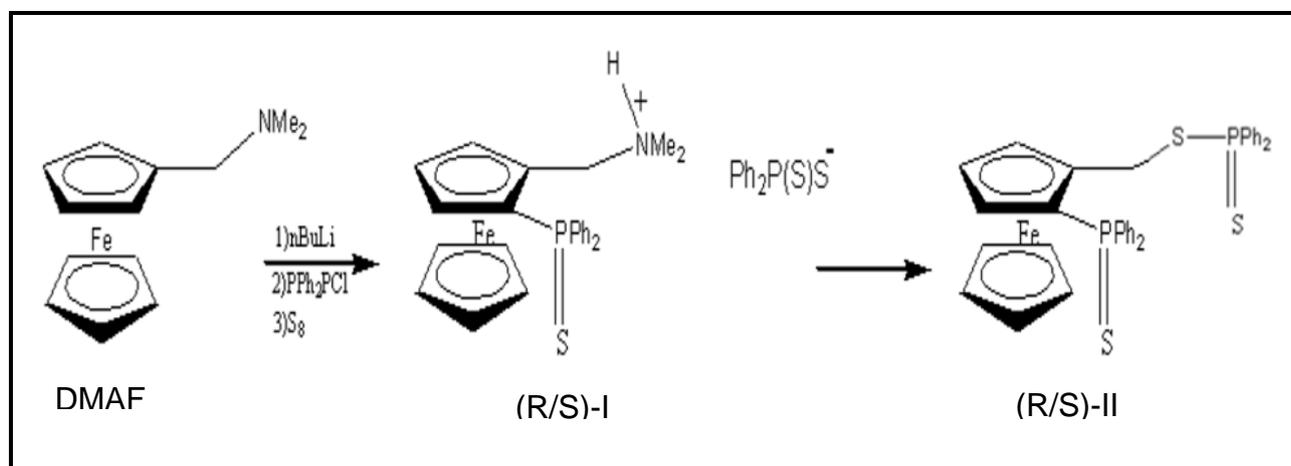


Schéma 3 : Synthèse du (R/S)-II

10.3. Caractérisation structurale :

La structure du (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinatométhyl) ferrocène, a été identifiée par l'utilisation combinée de trois techniques de caractérisation ; Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), spectrométrie de masse à haute résolution (ESI+) et la diffraction par rayons X sur monocristal. **(T. N. Mouas, 2013).**

1. Résultats de l'analyse d'RMN:

a) RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

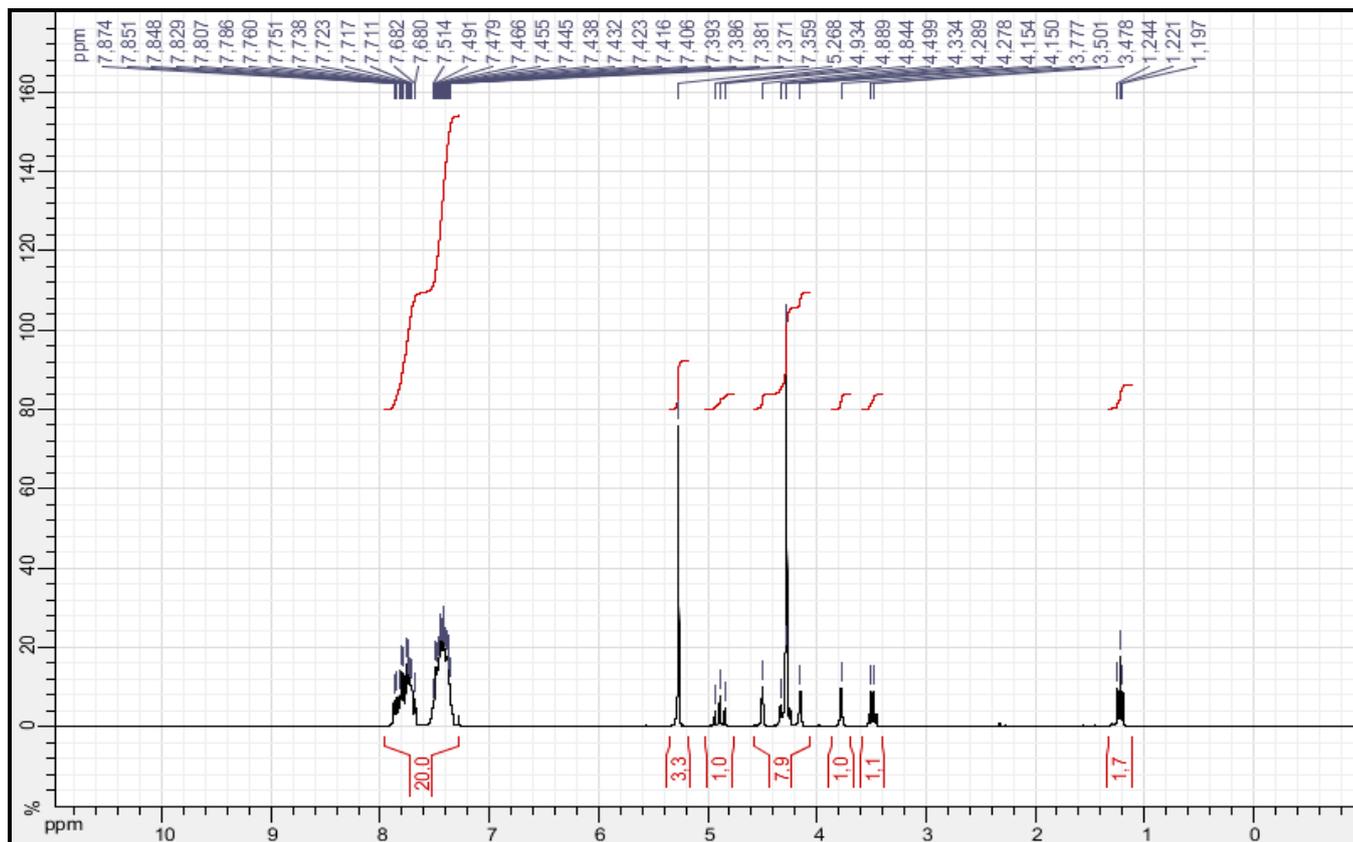


Figure 19 : Spectre RMN ^1H du composé (R/S)-II

Les résultats du dépouillement du spectre RMN ^1H , peuvent être regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Déplacements chimiques δ (ppm) RMN ^1H , du composé (R/S)-II

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.8-7.7	M	8H		Ph
7.5-7.4	M	12H		Ph
4.87	Dd	1H	13.2 _{HH} /14.0 _{HP}	CH_2
4.52	M	1H		Subst Cp
4.290	S	5H		Cp
4.289	D	1H	13.2 _{HH}	CH_2
4.16	M	1H		Subst Cp
3.78	M	1H		Subst Cp

a) RMN ^{31}P (500 MHz, CDCl_3) :

En RMN ^{31}P , il apparait deux pics de phosphore à $\delta(\text{ppm})$: 63.9 correspondant au coordinat $(\text{SP}(\text{S})\text{Ph}_2)$ et à $\delta(\text{ppm})$: 40.8 pour le coordinat $(\text{FcP}(\text{S})\text{Ph}_2)$ qui indiquent la coordination des deux fonctions phosphines sur l'entité ferrocénique.

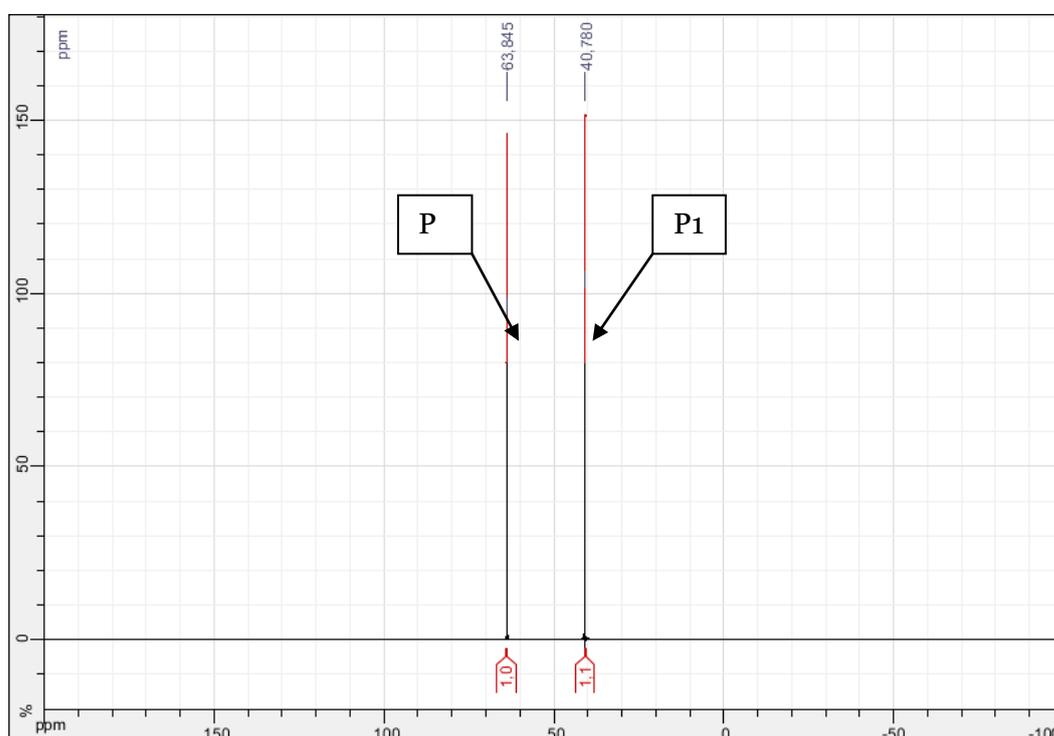


Figure 20 : Spectre RMN ^{31}P du composé (R/S)-II

2. Spectroscopie de masse à haute résolution ESI+ :

Le spectre de fragmentation donne un pic majoritaire pour une masse $M=664.033$ correspondant à la masse de l'ion moléculaire (R/S)-II

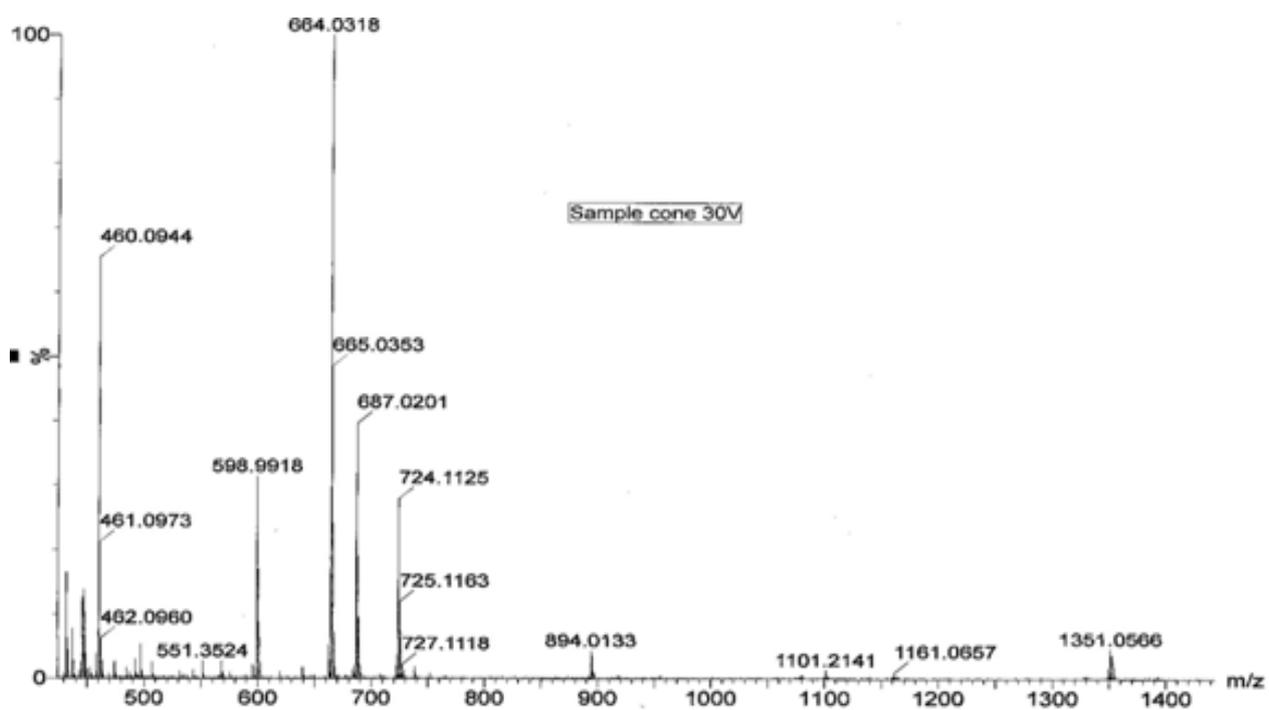


Figure 21: Spectre de fragmentation en spectroscopie de masse à haute résolution ESI+ du composé (R/S)-II

3. Etude cristallographique du composé (R/S)-II:

L'analyse par diffraction des rayons X a donné les résultats suivants et la vue donnée par le programme de dessin ORTEP confirme bien la structure de notre composé :

