



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse Protéomique et Santé

Intitulé :

Schéma D'élaboration d'une Molécule à Visée Thérapeutique et
Application Biologique

Présenté et soutenu par :

Le : 22/06/2015

BIOUD Mebarka ET LASSOUED Nihed

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mechakra A. (Professeur – UFM Constantine).

Rapporteur : Mouas T. N. (Maitre de Conférence B – UFM Constantine).

Examineur : Kitouni R. (Maitre Assistant A - UFM Constantine).

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer tous nos remerciements à **DIEU** tout puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

Nos profonds remerciements vont au **Docteur Mouas Toma Nardjes** qui a accepté d'encadrer nos travaux, pour tout le temps qu'elle nous a consacré, ses directives précieuses, et pour la qualité de son suivi durant toute la période de notre mémoire.

Nous remercions **Mme Mechakra A.** professeur à l'université Frères Mentouri, Constantine et **Mr Kitouni R.** maître-assistant à l'université Frères Mentouri, Constantine, de nous faire l'honneur de juger ce travail.

Un merci bien particulier adressé également à **Monsieur Khelifi. D.** professeur à l'université Frères Mentouri Constantine, pour nous avoir accueillies dans son laboratoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions jusqu'à l'obtention du diplôme de master.

Nos remerciements vont enfin à nos très chères parents, qui ont toujours été là pour nous, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Nous vous sommes redevables d'une éducation dont nous sommes fiers ».

LASSOUEDNIHED
BIOUD MEBARKA

Dédicace

A ALLAH le tout puissant, le clément et miséricordieux qui a guidé les pas de ma vie, loué soit ALLAH. Je dédie ce travail à la mémoire de ma très chère sœur « **SAMIRA** » et mes grands-pères, QU'ALLAH le tout puissant, puisse les accueillir dans son vaste paradis.

A mes très chers maman et papa raison de mon existence, pour vos sacrifices, votre soutien, votre générosité et votre tendresse. Vous avez toujours été là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec vos précieux conseils. Aucun mot ne saurait exprimer ma grande reconnaissance, ma gratitude et mon profond amour. QU'AALH vous garde et vous procure une bonne santé et une longue vie je vous aime très fort « Maman, Papa ».

A ma très chère petite fille « ISRAÀ », a mes très chères sœurs « HIBA, BASMA, SABRINA, KHADIDJA, AMIRA, HADJER » et chers frères « ISKANDER et ABD AZIZ » sans oublier les chers enfants « MAY, ADEM, MAYSSEM et AMIRE, MADJED » je vous aime, et à mes chères grands-mères et toute la famille.

A mes chères amies et sœurs « IKRAM, NADIA et IMEN » et à mes meilleurs amies « NIHAD, IMEN, AMINA, ANFEL, ASMA, SARA, INSAF et ROMAÏSSA » je vous aime toutes.

BIOUD MEBARKA

Dédicace

Au nom de dieu miséricordieux

J'aimerais en premier lieu remercier mon dieu **Allah**, l'unique, le tout puissant et le sachant, qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Que mon père accepte à cette occasion, mes hommages comme gage de mon profond amour, et ma reconnaissance jamais interrompue, « je t'aime papa ».

A mon cher frère « Mohamed El Amine » et ma petite très chère sœur « Meriem »

A mon cher fiancé « Fares » qui m'a beaucoup encouragé dans cette étude

A la mémoire de mes grands- parents, Qui ont toujours été dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A mes chères grands-mères, Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A tout ma famille du côté paternel et maternelle

Sans oublier mes très chères sœur et amies « Rym et Ferdaous » et mes fidèles amis :Mebarka,Narimen, Oumeima, Imen, Anfel, Amina et Sara.

LASSOUED NIHED

SOMMAIRE

Sommaire	I
Abréviations.....	IV
Liste des figures	VI
Liste des tableaux.....	IX
Introduction	1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'élaboration des molécules à visée thérapeutique	
1.1. Définition.....	3
1.2. Technique mise en œuvre.....	3
1.3. Les critères de la synthèse	4
1.4. Conception de médicament.....	4
1.4.1. Les différentes approches usitées au cours du temps	4
1.4.2. Les approches actuelles	6
1.4.3. Les approches rationnelles.....	6
1.4.4. Les approches par criblage à haute débit	7
1.4.5. Les approches par chimie combinatoire	7
1.5. Les phases de la conception des médicaments.....	7
1.5.1. La phase de recherche et découverte	8
1.5.2. La phase de développement	8
1.5.3. La phase clinique	8
1.5.4. La phase de mise sur le marché	9
2. Le ferrocène	
2.1. Historique	9
2.2. Structure	10
2.3. Synthèse	11
2.4. Propriétés physico-chimiques	12
2.5. Applications biologiques	12
3. La fonction hydrazone	
3.1. Généralité.....	13
3.2. Synthèse.....	13
3.3. Propriétés structurales	15
3.4. Applications biologiques des hydrazones	16
3.4.1. Activité anti-microbienne	16
3.4.2. Activité anti-inflammatoire	19
3.4.3. Activité anti-oxydante.....	21

3.4.4. Activité anti-VIH	22
4. La molécule 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène	
4.1. Structure	23
4.2. Synthèse	24
5. Méthodes d'analyses chimiques	
5.1. Purification.....	26
5.1.1. Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	26
5.1.2. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	27
5.2. Caractérisation structurale.....	28
5.2.1. Résonance magnétique nucléaire RNM	29
5.2.2. La spectroscopie infrarouge IR	29
5.2.3. La spectroscopie UV	30
6. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne	
6.1. L'antibiogramme.....	31
6.2. Méthode des puits ou cylindre.....	31
6.3. Méthode de dilution.....	32
7. Les microorganismes testés.....	32
7.1. Bactéries Gram (+)	32
7.2. Bactéries Gram (-)	33
7.3. Moisissure	34
8. Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme	35

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel d'étude	
1.1. Matériel chimique	37
1.2. Matériel biologique	37
1.3. Matériel de laboratoire	38
2. Méthode d'étude	
2.1. Purification du DMHF.....	38
2.1.1. Chromatographie liquide sur colonne (CC).....	38
2.1.2. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM).....	39
2.2. Caractérisation structurale du DMHF.....	39
2.2.1. Résonance magnétique nucléaire RMN.....	39
2.2.2. La Spectroscopie IR	40
2.2.3. La Spectroscopie UV	40
2.3. Application biologique du DMHF	40

2.3.1. La technique d'étude de l'activité antimicrobienne du DMHF.....	40
2.3.2. Préparation des souches	40
2.3.3. Préparation des dilutions.....	41
2.3.4. Protocole de l'étude de l'activité antimicrobienne du DMHF.....	42
2.3.5. L'antibiogramme.....	42

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

1. Contrôle de la pureté de DMHF.....	43
1.1. La purification de DMHF par CC	43
1.2. Contrôle de la pureté de DMHF par CCM.....	44
2. Caractérisation structurale du DMHF.....	44
2.1. L'analyse par RMN.....	44
2.2. L'analyse par la spectrophotométrie IR	47
2.3. L'analyse par la spectroscopie UV	48
3. L'évaluation de l'activité antimicrobienne du DMHF.....	49
4. L'antibiogramme	53

DISCUSSION

1. Purification	56
2. Caractérisation structurale.....	56
3. Activité antimicrobienne	58
4. Antibiogramme	59

CONCLUSION GENERALE.....61

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

Abstract

الملخص

RESUME.

Abréviations

AMC	Amoxicillin
B	Bacillus
C ₆ H ₅	Phenyl
C ₅ H ₄	1, 2,4-Cyclopentatriene
C ₅ H ₅	Cyclopentadienylthallium
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie préparative sur couche mince
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CHCl ₃	Chloroforme (trichloro-méthan)
CH ₃	Methyl
CH ₃ OH	Méthanol
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNRS	centre national de recherche scientifique
Cp	Cyclopentadiène
CTX	Cefotaxime
DCM	Dichlorométhane
DMAF	Dimethyle Amine Ferrocène
DME	1,2-Dimethoxyethane
DMHF	2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Do	Densité optique
E. coli	Escherichia coli
Fc	Ferrocène
FCCP	Cyanure de carbonyle-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
H	Hydrogène
IPM	Imipenème
IR	Infrarouge
J	jours
K	<i>Klebsiella</i>
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LC3	Laboratoire de Ligands Chiraux, Complexes et Catalyse.

Abréviations

M	<i>Morganella</i>
MH	Mueller Hinton
N-(CH ₃) ₂ ou (N-Me ₂)	N,N-diméthyl-1-naphtylamine
P	Proteus
R	Radical
RAMP	(R) -1- amino-2- méthoxyméthylpyrrolidine
Rf	Le rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAMP	(S)-1- amino-2- mithoxypyrrolidine
S	<i>Staphylococcus</i>
Sp	Species
Sr	Spiromycine
UV	Ultraviolet
UFM	Universite Frères Mentouri

Liste des figures

Schéma 1: Historique des approches utilisées pour la conception de nouveaux médicaments.....6

Schéma 2 : Les principales phases de la conception d'un médicament.....8

Figure 1: Représentation du ferrocène.10

Figure2: Synthèse du ferrocène.....11

Figure 3 : Les spectres ¹H RMN acquis à différents stades de la synthèse de ferrocène, 42 MHz:cyclopentadiène dans du DME (a), la formation d'anion cyclopentadiényle (b) et la formation de ferrocène (c).....11

Figure 4 : Molécule Fc- pénicilline et la molécule Fc- céphalosporine.....13

Schéma 3: Synthèse générale des dérivés hydrazones.....14

Schéma 4 : Hydrazones synthétisées sous microondes.....14

Schéma 5 : Caractère électrophile et nucléophile des hydrazones.....15

Figure 5 : Classification des centres actifs.....15

Schéma 6 : Voie de synthèse des composés (1,2,3,4et 5).....16

Schéma 7 : Voie de synthèse des composés (7a-7 e).....17

Schéma 8 : Voie de synthèse des composés (8a-8c).....18

Schéma 9 : Voie de synthèse des hydrazone (9a-9d).....19

Schéma 10 : Synthèse d'un dérivé d'hydrazone (12a-12f).....20

Schéma 11 : Voie de synthèse des composés (15a-15b).....20

Schéma 12 : Synthèse d'hydrazone syringique (16a-16e).....21

Schéma 13 : Synthèse des Benzo[d] isothiazolehydrazones (34x, 34y).....22

Figure 6: La structure du composé 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène.....23

Figure 7 : Vue schématique de l'hydrazone de ferrocényl à l'étude.....24

Schéma 14 : La synthèse de la molécule DMHF.....26

Figure 8 : Dessin d'une colonne de chromatographie liquide.....	27
Figure 9: Exemple d'élution en CCM.....	28
Figure 10: Chromatographie sur colonne du DMHF.....	38
Figure 11 : Chromatographie sur couche mince du DMHF.....	39
Figure 12 : La gamme des dilutions.....	41
Figure13: Purification du DMHF par chromatographie liquide CC.....	43
Figure 14 : La plaque CCM après développement, avant et après visualisation par la lampe UV.....	44
Figure 15: Spectre RMN ¹ H du DMHF.....	45
Figure 16: Spectre RMN ¹³ C du DMHF.....	46
Figure 17: Spectre de l'analyse spectroscopique IR du DMHF.....	47
Figure 18 : Concentration du composé dans l'échantillon analysé, calculée par l'appareil UV.....	48
Figure 19 : Spectre de l'analyse spectroscopique UV du DMHF.....	49
Figure 20-25 : Activité antimicrobienne du DMHF.	
Figure 20 : Effet de DMHF sur Entérobactérie <i>sp</i>	51
Figure 21: Effet de DMHF sur <i>M. marganii</i>	51
Figure 22 : Effet de DMHF sur <i>K.pneumonia</i>	51
Figure 23 : Effet de DMHF sur <i>B.subtilis</i>	52
Figure 24: Effet de DMHF sur <i>S.aureus 2S</i>	52
Figure 25: Effet de DMHF sur <i>Penicillium sp</i>	52
Figure 26-27 : Les résultats de l'antibiogramme pour les bactéries Gram positif.	
Figure 26 : <i>S. aureus 2S</i>	54

Figure 27: <i>B.subtilis</i>	54
Figure 28-31 : Les résultats de l'antibiogramme pour les bactéries Gram négatif.	
Figure 28: <i>Entérobacter sp</i>	55
Figure 29: <i>M. morganii</i>	55
Figure 30: <i>E.coli</i>	55
Figure 31: <i>K.pneumonia</i>	55
Figure 32: Chromatogramme CCM après développement observé sous UV.....	56
Figure 33: Éluion de DMHF par chromatographie CC.....	56
Figure 34 : Appareil ADVANCE-DPX 250 pour RMN.....	68
Figure 35 : Le spectromètre IR type FTIR -8201 PC Shimadzu.....	68
Figure 36 : Spectrophotomètre UV, BIOWAVE DNA Biochrom.....	69
Figure 37 : La lampe UV de type UVSL-58.....	69

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des hydrazones 1a, 2a, 3a, 4a et 5a.....	17
Tableau 2 : Les hydrazones les plus actives (7a-7e).....	17
Tableau 3 : Les composés 8a-8c.....	18
Tableau 4 : L'activité des composés (9a - 9d).....	19
Tableau 5 : Les six composés synthétisés (12a-12f).....	20
Tableau 6 : Les hydrazones (15a- 15b).....	21
Tableau 7 : Nouvelle série d'hydrazones (16a-16e).....	21
Tableau 8 : L'activité des composés (34x-34y).....	22
Tableau 9 : Données spectrales RMN { ¹ H et ¹³ C (ppm)} et électrochimiques pour le composé à l'étude.....	24
Tableau 10 : Les résultats du spectre RMN ¹ H du DMHF.....	45
Tableau 11 : Les résultats du spectre RMN ¹³ C du DMHF.....	46
Tableau 12 : Fréquences de vibration dans le domaine IR des groupements fonctionnels du DMHF.....	48
Tableau 13 : Identification des longueurs d'ondes d'absorption dans le domaine UV des groupements fonctionnels du DMHF.....	49
Tableau 14 : Activité antimicrobienne du DMHF.....	50
Tableau 15 : Les résultats de l'antibiogramme.....	53

Introduction

Le XIX^{ème} siècle a été marqué par la chimie organique qui a permis de poser les bases pour le développement d'une nouvelle chimie appliquée aux substances actives, la chimie thérapeutique (également appelée chimie médicinale, pharmaco-chimie). Cette dernière a pour objectif de découvrir et de mettre au point de nouvelles molécules bioactives qui seront progressivement optimisées vers l'obtention de candidats médicaments (**Borgne**).

La mise au point d'une nouvelle molécule à visée thérapeutique va dépendre d'un grand nombre de paramètres et de connaissances scientifiques. Ce concept permet d'aller de la simplicité réactionnelle, à la complexité d'édifices moléculaires en un minimum d'étapes, répondant à un certain nombre de critères de sélectivité ainsi qu'une grande efficacité.

En effet, l'élaboration de molécules à architecture complexe, à partir de produits simples et peu coûteux, constitue l'un des nouveaux défis de l'industrie chimique, qui fabrique les matières actives pour la pharmacie (synthèse des médicaments), l'agrochimie (phytosanitaires...), la parachimie (peintures, adhésifs...), les colorants, ...

De nos jours, nous arrivons à synthétiser et à produire en grandes quantités des molécules biologiquement actives (médicaments). L'intérêt étant de fabriquer la molécule souhaitée à partir de molécules peu onéreuses et facile à se procurer. La molécule est façonnée de la manière que l'on souhaite, afin de lui donner les propriétés voulues, mais pas seulement, l'enjeu est aussi d'avoir un rendement le plus élevé possible, ce qui inclut l'énergie investie (chauffage). Il faut aussi tenir compte de l'aspect sécurité/environnement : l'éventuelle nocivité/toxicité de certains réactifs, produits intermédiaires ou sous-produits de réaction. Enfin, il est nécessaire de prévoir un contrôle qualité de l'espèce chimique produite (extraction, purification). Tout cela ayant un rapport direct avec la valeur commerciale de la molécule synthétisée.

Cependant, l'identification d'une molécule à visée thérapeutique est un long processus, difficile et fastidieux, faisant intervenir de très nombreuses connaissances scientifiques dans les domaines de la chimie (bio) organique, la pharmacognosie, la pharmacologie, la pharmacocinétique, la pharmacie galénique, et la pharmacie clinique.

Ce rédigé est une humble contribution à l'identification d'une nouvelle molécule synthétique à visée thérapeutique.

Par conséquent, nos perspectives seront les suivants :

- Obtenir un composé performant et présentant un seul type de propriété, sans effets toxiques importants.
- Reposer sur des procédés de synthèse "propres" donc respectueux de l'environnement et de rendement élevé.
- Diminuer le coût de revient d'une molécule en réduisant le nombre d'étapes d'une synthèse.
- Minimiser les sous-produits et les effluents. (**Annuaire des Technologies-Clés, 2011**).

Pour mener à bien ces objectifs, nous nous sommes consacrées dans ce mémoire à présenter une nouvelle méthode de synthèse d'une molécule bioactive en une seule étape, à partir d'un aldéhyde ferrocénique avec un haut rendement (>95%), sa purification et caractérisation par différentes méthodes spectroscopiques, ainsi qu'une application biologique, et pour cela nous avons divisé notre mémoire en trois grandes parties :

- Une première partie bibliographique qui portera sur les notions de : l'élaboration et la conception des molécules bioactives, l'édifice ferrocénique, la fonction hydrazone, 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 nouvelle approche de l'élaboration d'une molécule à visée thérapeutique, et de sa valorisation, tout en projetant d'autres perspectives de recherche pour l'avenir.

Chapitre I
Revue
Bibliographique

1. L'élaboration des molécules à visée thérapeutique

1.1. Définition

Dans la Nature, on trouve la plupart des molécules dont on a besoin (parfums, médecine...). La phytothérapie désigne une pratique de la médecine qui utilise les propriétés médicinales des plantes. Cependant, dans les pays industrialisés, on rencontre peu cette pratique, au profit de la synthèse industrielle de molécules. Cela est dû à plusieurs raisons :

- Les quantités de substances actives étant très petites dans les plantes. A l'échelle d'une population, cela demanderait des quantités énormes de plantes.
- La synthèse est généralement moins coûteuse.
- Les molécules actives sont souvent mélangées dans les plantes à d'autres substances non souhaitées, et la séparation n'est pas aisée.
- Certaines molécules naturelles présentent des effets secondaires. (<http://leonardvinci.e-monsite>.)