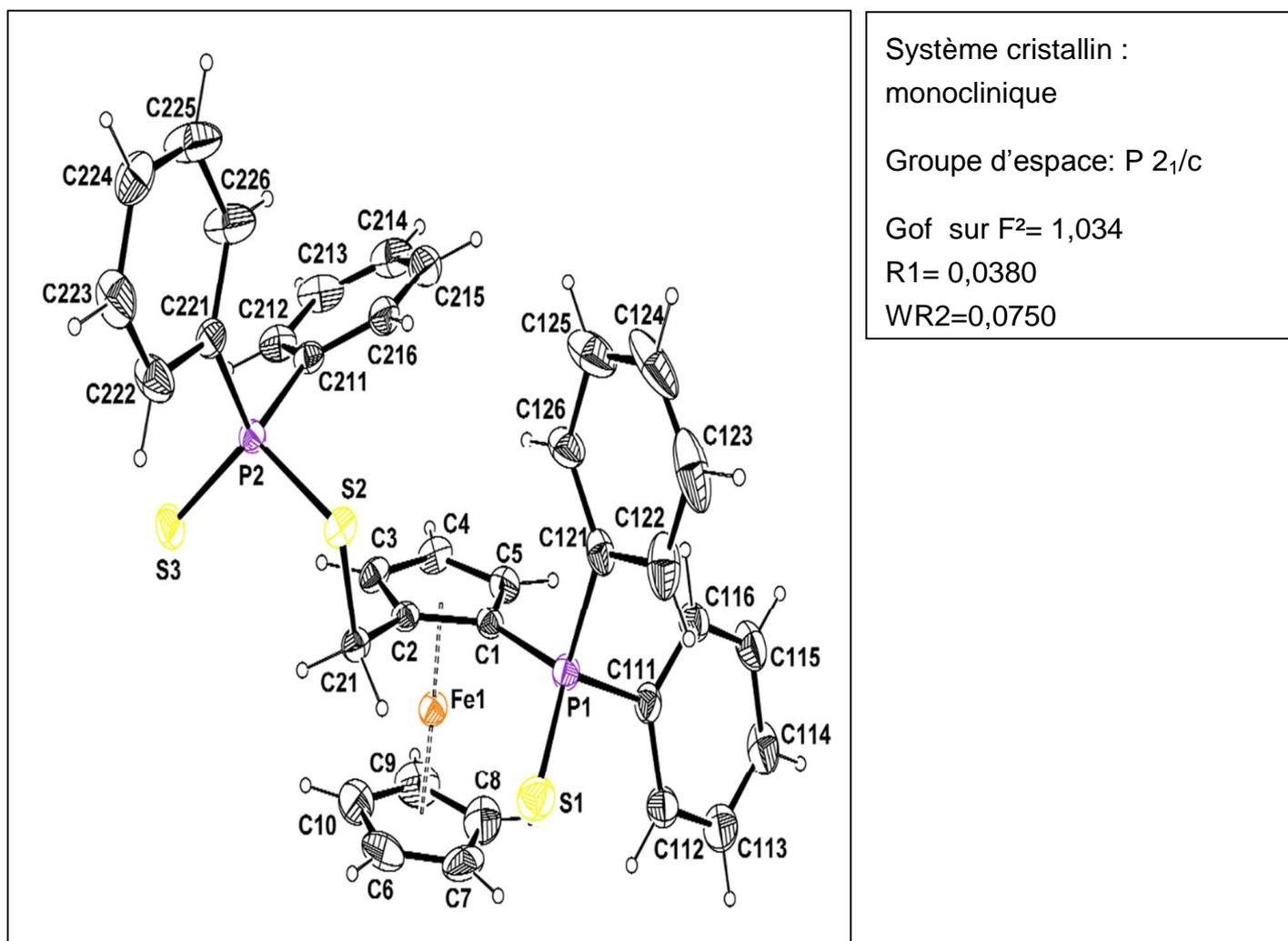


Figure 22: Vue ORTEP de l'unité asymétrique du (R/S)-II. L'atome d'hydrogène est représenté par une petite sphère de rayon arbitraire.

11. Méthodes d'analyses chimiques

11.1. Purification

11.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

La chromatographie CCM, est une technique physique d'analyse qualitative et séparative de la chimie analytique et de la biochimie.

Principe :

Cette méthode repose sur la séparation des différents constituants d'un mélange selon leur force de migration, suivant leur interactions chimiques ou physiques avec la phase mobile, qui est en général un mélange de solvants, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. La C.C.M est un procédé d'analyse simple, à condition de trouver la « bonne phase mobile », celle qui permet une bonne séparation des divers constituants d'un mélange. **(B. Hainque, 2008)**

Le rapport frontal : il caractérise une substance isolée d'un mélange par CCM, il est égal

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

à :

11.1.2. Chromatographie sur colonne (CC)

La chromatographie CC, est une technique physique d'analyse qualitative, quantitative et séparative de la chimie analytique et de la biochimie. Elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'un échantillon dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes.

Principe :

La technique repose sur le phénomène d'absorption, les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits apolaires sont élués en premier. La chromatographie sur colonne, est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

La phase stationnaire: C'est le support solide, qui est la colonne contenant une quantité calculée de gel de silice préparé sous forme de bouillie dans le moins polaire des solvants utilisés.

La phase mobile: Représente le solvant d'éluion utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire (**B. Hainque, 2008**)

11.2. Caractérisation structurale :

❖ Les techniques d'identification structurale:

L'identification de la structure moléculaire organique, se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques : la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone et la diffraction des rayons X, sont les techniques les plus souvent utilisées, elles permettent dans un temps réduit, d'avoir des données importantes conduisant à la élucidation structurale.

11.2.1. La spectroscopie UV-Visible

Les techniques de spectroscopie UV_visible, sont des méthodes simples et rapides, qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico-structurales, et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins. (É. Biémont, **2008**)

On définit la densité optique d'une solution à étudier par : $D = \log(I_0/I)$, qui est toujours positif. La densité optique D , est proportionnelle à la longueur de la cuve l , et à la concentration molaire volumique du composé C . Le coefficient de proportionnalité s'appelle le coefficient d'extinction molaire ϵ , qui est donné par la relation suivante:

$$D = \epsilon \cdot l(\text{cm}) \cdot C (\text{g/l})$$

Cette relation est appelée la loi de **Beer-Lambert**

I_0 est l'intensité initiale passant au travers d'une cuve contenant la solution (intensité transmise).

I est l'intensité de la lumière incidente.

11.2.2. La spectroscopie IR

La spectrophotométrie infrarouge, est une technique qui permet d'identifier la structure des composés liquides, solides, gaz, poudres, fibres, films ou surfaces. Elle s'intéresse à la caractérisation des groupements fonctionnels présents dans une molécule. L'analyse du faisceau infrarouge, permet de détecter un certain nombre de bandes d'absorption, qui correspondent aux modes de vibrations caractéristiques des divers groupements contenus dans les substances analysées. Le spectre infrarouge constitué par l'ensemble de ces bandes, représente alors l'empreinte digitale de la molécule. (É. Biémont, 2008)

12. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro*, sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents, selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (K. I. Suhr, 2003).

Les méthodes d'évaluation les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur l'Agar et la méthode de dilution. Dans la première méthode, les produits à étudier sont déposés sur des disques de papier ou dans des puits creusés dans l'Agar. Dans la seconde méthode, les produits sont incorporés dans le bouillon de culture ou d'autres liquides, dans lesquels les bactéries sont présentes. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publications. (Lahlou, 2004; Bosio et al, 2000).

12.1. Chromatogramme

L'Chromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Le contact se fait par l'intermédiaire du disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée des extraits de plante. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère et Avril, 2002). L'aromatogramme se réalise aussi sur un milieu liquide par la méthode des disques (P. Bellaïche, 1979).

12.2. Méthode du puits ou cylindre

Proposé par **Cooper et Woodman en 1946**, reprise par **Shroder et Messing (1949)**, elle mesure une diffusion radiale du produit à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution du produit à tester de concentration connue. Le produit diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique (**N. Bousbia, 2004**).

12.3. Méthode de dilution

Les produits à tester peuvent également être directement mélangés en concentrations connues au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide, sans oublier que les techniques de dilution exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**M. Ferhat, 2004**).

13. les microorganismes testés

13.1. Bactérie Gram (+)

13.1.1. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont des bactéries Gram+, aéro-anaérobies, immobiles, qui appartiennent à la famille des *Micrococcaceae*. Les *Staphylococcus aureus* sont connus pour provoquer des infections cutanées (furoncles, anthrax, panaris, impétigos, abcès mammaire chez les femmes qui allaitent) et des infections des muqueuses qui peuvent atteindre les yeux (conjonctivite), les oreilles (otites), la sphère génitale (endométrite, salpingite) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies). (<http://www.pasteur.fr/ip/easvsite>).

13.1.2. *Bacillus Sp*

Les *Bacillus Sp*. Sont des bacilles Gram-positif (**J G. Holt et al, 1994**), aéro-anaérobies facultatifs. Ils ont une importante capacité à produire des spores résistant à des conditions environnementales défavorables (**Logan et al, 2009a**). Les spores de nombreuses espèces de *Bacillus Sp*. (notamment *B. cereus*) sont abondantes dans le

sol (**Guinebretiere et al, 2003; StenforsArnesen et al, 2008**). Le Bacillus produit une grande variété d'enzymes extra-cellulaires, y compris les protéases. (**M.S. Ammar et al, 1991; B. Sookkheo et al, 2000**)

13.2. Bactérie Gram (-)

13.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie Gram- de la famille des *Enterobacteriaceae*, anaérobie facultative, vivant couramment dans les intestins de l'homme et des animaux. Les symptômes de la maladie provoquée par *E. coli* comprennent des crampes abdominales et une diarrhée aqueuse pouvant devenir sanglante (colite hémorragique), il arrive d'observer également de la fièvre et des vomissements. *E. coli* est considéré comme l'un des agents les plus connus causant des infections nosocomiales (**OMS, 1996**).

13.2.2. *Klebsiella pneumonia*

Les *Klebsiella* sont omniprésentes et rapportées dans le monde. Au cours des dernières années, elles sont devenues d'importants agents pathogènes dans les infections nosocomiales (**P. Nordamann, 2009**). Les Infections nosocomiales épidémiques et endémiques causées par les espèces *Klebsiella* sont les principales causes de morbidité et de mortalité (**S.J. Cryz et al, 1985**). En plus d'être la principale cause des infections des voies respiratoires telles que la pneumonie, rhinosclérome, ozène, la sinusite et l'otite, elle provoque aussi l'infections de l'appareil digestif comme l'entérite, l'appendicite et cholécystites. Ils sont souvent associés à des infections des voies urinaires, des voies génitales, et les yeux. (**A.D. Dean et al, 1990**).

13.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste, capable d'infecter une grande variété d'hôtes : humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (**D. Argenio et al, 2001; Pukatzki et al, 2002; Rahme et al, 1995**). Chez l'homme, elle n'adhère pas à l'épithélium normal intact et ne provoque de maladie que lorsqu'il existe une défaillance du système immunitaire ou une lésion préexistante. *P. aeruginosa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (**Bielecki et al, 2008; Branski et al, 2009; Lyczak, 2000**). Elle est capable de coloniser

une grande diversité de tissus. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, urinaires, des dermatites, des otites externes, des ératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, des infections de la peau chez les grands brûlés, des endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses, (**Bielecki et al, 2008 ; Bodey et al, 1983; Branski et al, 2009**). *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (**Carek et a, 2001**).

13.2.4. *Proteus Sp*

Les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans la nature ; elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de l'intestin de nombreuses espèces animales. (**B.W. Senior, 1998**).

Les *Proteus Sp* sont responsables d'infections diverses : surinfections des plaies, infections cutanées, infections de l'ombilic, infections de l'œil, infections du tractus respiratoire, infections de l'oreille, ... et plus rarement, de septicémies et de méningites particulièrement graves chez les nourrissons. (**A. Rozalski et al, 1997**).

13.2.5. *Morganella morganii*

Morganella morganii est un membre de Protéase qui est inclus dans la famille des Enterobacteriaceae (**C.M. O'Hara et al, 2000**), c'est un bacille à Gram négatif opportuniste qui se trouve généralement dans l'environnement et dans le tractus intestinal des humains, mammifères, reptiles et flore normale. Ils peuvent causer des infections de plaies, infections urinaires habituellement sur des patients qui ont une lithiase urinaire, la pneumonie, les infections osseuses et la maladie du système nerveux central (**V. Tucci et al, 1981 ; J. Abdalla et al, 2006**). Habituellement, ils sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques bêta-lactamines et peuvent être résistants à la ceftazidime et autres céphalosporines de troisième génération, mais ils sont sensibles au céfépime, imipénème, méropénème, pipéracilline, les aminoglycosides et les fluoroquinolones.

13.3. Champignons

13.3.1. *Aspergillus Niger*

L'*Aspergillus Niger* apparaît sous forme d'une moisissure filamentaire de couleur verte sur l'orange (Pourriture verte). Il peut produire une variété de métabolites,

appelées mycotoxines, en fonction des conditions de croissance. Les mycotoxines vont de modérément à hautement toxique en termes de toxicité aiguë. **(Zergat, 1996)**. Il est dans la distribution du monde et il a été isolé à partir de nombreux milieux. Les êtres humains sont continuellement exposés aux spores d'A. Niger et ces formes végétatives sur les denrées alimentaires et dans l'air. La plupart des isolats des souches d'A. Niger n'ont pas été documenté pour être pathogènes graves de l'homme, des animaux ou des plantes, bien qu'il existe des souches spécifiques qui peuvent produire certaines mycotoxines ou peuvent provoquer des réactions allergiques chez les travailleurs. **(K. V. Someren et al, 1990)**.

13.3.2. *Fusarium oxysporium*

Fusarium oxysporum est un champignon tellurique très diversifiée. Les membres pathogènes sont responsables de maladies de nombreuses cultures agricoles. L'espèce est subdivisée en formes, dont *F. oxysporum*, *f. cubense* (*Foc*), l'agent causal de la fusariose du bananier, est l'un des plus destructeurs.

L'invasion de plantes par *F. oxysporum* est complexe et résulte de trois processus principaux, à savoir l'adhésion, la pénétration et la colonisation. **(Bishop et al, 1983a)**.

13.3.3. *Alternaria Sp*

Alternaria Sp sont des moisissures cosmopolite et peuvent être trouvés dans les sols, les plantes, des aliments et l'air. Le genre *Alternaria* comprend deux saprobes et agents pathogènes des plantes qui ont été signalés dans le monde, ils infectent les cultures et provoquent la désintégration après la récolte de nombreux produits végétaux **(Thomma, 2003)**. En raison de leur croissance, même à basse température, *Alternaria Sp* sont des agents pathogènes après la récolte, et responsables de la détérioration des aliments pendant le transport et le stockage même réfrigéré. **(Ostry, 2008)**

8. les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

8.1. Gentamicines (CN) :

La gentamicine est un antibiotique aminoglycoside à large spectre, qui présente une efficacité antimicrobienne rapide dépendant de la concentration des divers organismes Gram-négatifs. Cependant, les barrières bactériennes et des

effets indésirables tels que la néphrotoxicité et une neurotoxicité limitent sa dose quotidienne (**McKinnon et Davis, 2004**). Des efforts ont été faits pour déterminer les schémas thérapeutiques optimales afin d'accroître son efficacité globale tout en réduisant la toxicité des médicaments.

8.2. Spiromycine (Sr) :

La spiromycine est un spectre moyen, à 16 chaînons, un antibiotique macrolide largement utilisé dans le traitement des infections des voies respiratoires (**E. Rubinstein et al, 1998**).

La spiromycine est également prescrit dans certains pays pour diverses infections odontogènes, y compris les abcès endodontie, péri coronarite, et formes destructrices de la maladie parodontale (parodontite) (**M. Al-Haroni et al, 2007; Bain et al, 1994**). Un certain nombre d'études ont évalué l'activité antimicrobienne de la spiromycine sur les bactéries parodontopathiques putatifs dans les biofilms de plaque sous-gingivale (**R.A. Mashimo et al, 1981; P.P. Poulet et al, 2005**).

8.3. Nalidixique (NA) :

L'acide Nalidixique (NA), un antibiotique de quinolones, est largement utilisé dans la médecine humaine et vétérinaire. Sa présence dans les effluents hospitaliers, le traitement des eaux usées, plantes effluents, eaux environnementales et des sols a été rapporté dans plusieurs études (**A. Y. C. Lin et al, 2008; F. Tamtam et al, 2011; A. J. Watkinson et al, 2009**).

Il a un large spectre d'activité biologique, comme antimicrobien (**A.L. Barry et al, 1984**), anti-inflammatoires (**K. Akahane et al, 1989**), antiprolifératif (**R. Hudej et al, 2012**) et anti-tumorale (**J. Kljun et al, 2013; J. Kljun et al, 2011**).

8.4. Cefotaxime (CTX) :

Les céphalosporines sont des antibiotiques beta-lactamines avec les mêmes exigences structurelles fondamentales comme la pénicilline. Ils sont utilisés pour le traitement d'infections provoquées par des bactéries gram-positifs et gram-négatifs. Ils agissent en inhibant la synthèse des composants structurels essentiels de la paroi cellulaire bactérienne. Ils sont parmi les plus sûrs et le plus efficace large spectre d'agents antimicrobiens bactéricides, par conséquent, ils sont les plus prescrits de tous les antibiotiques (**T.J. Franklin et al, 1981**).

8.5. Imipenème (IPM) :

L'imipenème est un antibiotique bêta-lactame, appartenant au groupe thiénamycine. Il est un inhibiteur puissant de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et est bactéricide contre un large spectre de pathogènes - Gram-positif et Gram-négatif, aérobie et anaérobie (**J. D. D. Pitout et al, 2005**).

8.6. Amoxicillin (AMC):

L'Amoxicillin est un agent antimicrobien largement prescrit en raison de son large spectre, l'absorption orale rapide et importante, et une bonne tolérance. Plusieurs études in vitro, indiquent que l'activité bactéricide de l'Amoxicillin est significativement meilleure que celle des autres antibiotiques beta-lactames (par exemple, la pénicilline G, cefpodoxime, cefprozil, cefac1or) contre sensible à la pénicilline et résistant pneumocoques (**S. K. Spangler et al, 1997; C. E. Thorburn et al, 1998**).

CHAPITRE II

MATERIEL ET MÉTHODES

La partie pratique de notre travail, s'est déroulée en trois grandes étapes :

- 1- Purification de la molécule (R/S)-II par chromatographie liquide sur couche mince et sur colonne.
- 2- Caractérisation de sa structure par différentes méthodes spectroscopiques.
- 3- Evaluation de son activité antimicrobienne in vitro.

1. Matériel d'étude

1.1. Matériel chimique

La molécule bioactive (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinato-méthyl) ferrocène, qui fait l'objet de notre étude chimique et biologique, a été synthétisée au laboratoire de recherche CNRS, LC3 (Ligands Chiraux, Complexes et Catalyse), Toulouse, France.

1.2. Matériel biologique

Nous avons testé l'activité antimicrobienne in vitro du R/S)-II, vis-à-vis de onze souches cibles, dont cinq sont référenciées et six de provenance cliniques:

➤ **Bactéries Gram (+) :**

- *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* 2S: ATCC 43300
- *Bacillus Sp*

➤ **Bactéries Gram (-) :**

- *Escherichia coli*: ATCC 25922
- *Klebsiella pneumonia*: ATCC 700603
- *Pseudomonas aeruginosa* : ATTC27853
- *Proteus Sp*
- *Morganella morganii*

➤ **Champignons :**

- *Aspergillus Niger*
- *Fusarium oxysprium*
- *Alternaria Sp*

1.3. Matériel de laboratoire

- les milieux nutritifs, ainsi que les milieux de cultures spécifiques : « Mueller Hinton (MH) » pour les bactéries et « Sabouroud » pour les champignons, proviennent de l'Institut Pasteur Alger.
- Les disques utilisés pour les tests antimicrobiens, ont été préparés à partir du papier wathman 4mm, puis ont été stérilisés à chaleur humide.

2. Méthode d'étude

2.1. Purification du (R/S)-II

2.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

Le contrôle de la pureté de la molécule (R/S)-II par chromatographie liquide sur couche mince, a été effectué sur gel de silice déposé sur feuille d'aluminium, en utilisant le diéthyléther comme solvant d'éluion et le dichlorométhane pour dissoudre le composé à analyser. Après développement dans une cuve en verre, la plaque a été séchée à l'air, puis observée à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 356 nm. **(T. N. Mouas, 2013)**

1.1.1. Chromatographie liquide sur colonne (CC)

La purification du produit par chromatographie sur colonne, a été effectuée sur colonne ouverte, en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire et le système (diéthyl-éther/ méthanol) (99V/1V) comme phase mobile **(T. N. Mouas, 2013)**, dans le but d'éliminer tout autre produit ne faisant pas l'objet de ce travail.

La taille de la colonne, la granulométrie de la phase solide, et le débit de la phase mobile, ont été adaptés à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer **(W. Clark Still et al 1978)**. Le choix des conditions d'éluion et le suivi de la séparation, ont été effectués sur la base de l'analyse par CCM.

Le composé à purifié, est déposé en phase liquide concentrée dans un solvant peu éluant, le dichlorométhane.

2.2. La recristallisation du (R/S)-II

La recristallisation de la molécule solubilisée dans un mélange de dichlorométhane et DMSO, a été faite dans le but de récupérer le composé et de le garder sous sa forme

cristalline pure. Le dichlorométhane est évaporé au *Rotavapor* 'BUTCHI' à 35°C / (3T/s). Le composé est recristallisé par diffusion lente dans le DMSO.

2.3. Caractérisation structurale du (R/S)-II

Notre biomolécule a été caractérisée par deux méthodes spectroscopiques différentes :

2.3.1. La spectroscopie UV

Le spectre UV de notre composé est mesuré en solution de 5mg% dans du dichlorométhane, à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV-Vis Biowave DNA. Les mesures sont effectuées dans des cuves en plastique, le balayage de l'absorbance se fait entre 220- 320nm.

2.3.2. La spectroscopie IR

Le spectre Infrarouge (IR), a été enregistré sur un spectromètre FTIR -8201 PC Shimadzu. Quelques milligrammes de produit sont dispersés dans des pastilles de KBr et analysés par l'appareil.

2.4. Application biologique du (R/S)-II

Nous avons cherché en premier lieu à faire des investigations sur l'activité antimicrobienne in vitro de notre composé, en utilisant la méthode de diffusion des disques sur milieux solide.

2.4.1. La technique d'étude de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II

Elle est effectuée selon la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé (**D. Bijondi, 1993**). L'ensemencement des suspensions bactériennes est réalisé par écouvillonnage en tournant la boîte d'environ 60°. Cette méthode permet d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum sur la gélose et de faciliter la diffusion des molécules actives sur une fine couche de surface (**M. A. Horicaw, 1999; J. H. Woo 2002**).

Des disques de papier Wathman stériles sont préalablement imprégnés de 10 µl de chaque dilution et sont ensuite déposés stérilement à la surface de la gélose Muller-Hinton, puis incubés 24 h à 37° C pour les bactéries, et sur gélose Sabouraud pour les champignons, puis incubés à 28° C de 72 h à 7j. Les essais ont été effectués sur deux boîtes pour chaque souche microbienne.

2.4.2. Préparation des souches

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

a) **La revivification** : Les microorganismes sont repiqués à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de leurs milieux de conservation dans du bouillon nutritif qui permettra leur croissance, puis incubés 24 h à 37°C pour les souches bactériennes et de 72 h à 7j à 28°C pour les souches fongiques.

b) **L'isolement** : les tubes de bouillon nutritif ensemencés dans l'étape précédente et qui montrent un trouble apparent à l'œil nu, sont ensemencés par stries à l'aide d'écouvillons stériles ou d'une anse en platine sur un milieu gélosé Muller-Hinton coulé dans des boîtes de pétries stériles de 90mm de diamètre pour les bactéries et sur gélose sabouraud pour les champignons. Cette étape permet d'enrichir la croissance microbienne et de vérifier la pureté des souches par isolement des colonies en espaçant les stries lors de l'ensemencement, de même les boîtes de pétries sont incubées 24 h à 37°C pour les bactéries et 72 h à 7j à 28°C pour les champignons.

c) **Préparation des suspensions cellulaires des microorganismes testés** : une fois nos colonies isolées et identifiées, l'une d'elles est recultivée à nouveau dans du bouillon nutritif et ré incubée dans les mêmes conditions comme précédemment, et juste avant leur utilisation, les différentes souches microbiennes doivent avoir une densité cellulaire optique comprise entre 0,5 et 1 Do, mesurée sur place grâce à un spectrophotomètre.

2.4.3. Préparation des dilutions

Comme nous sommes les pionniers à étudier l'activité antimicrobienne de notre molécule bioactive synthétique, nous avons dans un premier temps, procédé à un criblage microbiologique, afin de voir l'effet qu'aura l'utilisation du solvant de dilution choisi pour cette étude, ainsi que sa teneur en principe actif sur nos souches testées. Puis, dans un second lieu et suivant les résultats obtenus au criblage, nous procéderons à un deuxième essai, prenant en compte l'utilisation d'autres diluants et d'autres gammes de concentrations en principe actif.

2.4.4. Protocole de l'étude de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II

2.4.4.1. Premier essai

Partant du principe que notre composé n'est soluble que dans le dichlorométhane, nous avons utilisé ce dernier dans un premier temps comme solvant de dissolution et de dilution de notre molécule. Pour cela, nous avons utilisé une première gamme de dilution (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) en partant d'une solution mère à 50mg/ml.

2.4.4.2. Deuxième essai

Nous nous basons sur les résultats du premier essai, nous avons pensé dans une approche d'optimisation de notre protocole de travail, à étudier tout d'abord la miscibilité du dichlorométhane avec plusieurs solvants de dilution usuellement utilisés dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne et les moins toxiques possible, notre choix s'est porté sur les solvants suivants : eau, Hexane, Diéthylethere et DMSO.

En partant des résultats des testes de miscibilités, nous avons établi une deuxième gamme de dilution en augmentant la concentration de notre solution mère à 100 mg/ml et en prenant comme solvant de dilution, un mélange dichlorométhane /DMSO (50V/50V), puis nous avons préparé le reste des dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, en utilisant uniquement le DMSO comme solvant de dilution.

2.4.5. L'antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé en suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment (diffusion sur milieu solide). Les antibiotiques utilisés sont : la Gentamicine (10µg/disque), Cefotaxime (30µg /disque), Amoxicillin (20/10µg/disque), Spiromycine (100µg/disque), Nalidixique (30µg/disque) et Imipenème (10µg/disque).

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Purification de (R/S)-II

1.1. Contrôle de la pureté de (R/S)-II par CCM

Après développement et séchage de la plaque de CCM, le chromatogramme de (R/S)-II visualisé sous la lumière du jour, est présenté sur la figure 23 à gauche où notre composé apparaît sous forme d'un spot intense de couleur orange, le même chromatogramme visionné sous la lampe UV, est présenté sur la figure 23 à droite ; le même spot nous apparaît alors en couleur plus sombre :

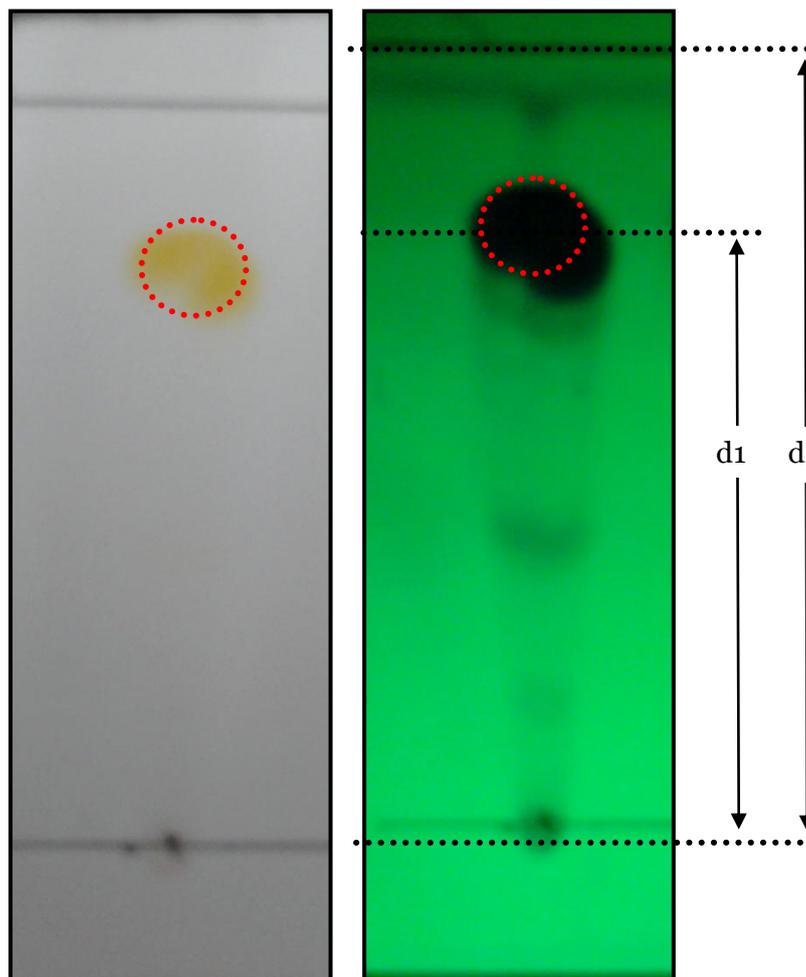


Figure 23: La plaque CCM après développement, avant et après visualisation par la lampe UV.