Une synthèse chimique consiste à fabriquer une nouvelle molécule à partir d'une ou plusieurs réactions chimiques répondant à un certain nombre de critères de sélectivité. L'enjeu d'une synthèse est de partir de molécules faciles à se procurer (peu chères), en ayant un rendement le plus élevé possible, ce qui inclut l'énergie investie (chauffage). Il faut aussi tenir compte de l'éventuelle nocivité/toxicité de certains réactifs, produits intermédiaires ou sous-produits de réaction, l'allongement des synthèses augmente graduellement la complexité, donc la valeur commerciale d'une molécule. Enfin, il est nécessaire de prévoir l'extraction et la purification de la molécule à synthétiser. (**Annuaire des Technologies-Clés, 2011**).

1.2. Technique mise en œuvre

La synthèse purement chimique présente l'avantage d'être plus versatile car elle peut être plus facilement ciblée. Dans l'industrie chimique, on arrive à synthétiser et à produire en grandes quantités des molécules biologiquement actives (médicaments). L'intérêt d'une synthèse est de fabriquer la molécule souhaitée à partir de molécules peu onéreuses. La

molécule est « façonnée » de la manière que l'on souhaite, afin de lui donner les propriétés voulues. (**Annuaire des Technologies-Clés, 2011**).

1.3. Les critères de la synthèse

La synthèse optimisée de molécules bioactives doit répondre à cinq critères essentiels :

- Obtenir des produits toujours plus performants et présentant un seul type de propriété, sans effets secondaires indésirables,
- Reposer sur des procédés de synthèse "propres" donc respectueux de l'environnement et de rendement élevé, ce qui nécessite généralement de développer au maximum les processus catalytiques,
- Diminuer le coût de revient d'une molécule en réduisant le nombre d'étapes d'une synthèse,
- Minimiser les co-produits et les effluents.
- Recycler les solvants. (**Annuaire des Technologies-Clés, 2011**).

1.4. Conception de médicament

La recherche de nouveaux médicaments a débuté à la fin du XIX^{ème} siècle avec la synthèse de très nombreuses molécules chimiques dont les industries pharmaceutiques naissantes se sont efforcées de définir l'intérêt thérapeutique et la toxicité. Ces études ont permis de sélectionner, parmi des centaines d'analogues, quelques molécules rapidement mises sur le marché.

Dans la seconde partie du XX^{ème} siècle, les exigences d'efficacité et d'innocuité se sont accrues. Ceci a conduit à trier toujours plus de molécules, naturelles ou de synthèse pour tenter de trouver un candidat médicament. (**Landry, 2012**).

1.4.1. Les différentes approches usitées au cours du temps

De l'Antiquité à la fin du XVIII^{ème} siècle, les médicaments ou les remèdes provenaient principalement de l'expérience accumulée des médecins au cours des millénaires. Ils ne reposaient pas sur des approches systématiques de découverte et de conception, même si de grands scientifiques de l'époque prônaient déjà l'importance de l'expérimentation, tels que

Claudius Galenus (Galien, 129-200), ou encore Ibn Sina (Avicenne, 930-1037), qui avait rédigé de nombreux ouvrages sur les remèdes. Pour qu'un composé soit considéré comme un remède, il suffisait que son activité soit démontrée. La connaissance de son mécanisme d'action était inutile. Cette ère était celle de la thérapeutique empirique. (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

Néanmoins, au début du XIX^{ème} siècle, en Europe, l'augmentation des connaissances en anatomie, en physiologie, en chimie, associée aux développements technologiques de l'époque ont permis l'émergence au sein de la médecine d'une nouvelle discipline, dénommée la pharmacologie. Des approches expérimentales variées ont accompagné le développement de la pharmacologie. Ses premiers pas furent assurés par les approches fonctionnelles, c'est-à-dire la mise en évidence de l'effet d'une substance sur une grande fonction de l'organisme *in vivo*, motricité, digestion..., ou *in vitro* sur un organe isolé, muscle.... Les substances étudiées furent d'abord les substances naturelles purifiées dès le XIX^{ème} siècle, alcaloïdes végétaux principalement, puis des substances de synthèse. Ceci faisait appel aux connaissances de physiologie, et corrélativement le médicament fut utilisé comme outil pour affiner les connaissances physiologiques et biochimiques. Le développement des laboratoires pharmaceutiques industriels se fit à la fin du XIX^{ème} et au XX^{ème} siècle à partir d'annexes d'officines de pharmacie ou de petites industries chimiques des colorants organiques. (**Landry et Gies, 2003- 2009**).

Les approches moléculaires, ou biochimiques, de l'effet des médicaments ne se sont réellement développées qu'à partir de 1975 avec l'essor des techniques de liaison spécifiques, puis à partir de 1985 avec la définition de la structure des récepteurs et d'autres cibles de médicaments et des grandes voies de signalisation cellulaire. Enfin une nouvelle ère est née à l'aube du troisième millénaire sur les bases de la génomique pour la recherche de nouvelles cibles de médicaments qui nécessite un retour vers les approches physiologiques et moléculaires classiques. Une illustration en a été donnée dès 1995 avec les débuts de la pharmacologie inverse. (**Landry et Gies, 2003-2009**).

1.4.2. Les approches actuelles

À partir du début des années 1970, une panoplie de stratégies se sont développées en parallèle. Celles-ci présentent chacune leurs avantages et leurs inconvénients. De nos jours, la problématique posée et les contraintes de départ orienteront le choix de l'approche, voire vers une combinaison de celles-ci. (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

Depuis les débuts de la pharmacologie, les approches et les processus de recherche d'un médicament ont évolué pour devenir de plus en plus rationnelles (schéma 1). (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

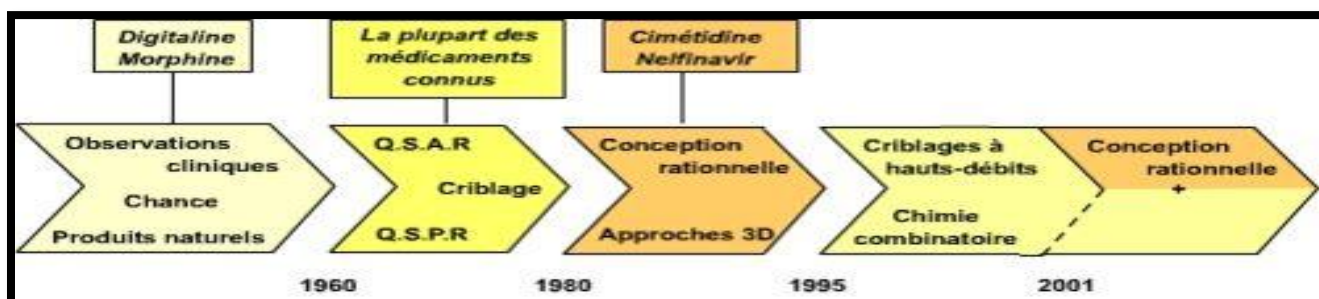


Schéma 1 : Historique des approches utilisées pour la conception de nouveaux médicaments

Ainsi pour la conception de nouveaux médicaments on peut distinguer trois grands types d'approches :

1.4.3. Les approches rationnelles

Aujourd'hui, la conception rationnelle d'un médicament s'appuie sur de nombreuses disciplines intimement interconnectées telles que la Chimie, Biochimie, Biologie structurale, Génomique, Bio et Chemoinformatique, Modélisation moléculaire, etc.

Ces approches sont basées sur l'obtention de données détaillées sur le mécanisme pathologique et sur les étapes biochimiques qui sont impliquées. Ceci suppose d'avoir identifié et validé la ou les étapes et les molécules biologiques impliquées : le récepteur à la surface de la cellule, l'enzyme... Cette validation suppose d'établir un lien direct entre la pathologie et la cible permettant d'espérer un effet thérapeutique. Cette validation peut s'appuyer sur les données des études génétiques et génomiques (mutation associée à la

pathologie), sur des données biochimiques (altérations métaboliques, dosages enzymatiques) et sur des études chez l'animal.

Lorsque la cible est validée, deux approches sont envisageables : celles qui sont basées sur la structure des ligands connus et celles qui sont basées sur la structure de la cibles.

Lorsque des ligands naturels de la cible sont connus, comme par exemple des agonistes ou des antagonistes d'un récepteur, on peut en synthétiser des analogues par des approches de chimie médicinale, afin de tester leur activité. En corrélant leur activité biologique avec leur structure, on peut alors établir des règles pour améliorer les molécules testées et obtenir des médicaments.

Les approches les plus récentes sont basées sur la détermination de la structure tridimensionnelle de la cible, par des techniques de biologie structurale. À partir de cette structure, on effectue alors la conception rationnelle de molécules chimiques capables de se fixer à la cible et de former des interactions avec elle. (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

1.4.4. Les approches par criblage à haute débit

L'automatisation des tâches via l'utilisation de robots et de logiciels de traitement de données permet de tester et d'analyser une importante quantité de composés chimiques sur une ou plusieurs cibles d'intérêt. (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

1.4.5. Les approches par chimie combinatoire

Les approches présentées jusqu'ici consistaient à tester des composés chimiques préalablement purifiés et identifiés. En revanche, cette approche procède comme suit. Avec, tout d'abord, la synthèse d'un très grand nombre de composés chimiques. Par la suite, on mesure l'effet de ce mélange sur l'activité biologique. Et s'il s'avère qu'un effet est observé, un processus de déconvolution permettra alors de remonter au composé responsable de cette activité. (<https://fr.wikipedia.org/wiki>).

1.5. Les phases de la conception des médicaments

Concrètement, dans l'industrie pharmaceutique, ces processus peuvent-être subdivisés et répartis en quatre phases ou étapes (Schéma 2) :



Schéma 2 : Les principales phases de la conception d'un médicament

1.5.1. La phase de recherche et découverte

Au départ, il y a la molécule originale = médicament princeps, Puis les concurrents industriels proposent des copies thérapeutiques, dont le principe est de modifier légèrement la structure chimique d'une molécule originale (médicament princeps) pour obtenir une nouvelle molécule brevetable (*à distinguer d'un médicament générique qui est rigoureusement la même molécule que le princeps, copiée lorsque le brevet est déchu*). (Zimmer, 2012).

Il y a principalement trois façons de découvrir un nouveau médicament:

- 1) Criblage de substances naturelles
- 2) Conception rationnelle
- 3) Approche combinatoire

⇒ En général, une molécule « tête de série » est d'abord repérée pour son potentiel thérapeutique, puis optimiser par modification structurale selon une logique rationnelle et/ou combinatoire. (Patrick, 2001).

1.5.2. La phase de développement

Une fois qu'une tête de série active est identifiée, il n'est pas possible de prévoir avec précision sa toxicité et ses effets secondaires, d'anticiper ni sa biodisponibilité, ni son métabolisme in vivo. Sa structure pourra être modifiée jusqu'à obtenir une molécule répondant à ces différentes caractéristiques, c'est-à-dire un médicament efficace.

1.5.3. La phase clinique

Un effet secondaire d'un médicament (ou effet indésirable) est défini par l'OMS comme « *une réaction nocive et non voulue à un médicament, se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement* ».

d'une maladie ou pour le rétablissement, la rectification ou la modification d'une fonction physiologique » Ces effets peuvent être « pressentis » dès les études précliniques de la molécule (chez l'animal) ou observés lors des premiers essais chez les sujets sains (phase I), ou chez les patients (phase II et phase III).

D'autres effets indésirables sont également signalés après commercialisation de la molécule (phase IV) par des médecins ou des pharmaciens aux centres de pharmacovigilance (des CHU ou parfois des firmes pharmaceutiques). Leur fréquence et/ou leur gravité peut entraîner le retrait du médicament. Leur analyse détaillée peut également permettre de détecter une nouvelle application thérapeutique (pour ce médicament ou pour des analogues de structures). (Zimmer, 2012).

1.5.4. La phase de mise sur le marché

Phase 0: découverte et tests précliniques sur animaux (6 ans et demi) et description du protocole d'évaluation chez l'homme.

Phase I: test de toxicité administration du médicament à des volontaires en bonne santé (de 20 à 80 personnes), détermination de la posologie et des effets secondaires, étude du métabolisme du médicament (1 an et demi).

Phase II: test d'efficacité administration du médicament à des malades volontaires (de 100 à 500 personnes, 2 ans).

Phase III: administration du médicament à un plus grand nombre de malades volontaires (de 1000 à 5000 personnes, 3 ans et demie) dépôt d'un dossier de demande de mise sur le marché incluant le protocole de préparation du médicament.

Phase IV: études des effets à long terme et de l'utilisation des médicaments sur d'autres populations de malades, exploration de nouvelles applications.

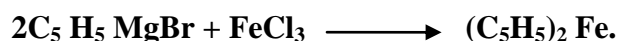
10 à 15 ans de recherche et de développement du découvert d'une substance active ou tête de série à sa mise sur le marché. (Quideau).

2. Le ferrocène

2.1. Historique

Comme pour beaucoup de produits, la première synthèse du ferrocène fut accidentelle. En 1951, Pauson et Kealy, de l'université de Duquesnes firent état de la réaction du bromure de magnésium de cyclopentadiényle et du chlorure de fer dans l'objectif de

coupler le diène et ainsi synthétiser le fulvalène. À la place, ils obtinrent une poudre légèrement orangée, d'une "remarquable stabilité". (Kealy et Pauson, 1951).



Cette stabilité fut accordée au caractère aromatique du cyclopentadiényle mais la structure "en sandwich" ne fut pas découverte à cet instant.

Ce sont Robert Burns Woodward et Geoffrey Wilkinson qui découvrirent cet assemblage particulier en se basant sur sa réactivité (Wilkinson *et al.*, 1952). Indépendamment, Ernst Otto Fischer arriva à la même conclusion et commença à synthétiser d'autres métallocènes, comme le nickelocène et le cobaltocène (Fischer et Pfab, 1952). La structure des ferrocènes fut ensuite confirmée par spectroscopie RMN et cristallographie Rayons X (Dunitz *et al.*, 1956 ; Laszlo et Hoffmann, 2000). Sa structure distinctive mena à un engouement sans précédent pour la chimie des métaux de transition avec les hydrocarbures.

2.2. Structure

Le ferrocène est un composé organométallique de formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Il fait partie de la famille des métallocènes, un type de composé sandwich dans lequel le centre métallique est entouré de deux cycles cyclopentadiényle. (Dagani, 2001).

L'atome de fer dans le ferrocène est à l'état d'oxydation +2. Chaque cycle pentadiényle est donc chargé une fois négativement, amenant le nombre d'électrons π à six sur chaque cycles. Ils sont donc aromatiques. Ces douze électrons - six pour chaque cycle - forment des liaisons covalentes avec le métal. Ajoutés aux six électrons de la couche *d* du fer, le complexe complait à la règle des 18 électrons. La distance des liaisons carbone-carbone des cycles est de 1,40 Å. Les liaisons Fer - carbone font 2,04 Å (figure 1). (Mouas, 2013).

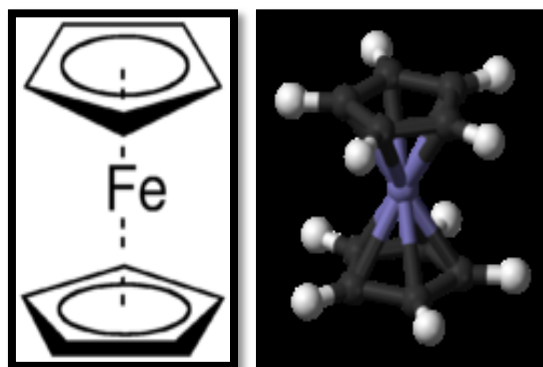


Figure1 : représentation du ferrocène

2.3. Synthèse

Le ferrocène est synthétisé en faisant réagir le cyclopentadiène et l'hydroxyde de sodium (KOH) dans du 1,2-diméthoxyéthane (DME) afin d'obtenir le cyclopentadiényle sous forme ionique ($C_5H_5^-$), qui réagira en suite avec le dichlorure de Fer(II) tétrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) dans du diméthylesulfoxyde (DMSO), le ferrocène est ainsi obtenu, les résultats des différentes réactions est suivi et confirmé par RMN (figure 2, 3). (<http://www.magritek.com>).

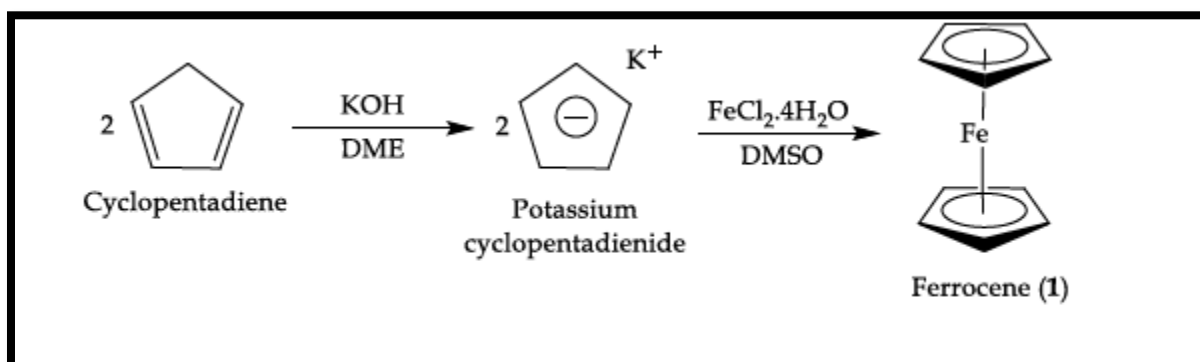


Figure 2: Synthèse du ferrocène

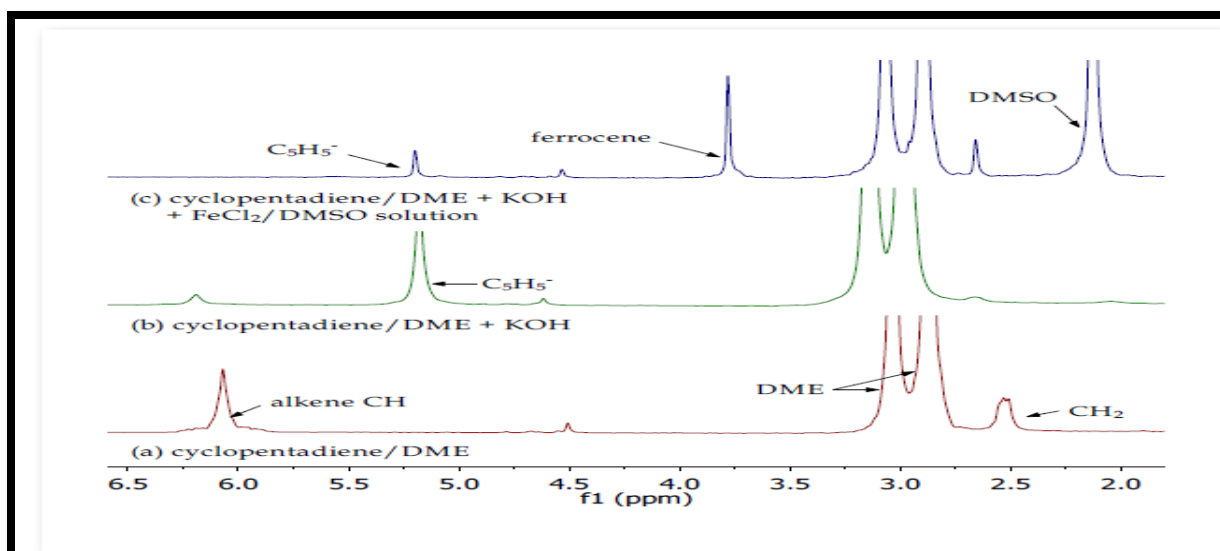


Figure 3 : Les spectres 1H RMN acquis à différents stades de la synthèse de ferrocène, 42 MHz: cyclopentadiène dans du DME (a), la formation d'anion cyclopentadiényle (b) et la formation de ferrocène (c)

2.4. Propriétés physico-chimiques

Le ferrocène est un solide stable à l'air, bien qu'il se sublime assez facilement. Comme on pouvait le prévoir pour une molécule symétrique et neutre, le ferrocène est un solide cristallin orange, d'une odeur de camphre et de masse molaire 186,04 g.mole⁻¹, soluble dans les solvants organiques courants, mais insoluble dans l'eau et l'acide chlorhydrique concentré. Il est stable à haute température, allant jusqu'à 400 °C. (**Solomons *et al.*, 2006**).