- Ainsi, le composé (R/S)-II est une molécule colorée "orange", donc l'observation ne nécessite pas de révélateur chimique.
- Le spot entouré, représente le composé (R/S)-II, il forme un spot intense.

➤ L'observation sous la lampe UV, révèle des traces d'impuretés de faible concentration par rapport à celle du composé. Ces impuretés sont probablement des résidus de produits de départ.

Calcul du rapport frontal Rf : $R_f = d_1/d_2$

Avec : $d_1 = 4,4 \text{ cm}$

$d_2 = 5,6 \text{ cm}$

Ce qui implique : $R_f = 4,4/5,6 = \mathbf{0,785}$

Il est donc nécessaire de passer par une chromatographie sur colonne afin purifier parfaitement notre composé.

1.2. La purification du (R/S)-II par CC

Le composé à purifié, est déposé en phase liquide concentrée dans un solvant peu éluant « le dichlorométhane », uniformément sur la couche de sable, puis le système de solvants éluant est rajouté à la colonne. Le début de colonne est éliminé, il ne contient que l'éluant de la phase mobile. Notre composé le (R/S)-II est récupéré en une seule fraction colorée en éliminant la fin de colonne qui contient des impuretés ou les molécules retardées dans leur migration.

La fraction récupérée, est séchée au *Rotavapor* à 35°C / (3T/s)



Figure 24 : Purification du (R/S)-II par chromatographie liquide CC

2. La recristallisation du (R/S)-II

La recristallisation de la molécule solubilisée dans un mélange de dichlorométhane et DMSO, se fait après évaporation du dichlorométhane au rotavap, et une nuit de diffusion lente dans le DMSO. Le composé a été récupéré après filtration, sous forme de cristaux orange (figure 25)



Figure 25 : la recristallisation du composé R/S-II

3. Caractérisation structurale du (R/S)-II

3.1. L'analyse par la spectroscopie UV

La molécule (R/S)-II, a été caractérisée par la spectroscopie UV dans une gamme absorption comprise entre 220 et 320 nm. Cette méthode permet d'avoir une analyse quantitative, en nous donnant la concentration de notre produit qui est de 5610 $\mu\text{g/ml}$ figure 26a, comme elle est également qualitative, car elle confirme la présence des groupements fonctionnels appartenant à notre composé, qui absorbent dans ce domaine, par l'apparition de bandes caractéristiques reportés sur le tableau 2 et (figures 26 a et 26 b).

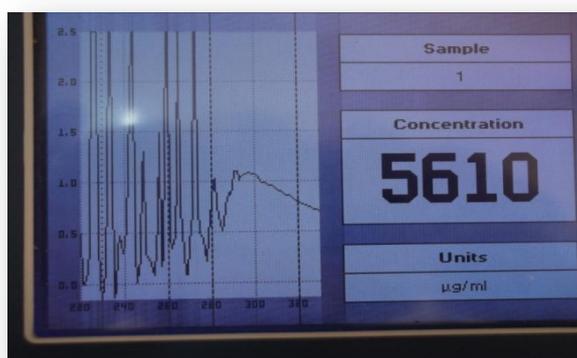


Figure 26 a : Concentration du composé dans l'échantillon analysé, calculée par l'appareil UV.

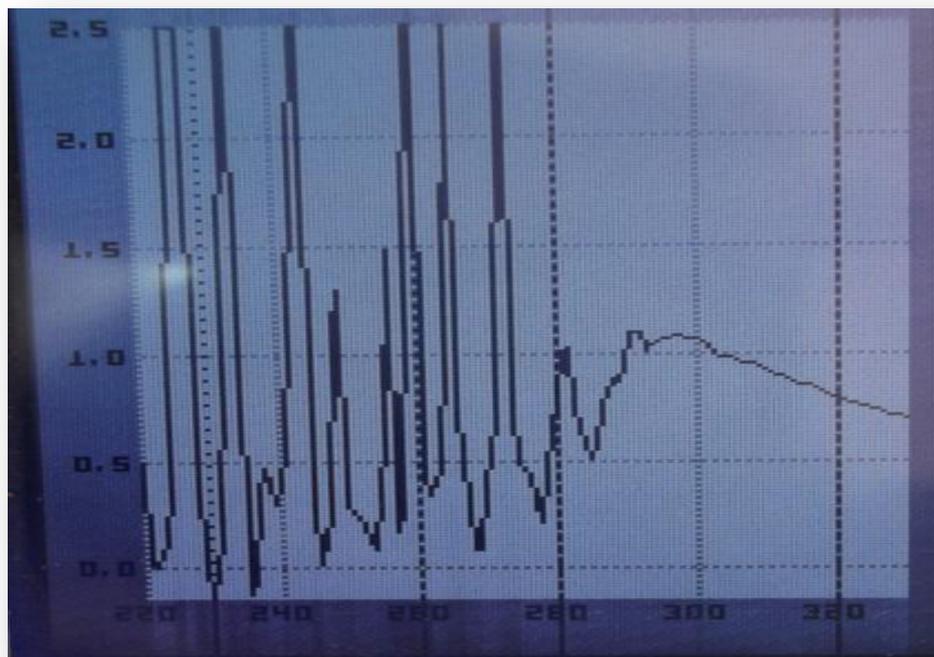


Figure 26 b : Spectre de l'analyse spectroscopique UV du (R/S)-II

Tableau 2 : Identification des longueurs d'ondes d'absorption dans le domaine UV des groupements fonctionnels du (R/S)-II

Groupements fonctionnels	λ_{\max} (nm) Réf	La lecture du spectre
Cyclopentadiène	238	232.5
— S — R	30	-
Cyclopentadiène— S — R	$232.5 + 30 = 262.5$	263.6
Phényle	255	250

3.2. L'analyse par la spectrophotométrie IR

La molécule (R/S)-II a été caractérisée par la spectroscopie IR.; qui permet de confirmer la présence des différents groupements fonctionnels appartenant à ce

composé, par l'apparition de fréquences de vibration caractéristiques, et qui sont répertoriées sur le tableau 3 et (figure 27)

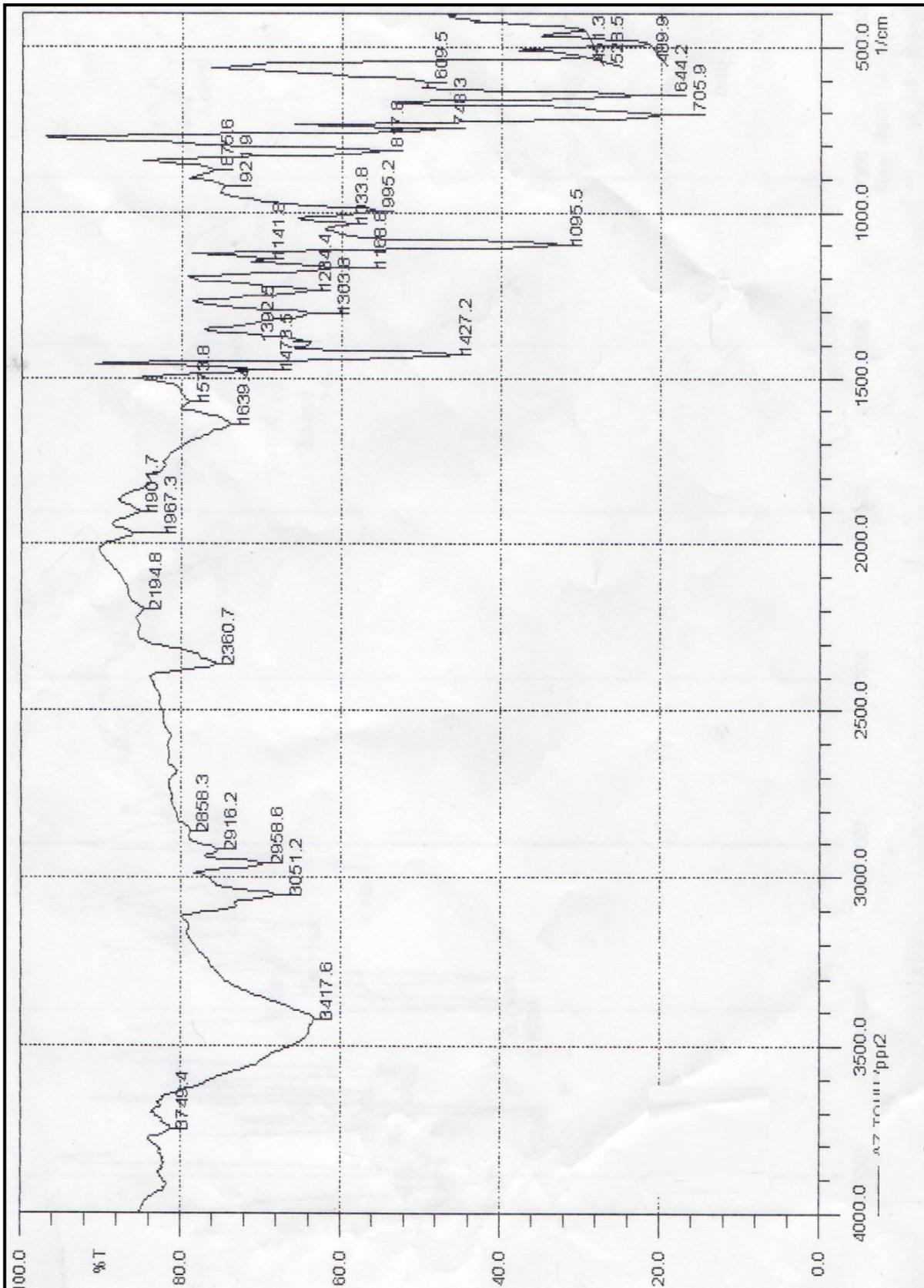
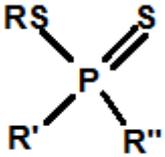
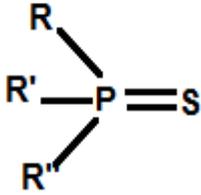


Figure 27 : Spectre de l'analyse spectroscopique IR du (R/S)-II

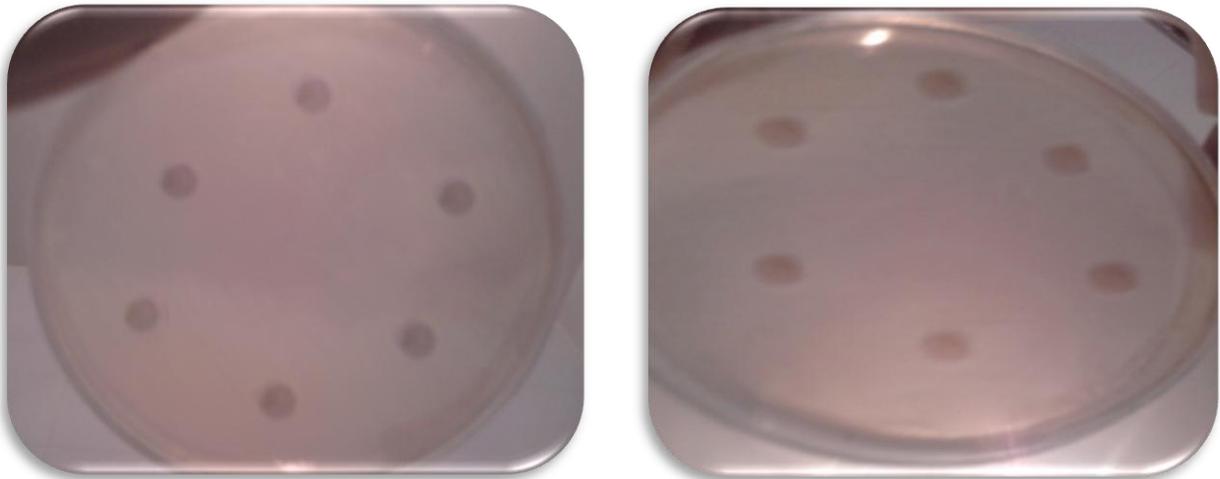
Tableau 3 : Fréquences de vibration dans le domaine IR des groupements fonctionnels
du (R/S)-II

Fonction	Fréquence de vibration (cm ⁻¹) Réf	La lecture du spectre
	472 – 481	451.3
	627 – 663	644.2
P — Ph	1420 – 1450	1427.2
P — C=C	1605 – 1645	1639
S — C	650 – 740	705.9
C=C	1500 - 1610	1573.8
C—H aromatique	1700 – 1900	1967
Vibration d'élongation des hydrogène des cycles benzéniques	800	817.6
Fc—	500 – 485	489.9

4. L'évaluation de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II

4.1. Résultat du premier essai

Suite au criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II, en utilisant le dichlorométhane pur comme solvant de dilution, nous n'avons pas obtenu à première vue des résultats probants, et ceux vis-à-vis de l'ensemble des microorganismes testés, comme le montre dans les deux exemples sur la figure



28 et 29.

Figure 28 : Action du (R/S) II sur le *Bacillus Sp*
E. coli

Figure 29: action du (R/S) II sur
au premier essai.

Cependant, cela nous a permis d'après le déroulement de ce premier essai, et l'observation des résultats, de remarquer que le dichlorométhane s'évapore instantanément, et par conséquent solidifie l'échantillon trop rapidement, ce qui empêche la diffusion du composé (R/S)-II sur la gélose.

Donc le choix du dichlorométhane pur comme solvant pour notre étude, n'est pas approprié, c'est pour cela que nous avons d'abord cherché à optimiser nos conditions opératoires, notamment les solvants de dilution ainsi que la quantité du principe actif utilisé, avant de lancer un deuxième essai.

4.2. Optimisation du protocole de travail:

Afin de trouver un bon système de diluants pour notre composé, nous avons procédé à une série de tests de miscibilité pour le dichlorométhane avec

différents solvants organiques usuels en biologie clinique (voir annexe), et qui sont susceptibles d'améliorer la diffusion du (R/S)-II. Les résultats de ces essais sont reportés dans les tableaux 4, 5 et la figure 30 :

Tableau 4 : Teste de miscibilité du Dichlorométhane avec différents solvants.

Solvants	Eau	Hexane	Diéthylethere	DMSO
Dichlorométhane	-	-	-	+

Tableau 5 : Teste de miscibilité du mélange (Dichlorométhane/DMSO) avec l'eau.