A température ambiante, le ferrocène est le plus stable des métallocènes, néanmoins les études ont montré qu'il est sensible à l'exposition prolongée à l'air et à la lumière.

En effet, le Ferrocène, avec ses 18 électrons de valence, est le membre le plus stable en série de métallocène. Il sublime facilement et peut être oxydé réversiblement. (**Bochmann, 1994**).

2.5. Applications biologiques

Depuis quelques décennies, la chimie du ferrocène a eu un impact énorme dans de nombreux domaines tels que : la catalyse, les applications biologiques et pharmaceutiques (fabrication des médicaments tels que: La Pénicilline, Céphalosporine, et Rifamycines), les applications thérapeutiques, la lutte contre certaines bactéries. En effet 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. (**Auzias, 2008**).

Une des premières applications dans ce domaine, fut le développement de dérivés ferrocéniques d'antibiotiques (les ferrocényl-pénicilline et ferrocényl-céphalosporine) (figure 4) par Edwards et ces collaborateurs pour lutter contre certaines bactéries (**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. (**Scutaru *et al.*, 1991**).

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%). (Maier *et al.*, 1984).

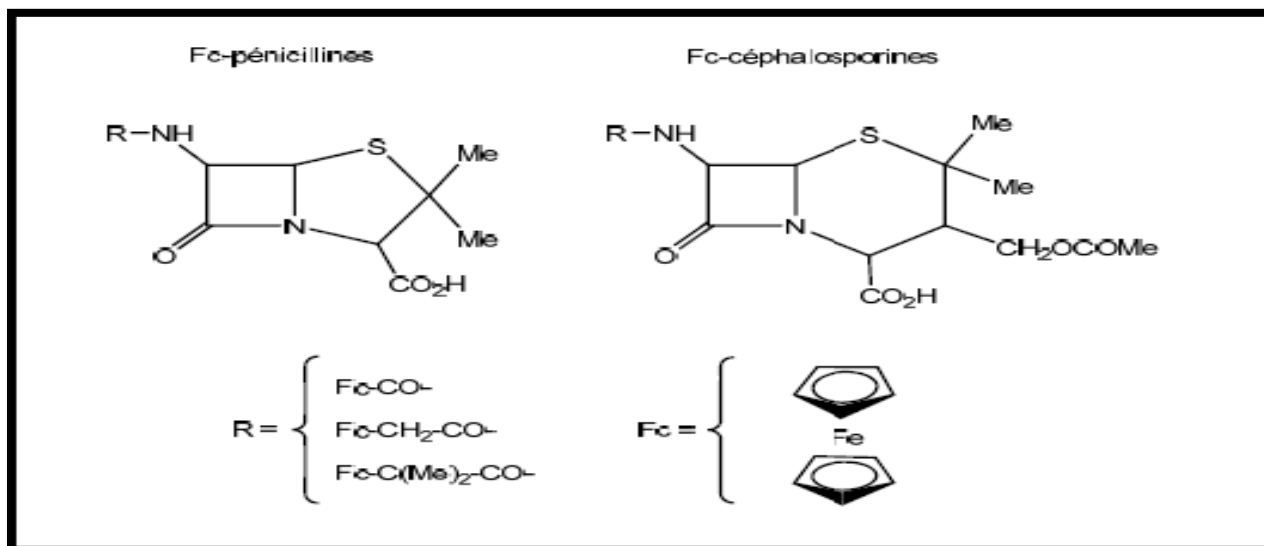


Figure 4 : La molécule Fc- pénicilline et la molécule Fc- céphalosporine

3. La fonction hydrazone

3.1. Généralités

La chimie des composés azotés est depuis longtemps la source privilégiée de nombreux sujets d'étude. L'atome d'azote est présent dans de nombreuses molécules naturelles ou d'intérêt pharmacologique, ainsi les hydrazones et leurs dérivés présentent une classe de composés polyvalents en chimie organique en raison de leur facilité de synthèse, leur stabilité et leur diversité structurale, qui trouve de nombreuses applications en tant que produits organiques intermédiaires précieux (Kobayashi *et al.*, 2010), composants moléculaires de matériaux (Tatum *et al.*, 2014), dans des polymères -dégradable acides pour l'administration de médicaments (Binauld et Stenzel, 2013), ils sont également d'intéressants ligands (Mahmudov *et al.*, 2013) pour la formation de complexes métalliques en catalyse et la synthèse de composés hétérocycliques.

3.2. Synthèse

Les hydrazones sont une famille de composés organiques comportant une structure de type $R_1R_2C=N-NR_3R_4$, ils sont caractérisés par leur synthèse relativement simple, une

stabilité hydrolytique propre aux imines ainsi qu'une grande tendance à cristalliser. (Mouas, 2013)

La méthode de synthèse la plus simple et la plus utilisée pour former une hydrazone consiste à condenser une hydrazine sur un aldéhyde ou une cétone (Schéma 3). L'hydrazine peut subir une double condensation du composé carbonylé ; aussi l'utilisation d'hydrazines mono- ou *N,N*-disubstituées permet d'éviter cette double condensation et de synthétiser facilement les hydrazones correspondantes. (Belkheiri, 2010).

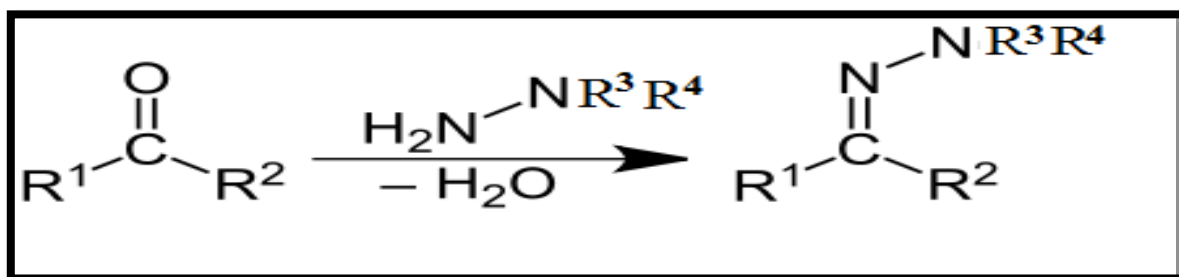


Schéma 3: Synthèse générale des dérivés hydrazones

Plus récemment, Andrade et coll. ont rapporté la synthèse d'*N*-acylhydrazones par réactions sous microondes. Les auteurs ont effectué la synthèse à grande échelle et en absence de solvant. Ainsi, en faisant réagir une hydrazine en présence d'un équivalent de cétone ou aldéhyde sous irradiation microondes (200W, température entre 150°C et 260°C suivant le cas, temps de réaction quelques minutes) ils obtiennent avec de très bons rendements les hydrazones correspondantes (85-98%) (Schéma 4). (Andrade *et al.*, 2010).

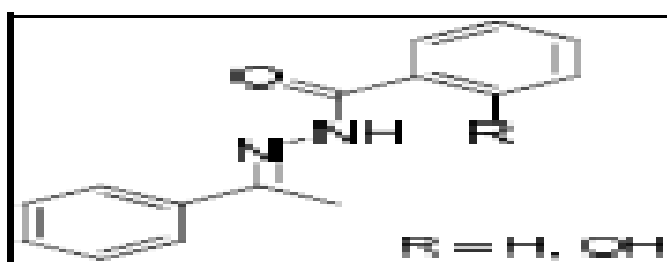


Schéma 4 : Hydrazones synthétisées sous microondes

3.3. Propriétés structurales

La structure des hydrazones confère au carbone de la liaison double C=N à la fois un caractère électrophile, dû à la polarisation de la liaison double, et un caractère nucléophile, dû à la participation à la conjugaison du doublet non liant de l'azote terminal.

Les deux types de réactivité ont été observés et exploités. Suivant les conditions réactionnelles et les hydrazones choisies, c'est l'une ou l'autre des propriétés qui s'exprimera (Schéma 5). (Hadrot, 2006).

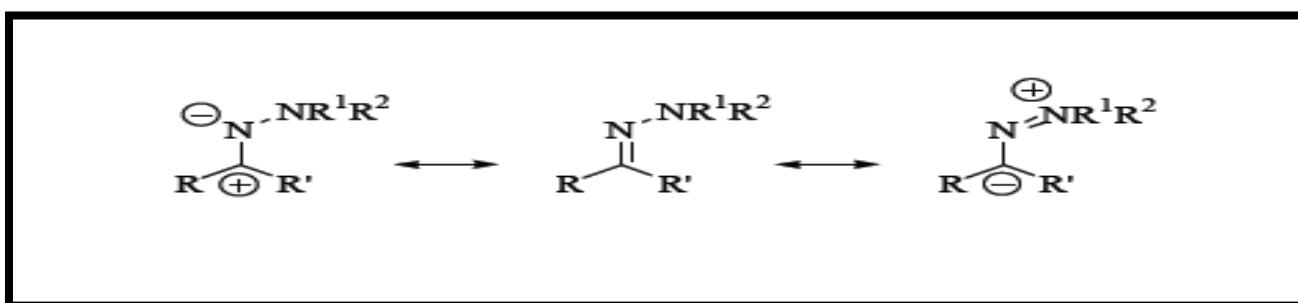


Schéma 5: Caractère électrophile et nucléophile des hydrazones

Les hydrazones contiennent donc deux atomes d'azote connexes de nature différente et une double liaison C=N qui est conjuguée avec une paire d'électrons célibataires de l'atome d'azote terminal. Ces fragments sont principalement responsables des propriétés physiques et chimiques des hydrazones (figure 5). Les deux atomes d'azote du groupe hydrazone sont nucléophiles, bien que l'azote amino soit plus réactif. L'atome de carbone de l'hydrazone a quand à lui à la fois un caractère électrophiles et nucléophiles. (Kim *et al.*, 2004).

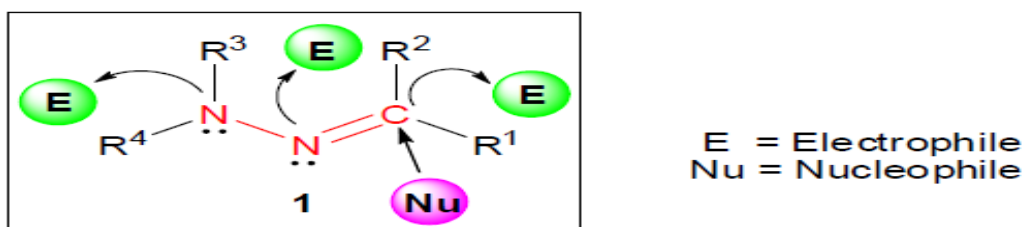


Figure 5: Classification des centres actifs

3.4. Applications biologiques des hydrazones

La chimie des combinaisons complexes avec des ligands de la classe des hydrazones a reçu un regain d'intérêt, grâce notamment à leur activité biologique (**Dutta et al., 1985 ; Singh et al., 1984**) (**Holla, 1988**) , nous trouverons ainsi que les hydrazones et leurs complexes métalliques possèdent entre autre des propriétés antivirales, antibactériennes (**Kumar et al., 1990 ; Gursoy, et al., 1997**), anticonvulsantes (**Popp, 1984**) et antifongiques (**Mohan et Pujari, 1975 ; Gupta et Pujari, 1978**).

3.4.1. L'activité antimicrobienne

Au cours des dernières années, les infections microbiennes résistantes, sont devenues un danger grave pour la santé. Cela a conduit à la recherche et au développement de nouveaux agents antimicrobiens qui amélioreront l'activité biologique.

Un grand nombre de tests pour le benzisothiazolinone ont montré des propriétés antifongiques contre *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida tropicalis*. Les composés 1, 2 et 4 sont également actifs contre *Aspergillus Niger* (schéma 6).

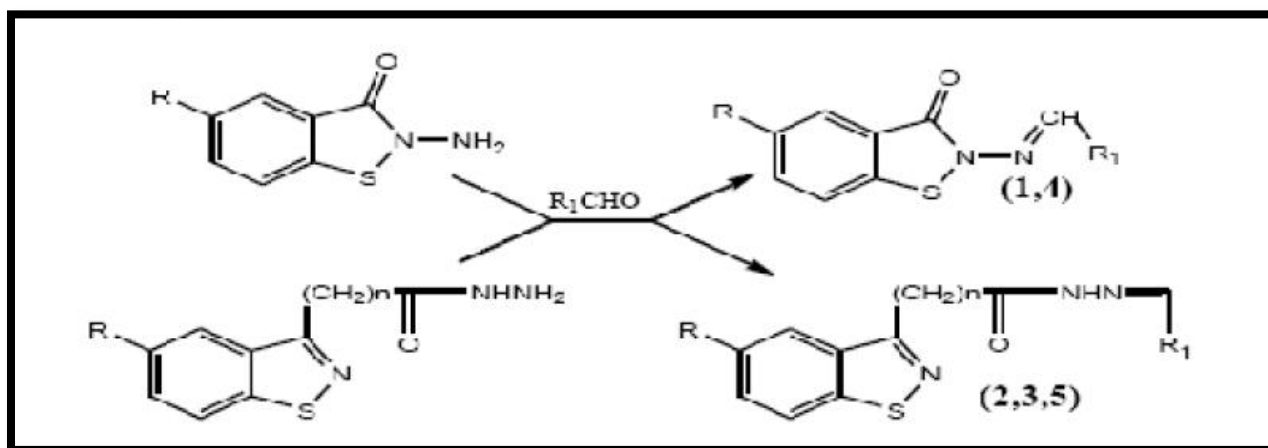


Schéma 6 : Voie de synthèse des composés (1,2,3,4 et 5)

Les hydrazones 1a, 2a, 3a, 4a et 5a (Tableau 1) ont été synthétisés à partir d'hydrazide 1,2-benzisothiazole 6 cyclique (1 et 4) ou acyclique (2, 3 et 5) ont montré une inhibition de la croissance contre des levures supérieures, comparable à celle du Miconazole, le médicament de référence. (**Vicini et al., 2002**).

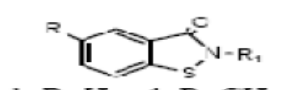
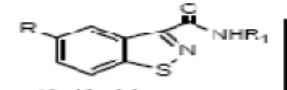
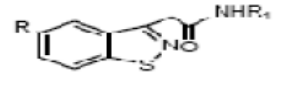

R_1			
	1, R=H 4, R=CH ₃	2, R=H	3, R=H 5, R=CH ₃
-NH ₂	1 4	2	3 5
	1a 4a	2a	3a 5a

Tableau 1: Synthèse des hydrazones 1a, 2a, 3a, 4a et 5a

Les Hydrazones de l'acide 2-aryl-quinoléine-4-carboxylique hydrazides (Schéma 7) ont été synthétisés et évalués pour une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Les hydrazones les plus actives (7a-7e) sont reportées dans le (tableau 2). (Metwally *et al.*, 2006).

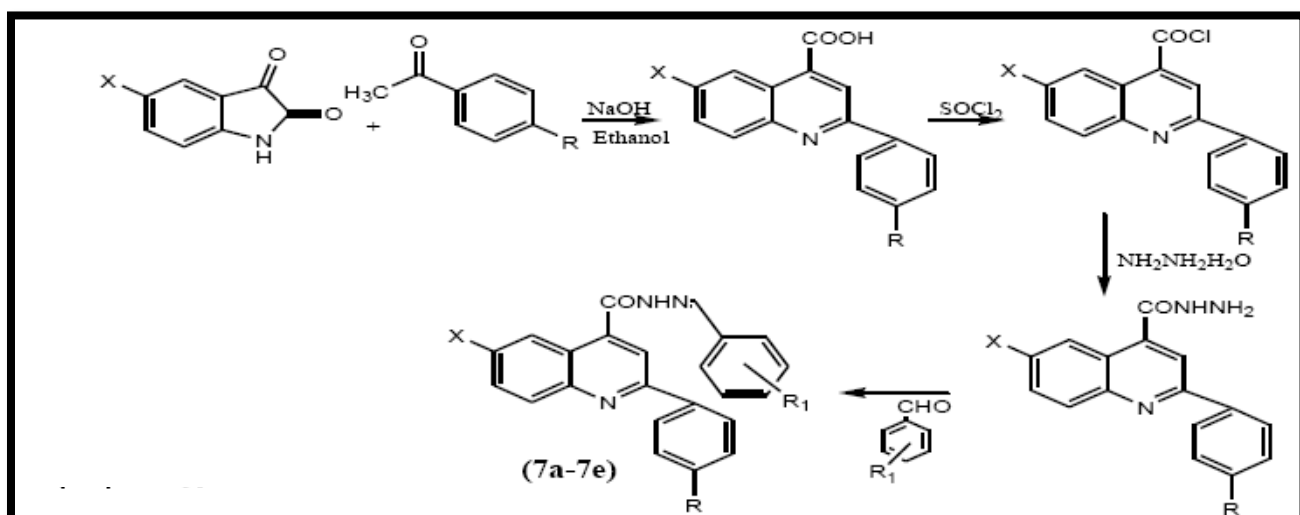


Schéma 7 : Voie de synthèse des composés (7a-7 e).

7	X	R	R ₁
a	-H	-Br	2-NO ₂
b	-Cl	-Br	2-NO ₂
c	-Cl	-Br	4-NO ₂
d	-Cl	-OCH ₃	2-NO ₂
e	-Cl	-OCH ₃	4-NO ₂

Tableau 2 : Les hydrazones les plus actives (7a-7e).

Chapitre I. Revue bibliographique

L'acide cholique (schéma 8) analogues d'hydrazone étaient synthétisés et évalués pour une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus megaterium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter aerogenes*. La plupart des composés ont montré une activité antimicrobienne plus forte que le Céfaclorcéfixime. Les composés 8a-8c (tableau 3) indiquent une activité antimicrobienne 15 fois plus forte contre *Enterobacter faecalis*. (Rasras *et al.*, 2010).

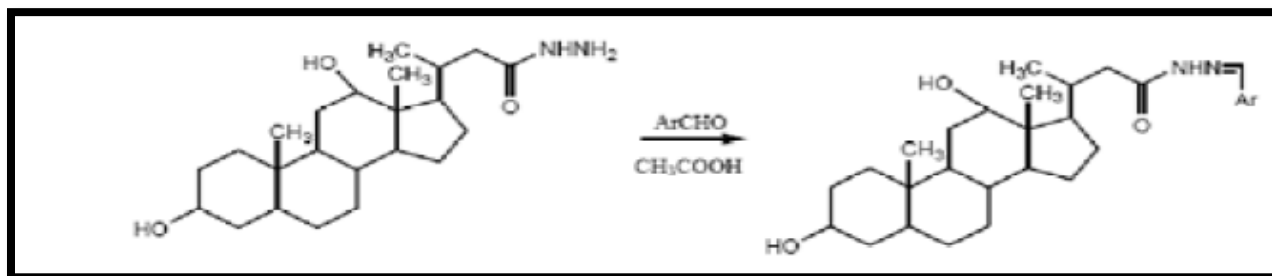


Schéma 8 : Voie de synthèse des composés (8a-8c)

8	Ar
a	p-Bromophenyl
b	m-Chlorophenyl
c	o-Bromophenyl

Tableau 3 : Les composés (8a-8c)

Certains analogues 2-iodo-N'-[(1E) un groupe phényle substitué méthylidène] benzohydrazide (schéma 9) ont été synthétisés et leur activité antibactérienne contre différentes souches de bactéries évaluée, telles que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* utilisant la Norfloxacine comme médicament de référence. L'activité antifongique a été évaluée contre *Aspergillus Niger* et *Candida albicans* en utilisant comme médicament de référence la Griséofulvine. L'activité des composés 9a à 9d (tableau4) était hautement significative contre 10 micro-organismes pathogènes testés. (Harer *et al.*, 2010).

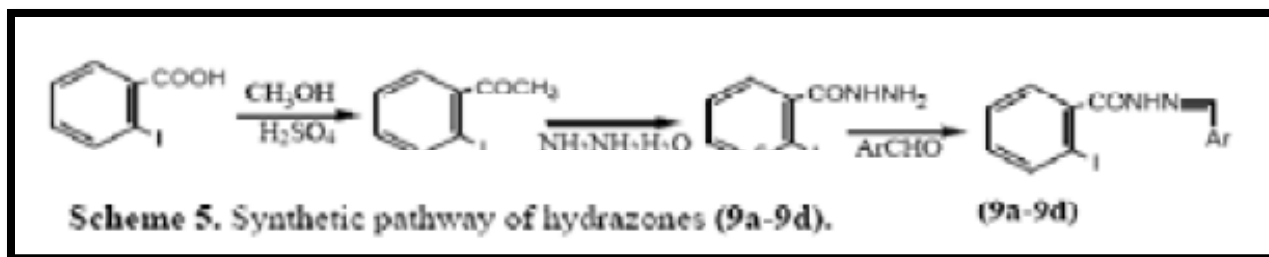


Schéma 9 : Voie de synthèse des hydrazone (9a-9d)

9	Ar
a	Cinnamaldehyde
b	Furan
c	o-Hydroxyphenyl
d	p-Hydroxyphenyl

Tableau 4: Les composés (9a - 9d)

3.4.2. L'activité anti-inflammatoire

Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont une utilisation clinique très importante dans le traitement de l'inflammation et diverses conditions douloureuses telles que la polyarthrite rhumatoïde, des tissus mous, des lésions de la cavité buccale, infections des voies respiratoires et de la fièvre.

Certains dérivés d'amidine et d'hydrazone étaient synthétisés et leur activité anti-inflammatoire et analgésique évaluées. 2-acétylpyridine et de 4-acétylpyridine ont été condensés avec sulfonylhydrazides par irradiation micro-ondes en phase solide pour donner les hydrazones correspondantes (12a-12d). Indole-3-carboxaldéhyde a été condensés avec des sulfonylhydrazides par chauffage au reflux dans l'acide acétique (schéma 10) pour donner la condensation correspondante du produit (12e, 12f). Les six composés synthétisés ont été consignés dans le (tableau 5). L'évaluation de L'activité anti-inflammatoire a été effectuée en utilisant la carragénine induite de l'oedème patte et le composé 12e présentait une bonne activité anti-inflammatoire. (Sondhi *et al*, 2006).

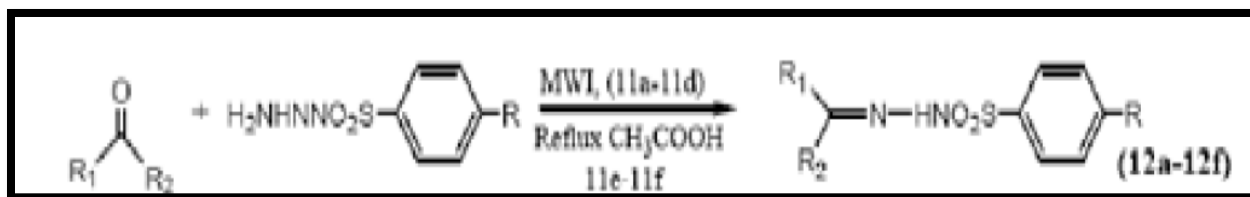


Schéma 10 : Synthèse d'un dérivé d'hydrazone (12a-12f)

12	R ₁	R ₂	R
a		-CH ₃	-CH ₃
b		-CH ₃	-OCH ₃
c		-CH ₃	-CH ₃
d		-CH ₃	-OCH ₃
e		-H	-H
f		-H	-CH ₃

Tableau 5 : Les six composés synthétisés (12a-12f)

Une série de nouveaux congénères de benzopyranone ont été synthétisés pour leur activité anti-inflammatoire présumée. Le 8-acétyl-7-hydroxy-4-phényl-2H-benzopyranone-2-one a été utilisé comme matériau de départ (schéma 11) pour la synthèse de dérivés hydrazones 15a-15b (tableau 6).

L'hydrazone 15 n'a montré qu'une légère activité anti-inflammatoire, cependant le 15b à une activité antipyrétique. (Eissa *et al.*, 2009).

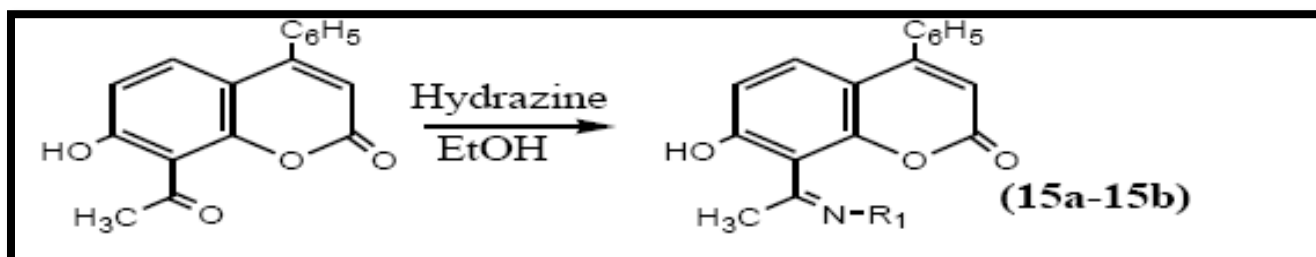


Schéma 11 : Voie de synthèse des composés (15a-15b)

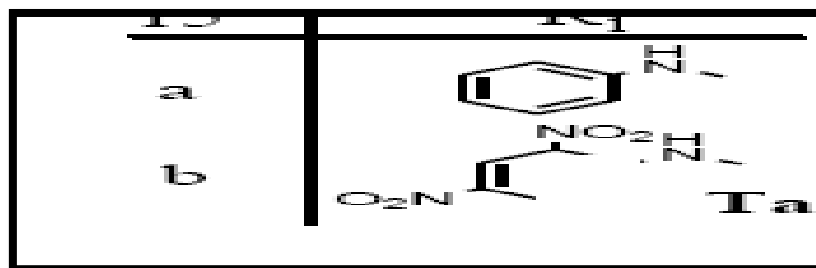


Tableau 6 : Les hydrazones (15a- 15b)

3.4.3. L'activité antioxydante

Une famille des hydrazones de syringique a été synthétisée et évaluée pour l'activité antioxydante. Une nouvelle série d'hydrazones (16a-16e) indiquées dans le (tableau 7) ont été synthétisées à partir de syringaldéhyde (Schéma 12). L'efficacité du carbonyle piègeur a été évaluée en mesurant l'aptitude à diminuer la teneur en carbonyle des protéines dans des cellules contesté avec de l'LDL oxydé. (Belkheiri *et al.*, 2010).

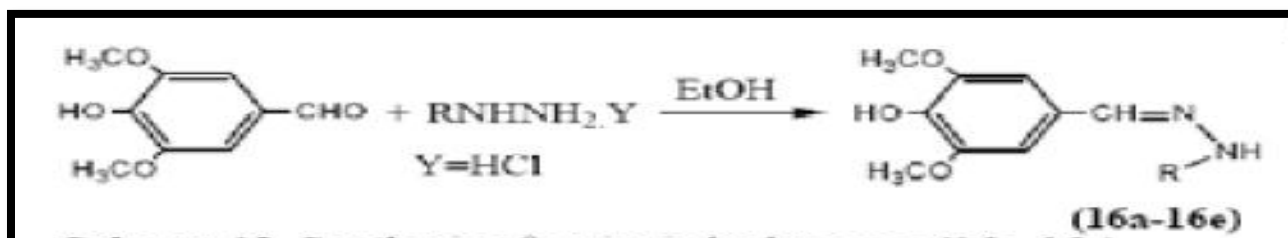


Schéma 12 : Synthèse d'hydrazone syringique (16a-16e)

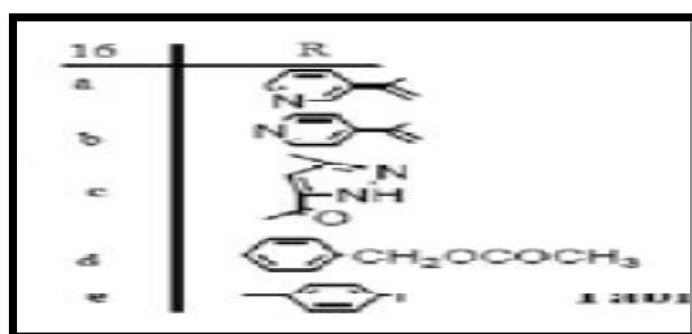


Tableau 7 : Nouvelle série d'hydrazones (16a-16e)

3.4.4. L'activité anti-VIH

L'infection par le VIH et le sida est la première maladie pour laquelle la découverte des médicaments a été effectuée entièrement sur la base des approches rationnelles de la conception des médicaments. Les schémas du traitement actuel sont appelés comme antirétroviral hautement actif. Certaines hydrazones s'avèrent être de puissants inhibiteurs de la ribonucléotide réductase. Une série de benzo [d] isothiazole, a été synthétisée et évaluée pour l'activité anti-VIH. Tout les benzo [d] isothiazolehydrazones ont été obtenues par condensation des acides intermédiaires, à savoir les hydrazides cycliques ou acycliques (Schéma 13). Les composés 34x (a) et 34x (c) ont montré une bonne activité contre le VIH-1 de type sauvage, tandis que les composés 34x (a), 34x (b), 34x (d), 34x (e), 34x (f), 34y (a), 34y (b), 34y (c) et 34y (d) (tableau8) ont montré une bonne activité contre le EFVR (efavirenz resistance) mutant 35. (Tian *et al.*, 2009).

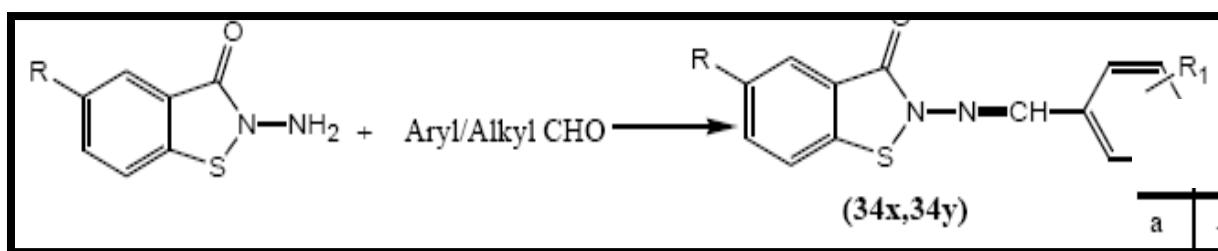


Schéma 13 : Synthèse des Benzo[d] isothiazolehydrazones (34x, 34y)

34x	R=H	34y	R=CH ₂
a	-H	a	4-F
b	3-F	b	4-Cl
c	4-F	c	3-NO ₂
d	4-Cl	d	3-OH
e	3-NO ₂		
f	4-OH		

Tableau 8 : Les composés (34x-34y)

Nous avons également relevé dans la littérature d'autres applications d'intérêt : les dérivés d'hydrazones aromatiques sont utilisés pour mesurer la concentration du poids moléculaire des aldéhydes et les cétones, dans les flux de gaz par exemple. Le cyanure de carbonyle-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (en abrégé FCCP) est utilisé pour la réduction de l'oxygène dans la phosphorylation oxydative en biologie moléculaire. La méthode de couplage hydrazone-base est utilisée en biotechnologie médicale pour coupler

les médicaments aux anticorps voulus, ces derniers sont utilisés contre un certain type de cellules cancéreuses et ceux afin d'augmenter leur stabilité et leur efficacité en milieu cellulaire. Dans *N, N'*-dialkylhydrazones la liaison C = N peut être hydrolysée, oxydée et réduite, la liaison N-N peut être réduite en amine libre. Si la liaison C=N peut réagir avec des nucléophiles organométalliques, l'atome d'hydrogène en alpha est dix fois plus acide que la cétone et donc plus nucléophile, la déprotonation avec par exemple l'LDA donne une azaenolate qui peut être alkylée par les halogénures d'alkyle, une réaction initiée par EJ Corey et Enders Dieter en 1978. En synthèse asymétrique SAMP et RAMP sont deux hydrazines chirales qui réagissent comme auxiliaire chiral avec une hydrazone intermédiaire chirale. (Mouas, 2013).

4. La molécule 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène

4.1. Structure

Notre composé est constitué par l'unité ferrocénique ou l'un des cyclopentadiényl est monosubstitué par une fonction diméthylhydrazone.

De très nombreuses méthodes ont été mises au point pour accéder aux composés azotés, et à travers la chimie des hydrazones, nous avons tenté d'en explorer d'autres (figure 6). (Mouas, 2013).

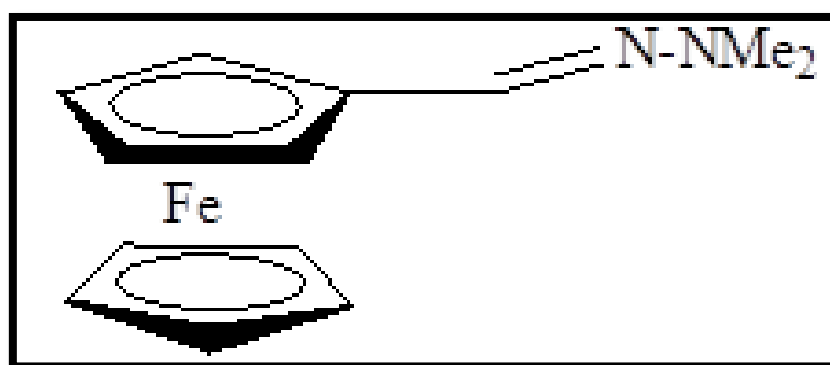


Figure 6 : La structure du composé 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène

1.4. Travaux antérieures

En survolant la revue bibliographique nous avons sélectionné deux méthodes de synthèse différentes pour accéder à notre composé :

4.2. Synthèse

a) Synthèse à partir d'un Ferrocèncarboxaldehyde et de 1,1-diméthylhydrazine commerciaux:

1,00 g de Ferrocenecarboxaldehyde (4,1 mmol) a été ajouté à 10 ml d'éthanol et le tout agité à température ambiante pour 5 min. Ensuite, les matières non dissoutes ont été éliminés par filtration et jetée. Puis, 0.31ml de 1,1-diméthylhydrazine (4,1 mmol) ont été ajouté au filtrat rouge, le mélange résultant a été agité à la température ambiante (environ 20 ° C) pendant 1,5 h. Une évaporation lente du solvant (à environ 4 ml) à température ambiante, produit la formation d'un microcristalline jaune, matériau qui a été recueilli par filtration et séché à l'air (rendement 86%). (Lopez *et al.*, 1997).

Caractérisation structurale :

Le composé $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4)\text{-CH}=\text{N-N}(\text{CH}_3)_2\}]$ (1) est un solide de couleur jaune à température ambiante et présente une solubilité élevée dans le plus commun des solvants (par exemple CHCl_3 , CH_2Cl_2 , le méthanol, le benzène), mais il est insoluble dans les alcanes, et s'hydrolyse très rapidement en milieu aqueux ou acide. Les analyses élémentaires sont compatibles avec la formule proposée. Le spectre infrarouge montre une forte bande intense à ca. 1620cm^{-1} en raison de l'étirement de la asymétrique de la) Groupe C=N- (figure7). (Lopez *et al.*, 1997).