Solvants	Eau	Dichlorométhane
DMSO	+	+
DMSO	-	

- : mauvaise miscibilité + : bonne miscibilité



Figure 30 : Teste de vitesse de diffusion du Dichlorométhane avec différents solvants.

- Les résultats des testes de miscibilité, montrent que le dichlorométhane est à priori miscible en toute proportion avec tous les solvants **organiques à part l'eau**.
- Mais une fois le (R/S)-II à 100 mg/ml dans le dichlorométhane, ajouté aux différents solvants organiques, le meilleur résultat de miscibilité dans ce cas la, est obtenu pour, le mélange (dichlorométhane /DMSO) (50V/50V).

4.3. Résultats du deuxième essai

L'étude de l'activité antimicrobienne du (R/S)-II en utilisant le mélange (dichlorométhane/ DMSO), (50V/50V) comme solvant de dilution, a donné les résultats suivants :

- Nous n'avons observé aucune activité antimicrobienne, contre les bactéries Gram (-) *Escherichia coli* et *Margenelle marganie*, les bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* 2S et *Bacillus Sp*, et le champignon *Aternaria Sp*.

- les résultats positifs pour le restant des souches testées, sont illustrés dans les figures de 31 à 35 et reportés sur le tableau 6 :

Tableau 6 : Activité antimicrobienne du (R/S)-II pour le deuxième essai.

Dilution (mg/ ml)		1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
		100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
		Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (cm)						
Gramm -	<i>P. aeruginosa</i>	1.1	1	1.1	1.5	0.7	1	0.8
	<i>Proteus Sp</i>	0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	<i>K.pneumonia</i>	0	0.7	1	0	0	0	0
Champigno ns	<i>F. oxysprium</i>	0	0.7	0.7	0.7	0.9	0.9	0
	<i>A.Niger</i>	0	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7

- le témoin n'a aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées.

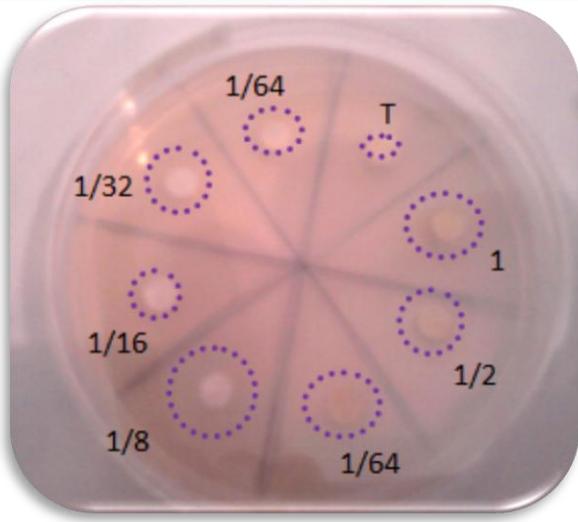


Figure 31: *P. aeruginosa*

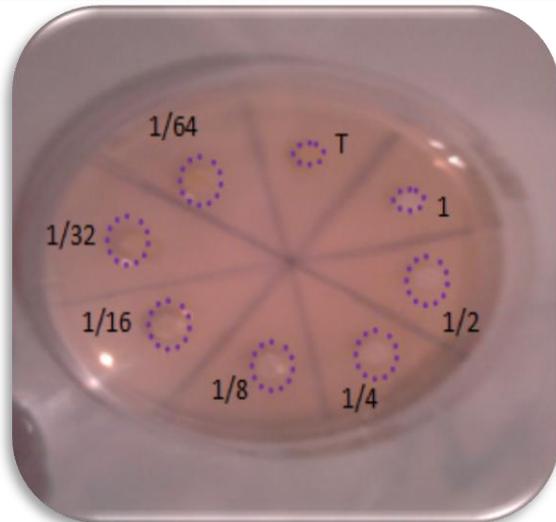


Figure 32: *Proteus Sp*

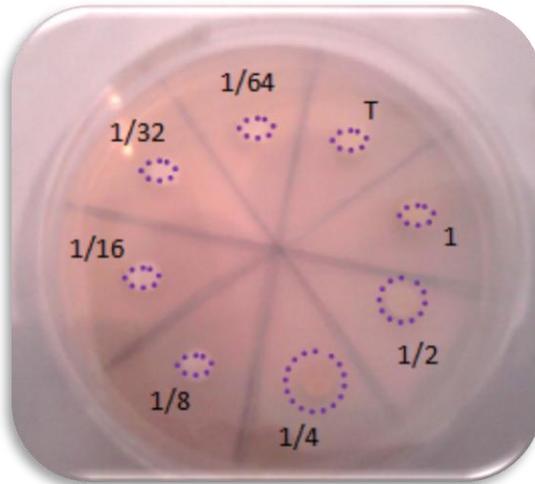


Figure 33: *K.pneumonia*

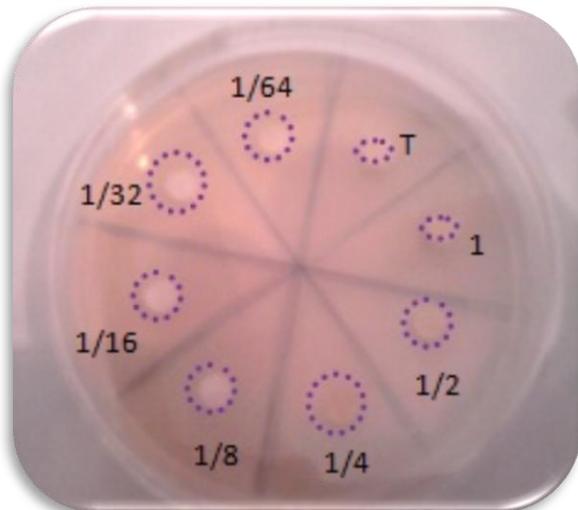


Figure 34: *A.Niger*

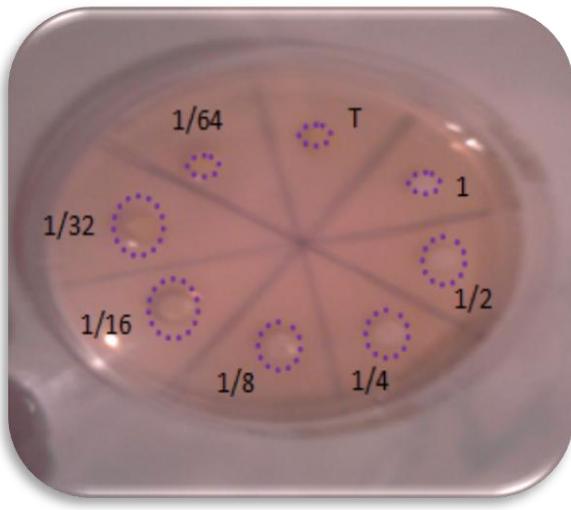


Figure 35: *F. oxysprium*

Figure 31-35 : les résultats du deuxième essai

5. l'antibiogramme :

Les résultats obtenu pour l'antibiogramme des antibiotiques : IPM, NA, Sr, CN, CTX, AMC, testés sur les même souches microbiennes sont illustrés dans les figures suivantes puis consignés dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Les résultats de l'antibiogramme.

Antibiotiques Souches testées		IPM	NA	Sr	CN	CTX	AMC
		Diamètres de la zone d'inhibition (cm)					
Gramme Positif	<i>S. aureus</i>	6	2.2	0	-	-	-
	<i>S. aureus 2S</i>	6	2	2.5	-	-	-
	<i>Bacillus Sp</i>	5.4	2.3	3	-	-	-
Gramme Négatif	<i>E. coli</i>	6	4.2	-	3.8	3	0
	<i>K. pneumonia</i>	4.5	2.8	-	1.8	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	3.3	0	-	2.4	0	0
	<i>Proteus Sp</i>	5	0	-	3.15	2.6	0
	<i>M. marganii</i>	2.3	0	-	0	0	0

- le témoin n'a aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées.

Gramme positif

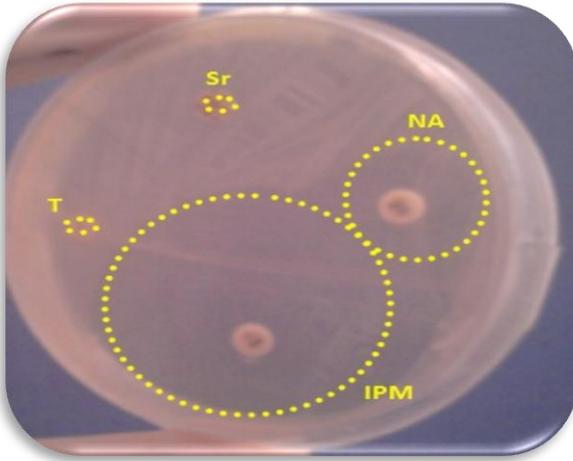


Figure 36: *S. aureus*

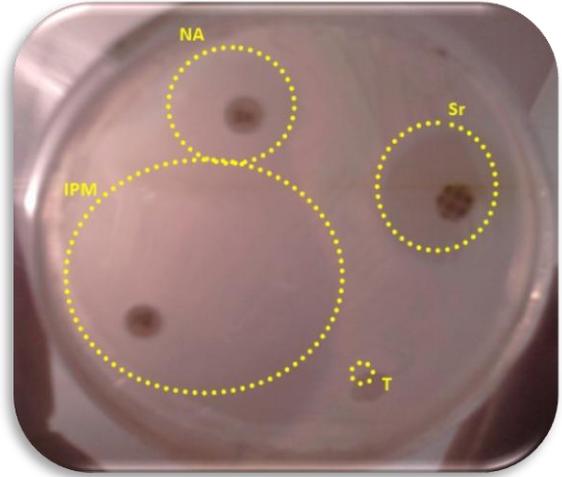


Figure 37: *S. aureus* 2S

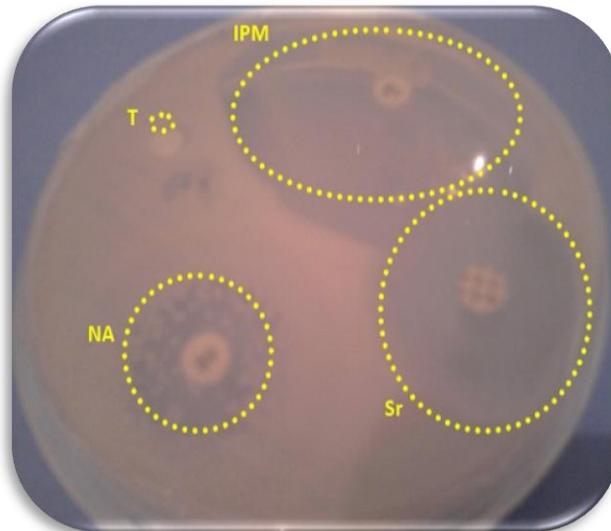


Figure 38: *Bacillus Sp*

Figure 36-38 : les résultats d'antibiogramme sur les bactéries Gramme positif

Gramme négatif

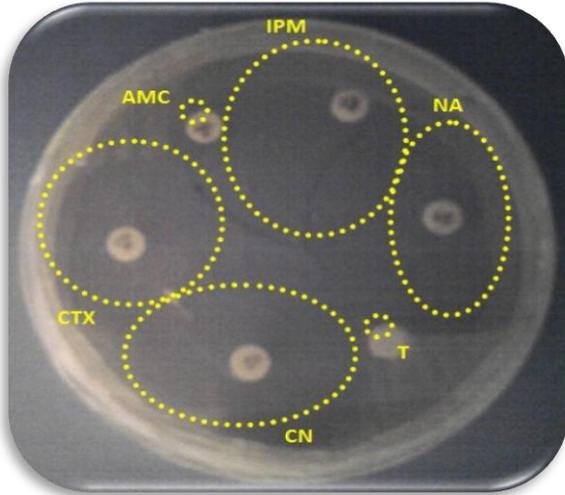


Figure 39: *E. coli*

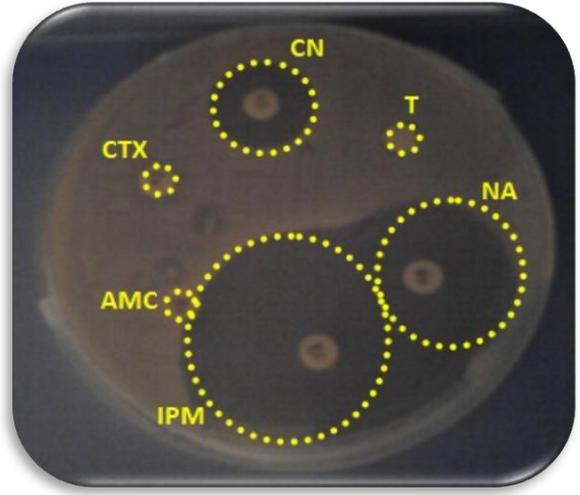


Figure 40: *K. pneumoniae*

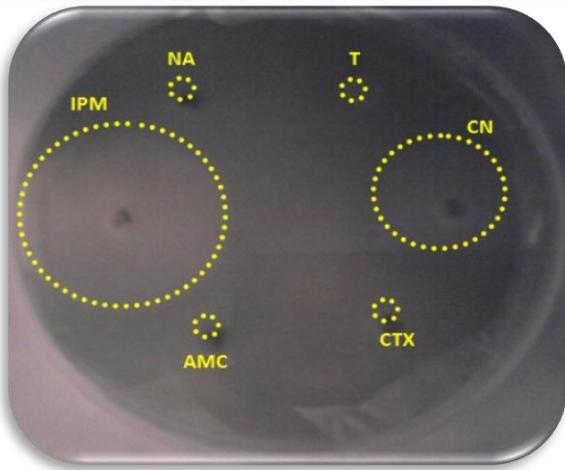


Figure 41: *P. aeruginosa*

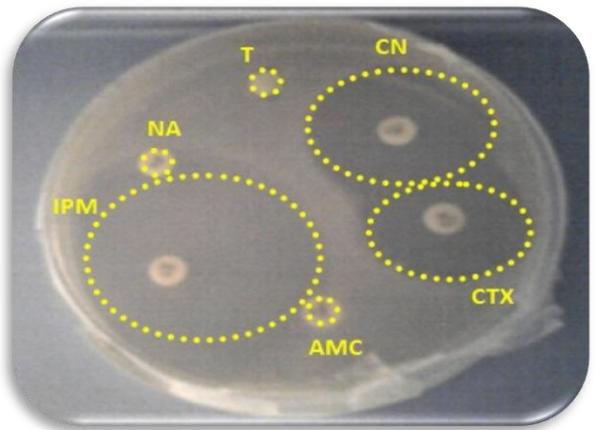


Figure 42: *Proteus Sp*

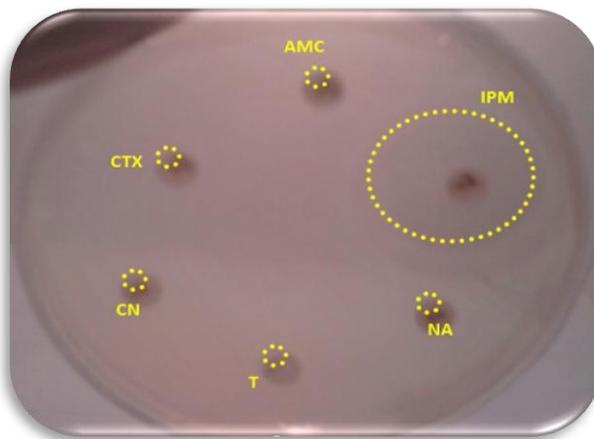


Figure 43: *M. morganii*

Figure 39-43 : les résultats d'antibiogramme sur les bactéries Gramme négatif

1. Purification

➤ Discussion de la fraction choisie au cours de la purification du (R/S)-II par CC

Le choix du solvant éluant utilisé pour la séparation est dicté par la valeur du R_f de la CCM. Il est supérieure à 0.1, et par conséquent le solvant peut assurer une bonne séparation du produit (W. C. Still, 1978).