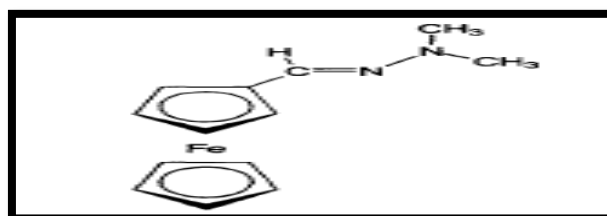


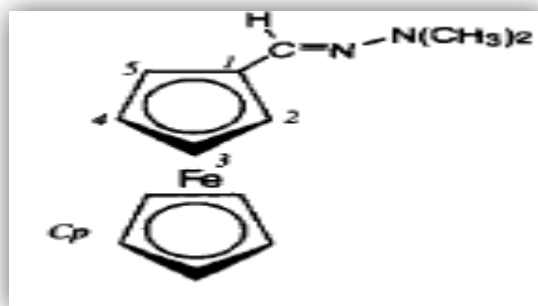
Figure 7 : Vue schématique de l'hydrazone de ferrocényl à l'étude

Données RMN ^1H					
Cp	$^2\text{H}, ^5\text{H}$	$^3\text{H}, ^4\text{H}$	-CH=N	N-CH ₃	
4,13	4,51	4,24	7,14	2,83	
Données RMN ^{13}C					
Cp	C ¹	C ² ,C ⁵	C ³ ,C ⁴	-CH=N	N-CH ₃
69,00	82,12	72,12	73,45	143,53	43,36

Tableau 9 : Données spectrales RMN $\{^1\text{H}$ et ^{13}C (ppm)} et électrochimiques du composé à l'étude (étiquetage des atomes se réfère aux régimes ci-dessous)

- Données électrochimiques :

- Potentiel de demie vague : $E_{1/2}(\text{Fc}) (\text{v}) = -0.03$.



- b) Synthèse à partir d'un Ferrocène carboxaldehyde synthétisé en chaîne :

Cette deuxième méthode de synthèse plus élaborée, décrit l'obtention de notre molécule à partir d'un alcool ferrocénique synthétisé avec des réactions en chaînes qui se suivent (schéma14), l'intérêt de cette synthèse est la possibilité de fonctionnaliser le ferrocène avec des groupements différents. Ainsi nous avons pris comme produit de départ la diméthyl amine ferrocène (DMAF), une amine ferrocénique commerciale accessible $\text{Cp}_2\text{FeCH}_2\text{NMe}_2$ (1), ce composé est traité par l'anhydride acétique pour conduire à l'acétate (2) par une substitution nucléophile et finalement en alcool ferrocénique primaire (3) par simple saponification. Le composé (3), sera par la suite, oxydé en carbaldéhyde correspondant (4), à l'aide d'une méthode développée par Sharpless et ses collaborateurs (Mateus *et al.*, 2006), en utilisant l'oxyde de N-méthylmorpholine (NMO) comme oxydant en présence d'un complexe de Ruthénium $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ comme catalyseur. (Sharpless *et al.*, 1976).

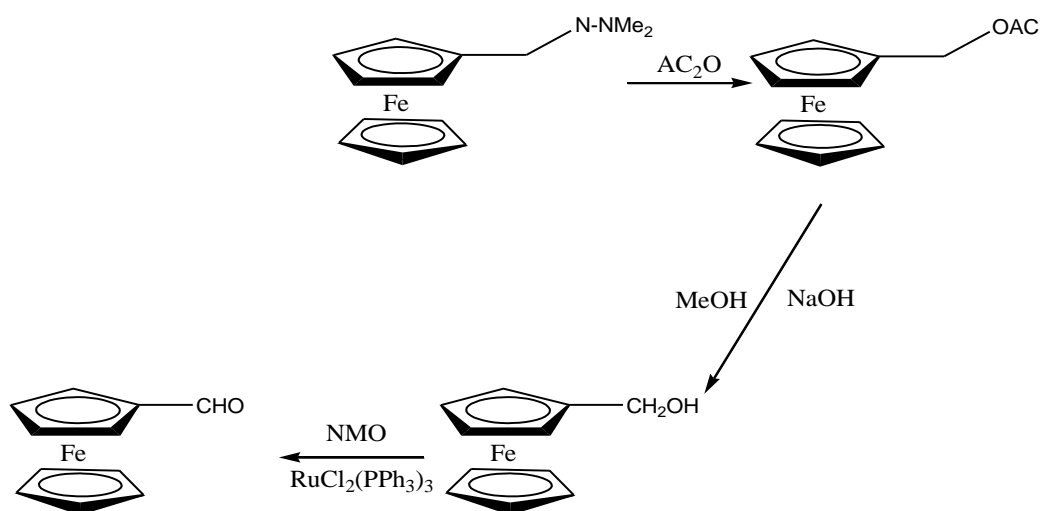


Schéma 14 : La synthèse de la molécule DMHF

5. Méthodes d'analyses physico-chimiques

5.1. Purification

5.1.1. Chromatographie sur colonne (CC)

Le résultat de la séparation de notre mélange de composés en CCM, est déterminant quant au choix de l'éluant à utiliser pour la séparation et la purification à grande échelle par chromatographie liquide sur colonne, mais il faut être vigilant, car la CCM n'est pas toujours reproductible sur colonne, elle donne seulement une approche approximative et grossière de ce que nous pouvons avoir comme paramètres de séparation sur cette dernière, notamment sur le choix de la phase mobile utilisée, son volume, le diamètre de la colonne utilisée et l'ordre d'éluion des fractions des produits séparés (figure 8). (Mouas, 2013).

▪ Principe

Comme pour la CCM, le principe est simple, prendre une colonne en verre de diamètre adéquat (en fonction de la quantité du mélange à purifier ou séparé et des Rf), ouverte à l'une de ses extrémité et ayant un robinet d'arrêt à l'autre, ensuite fermer l'entrée du robinet à l'aide d'un coton et la conditionner d'abord avec une couche de sable d'environ 2cm, ensuite avec 20cm de silice ordinaire ou flash (cela dépend du type de séparation voulu), bien tasser le tout et terminer par une deuxième couche de sable, la phase stationnaire ainsi préparée, doit être bien solvatée avec la phase mobile plusieurs fois jusqu'à ce qu'elle devienne homogène. Une fois la colonne prête, le mélange d'analytes dissouts, est concentré et transvasé uniformément sur la couche de sable à l'aide d'une

pipette ou canule, puis, une fois les produits absorbés par le sable, l'éluant commence à être déversé de façon à ce que la colonne soit toujours remplie et les composés commencent à migrer dans la colonne à différentes vitesses et se séparent ainsi en fractions colorées, qui seront collectées et pesées indépendamment. Elles pourront ensuite servir à d'autres analyses ou préparations. (Mouas, 2013).

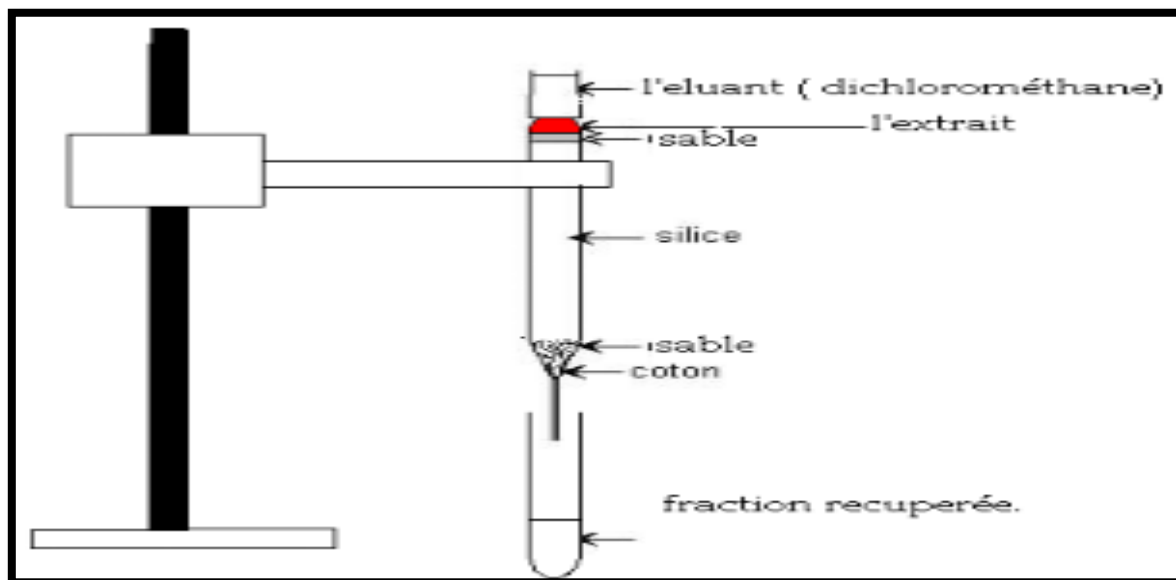


Figure8 : Dessin d'une colonne de chromatographie liquide

5.1.2. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

Le principe de séparation des composés par CCM est proche de celle en HPLC. Le principal intérêt de la CCM est l'identification rapide des composés d'un mélange. En contrepartie, l'analyse est uniquement qualitative et ne permet pas le dosage d'un composé.

La chromatographie sur couche mince s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange à étudier est ensuite posé à l'aide d'un capillaire (pipette Pasteur par exemple) à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés, Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés : La plaque de chromatographie est lue directement si les composés sont visibles (colorés), ou placée sous une lumière UV si ils sont fluorescents. Ils peuvent également être révélés en pulvérisant

un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits (en les détruisant) et dont le résultat sera coloré. (Ex : une solution d'acide sulfurique puis chauffé dans une étuve) (figure9). (Mouas, 2013).

C'est le phénomène d'éluion, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) :

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

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin. (<http://eduscol.education.fr>)

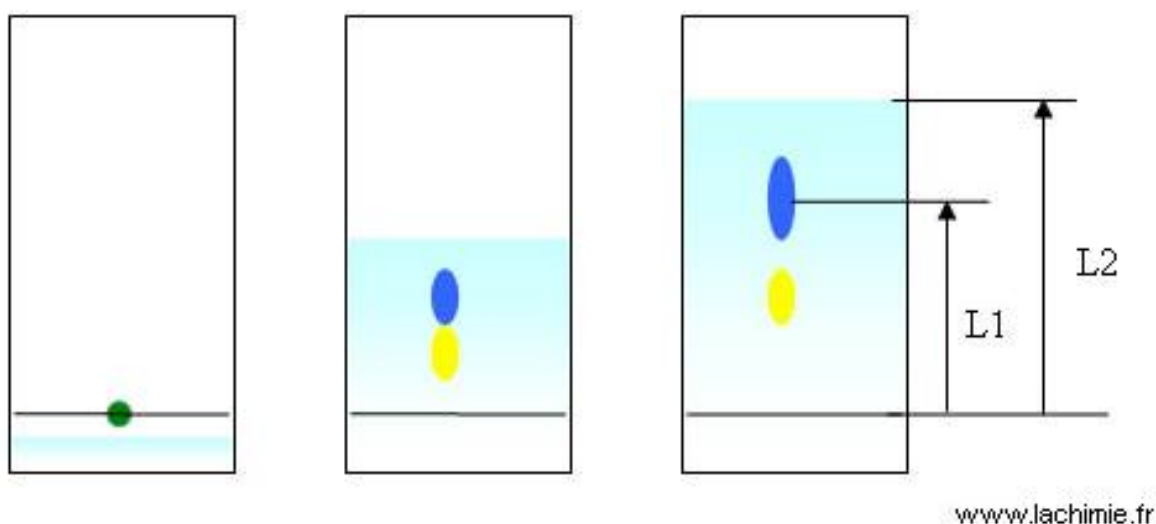


Figure 9 : Exemple d'éluion en CCM

5.2. 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 l'élucidation structurale. (Nabila et Nadia, 2014).

5.2.1. Résonance magnétique nucléaire

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...). Ils existent aujourd'hui une grande variété d'expériences RMN qui permettent de déterminer ou de corrélérer quantité de paramètres structuraux ou dynamiques, aussi bien en phase liquide qu'en phase solide.

Pour qu'un noyau résonne sous l'effet d'un champ magnétique appliqué par un appareil de RMN il faut qu'il ait un moment dipolaire ou un spin non nul, ces noyaux se comportent comme de minuscules aiguilles de boussoles et ont des niveaux d'énergies différents lorsqu'on les place dans un champ magnétique sauf que le noyau atomique est plus limité, et il ne peut adopter que certains niveaux d'énergie déterminés. Les noyaux que nous examinerons, ^1H et ^{13}C , ont une interaction et n'ont que deux niveaux d'énergie ($\text{spin}=1/2$). Si nous appliquons un champ magnétique à ces noyaux, ils peuvent s'aligner sur le champ, ce qui est le niveau d'énergie le plus bas, ou s'aligner dans la direction opposée au champ, ce qui est un niveau de plus haute énergie, 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. Plus le champ magnétique que nous appliquons au noyau est fort, plus la différence d'énergie entre les deux alignements est grande. (Mouas, 2013).

5.2.2. La spectroscopie infrarouge IR

La spectroscopie IR est l'une des méthodes les plus aisées à mettre en œuvre. Son domaine d'application est pratiquement universel et résulte largement des progrès de l'appareillage, tant dans la production de lumière par laser que dans la précision des détecteurs. (Sevin *et al.*, 2012).

Cette méthode tout comme la spectroscopie UV –visible est une spectroscopie d'absorption. Cependant une radiation IR n'a pas une énergie suffisante pour exciter les électrons de valence d'une molécule, mais elle est capable d'induire des transitions entre niveaux énergétiques de vibration ou de rotation des atomes autour de leurs positions moyennes. (Mesplède *et al.*, 2013).

La spectrométrie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques. C'est une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes. Son utilisation est simple et le coût de son instrumentation en fait un outil accessible à la plupart des laboratoires. Elle est principalement utilisée pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements).

Elle s'applique en mesurant de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Le rayonnement infrarouge dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs.

La majorité des applications se situe entre 2,5 et 15 μm soit en nombre d'ondes de 4000 cm^{-1} à 670 cm^{-1} (IR moyen).

5.2.3. La spectroscopie UV-Visible

En chimie organique la spectroscopie UV est essentiellement utilisée pour mettre en évidence les insaturations (les doubles liaisons) dans les molécules et les possibilités de délocalisation de ces doubles liaisons par effet mésomère.

Les radiations UV ($200\text{nm} \leq \lambda \leq 400\text{nm}$) et les radiations visibles ($400\text{nm} \leq \lambda \leq 800\text{nm}$) sont absorbées par les molécules en provoquant l'excitation des électrons de valence. Cette absorption se traduit par l'existence d'un spectre d'absorption pour lequel on porte en ordonnée l'absorbance en fonction de la longueur d'onde en abscisse. (Mesplède *et al.*, 2013).

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: $D = \epsilon \cdot l \cdot C$ (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. La spectroscopie UV est de ce fait une technique d'analyse aussi bien qualitative que quantitative. (Nabila et Nadia, 2014).

6. 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. (Suhr, 2003).

L'évaluation de l'efficacité antibactérienne *in vitro* peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes : diffusion (méthode de Kirby-Bauer à l'aide de disques, méthode par gradient à l'aide de bandelettes e-test) ou dilution (détermination de CMI en milieu liquide ou solide). (Jorgensen et Ferraro, 2009).

6.1. L'antibiogramme

Un antibiogramme est une méthode d'analyse qui a pour but de déterminer la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne face à un ou plusieurs antibiotiques. Elle peut se faire en milieu liquide (dans une culture bactérienne liquide) ou en milieu solide (sur une boîte de pétri gélosée) en ajoutant une concentration connue d'antibiotique. La CMI est la concentration ne permettant aucune croissance bactérienne. (<http://www.futura-sciences.com>).

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante. (<https://fr.wikipedia.org>).

6.2. Méthode des 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 connu. Le produit diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique. **(Bousbia, 2004).**

6.3. 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. **(Ferhat, 2004).**

Etant donné le nombre potentiellement important de tests à réaliser et la forme et quantité disponible de notre molécule, le choix s'est porté sur une méthode de diffusion en milieu gélosé à l'aide de disques (méthode de Kirby-Bauer ou méthode de l'antibiogramme).

7. Les microorganismes testés

7.1. Bactérie Gram (+)

❖ *Bacillus sp*

Bacillus sont des espèces anaérobies, aérobies ou facultativement formant des endospores, des bactéries à Gram positif en forme de tige; chez certaines espèces de cultures peuvent tourner à Gram négatif avec l'âge. Les nombreuses espèces du genre présentent un large éventail de capacités physiologiques qui leur permettent de vivre dans chaque environnement naturel. Un seul endospore est formée par cellule. Les spores sont résistants à la chaleur, le froid, le rayonnement, la dessiccation, et désinfectants. **(Claus, 1872).** Ces organismes sont habituellement trouvés dans la décomposition de la matière organique, de la poussière, de légumes, de l'eau, et certaines espèces font partie de la flore normale. **(Barrie et al., 1994 ; Bryce et al., 1993 ; Curtis et al., 1967 ; Hsueh et al., 1999)**, la grande majorité n'a pas de potentiel pathogène et n'a jamais été associée à la maladie chez l'homme ou les animaux. Les membres du genre ont des utilisations microbiologiques importantes **(Turnbull et al., 1990).**

❖ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram-positif, non sporulée bactérie sphérique qui appartient au Genre *Staphylococcus*. (Montville et Matthews, 2008). *S. aureus* est communément trouvée dans l'environnement (sol, eau et air) et se retrouve également dans le nez et sur la peau de l'homme. Elle est responsable d'intoxications alimentaires staphylococcique, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). (George Liu *et al.*, 2005).

7.2. Bactérie Gram (-)

❖ *Escherichia coli*

E. coli, est une bactérie qui compose 80 % de la flore intestinale, elle y est donc naturellement présente. C'est une bactérie Gram- de la famille des Enterobacteriaceae Elle empêche d'autres souches de bactéries pathogènes (à l'origine de maladies) de coloniser la flore intestinale et participe à la production de la vitamine k, qui aide à la coagulation sanguine. Si la plupart des souches d'*E.coli* sont inoffensives, certaines sont pathogènes ce qui indique qu'il existe une grande variété antigénique d'*E.coli*. (<http://sante-medecine.commentcamarche.net>).

❖ Les Entérobactéries

Les Enterobacteriaceae (ou entérobactéries) sont des bacilles à Gram négatif constituent une famille de bactéries très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie, et qui regroupe plus d'une quarantaine de genres. Ces bactéries sont définies par sept critères différents. On les trouve de manière très répandue aussi bien dans l'environnement (notamment les milieux humides) que chez de nombreuses espèces animales et végétales. (<http://sante-medecine.commentcamarche.net>).

❖ *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae est une bactérie Gram négatif, anaérobie facultative immobiles, encapsulée, en forme de tige, qui appartient à la famille des entérobactéries. Elle est présente dans la flore normale de la bouche, la peau et les intestins, (Ryan *et al.*, 2004), elle peut causer des changements destructeurs aux poumons humains en cas d'aspiration, en particulier pour les alvéoles résultant des expectorations sanglantes.

C'est une bactérie commensale de l'homme et des animaux ; elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies avec choc,...).

❖ *Morganella morganii*

Morganella morganii est une bactérie à Gram négatif qui se loge dans le tractus digestif de certains mammifères, oiseaux et reptiles. Caractérisée par sa forme de bacilles, *Morganella morganii* fait partie de la famille des *entérobactéries* et présente la spécificité de fermenter le glucose. Les souches du biogroupe A de *Morganella morganii* occasionnent des infections opportunistes chez des patients immunodéprimés. On peut citer des cas d'infections urinaires, d'infections extra-intestinales ou encore d'infections materno-foetales. La bactérie est réputée pour être sensible aux aminosides et aux chloramphénicols mais résistante à la pénicilline et l'ampicilline. (<http://sante-medecine.commentcamarche.net>).

7.3. Moisissure

❖ *Penicillium species*

Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, de type moisissure. Le conidiospore ramifié possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes. Le thalle est vert ou blanc. Ce genre comprend entre 100 et 250 espèces.

Ce sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les graines, les céréales...

Certains membres du genre produisent la pénicilline, une molécule qui est utilisée comme un antibiotique qui tue ou empêche la croissance de certains types de bactéries à l'intérieur du corps. D'autres espèces sont utilisées dans la fabrication du fromage. Selon le dictionnaire des champignons (10^{ème} édition, 2008), le genre répandu contient plus de 300 espèces. (**Kirk et al., 2008**).

8. Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

❖ Spiromycine (Sr)

La Spiramycine est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides. Elle est indiquée dans le traitement des infections provoquées par des germes sensibles telles que les angines, les sinusites aiguës, les bronchites, les pneumopathies, les infections bucco-dentaires, les infections de la peau (impétigo), certains rhumatismes et certaines infections génitales. Elle est surtout commercialisée sous forme de comprimé. Elle peut entraîner quelques effets indésirables (nausées, vomissements, diarrhée, urticaire, démangeaisons...). Elle est commercialisée sous le nom de Rovamycine®, Birodogyl® ou Missilor Gé®. (<http://sante-medecine.commentcamarche.net>).

❖ Céfotaxime (CTX)

Le Céfotaxime est un antibiotique bactéricide de synthèse de la classe des céphalosporines de troisième génération, appartenant à la famille des bêta-lactamines. Il agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Son large spectre lui confère une activité sur des bactéries gram positif et gram négatif. Son efficacité est très proche de celle de la ceftriaxone. Il est commercialisé sous le nom de Claforan®. Il fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé. ([who model list of essential medicines, 2013](#)).

❖ Imipénème (IPM)

L'imipénème est un agent antibiotique de la classe des carbapénèmes et un dérivé semi synthétique de la thiénamycine (voir azoline) produite par *Streptomyces cattleya*. L'IPM étant inactivé par une enzyme rénale, on lui ajoute de la cilastatine sodique qui est un inhibiteur compétitif réversible de cette enzyme. Il est toujours utilisé en association avec de la cilastatine. ([https:// www.has-sante.fr](https://www.has-sante.fr), 2004).

❖ Amoxicilline (AMC)

L'Amoxicilline est un médicament qui appartient à la classe des antibiotiques. C'est une pénicilline (médicament hautement allergisant), Ce produit permet de traiter de nombreuses maladies infectieuses touchant notamment la sphère ORL, des infections pulmonaires, urinaires ou gynécologiques. Il est généralement utilisé en cas d'infection par

Chapitre I. Revue bibliographique

Helicobacterpylori (cause d'ulcères gastroduodénaux à répétition), dans le traitement de la maladie de Lyme et pour prévenir l'endocardite bactérienne. (<http://sante-medecine.commentcamarche.net>).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Nous avons partagé notre travail pratique en trois parties principales:

1- Purification de la molécule DMHF 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 à visée thérapeutique 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène, qui fait l'objet de notre étude chimique et biologique, a été synthétisée au laboratoire de chimie de coordination, du CNRS Toulouse, France. (Mouas, 2013).

1.2 Matériel biologique

L'activité antimicrobienne du 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène a été testée vis-à-vis de sept souches cibles, dont trois sont référenciées et quatre de provenance clinique et alimentaire, qui nous ont été fourni par le laboratoire d'application microbiologique et pathologies UFM, Constantine.

❖ Bactéries Gram (+) :

Staphylococcus aureus 2S: ATCC 43300.

Bacillus Sp : souche clinique.

❖ Bactéries Gram (-) :

Escherichia coli: ATCC 25922.

Klebsiella pneumonia: ATCC 700603.

Morganella morganii : souche clinique.

Enterobacter sp : souche clinique.

❖ Moisissure :

Penicillium sp : souche alimentaire.

1.3. Matériel de laboratoire

Les milieux nutritifs, ainsi que les milieux de cultures spécifiques : « Mueller Hinton (MH) » pour les bactéries et « Sabouraud » pour la moisissure, 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. Tous les solvants chimiques utilisés sont de qualité analytique.

2. Méthode d'étude

2.1. Purification du 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène

2.1.1. Chromatographie liquide sur colonne (CC)

La chromatographie sur colonne, permet de séparer un mélange en vue d'isoler chacun des constituants séparés de ce mélange.

Dans notre cas, la phase stationnaire qui est la silice est conditionnée au préalable avec la phase mobile qui est le diéthyléther puis versée dans la colonne, puis recouverte d'une fine couche de sable, ensuite une petite quantité du composé à purifier, est déposée uniformément en phase liquide concentrée dans un solvant moyennement polaire, le dichlorométhane (figure 10).



Figure 10: Chromatographie sur colonne du DMHF

2.1.2. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

La chromatographie liquide sur couche mince de la molécule DMHF a été effectuée, avec une phase stationnaire solide la silice fixée sur une plaque d'aluminium, et une phase mobile le diéthyléther. Une goutte du composé dissout est déposée sur la plaque à l'aide d'une micropipette, après séchage à l'air libre la plaque est déposée dans une cuve en verre saturée par les vapeurs de l'éluant, la migration de la molécule par capillarité est arrêtée, dès que le solvant atteint le front que nous avons dessiné au préalable sur la plaque, la plaque est alors à nouveau séchée à l'air et observée à l'œil nu et sous lampe UV à 254 et 356 nm (figure 11).



Figure 11 : Chromatographie sur couche mince du DMHF

2.2. Caractérisation structurale du DMHF

Notre composé a été caractérisé par la combinaison de trois méthodes spectroscopiques différentes :

2.2.1. La résonance magnétique nucléaire RMN

Des analyses de RMN proton (RMN ^1H) et carbone 13 (RMN ^{13}C), ont été enregistrés sur un appareil ADVANCE-DPX 250. En utilisant le chloroforme deutéré comme solvant de dilution de notre produit.

2.2.2. La spectroscopie infrarouge 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.

2.2.3. La spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière. L'absorbance de notre molécule est mesurée dans du dichlorométhane, en utilisant un spectrophotomètre de type UV-Vis Biowave DNA. Les mesures sont effectuées dans des cuves en verre, le balayage de l'absorbance se fait entre 220 nm et 320nm.

2.3. Application biologique du DMHF

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.

2.3.1. La technique d'étude de l'activité antimicrobienne du DMHF

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, l'ensemencement des souches bactériennes est fait par dépôts de deux gouttes de suspension microbienne sur la surface gélosée sèche et l'étaler par la suite par râteau avec une pipette pasteur. L'opération est répétée, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

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 la moisissure, et incubés à 28°cde 72 h à 7j. (Nabila et Nadia, 2014), il faut bien Presser chaque disque à l'aide de la pince stérile pour s'assurer de sa fixation et laisser le produit diffuser 24h au réfrigérateur avant incubation.

2.3.2. Préparation des souches

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

a) La revivification :

Les microorganismes sont prélevés à partir de leurs géloses de conservation à l'aide d'une pipette pasteur et mis dans des tubes contenant un bouillon nutritif qui assurera leur croissance, puis incubés 24 h à 37°C pour les souches bactériennes et de 72 h à 7j à 28°C pour le champignon.

b) L'isolement :

Les tubes de bouillon nutritif de l'étape précédente et qui montrent un trouble apparent à l'œil nu, sont ensemencés par stries à l'aide des pipettes pasteur sur un milieu gélosé Muller-Hinton pour les bactéries et sur gélose sabouraud pour la moisissure. Cette étape permet d'enrichir la croissance microbienne et de vérifier la pureté des souches par la séparation des bactéries en obtenant des colonies espacées les unes des autres, les boîtes de pétries sont ensuite incubées 24 h à 37°C pour les bactéries et 72 h à 7j à 28°C pour le champignon.

2.3.3. Préparation des dilutions

Dans cette partie, nous avons préparé dans un premier temps un tube de notre solution mère qui contient un mélange de notre molécule dissoute dans un minimum de dichlorométhane 5 ml et on complète le volume à 10 ml avec le DMSO, à partir de cette préparation, on peut réaliser nos dilutions en prenant à chaque fois 5 ml de la solution à diluer et en complétant par 5 ml de DMSO la gamme de dilution réalisée est la suivante : 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.



Figure 12 : La gamme des dilutions

2.3.4. Protocole de l'étude de l'activité antimicrobienne du DMHF

Nous avons établi pour cette étude une gamme de dilution en partant d'une concentration de 500mg/ml pour notre solution mère et en prenant comme solvant de dilution un mélange dichlorométhane/DMSO (5ml/5ml), puis nous avons préparé le reste des dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, en utilisant à chaque fois uniquement le DMSO comme solvant de dilution, cette initiative nous a été inspirée par une étude antérieure similaire portant sur l'optimisation de l'effet des solvant de dilution sur l'activité de la molécule étudiée et donnant le mélange dichlorométhane / DMSO comme meilleur candidat. (Nabila et Nadia, 2014).

2.3.5. L'antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé pour l'*Enterobacterie* suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment (diffusion sur milieu solide). Les antibiotiques utilisés sont :

La Cefotaxime, Amoxicilline, Spiromycine et Imipenème sous forme de disque. Pour le reste des souches testées nous avons pris comme référence l'étude antérieure sur les mêmes souches de mêmes références. (Nabila et Nadia, 2014).

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Contrôle de la pureté de DMHF

Les produits utilisés à des fins thérapeutiques doivent être d'une pureté immaculée, c'est pour cela qu'il faut passer préalablement par une étape de purification.

1.1. Purification de DMHF par Chromatographie sur colonne

Notre produit est solubilisé avec un minimum de dichlorométhane, la molécule en phase liquide, est ensuite déposée uniformément sur la couche de sable, elle commence alors à migrer entraînée par l'écoulement de la phase mobile le diéthyléther tout au long de la colonne, le composé pur est récupéré en une seule fraction colorée en éliminant la tête et la fin de colonne qui peuvent contenir des impuretés.



Figure13: Purification du DMHF par chromatographie liquide CC

1.2. Contrôle de la pureté de DMHF par chromatographie sur couche mince CCM

Le contrôle de la pureté par CCM de la fraction éluée à l'aide de la chromatographie sur colonne, nous a révélé à la lumière du jour comme sous lampe UV qu'il n'apparaissait dans les deux cas qu'un seul spot intense dont nous avons pu calculer le rapport frontal.

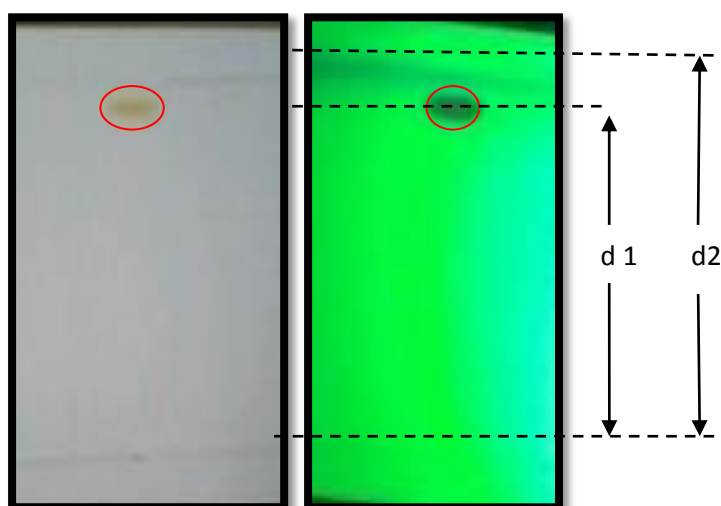


Figure 14 : La plaque CCM après développement, avant et après visualisation par la lampe UV

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

Avec : $d_1 = 3 \text{ cm}$

$d_2 = 4 \text{ cm}$

Ce qui implique : $R_f = 3/4 = 0,75$

2. Caractérisation structurale du DMHF

2.1. Analyse par résonance magnétique nucléaire RMN

La molécule DMHF a été en premier lieu structurellement caractérisée par spectroscopie RMN du ^1H et ^{13}C , les spectres obtenus sont représentés sur les figures (15,16) et les résultats de leurs dépouillements répertoriés sur les tableaux (10,11).

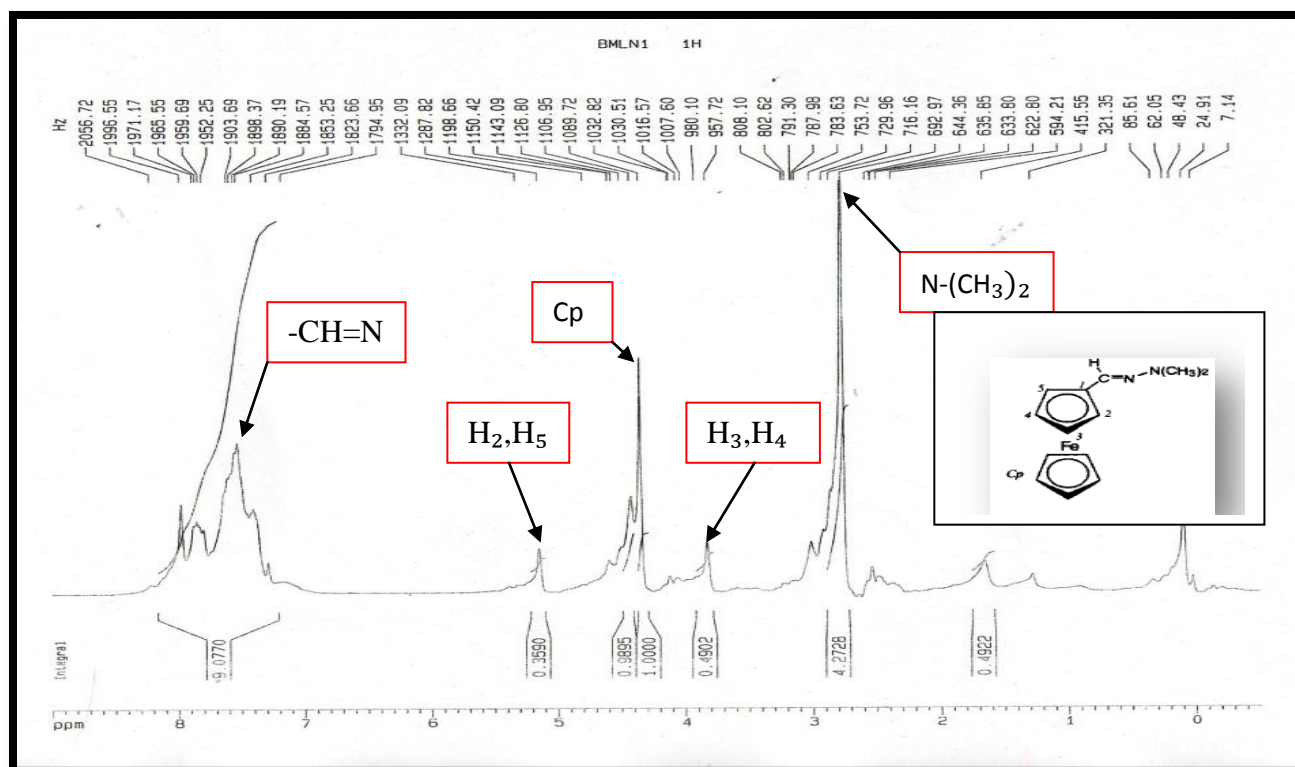


Figure 15: Spectre RMN ^1H du DMHF (250 MHz, CDCl_3)

Attribution	Multiplicité	Intégration	RMN ^1H Réf (ppm)	La lecture du spectre (ppm)
Cp	S	5	4.13	4.40
$\text{N}-(\text{CH}_3)_2$	S	6	2.83	2.80
$-\text{CH}=\text{N}$	M	1	7.14	7.40
H_2,H_5	S	2	4.51	5.10
H_3,H_4	S	2	4.24	3.80

Tableau 10 : Les résultats du spectre RMN ^1H du DMHF

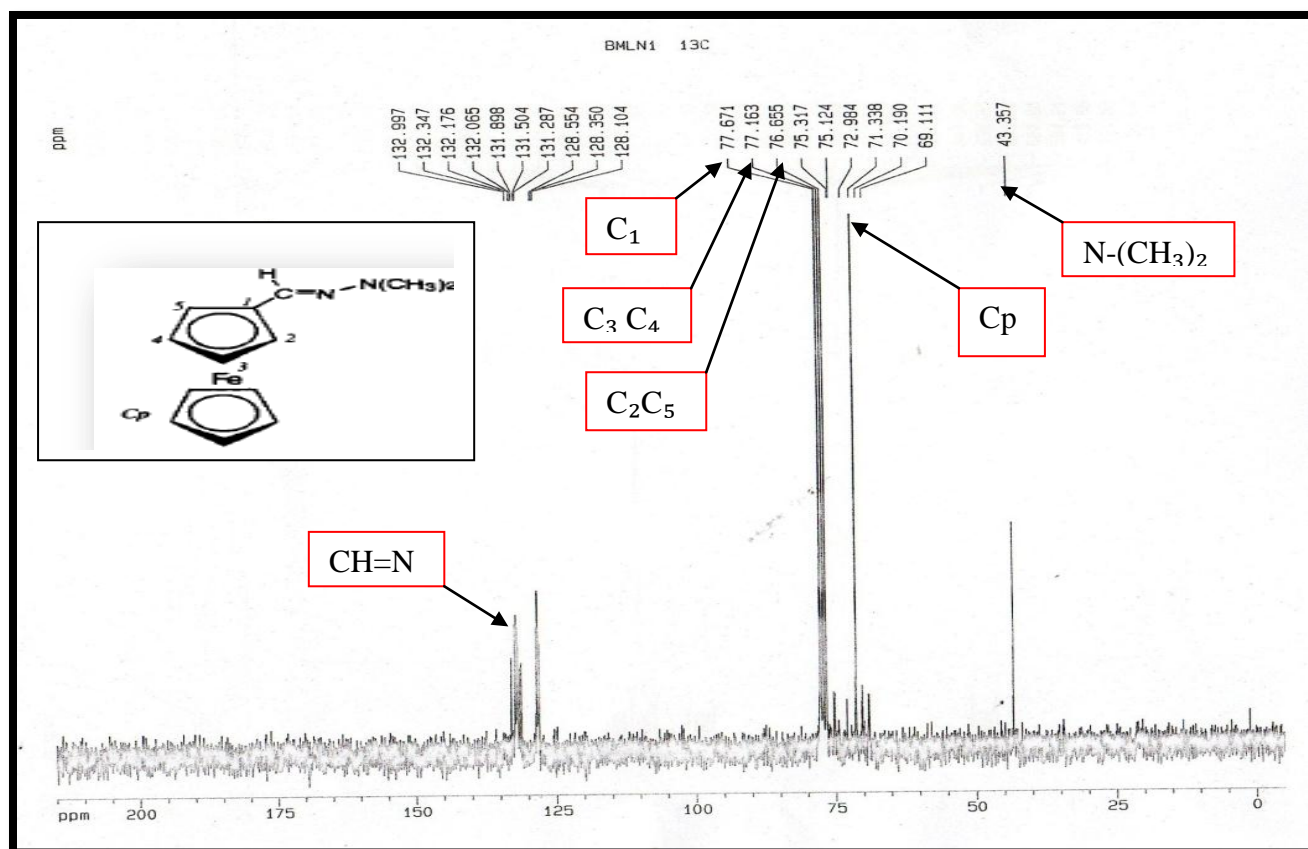


Figure 16: Spectre RMN ^{13}C du DMHF (250 MHz, CDCl_3)