Le choix de la fraction récupérée est aussi basé sur le résultat de la CCM, ou on remarque qu'il n'apparaît qu'un seul spot intense, de même sur CC, la molécule du (R/S)-II est éluée en une seule fraction, qui migre à une vitesse supérieure à celle des impuretés, ce qui prouve que le choix de la phase mobile fut adéquat.

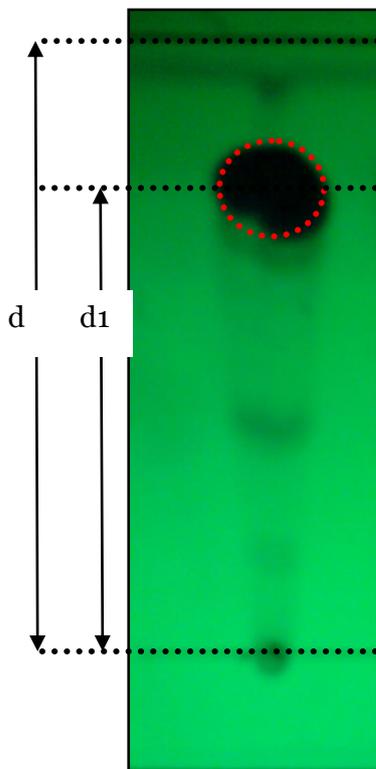


Figure 44 : Chromatogramme CCM par après développement, observé sous UV CC

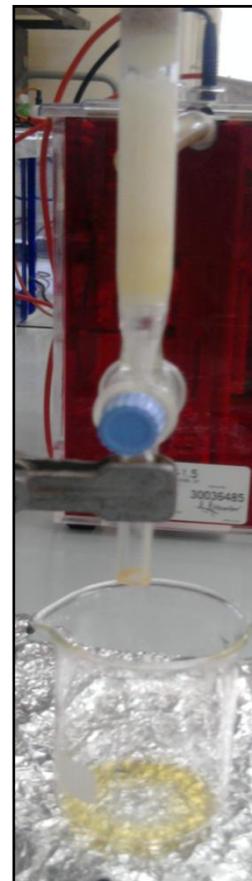


Figure 45 : Elution du (R/S)-II par chromatographie CC

2. Caractérisation structurale

➤ Discussion des résultats de l'analyse par UV

Nous pouvons discuter les résultats de cette analyse spectroscopique, en nous référant à diverses sources bibliographiques :

Selon: G. Silverstein

- a) les groupements Cyclopentadiène sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 238nm; A laquelle s'ajoute éventuellement une bande de 30 nm due à la présence d'une liaison de conjugaison avec le groupement — S — R

Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente à 263.6 nm dans le spectre de notre produit.

- b) une bande d'absorption due aux groupements Phényle, devrait se trouver aux environs de 255 nm. Elle apparaît à 250 nm sur notre spectre. **(G. Silverstein, 2004)**

➤ Discussion des résultats de l'analyse par IR

De la même manière, nous discuterons également les résultats de la spectroscopie IR , en nous basant sur les références suivantes :

Selon Thomas :

- c) les groupements $R_1R_2P(S)S$ libres à phosphore tétracoordonné sont responsables d'une bande dans la région de $472 - 481 \text{ cm}^{-1}$; mais lorsqu'ils sont engagés dans une liaison avec d'autres groupements ; la fréquence correspondante est plus basse. *Ce qui correspond à la bande apparaissant à 451.3 cm^{-1} dans le spectre de notre produit.*
- d) une bande de vibration due aux groupements $R_1 R_2 R_3P(S)$, se trouve dans la région de $627 - 663 \text{ cm}^{-1}$. *Elle apparaît bien dans cet intervalle dans le spectre de (R/S)-II à 644.2 cm^{-1} .*
- e) une bande due aux groupements $P - Ph$, se trouve dans la région de $1420-1450 \text{ cm}^{-1}$: *Elle apparaît dans le spectre de notre composé à 1427.2 .*
- f) la bande entre $650 - 740 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupement $S - C$. Elle apparaît à 705.9 cm^{-1} sur le spectre du (R/S)-II. **(L. C. Thomas, 1974)**

Selon Lebreton :

- g) Les doubles liaisons aromatiques ont une fréquence de vibration entre 1500 et 1610 cm^{-1} . A laquelle s'ajoute éventuellement une bande à 1585 cm^{-1} due à la présence d'une double liaison conjuguée avec un cycle benzénique. *Nous obtenons cette fonction à 1573.8 cm^{-1} sur le spectre de notre produit.*
- h) les groupements $\text{P} = \text{C}=\text{C}$ à une fréquence de vibration importante dans la région de 1605 – 1645 *Nous obtenons cette fonction à 1639 cm^{-1} dans le spectre de notre produit.*
- i) la région du spectre située en dessous de 1100 cm^{-1} est difficilement interprétable ; on note cependant, aux environs de 800 cm^{-1} , une bande caractéristique des hydrogène des cycles benzéniques. *Dans notre cas, cette fonction est détectée à 817.6 cm^{-1} . (P. Lebreton et al, 1963)*

Selon F. Balazs:

- j) La région du spectre située entre 500 - 485 cm^{-1} est principalement due aux vibrations du groupement Fc - Elle apparaît dans le spectre du (R/S)-II à 489.9 cm^{-1} . (F. Balazs, 2009)

En conclusion, les résultats obtenus par les spectres UV et IR, concordent parfaitement avec ceux relevés dans la littérature pour la même analyse, et nous retrouvons bien par conséquent, les bandes caractéristiques qu'elles soient de vibration ou d'absorption, de toutes les fonctions présentes dans notre composé.

Ceci, vient conforter les résultats de la caractérisation par RMN, Masse et RX entrepris au préalable pour cette molécule (T. N. Mouas, 2013)

3. Activité antimicrobienne

Le criblage microbiologique préliminaire du premier essai, nous a permis d'optimiser notre système de dilution ainsi que les quantités de principe actif testé, l'ors du deuxième essai nous avons pris le mélange (dichlorométhane/ DMSO 50V/50V) comme solvant de dilution en partant d'une solution mère à 100mg/ml, nous avons pu alors observer une activité antimicrobienne modérée, contre les bactéries Gram (-) ; en effet, la zone d'inhibition d'un bon agent antimicrobien diffère selon les références bibliographiques. D'après Pereira et ses collaborateurs (PEREFRA LEITES et al, 2006) celle-ci doit être égale ou supérieure à 10 mm ; pour Vireira et ses collaborateurs (VIREIRA

et al, 2001) elle est de 13 mm alors que pour Seokwon Kim et ses collaborateurs (SEOKWON K I M et al. 2006) elle est supérieure à 6 mm.

Quand à nos résultats, ils montrent que les diamètres d'inhibition varient de 7mm à 15 mm ; la plus petite inhibition est obtenue chez *K. pneumonia* avec un diamètre 7 mm et la plus grande chez *P. aeruginosa* 15 mm.

Pseudomonas aeruginosa : le diamètre de la zone d'inhibition est le même pour les 3 premières dilutions 7 mm, il augmente sensiblement pour la quatrième 15 mm, puis décroît pour rester stable pour les trois dernières dilutions.

Proteus Sp : le diamètre de la zone d'inhibition est nul pour la première dilution, il augmente et reste stable pour les six dernières dilutions 7 mm.

Klebsiella pneumonia : le diamètre de la zone d'inhibition est nul pour la première dilution, il augmente sensiblement dans la deuxième et troisième dilution pour rechute vers le zéro pour les quatre dernières dilutions.

Pour les champignons :

Fusarium oxysporum : le diamètre de la zone d'inhibition est nul pour la première dilution, il augmente et se stabilise pour les 4 dilutions qui suivent (7-9 mm) jusqu'à la dernière dilution où il s'annule.

A.Niger : le diamètre de la zone d'inhibition est nul pour la première dilution, puis il augmente et se stabilise pour le reste des dilutions 8 mm.

Nous pouvons expliquer cela par une meilleure diffusion du composé au fur et à mesure que la quantité de DMSO augmente et que celle de dichlorométhane diminue dans la dilution.

Ce qui confirme ce que nous savons déjà par la littérature, à savoir que les solvants de dilution ainsi que le dosage du principe actif, revêtent une grande importance pour cette étude, et nous amène à conclure à l'existence d'un potentiel antimicrobien intéressant de notre biomolécule synthétique.

4. Antibiogramme

D'après la littérature, IPM et NA sont des antibactériens qui ont le spectre le plus large parmi tous ceux que nous avons utilisé. Nos résultats expérimentaux montre bien que l'IMP est l'antibiotique le plus puissant à la fois pour les souches Gram positif comme pour celles Gram négatif et même beaucoup plus que le NA.

Comme nous pouvons aussi remarquer que le Sr est un antibiotique contre les bactéries Gram positif, par comparaison, le Sr est plus efficace que NA mais beaucoup moins que l'IPM pour la souche *S. aureus 2S* et *Bacillus Sp.* où on peut remarquer une forte résistance du *Staphylococcus aureus: ATCC 25923*

CN, CTX, AMC sont des antibactériens spécifiques aux bactéries Gram négatif, ils ont des efficacités respectivement décroissantes, et ils sont beaucoup moins efficace que l'IMP, nous remarquerons en outre, que l'ACM n'a aucune activité sur les souches Gram négatif testées.

CONCLUSION

GENERALE

Notre étude chimique et microbiologique de la molécule (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinato-méthyl) ferrocène, nous a permis de balayer un des domaine d'application possible de ce nouveau composé. Le choix de ce thème, a été dicté par l'utilisation de ces composées dans la pharmacologie pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier les infections microbiennes.

Dans ce travail, nous avons pu purifier le composé (R/S)-II. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de deux méthodes chromatographiques séparatives : la CCM et la CC. Nous avons pu obtenir le produit pur par la chromatographie liquide sur colonne en une seule fraction, que nous avons également pu recristalliser par diffusion lente dans le DMSO.

Le produit obtenu, a été caractérisé par les méthodes structurales spectroscopiques IR et UV, lesquelles ont confirmé la structure de cette nouvelle biomolécule synthétique.

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, le test de diffusion des disques sur milieu gélosé, a été utilisé, et les résultats ont montré que la molécule (R/S)-II, présente une activité modérée vis-à-vis d'au moins trois souches bactériennes Gram(-): *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus Sp* et *Klebsiella pneumonia* et deux champignons : *A. Niger* et *Fusarium oxysprium*.

Notons enfin, que ce travail permettra d'envisager des horizons de recherche ciblés dans l'axe que nous avons initié sur cette molécule synthétique. A cet effet, nous pouvons suggérer les perspectives suivantes :

- Poursuivre l'étude de l'activité anti-microbienne de la molécule, notamment en améliorant les systèmes de solvant de dilution utilisés, ce qui permettra non seulement une meilleure solubilisation du composé, mais aussi une meilleure diffusion dans le milieu utilisé.
- Etendre l'étude biochimique de la molécule, afin de découvrir son mode d'action antimicrobien, sa CMI, son activité anti-microbienne *in vivo* et même d'autres activités biologiques.
- Identifier l'énantiomère actif de cette molécule qui confère l'activité souhaité, en prenant en considération l'étape de la résolution, afin d'éviter les effets non souhaités du deuxième énantiomère, et d'amplifier par la même son effet thérapeutique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A. D. Dean, A. J. Dean, A. H. Burton & R. C. Dicker. (1990) Epi-Infoversion 5: a word processing database and statistics programme for epidemiology on microcomputers.

A. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin & S. D. Costanzo. (2009) the occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*. 407: 2711–2723.

A. Kirrmann, M. & Janot G. Ourisson. (1976) les composés thiophosphororganiques. 25-27.

A. L. Barry, R. N. Jones, C. Thornsberry, L. W. Ayers, E. H & H. M. Gerlach. (1984) Sommers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 633–637.

A. N. Nesmeyanov, L. G. Bogomolova, V. Viltchevskaya, N. Palitsyne & I.O. Andrianova. (1971) Belozerova. *US. Patent*. 119-356.

A. Rozalski, Z. Sidorczyk & K. Kotełko, 1997, Potential virulence factors of *Proteus* bacilli, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65–89.

A. Y. C. Lin, T. H. Yu & C. F. Lin. (2008) Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*. 74 : 131–141.

B. Hainque, B. Baudin & P. Lefebver. (2008) *Appariele et méthodes es biochimie et biologie moléculaire, Médecine-Sciences, Flammarion*. 59-80, 216-225.

B. Sookkheo, S. Sinchaikul & S. Phutrakul. (2000) *Chen, Prot. Exp. Purification*. 20: 142-151.

B. Thomma. (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4: 226-236.

B. W. Senior. (1998) *Proteus, Morganella and Providencia*. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds) *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections, Systematic bacteriology*. London, Arnold. 2: 1035–1050.