Attribution	RMN ^{13}C Réf (ppm)	La lecture du spectre (ppm)
Cp	69.00	71.00
N-(CH_3) ₂	43.36	43.35
-CH=N	143.53	132.065
C ₂ ,C ₅	72.12	76.65
C ₃ ,C ₄	73.45	77.16
C ₁	82.12	77.67

Tableau 11 : Les résultats du spectre RMN ^{13}C du DMHF

2.1. L'analyse par la spectrophotométrie IR

La caractérisation de la molécule DMHF a été effectuée par la spectroscopie IR en nous donnant les différents groupements fonctionnels appartenant à ce composé, par l'apparition de fréquences de vibration caractéristiques de chaque fonction présentées sur (tableau 12)

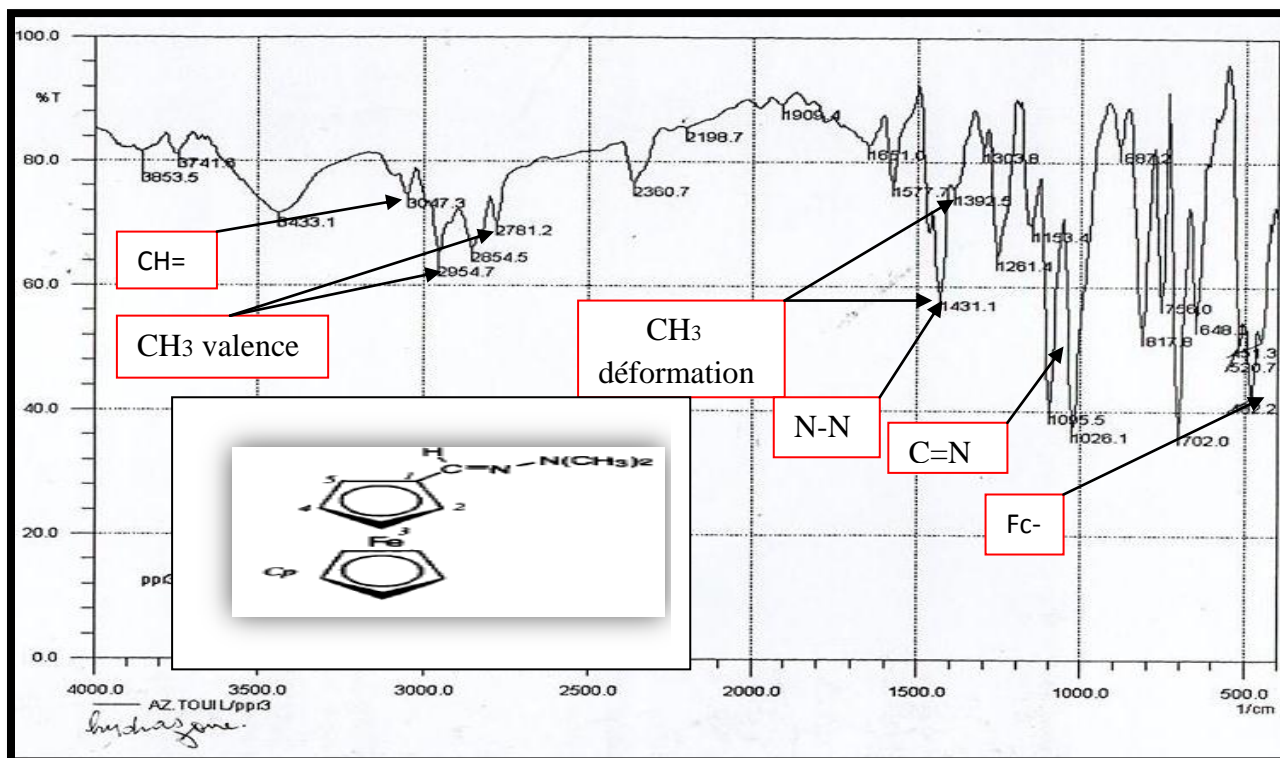


Figure17: Spectre de l'analyse spectroscopie IR du DMHF

Fonction	Fréquence de vibration (cm-1) Réf	La lecture du spectre (cm-1)
C=N	1145	1095
Fc-	485-500	482.2
N-N	1410	1431
CH ₃ déformation	1365-1385	1392
	1415-1470	1431
CH ₃ valence	2800-3000	2781-2954
CH=	3000-3100	3047

Tableau 12 : Fréquences de vibration dans le domaine IR des groupements fonctionnels du DMHF

2.2. L'analyse par la spectroscopie UV

La caractérisation par spectroscopie UV s'est fait par un balayage dans une gamme d'absorption comprise entre 220-320 nm. L'analyse quantitative a donné une concentration de notre produit égale à 1488µg/ml, de plus l'analyse qualitative a confirmé la présence des groupements fonctionnels de notre composé qui absorbent dans ce domaine par l'apparition de bandes caractéristiques reportées sur (tableau 13) et (figures 18 et 19).



Figure 18 : Concentration du composé dans l'échantillon analysé, calculée par l'appareil UV

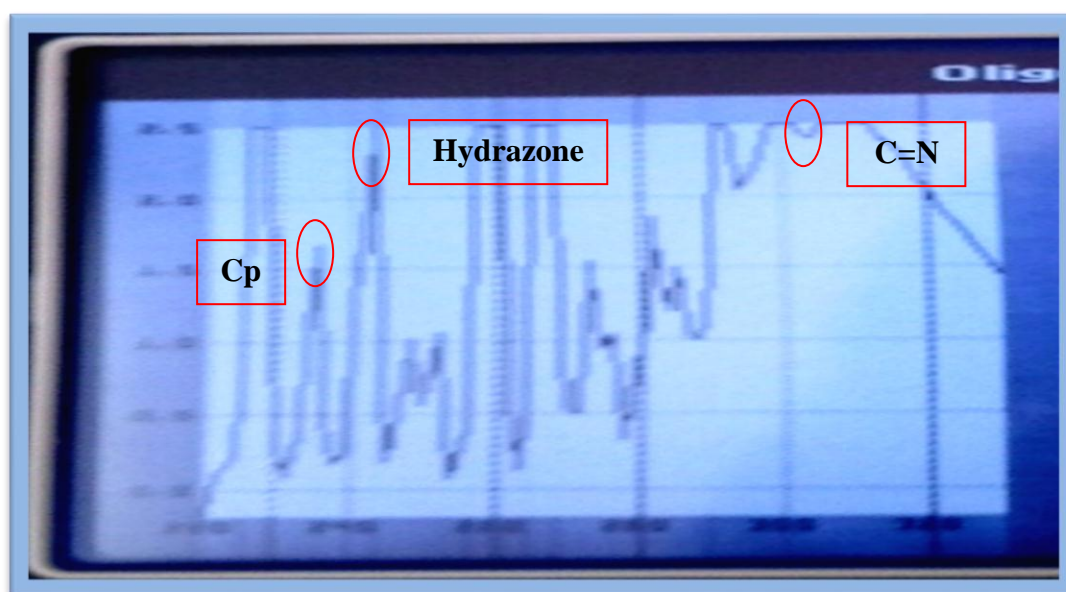


Figure 19 : Spectre de l'analyse spectroscopique UV du DMHF

Groupements fonctionnels	λ :max (nm) Réf	La lecture du spectre
Cyclopentadiène	238	237
C=N	340	306
Hydrazone	257	258

Tableau 13 : Identification des longueurs d'ondes d'absorption dans le domaine UV des groupements fonctionnels du DMHF

3. L'évaluation de l'activité antimicrobienne du DMHF

Nous nous sommes référés à une étude similaire sur un dérivé ferrocénique concernant l'optimisation du protocole de travail et le choix du solvant de dilution (**Nabila et Nadia, 2014**), pour l'étude de l'activité antimicrobienne, c'est ainsi que nous avons choisi le mélange (dichlorométhane / DMSO), (50V/50V) comme solvant de dilution.

Concernant les résultats de l'activité antimicrobienne :

Nous n'avons observé aucune activité antimicrobienne, contre les bactéries Gram (-) *Escherichia coli*. Les résultats positifs pour le restant des souches testées, sont illustrés dans les figures de 20 à 25 et reportés sur le tableau 14.

Souches testées		Dilutions	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
		Concentration (mg/ml)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
		Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (mm)							
Gram -	<i>k.pneumonia</i>	10	7	7	0	8	0	0	
	<i>M.morganii</i>	0	7	6	8	6	7	7	
	<i>Enterrobactries.Sp</i>	8	9	7	7	7	6	0	
Gram +	<i>S. aureus 2S</i>	8	7	7	8	7	6	0	
	<i>Bacillus Sp</i>	7	7	7	8	8	10	0	
Moisissure	<i>Penicillium Sp</i>	10	8	9	7	7	7	7	

Tableau 14: Activité antimicrobienne du DMHF

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

Gram négatif

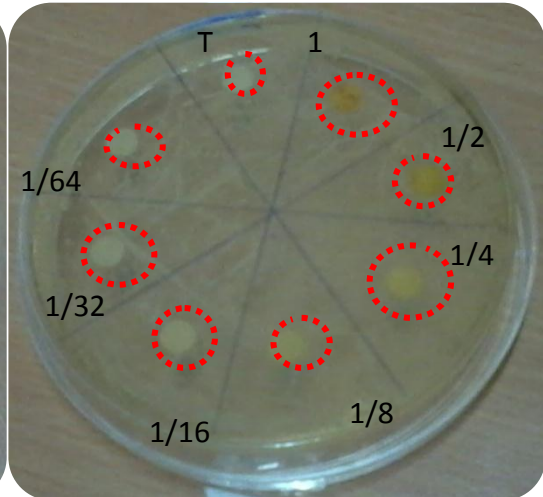
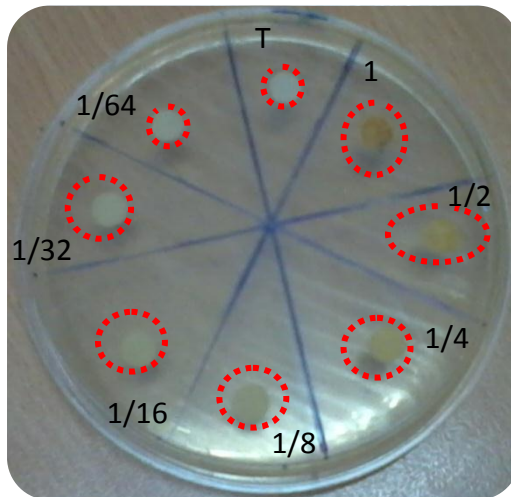


Figure 20 : Effet de DMHF sur Entérobactéries *sp*

Figure 21: Effet de DMHF sur *M. marginii*

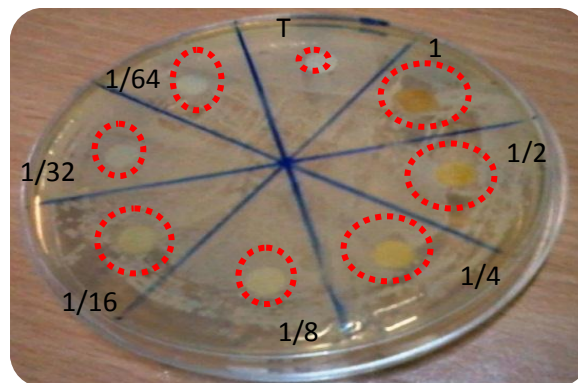


Figure 22 : Effet de DMHF sur *K.pneumonia*

Gram positif

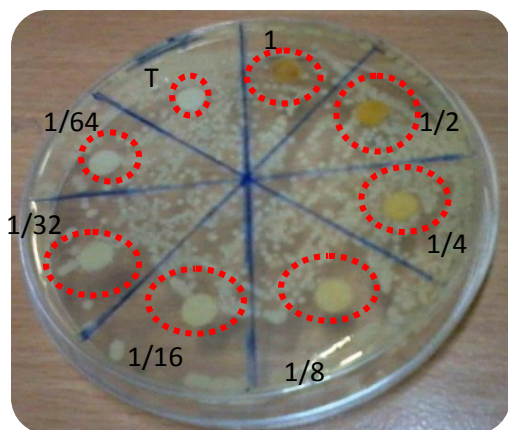


Figure 23 : Effet de DMHF sur *B.subtilis*

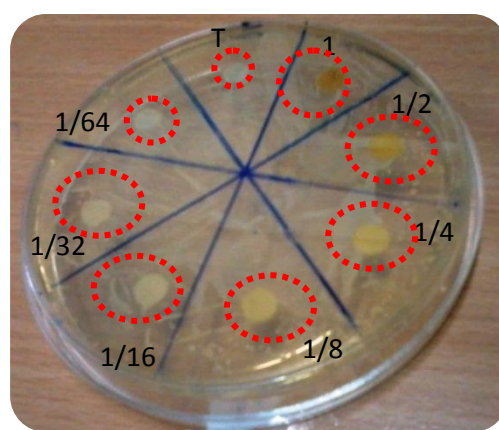


Figure 24: Effet de DMHF sur *S.aureus* 2S

Moisissure

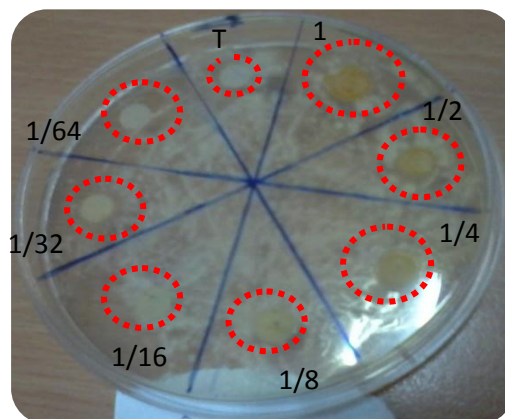


Figure 25: Effet de DMHF sur *Penicillium* sp

4. L'antibiogramme

Les résultats obtenu pour l'antibiogramme des antibiotiques : IPM, Sr, CTX, AMC, testés sur les même souches microbiennes sont illustrés dans les figures 26 à 31 suivantes puis consignés dans le (tableau15) :

Antibiotiques Souches Testées		IPM	Sr	CTX	AMC
		Diamètres de la zone d'inhibition (cm)			
Gram Positif	<i>S. aureus 2S</i>	6	2,5	-	-
	<i>Bacillus Sp</i>	5,4	3	-	-
Gram Négatif	<i>E. coli</i>	6	-	3	0
	<i>K.pneumonia</i>	4,5	-	0	0
	<i>M.marganii</i>	2,3	-	0	0
	<i>Enterrobacteries</i>	2,5	1,1	1,2	1,3