C. A. Bain, G. S. Beagrie, J. Bourgoïn, F. Delorme, A. Holthuis, R. G. Landry et al. (1994) the effects of spiramycin and/or scaling on advanced periodontitis in humans. *J Can Dent Assoc.* 60: 2,9-17.

C. André, C. Jeanne, D. Jean-Pierre & G. Laure. (2006) Molécules chirales, Stéréochimie et propriétés, édition CNRS, EDP SCIENCES. 7-103.

C. André et al. (2006a) Bijvoet. (1951) La détermination des configurations absolues par diffraction des rayons X.

C. André et al. (2006b) Cahn, Ingold & Prelog. (1966) L'établissement d'une nomenclature stéréochimique cohérent.

C. Biot, G. Glorian, L. A. Maciejewski & J. S. Brocard. (1997) J. Med. Chem. 40: 3715.

C. D. Bishop & R. M. Cooper. (1983a) An ultrastructural study of root invasion of three vascular wilt diseases. Physiological and Molecular Plant Pathology. 22: 15-27.

C. E. Thorburn, S. Knott & D. I. Edwards. (1998) In vitro activities of oral beta-lactams at concentrations achieved in humans against penicillin-susceptible and -resistant pneumococci and potential to select resistance. Antimicrob Agents Chemother. 42: 1973-1979.

C. M. O'Hara, F. W. Brenner & J. M. Miller. (2000) Classification, identification and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Clin Microbiol Rev. 13: 534-546.

Cheymol. (1970) Colloques Nationaux du CNRS, Composés organiques du Phosphor, Ed. CNRS. 367.

D. A. D'Argenio, L. A. Gallagher, C. A. Berg & C. Manoil. (2001) *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Bacteriol. 183: 1466-1471.

D. BIJONDI, P. CIANCI, C. Geraci & G. Ruberto. (1993) Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants, *Favos* and fragrance journal. 331-377.

D. Scutaru, L. Tataru, I. Mazilu, E. Diaconu, T. Lixandru & C. Simionescu. (1991) J. Organomet. Chem. 401-81.

E. I. Edwards, R. Epton & G. Marr. (1975) J. Organomet. Chem. 85.

E. Merz. (1993) Partitioning and transmutation of actinides and fission products. Report Jil. 2818.

- E. Newallis, P. John et al. (1962) Leo C.D. Groenweghe Thionophosphine Sulfides.I, preparation and use in the Friedel-Crafts reaction. 27: 3829-3831.
- E. Newallis, Peter, Chupp, P. John & C. D. Leo Groenweghe. (1962) I. Thionophosphine Sulfides, , preparation and use in the Friedel-Crafts reaction. 27: 3829-3831.
- E. Rubinstein & N. Keller. (1998) Spiromycine renaissance. J Antimicrob Chemother. 42 : 572-6.
- F. Balazs, C. Antal, N. Zs. Tibor et al. (2009) Synthesis, ring transformations, IR-, NMR and DFT study of heterocycles with two ferrocenyl units. J.ORG.CHEM. N° 23. 694: 3737.
- F. Mathy & A. Sevin.(2000) chimie moléculaire des éléments de transition, Brève histoire de la chimie organométallique. 5-11.
- F. Tamtam, F. van Oort, B. Le Bot, T. Dinh, S. Mompelat, M. Chevreuil, I. Lamy & M. Thiry. (2011) Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. Science of the Total Environment. 409: 540–547.
- F. ZERGAT. (1996) Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- G. Modolo & R. Odoj. (1998) the separation of trivalent actinides from lanthanides by dithiophosphinic acids from HNO₃ acid medium Journal of alloys and compounds. 248 -251.
- G. P. Bodey, R. Bolivar, V. Fainstein & L. Jadeja. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 5: 279-313.
- G. Silverstein Robert Milton, B. Clayton, C. Terence, C. Morrill et al. (2004) Identification spectrométrique de composés organiques, édition de boeck, caractérisations d'absorption de composés organiques. 311.
- G. Stéphane & L. Danielle. (2008) chimie organique 1. 1: 97 -127.

G. Wilkinson, M. rosenblum, M. C. whiting, R. B. Woodward & J. Am. (1952) Chem. Soc. 74: 2125.

J. Abdalla, M. Saad, I. Samnani et al. (2006) Central nervous system infection caused by *Morganella morganii*. Am J Med Sci. 331: 44-47.

J. B. Lyczak, C. L. Cannon & G. B. Pier. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* Infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2: 1051-1060.

J. Brettar. (2004) La chiralité planaire du ferrocène : un nouveau concept pour l'élaboration de matériaux mésomorphes optiquement actifs. 17.

J. D. D. Pitout, P. Nordmann, K. B. Laupland et al. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. J. Antimicrob. Chemother. 56: 52.

J. G. Holt, N. R. Krieg. P. H. A. Sneath, J. T. Staley & S. T. Williams. (1994) editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 559.

J. H. WOO, E. KITAMURA, H. MYOUGA & Y. KANEI. (2002) An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain Ap 77 is spécifique for Pytiumporphyræ, a causative agent of red rad disease in porphyra.

J. Kljun, A. K. Bytzek, W. Kandioller, C. Bartel, M. A. Jakupec, C. G. Hartinger, B. K. Keppler & I. Turel. (2011) Organometallics. 30: 2506–2512.

J. Kljun, I. Bratsos, E. Alessio, G. Psomas, U. Repnik, M. Butinar & B. Turk. (2013) Turel, Inorg. Chem. 52: 9039–9052.

J. L. Fauchère & J.-Loup Avril. (2002) "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris. 365.

K. Akahane, M. Sekiguchi, T. Une & Y. Osadaanti. (1989) Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1704–1708.

K. Bosio, C. Avanzini, A. D'avolio et al. (2000) *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*, Letters in Applied Microbiology. 174-177.

K. I. Suhr & P. V. Nielson. (2003) Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi, *Journal of Applied Microbiology*. 665-674.

K. L. Nach et al. (1993) L. Nash, *Solv. Extract. Ion Exchange*. 11(4): 729-768.

Khorana. (1961) *Some Recent Development in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*. John Wiley Ltd. London.

L. Almasi. (1976) a: Hilgetag, Teichmann. *Z. Chem*. 11-1-1971.

L. Almasi. (1976) b: Wieland, Bauerlein. *Naturwiss*. 54-80-1967.

L. Almasi. (1976) c: Eckstein. *J. Am. Chem. Soc*. 88-4292-1966.

L. Almasi. (1976) d: Eckstein. *Tetrahedron Letters*. 1967-1157.

L. Almasi. (1976) e: Eckstein, Gindl. *Chem. Ber*. 101-1670-1968.

L. Almasi. (1976) *Les composés thiophosphororganique*. Masson Paris. 6-7,38-39, 299-330.

L. Almasi. (1976) *les composés thiophosphororganiques*. 5-16, 62-102.

L. C. Thomas. (1974) *Interprétation of the infrared spectra of organophosphorus compounds*, Monographie, edition London, Heyden. 60 -153.

L. F. Tang, W. L. Jia, Z. H. Wang, J. F. Chai & J. T. J. Wang. (2001) *Organomet. Chem*. 637: 209-215.

L. G. Rahme, E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins & F. M. Ausubel. (1995) *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. *Science*. 268: 899-1902.

L. K. Branski, A. Al-Mousawi, H. Rivero, M. G. Jeschke, A. P. Sanford & D. N. Herndon. (2009) *Emerging Infections in Burns. Surg Infect (Larchmt)*. 10: 389-397.

L. P. Stenfors Arnesen, A. Fagerlund & P. E. Granum. (2008) *from soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. *Fems Microbiology Reviews*. 32(4): 579-606.

M. Lahlou. (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils phytotherapy research. 435-448.

M. A. HORICAW, T. NORA & Y. KAMEI. (1999) /nv/Yroantimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* Xi\Xy found in extract of marine algae indigenous to the coastline of Japan. J. Antibiot. 52: 186-89.

M. A. Kusters-van Someren, H. C. M. Kester, R. A. Samson & J. Visser. (1990) Variations in pectolytic enzymes of the black Aspergilli: A biochemical and genetic approach. In R. A. Samson and J.I. Pitt, (eds.), Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification. NATO Advanced Science Institute Series, Series A: Life Sciences. 185: Plenum Press. NY. (1).

M. Al-Haroni & N. Skaug. (2007) Incidence of antibiotic prescribing in dental practice in Norway and its contribution to national consumption. J Antimicrob Chemother. 59: 1161-6.

M. Auge. (2013) Stratégie de l'anion chiral en catalyse asymétrique organométallique. 23.

M. Auzias. (2008) Complexes mono- et dinucléaires de ruthénium à ligands ferrocéniques et porphyriniques: Synthèses, structures moléculaires, propriétés rédox et applications biologiques. 28-33.

M. Bochmann. (1994) Organometallic II, Complexes with Transition Metal-Carbon π -Bonds. 2nd Ed.ed. Oxford Univ. Press. New York.

M. Fayna, B. Piro & R. Steeve. (2011) chimie³, introduction à la chimie inorganique, organique et à la chimie physique. 450-476.

M. Ferhat. (2009) Recherche de substances bio actives de *Centaurea microcarpa* coss et dur, Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila. 12-22.

M. H. Guinebretiere, H. Girardin, C. Dargaignaratz, F. Carlin & C. Nguyen-The. (2003) Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. International Journal of Food Microbiology. 82(3): 223-232.

M. S. Ammar, S. S. El-Louboudy & U. M. Az. Abdulraouf. (1991) J. Microbiol. 13: p: 12-29.

N. A. Logan & P. De Vos. (2009a) Genus I. Bacillus. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman). 21-128. (Springer: Dordrecht).

N. Bousbia. (2004) Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, organ, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes, Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique. Alger (Algérie).

OMS. (1996) (on line) [https:// apps. Who.int/inf-fs/fr/am125.html](https://apps.who.int/inf-fs/fr/am125.html).

P. A. Mashimo, Y. Yamamoto, J. Slots, R. T. Evans & R. J. Genco. (1981) In vitro evaluation of antibiotics in the treatment of periodontal disease. Pharmacol Ther Dent. 6: 45-56.

P. Bellaiche. (1979) Aromatogramme *In Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Edition Maloine-S-A. Tom 1. 1: 9-20.

P. Bielecki, J. Glik, M. Kawecki & V. A. Martins dos Santos. (2008) towards understanding Pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression. Biotechnol Lett. 30: 777-790.

P. J. Carek, L. M. Dickerson & J. L. Sack. (2001) Diagnosis and management of osteomyelitis. Is FAM Physician. 63: 2413-20.

P. Lebreton & J. Chopin. (1963) Contribution à l'étude spectrographique infrarouge des composés flavoniques. 19: 2099–2112.

P. Nordamann, G. Cuzon & T. Naas. (2009) the real threat of Klebsiella pneumonia carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infec Dis. 9(4): 228-236.

P. P. Poulet, D. Duffaut, P. Barthet & I. Brumpt. (2005) Concentrations and in vivo antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/ metronidazole combination. J. Antimicrob Chemother. 55: 347-51.

P. S. McKinnon & S. L. Davis. (2004) Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 271–288.

Polonovski. (1966) Colloques Nationaux du CNRS , Composés organiques du Phosphore. Ed. CNRS. 23.

Q. Françoise , G. Paul-Françoise, G. Michel & Q. Bernadette. (2011) MAXI FICHES, Biochimie en 83 fiches. 28, 29.

R. A. Yeary. (1969) *Toxicol, Appl. Pharmacol.* 15-666.

R. Dagani et al. (2001) *Chemical and Engineering News.* N° 49. 79: 37–38.

R. Hudej, J. Kljun, W. Kandioller, U. Repnik, B. Turk, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, D. Miklavcic & I. Turel. (2012) *Organometallics.* 31: 5867–5874.

R.K. Barakat *et al.* (2000) Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultrymeat". *INT. J. F. MIC.* 62: 83-94.

RIPERT Christian. (2013) *Mycologie médicale*, Lavoisier. ([ISBN 9782743064884](https://doi.org/10.1017/9782743064884)).

S. Perefra, J. R. Leite, C. Vieira, P.L. De Medeiros et al. (2006) Antimicrobial activity of *Indigoferasuffruticosa*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3: 261-265.

S. J. Cryz, R. Furer & R. Germanier. (1985) Protection against fatal klebsiella pneumonia burn wound sepsis by passive transfer of anticapsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 45: 139-142.

S. K. Spangler, G. Lin, M. R. Jacobs & Pc. Appelbaum. (1997) Postantibiotic effect of sanfetrinem compared with those of six other agents against 12 penicillin-susceptible and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2173-2176.

S. Pukatzki, R. H. Kessin & J. J. Mekalanos. (2002) the human pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S a.* 99: 3159-3164.

SEOKWON K I M et al. (2006) Antimicrobial and antifungal activity of sulfur-containing compound from *Petiveriaaliacea*.

Shrader. (1963) Die Entwicklung Neuer Insektizider Phosphorsare-Ester. Verla chemie. Weinheim.

T. J. Franklin & G. A. Snow. (1981) Biochemistry of Antimicrobial Action, Chapman & Hall, London. 45–46.

T. J. Kealy & P.L. Pauson. (1951) Nature. 168 - 1039.

T. N. Mouas, H. Merazig, J- C. Daran & E. Manoury, Acta Cryst. (2012) E68. 381-382.

T. N. Mouas. (2013) Synthèse, caractérisation, structurale et propriétés catalytiques de nouveaux composés ferrocéniques. 7-50.

V. Ostry. (2008) Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs, World Mycotoxin J. 1: 175-188.

V. Tucci & H. D. Isenberg. (1981) Hospital cluster epidemic with Morganella morganii. J Clin Microbiol. 14: 563- 566.

VIREIRA et al. (2001) Microbiocidal effect of medicinal plant extracts (Psidium guajava LINN and Carica papaya LINN) upon bacteria isolates from fish muscle known to induce diarrhea in children.

W. A. Higgins, P. W. Vogel & W. G. Craig. (1955) J. Am. Chem. Soc. 77-1864.

W. Clark Still, M. Kahn & A. Mitra. (1978) Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. J. ORG.CHEM. N° 14. 43: 2924.

www.pasteur.fr/ip/easvsite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/staphylococcies

http://www.sanofiaventis.com/rd/portfolio/p_rd_portfolio_medecine_interne.asp

ANNEXES I

1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est une technique d'analyse chimique très utilisée pour détecter les noyaux atomiques et indiquer le type d'environnement dans lequel ils se trouvent à l'intérieur de la molécule ainsi que la pureté d'un échantillon.

En mesurant la fréquence de résonance des spins nucléaires de certains noyaux atomiques lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique intense, on peut étudier l'environnement chimique de ces atomes. Ces informations permettent d'identifier les molécules, de déterminer leur structure et d'étudier certaines de leurs propriétés physiques (changement de conformation, de phase, solubilité, autodiffusion...).

La différence d'énergie entre l'alignement du spin nucléaire avec ou contre le champ appliqué dépend de la force du champ magnétique, et aussi des propriétés du noyau lui-même.

La spectroscopie RMN a été réalisée au libre service RMN du LCC Toulouse sur des spectromètres Bruker (ARX 250, DPX 300, Avance 300 et Avance 400) pour la réalisation d'expériences 1D (^1H , ^{13}C , ^{31}P)

2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse structurale destructrice (l'échantillon ne pouvant être recouvré après analyse) utilisée en chimie organique. Elle présente l'originalité de s'adresser à des substances analysées en phase gazeuse. La technique basée sur la pesée de la molécule pour déterminer sa masse et sa composition atomique, dont l'objet analysé correspond par conséquent à un flux gazeux ionique généré à partir des molécules introduites dans le spectromètre.

La spectroscopie de masse a été réalisée au service commun de spectrométrie de masse de la Structure Fédérative en Chimie Moléculaire localisé à l'Université Paul Sabatier.

3. La diffraction par rayons X sur monocristal

La cristallographie aux rayons X est une technique qui permet de déterminer l'organisation tridimensionnelle des atomes des molécules à une résolution de 1 \AA . Donc c'est la seule méthode qui permet d'attribuer à une molécule sa véritable structure.

La technique de cristallographie aux rayons X est basée sur quatre étapes : l'obtention de cristaux de la molécule ou cristallogenèse ; la collecte d'images de

diffraction des rayons X à partir de ces cristaux ; le traitement informatique des données de diffraction ; la construction du modèle atomique.

L'analyse structurale par diffraction des rayons X sur monocristal, a été réalisée au service des rayons X du LCC Toulouse. Les résolutions structurales ont été réalisées à des méthodes directes en utilisant les programmes SIR92¹, SHELXS86² ou SHELXS97³, les affinements des structures cristallographiques ont été effectuées par la méthode des moindres carrés, soit sur les facteurs de structures $F(\text{CRISTALS})^4$, soit sur le carré des facteurs de structure $F^2(\text{SHELXL97})^5$.

Tableau 8 : Données cristallographiques et résultats de l'affinement du composé **C₃₅H₃₀FeP₂S₃**

Composé	(R/S)-III-12
Diffractomètre	XCALIBUR Sapphire 1
Formule	C ₃₅ H ₃₀ FeP ₂ S ₃
Poid moléculaire	664,56
Température, K	180(2)
Longueur d'onde, Å	0,71073
Système cristallin	Monoclinique
Groupe d'espace	P 2 ₁ /c
a, Å	10,7284(4)
b, Å	23,9422(11)
c, Å	12,0949(6)
α, °	90,0
β, °	97,311(4)
γ, °	90,0
Volume, Å ³	3081,5(2)
Z	4
Densité (calc), Mg/m ³	1,432
Absorption, mm ⁻¹	0,821
F(000)	1376
Taille du cristal, mm ³	0,75 x 0,62 x 0,50
Domaine en θ, °	3,07 to 27,1
Réflexions mesurées	32489
Réflexions uniques (R _{int})	6763 (0,0371)
“Completeness”, %	99,4 %
Correction d'absorption	Multi-scan
Transmission Max. / min.	1,0 / 0,68593
Affinement	F ²
Données/paramètres	6763 / 370
“Goodness-of-fit” sur F ²	1,034

R1, wR2 [$I > 2\sigma(I)$]	0,0299, 0,0720
R1, wR2 (toutes les données)	0,0380, 0,0750
Densité résiduelle, $e.\text{\AA}^{-3}$	0,346 / -0,397

Les solvants organiques utilisés

- Tous les solvants utilisées sont de qualité analytique.
- La chromatographie sur colonne liquide a été réalisée sur Merck KieselgelSiO₂ et sur couches minces CCM a été réalisée sur Merck Kieselgel 60F254.

A- DMSO (diméthylsulfoxyde) :

Le DMSO ou diméthylsulfoxyde ou méthylsulfoxyde (C₂H₆OS, CAS est un Solvant organique utilisé en chimie ou biologie, notamment comme agent protecteur lors de la congélation de cellules ou tissus. C'est un liquide dense et incolore. Il est totalement miscible dans l'eau et est moyennement inflammable. Le DMSO est un produit pouvant être nocif et qui requiert des procédures spéciales pour une manipulation et une disposition sécuritaire (D.C. Washington, **1995**).

Il a aussi une utilisation accrue dans la synthèse pharmaceutique, la fabrication de produits électroniques, et l'administration de médicaments dans le corps. Son utilisation est soutenue par plus de 45 années d'expérience industrielle et académique.

B- Dichlorométhane :

Dichlorométhane (DCM) ou chlorure de méthylène est couramment employé comme décapant pour peinture, solvant, dégraissant, un propulseur d'aérosol et comme un dépresseur de l'inflammabilité des aérosols (revêtement, laques, désodorisants, les herbicides et insecticides). DCM est également utilisé en tant que solvant de traitement dans la synthèse des stéroïdes, des vitamines, l'enrobage des comprimés, des esters de cellulose, des graisses, des huiles, des résines et du caoutchouc (**Rossberg et al, 1986; Holbrook, 1993**).

DCM est une substance très volatile. Jusqu'en 1972, on pensait que son principal effet toxique en usage normal est celui de la narcose. Ainsi, la limite de concentration atmosphérique dans l'air a été fixée à 500 ppm (**R.C. Baselt et al, 1995**).

La plupart des effets toxiques de DCM ont été observés après une exposition aiguë et ont donné lieu à partir de ses effets directs nerveux central dépresseurs du système, sa conversion in vivo de l'oxyde de carbone, ou de son oxydation au phosgène dans un flammé ouverte **(W.B. Gerritsen et al, 1960)**.

C'est un liquide incolore avec pénétration d'éther ou de l'odeur douce et sucrée. Il est modérément soluble dans l'eau (2 g/100 ml à 20 ° C) et soluble dans la plupart des solvants organiques tels que l'éthanol, l'éther, les phénols, les aldéhydes et les cétones. **(York et al, 1979)**.

Méthanol :

Dérivé du gaz naturel, le méthanol est un hydrocarbure composé de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Sa formule chimique est CH₃OH.

Le méthanol est un alcool. C'est un liquide incolore, neutre, polaire et inflammable. Il est miscible à l'eau, aux alcools, aux esters et à la plupart des autres solvants organiques. Il n'est que peu soluble dans les graisses et les huiles.

Le méthanol se biodégrade facilement dans l'eau et dans les sols. À concentration élevée (> 1 %) dans l'eau fraîche ou salée, il peut avoir des effets néfastes sur la vie aquatique à proximité immédiate Du lieu de déversement **(Eckhard Fiedler et al, 1990)**.

C- Hexane :

Le n-hexane est absorbé essentiellement par les poumons, distribué largement dans l'organisme et éliminé tel quel dans l'air expiré ou sous forme de 3 ou 4 métabolites, dont la 2,5- hexanedione, dans les urines.

La toxicité aigue du n-hexane est relativement faible ; c'est un dépresseur du système nerveux central et un irritant respiratoire et cutané. **(N-hexane, 2004)**

ANNEXES II

Les appareils de laboratoire

1. La lampe VU

La visualisation de la plaque CCM, a été réalisée à l'aide d'une lampe UV de type UVSL-58.



Figure 46 : La lampe UV de type UVSL-58

2. Le spectromètre UV

L'analyse structurale par spectrophotométrie d'absorption UV, a été réalisée au laboratoire de Génétique moléculaire à l'aide d'un spectrophotomètre UV, **BIOWAVE DNA Biochrom**.



Figure 47: Spectrophotomètre UV, BIOWAVE DNA Biochrom

3. Le spectromètre IR

L'analyse structurale par spectrophotométrie IR, a été réalisée au laboratoire de Chimie moléculaire par le spectrophotomètre de type FTIR -8201 PC Shimadzu.



Figure 48 : Le spectromètre IR type FTIR -8201 PC Shimadzu

4. Le Rotavapor

L'évaporation des différents solvants a été effectuée à l'aide du rotavapor BUTCHI de type R II



Figure 49 : Rotavapor BUTCHI de type R II.

RESUMES

المخلص

عرفت العقود الماضية نموا كبيرا لعمليات تركيب جزيئات جديدة ذات التأثير العلاجي , و يرجع ذلك أساسا إلى الطلبات المتزايدة لصناعة المستحضرات الصيدلانية على المركبات النشطة العلاجية الأكثر كفاءة ولكن أيضا أكثر اقتصادا من تلك المصنعة المتوفرة في السوق أو المستخلصة من الطبيعة.

الهدف من هذا العمل هو مساهمة في الدراسة الكيميائية البنيوية لمركب صناعي جديد ذو بنية لاتناظرية مستوية و هو عبارة عن خليط من كميات متساوية من المتزامرات الفراغية اليمينية و اليسارية لجزيئة 1 (2 ثنائي الفينيل الثيوفوسفينو) 2 , (2 ثنائي الفينيل ثنائي الثيوفوسفينات الميثيل) الفيروسين كما يهدف الى تقييم قدرتها المضادة للميكروبات , لتحقيق هدفا، قمنا باستخدام طرق تنقية نوعية و كمية : الاستشراب اللوني بالطبقة الرقيقة (CCM) و الكروماتوغرافيا السائلة العمودية (CC) , و قد سمحت لنا تنقية المركب بإعادة بلورته بفعالية بواسطة مزيج ثنائي كلوروميثان وثنائي ميثيل سلفوكسيد , كما قمنا بإسخدام تقنيات دراسة البنية : مطيافية الأشعة تحت الحمراء و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية , مما اكد لنا بنية المركب السابق تنقبة .

لقد تم تقييم القدرة المضادة للميكروبات لهذه المادة النشطة بيولوجيا بواسطة تقنية الانتشار على الأغار Mueller-Hinton من اجل ثمانية ميكروبات (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Bacillus Sp* , *Staphylococcus aureus* 2S ATCC 43300 , *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 , *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Morganella* , *Proteus Sp* , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 , *Niger Aspergillus*) و على اغار Sabouraud من أجل الثلاث فطريات : (*Alternaria Sp* , *Fusarium oxysprum*) , وقد كشفت التجارب أن المركب لديه امكانات مضادة للميكروبات جديدة بالإهتمام على الأقل على خمس سلالات ميكروبية، ولكنها تتطلب تعمقا اكثر في الدراسة لتحسينها.

Abstract

The synthesis of novel therapeutic molecules, known, from several decades, considerable development due to the increase request of pharmaceutical industry of active compounds more efficient and economical than those already existed on market or in nature.

Our work is a contribution in a structural study of a new synthetic compound with a planar chirality (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinato-méthyl) ferrocène and the evaluation of its antimicrobial potential. To realize our objective, we used chromatography as purification method like TLC and CC, in order to crystallize our target molecule in a mixture of dichloromethane and DMSO, we also used IR and UV spectroscopy to characterize the compound, and we finally tested our compound on eleven micro-organism: (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 2S ATCC 43300, *Bacillus Sp*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC27853, *Proteus Sp*, *Morganella morganii*), (*Aspergillus Niger*, *Fusarium oxysprium*, *Alternaria Sp*), our investigations shows that our compound has an interesting antimicrobial activity at list against five micro-organism, but this area of research still need to be more explored and ameliorate

AZIZA NABILA ABDICHE NADIA	<u>Encadreur</u> <i>Maitre de conférence B</i> Mouas Toma Nardjes
Date de soutenance :25/06/2014	
<p style="text-align: center;"><u>Thème</u></p> <p style="text-align: center;">Purification, Caractérisation et Evaluation de l'activité antimicrobienne d'une Nouvelle Molécule Bioactive Ferrocénique Synthétique Chirale</p>	
<p>Résumé</p> <p>La synthèse de nouvelles molécules à effet thérapeutique, connaît depuis quelques décennies déjà, un essor considérable, grâce notamment à la demande accrue de l'industrie pharmaceutique en composés actifs à la fois plus performants mais aussi plus économiques que ceux qui existent déjà sur le marché ou dans la nature.</p> <p>L'objectif de ce travail, est une contribution à l'étude chimique structurale d'un nouveau composé synthétique à chiralité planaire le (R/S)-1, 2-diphénylthiophosphino – 2(2-diphényldithiophosphinato-méthyl) ferrocène et l'évaluation de son potentiel antimicrobien. Afin de réaliser notre objectif, nous avons utilisé des méthodes de purification qualitatives et quantitatives: la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne (CC). La purification du composé nous permet de le recristalliser efficacement dans un mélange dichlorométhane et DMSO. Nous avons fait également appel aux techniques de caractérisation structurale : (IR) et ultraviolet (UV) ce qui nous a confirmé la structure de notre composé purifié. L'effet antimicrobien de notre molécule bioactive a été évalué par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé Mueller-Hinton, pour huit bactéries (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus aureus</i> 2S ATCC 43300, <i>Bacillus Sp</i>, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC27853, <i>Proteus Sp</i>, <i>Morganella morgani</i>) et sur gélose Sabouraud pour trois champignons (<i>Aspergillus Niger</i>, <i>Fusarium oxysprium</i>, <i>Alternaria Sp</i>). Nos investigations, nous ont révélé que le composé possède bien un potentiel antimicrobien intéressant vis-à-vis d'au moins cinq souches microbiennes, mais qui demande encore à être exploré et amélioré.</p>	
<p>Mots clés : biomolécules synthétiques, chiralité, ferrocène, fonctions Thio /Dithionophosphorique, activité antimicrobienne</p>	
<p style="text-align: center;">Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales</p>	
<p><u>Membres du jury</u></p> <p><i>Président</i> : <i>Mme Mechakra A. professeur</i> <i>Université Constantine 1</i></p> <p><i>Encadreur</i> : <i>Mme Mouas T. N. maitre de conférence B</i> <i>Université Constantine 1</i></p> <p><i>Examineur</i> : <i>M Kitouni R. maitre assistant A</i> <i>Université Constantine 1</i></p>	