Tableau 15 : Les résultats de l'antibiogramme

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

Gram positif

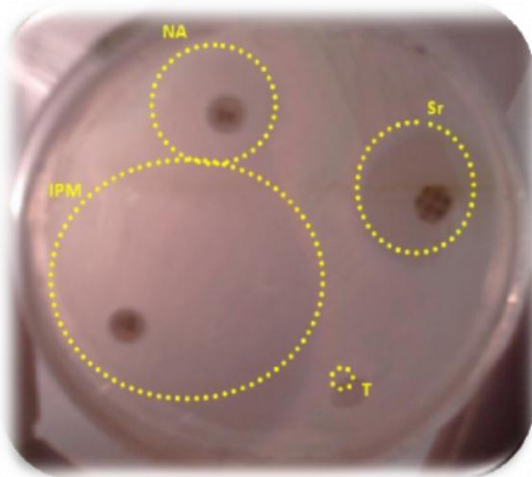


Figure 26: *S. aureus* 2S

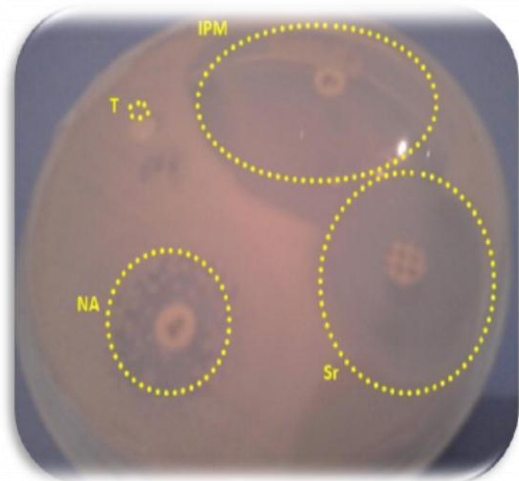


Figure 27 : *B. subtilis*

Gram négatif

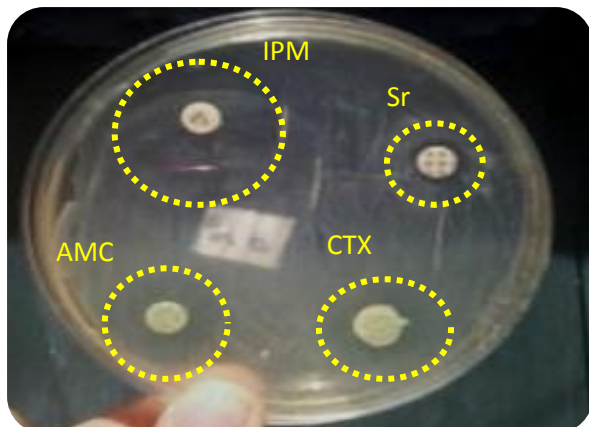


Figure 28 : *EnterobacteriesSp*

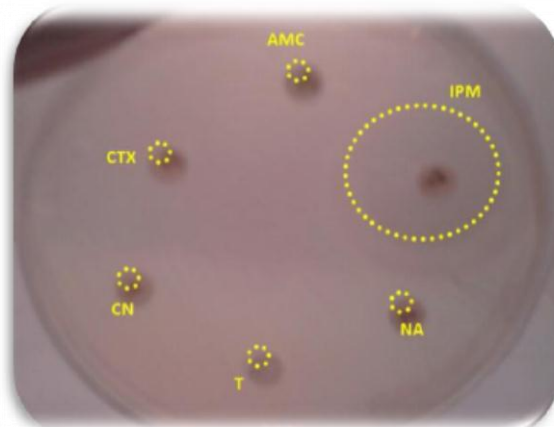


Figure 29 : *M. morgani*

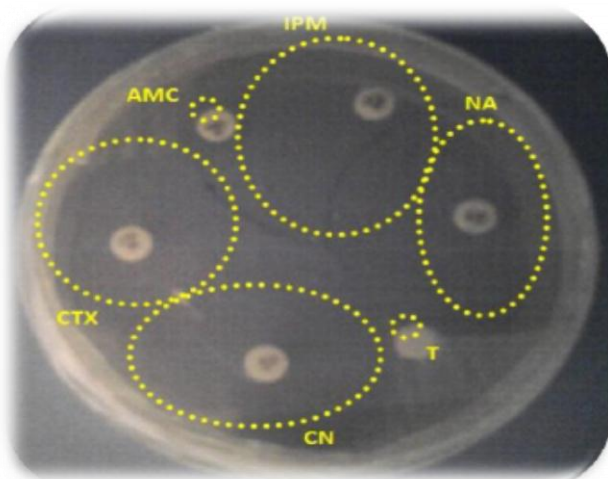


Figure30: *E.coli*

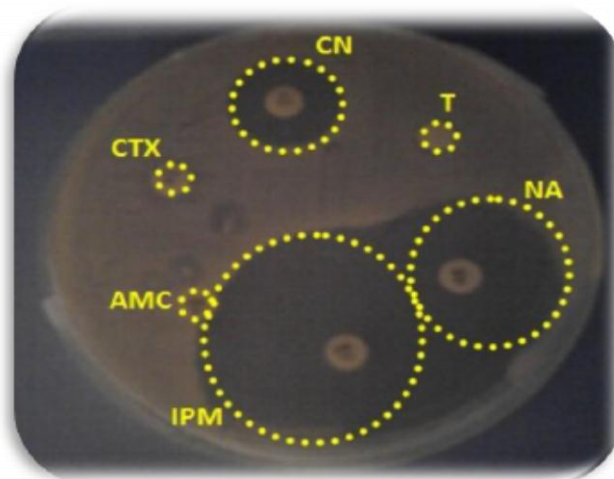


Figure31: *K.pneumonia*

1. Purification

- **Discussion de la fraction choisie au cours de la purification du DMHF par CC et CCM**

L'élution d'une seule fraction par chromatographie sur colonne indique que notre composé est pur et l'analyse complémentaire par CCM confirme bien ce résultat avec l'apparition d'un seul spot coloré et intense aussi bien à la lumière du jour que sous UV, le choix du solvant éluant utilisé pour la séparation était adéquat au vue des Rf obtenu (figure 32 et figure 33).

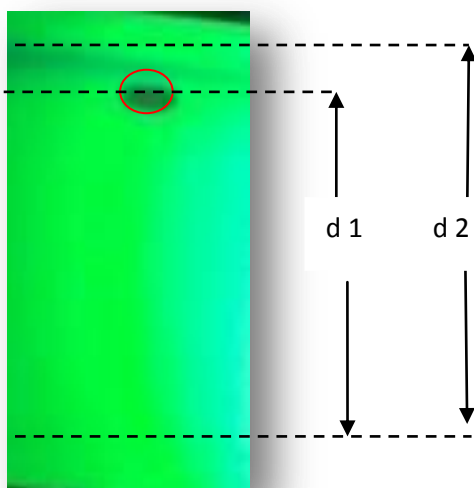


Figure 32: Plaque CCM après développement observée sous UV.



Figure 33: Éluion de DMHF par chromatographie CC

2. Caractérisation structurale

- **Discussion des résultats de l'analyse par RMN**

Pour le dépouillement et discussion de nos spectres RMN, nous nous sommes référés à l'article de Concepción Lopez et ses collaborateurs pour la même structure, nous avons toutefois relevé les différences suivantes :

- La résonance due à l'atome de carbone imine apparaît à {ca.143.53ppm} fortement déplacé vers des champs élevés, alors que notre imine apparaît à 132,065ppm.

- Pour le groupement cyclopentadiényl, concernant les deux spectres ^1H et ^{13}C les résultats se rapprochent.

- On peut dire par conséquent que les résultats des références et celles obtenus sont proches parce que la structure des deux molécules est la même la seule différence étant la méthode de synthèse.

• Discussion des résultats de l'analyse par IR

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

Selon F. Balazs:

- La région du spectre située entre $500 - 485 \text{ cm}^{-1}$ est principalement due aux vibrations du groupement Fc. Elle apparaît dans le spectre du DMHF à 482.2 cm^{-1} . (**Balazs, 2009**).

Selon : C. Lopez

▪ Le pic situé à 1620 cm^{-1} est due à la vibration du groupement $\text{C}=\text{N}$, il apparaît dans notre spectre à 1651 cm^{-1} .

Selon : P. Basignana et E.Cogrossi

▪ Le pic du spectre situé à 1410 due au groupement $\text{N}-\text{N}$, apparaît à 1431 cm^{-1} sur notre spectre.

▪ Le groupement CH_3 déformation apparaît à deux régions entre $1365-1385 \text{ cm}^{-1}$ et entre $1415-1470 \text{ cm}^{-1}$, par contre sur notre spectre il apparaît entre $1391-1431 \text{ cm}^{-1}$.

▪ Le groupement CH_3 valence apparaît entre $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$, dans notre cas il apparaît entre $2781-2954 \text{ cm}^{-1}$

▪ Le groupe $\text{CH}=\text{}$ apparaît entre $3000-3100 \text{ cm}^{-1}$, sur le notre il est à 3047 cm^{-1} .

La comparaison de nos résultats avec ceux des références montre bien le grand rapprochement et la similitude de l'interprétation.

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

- Les groupements Cyclopentadiène sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 238nm; notre résultat est proche de celui de la référence, 237nm.

Selon : R.Abdellatif

▪ Le groupement C=N apparaît à 340 cm^{-1} , pour notre molécule il apparaît à 306 nm. **(Reguig abdellatif, 2013).**

Selon W.Freist et ses collaborateurs

▪ Le groupement hydrazone apparaît à 257 nm, sur notre spectre il apparaît à 258nm. **(Freist *et al.*, 1972).**

Ces résultats viennent aussi conforter les nôtres et l'ensemble des trois analyses spectroscopiques confirment bien la structure de notre molécule synthétique DMHF.

3. Activité antimicrobienne

L'optimisation du système de dilution selon A. Nabila et A. Nadia **(Nabila et Nadia, 2014)**, nous a permis d'adapter ces résultats pour d'autres dérivés ferrocéniques, en ce qui concerne l'activité antimicrobienne, nous avons pu observer une activité 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 **(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 **(Kim *et al.*, 2006)** elle est supérieure à 6 mm.

Quand à nos résultats, ils montrent que les diamètres d'inhibition varient de 6mm à 10mm :

▪ *Klebsiella pneumoniae* : le diamètre de la zone d'inhibition est de 10 mm dans la première dilution, puis décroît dans les trois dilutions qui suivent, pour n'en montrer aucune pour les trois dernières dilutions 1/8, 1/32, 1/64.

- *Morganella morganiie* : la solution mère ne montre aucune activité vis-à-vis de cette souche mais nous obtenons des diamètres d'inhibition qui varient entre 6,7 et 8 mm pour le restant des dilutions.
- *B.subtilis* : le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 7mm et 8 mm pour les cinq premières dilutions et augmente à 10mm pour la dilution (1/32), mais ne montre aucune activité pour la dernière dilution (1/64).
- Enterrobacterie : les zones d'inhibition pour toutes les dilutions varient de 7mm jusqu'à 9mm, sauf la dernière dilution pour la quelle on ne remarque aucune inhibition.
- *Staphylococcus sp* : les diamètres de la zone d'inhibition pour les cinq premières dilutions varient entre 7mm et 8mm, par contre elles rechutent vers 6mm dans la dilution de (1/32) et s'annule à la dernière dilution (1/64).

Pour la moisissure :

- *Penicillium sp* : le diamètre de la zone d'inhibition est de 10 mm pour la solution mère, et varie entre 7mm et 9mm pour le reste des dilutions.

Ceci confirme que la concentration du principe actif ainsi que le solvant ont un grand impact sur l'effet thérapeutique obtenu, et nous amène à conclure à l'existence d'un potentiel antimicrobien intéressant de notre molécule de synthèse.

4. Antibiogramme

D'après la littérature, IPM est l'antibactérien qui a le spectre le plus large parmi tous ceux que nous avons utilisé. Nos résultats expérimentaux confirment également cela aussi bien pour les souches Gram positif comme pour celles Gram négatif.

Comme nous pouvons aussi remarquer que le Sr est un antibiotique contre les bactéries Gram positif et aussi pour la souche de l'entérobactérie(Gram négatif) il donne une zone d'inhibition de 1,1mm, donc, le Sr est beaucoup moins efficace que l'IPM contre la souche *S. aureus 2S et Bacillus sp*. où on peut remarquer une forte résistance du *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923.

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'AMC n'a aucune activité sur les souches Gram négatif testées, à part les entérobactéries pour qui il montre une petite zone d'inhibition (1,3mm).

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons pu étudier la molécule à visée thérapeutique de synthèse -2-2 diméthyle méthylène hydrazine ferrocène aussi bien sur le plan chimique que biologique, de par l'intérêt que revête ses fonctions dans la revue littéraire et pour son utilisation en pharmacologie dans le traitement de plusieurs pathologies.

Nous avons contrôlé la pureté de notre produit par l'utilisation des deux principales méthodes chromatographiques de purifications : la CCM et la CC.

La caractérisation structurale de DMHF a été effectuée par la combinaison de trois méthodes spectroscopiques RMN (^1H , ^{13}C), UV et IR, ce qui nous a bien confirmé la structure du composé à l'étude.

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien, l'utilisation de la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé donne un résultat qui montre une bonne activité de DMHF avec deux souches bactériennes Gram(-) *Klebsiella pneumoniae*, et Entérobactérie *sp*, et deux souches bactériennes Gram (+) : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus sp* et une moisissure : *Penicillium sp*.

Notons enfin, que l'objectif de cette étude qui se présente dans la purification, caractérisation structurale et l'application de cette molécule synthétique dans le domaine thérapeutique a été mené à bien, reste en fin de tester son activité antimicrobienne in vivo et d'établir sa CMI, en plus des différents tests cliniques qui s'y rattachent.

Références

Bibliographies

Andrade.M.M.,Maria.T.B. J. Comb. Chem.(2010).vol 12: p245-247.

Annuaire des technologies-clés, Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie. France. (2011).

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

Balazs. F., Antal.C., Tibor.N. Zs *et al.*, Synthesis, ring transformations, IR-, NMR and DFT study of heterocycles with two ferrocenyl units. J.Org.Chem. N° 23. (2009).Vol694: p3737.

Barrie. D., Hoffman. PN., Wilson.,et Kramer.JM. Contamination de linge de l'hôpital par *Bacillus cereus*. Epidemiol Infect. (1994).Vol 113:p 297-306.

Baselt. R.C., Cravey. R.H. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 4th edition.Chemical Toxicology Institute. Foster City, CA. (1995).

Bassignana. P.,Cogrossi. E. Absorption Ir du groupe N-N en colorants azoïques. Tetrahedron. (1964). Vol 20 :p 2361–2371.

Belkheiri. N., Bouguerne. B., Bedos-Belval. F., Duran.H.,Bernis. C.,Salvayre. R., Negre-Salvayre. A et Baltas. M. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringichydrazones family. Eur.J. Med. Chem. (2010). Vol 45: p 3019-3026.

Belkheiri. N. derivesphenoliques a activitesantiatherogenes. UniversitéToulouse III - Paul Sabatier.Spécialité : Chimie-Biologie-Santé. (2010). P 45.

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

Binauld. S., Stenzel.M. H. J. Chem. Commun. (2013).Vol49: p2082.

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

Borgne.M., Professeur de chimie thérapeutique, université Claude Bernard Lyon 1, Institut des sciences Pharmaceutiques et biologiques de Lyon.

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

Bryce. E.A., Smith., Tweeddale.MetAndruschak. BJ., Maxwell.M. Diffusion de *Bacillus cereus* dans une unité de soins intensifs. *Infecter contrôle HospEpidemiol.* (1993). Vol 14:p62-459.

Clark Still.W., Kahn.M.,Mitra. A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution.*J. Org.Chem.* N° 14. (1978). Vol43: p 2924.

Claus.D., Berkeley RCW: Genre *Bacillus* Cohn. En PHA Sneath, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds): *Manuel de Bergey de Bactériologie systématique.*(1872).Vol.2 : p 1105.

Curtis. JR., Aile. AJ., Coleman .J.C. *Bacillus cereus* bactériémie-une complication de l'hémodialyse intermittente. *Lancet.* (1967).Vol1: p8-136.

Dagani.R. Fifty Years of Ferrocene Chemistry.*Chemical and Engineering News.* (2001). Vol79: p 37–38.

Dunitz. J., Orgel. L., Rich .A.The crystal structur ferrocene. *ActaCrystallographica.* (1956). vol9: p 5–373.

Dutta. R.L., Hossain. Md.M. *J. Sci. Ind. Res.* (1985).Vol 44: p 635-74.

Edwards. E. I., Epton. R.,Marr. G. J. *Organomet. Chem.* (1975).Vol85.

Eissa.A. A. M.,Farag. N. A. H.,Soliman, G. A. H. Synthesis,biological evaluation and docking studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory,analgesic and antipyretic agents. *Bioorg. Med. Chem.*(2009).Vol17: p5059–5070.

Fauchère .J. L., Loup. J. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Editions Paris. (2002).P 365.

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

Fernandez. R., Ferrete. A., Lassaletta .J. M ., Llera. J.M et Mrtin-Zamora. E. Angew. Chem Int. (2002). Vol41: p 832.

Fischer.E. O., Pfab.W. Zur Kristallstruktur der Di-Cyclopentadienyl-Verbindungen des zweiwertigen Eisens, Kobalts und Nickels. Z. Naturforsch. B. (1952). Vol 7 : p 377–379.

Freist.W., Maelickem.A., Sprinzl.A., et Cramer .F. Incorporation of 3 -Methyl-2-benzothiazolone Hydrazone into the Anticodon Loop of tRNA^{Phe} from Yeast, J. Biochem. (1972). Vol 31: p 215-220.

George.Y.L., Essex.A., Buchanan. J.T., Hoffman. H.M. , Bastian .J.F., Fierer.J., Nizet.V. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. J. Experimental Medecine. (2005).

Gerritsen. Buschmann. Phosgene poisoning caused be DCM paint strippers, Brit.J.industr.Med. (1960). Vol 17: p 187.

Gomez.G. Abécédaire de Chimie Organique. Université Montpellier. (2014).

Gupta. G.D., Pujari. H.K. J. Indian.Chem.(1978). Vol 16 : p31-329.

Gursoy.A., Terzioglu. N., Otuk. G. J. Med. Chem. (1997). Vol32: p 7-753.

Hadrot. S. Developpements methodologiques dans la chimie des hydrazones et des isonitriles. J.Chemical Sciences.Ecole Polytechnique X. French. (2006).

Holbrook.M.T., Dichloromethane. In: Kroschwitz, J.I. & Howe-Grant, M., eds. Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Ed. New York. John Wiley. (1993). Vol 5: p 1041–1050.

Holla.B.,Udupa. K.V. J. Indian.Chem. Soc. (1988).Vol 65: p 5-524.

Hsueh. PR., Teng.LJ., Yang.PC.,Pan.HL., Ho.SW., et Luh. KT.Épidémie de pseudo nosocomiale causée par *Bacillus cereus* tracée à l'alcool éthylique contaminée provenant d'une usine de liqueur. J. Clin Microbiol.(1999).Vol 37:p4-2280.

Jorgensen. J., Ferraro.M., Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Clinicalinfectiousdiseases.(2009).Vol49: p 1749-1755.

Kealy.T. J., Pauson.P. L. A New Type of Organo-Iron Compound.Nature.(1951).Vol168: p1039.

Kim.S *et al.*, Yoon. J.Y. Sci. Synth. (2004).Vol 27: p 671.

Kim. S *et al.*, Antimicrobial and antifungal activity of sulfur-containing compound from *Petiveriaaliacea*.(2006).

Kirk.PM., Cannon, PF., Minter.DW., et Stalpers. JA .Dictionnaire des Champignons (10e éd.). Wallingford, UK: CABI. (2008). P 505.

Kobayashi. S., Mori. Y., Fossey. H. S et Salter.M. Chem. Rev. (2011).Vol111: p 2626. b)
Lazny.R., Nodzeswska.A. Chem. Rev. (2010).Vol110: p 1386.

Köpf-Maier.P., Köpf. H., Neuse. E. W. J. Cancer Res. Clin. Oncol. (1984).Vol 108 : p 336.

Kumar.A.,Sethi. P.D., Jain. C.J. J. Indian. Chem. Soc. (1990).Vol67: p9-796.

Landry.Y., Gies.Jean-Pierre. pharmacologie des cibles vers l'indication thérapeutique.dunod, paris.(2003-2009). P 13-18.

Lassaletta. J.M .,Alcarazo.M., Fernandez. R.J.Chem.Comm.(2004).P 298-299.

Laszlo.P., Hoffmann. R. Ferrocene: Ironclad History or Rashomon Tale? Angewandte.Chemie. International. Edition. (2000).Vol. 39 : p 123–124.

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

Long. N. J., Angew. J.Chem.Int. (1995).Vol34: p 21.

Lopez. C., Sales. J., Solans. X etZquiak. R. J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1992).P 2321.

Lopez .C.,Bosque. R., Solans.X., et Font-Bardla. M.Stereochemical rigidity in a trimetallic complex. X-ray crystal structure of trans-[Pd {(5-C5H5) Fe [(x15-CsH4)-CH=N-N (CH 3) 2]} 2C12].J.Organometallic Chemistry.(1997).Vol 535: p 99-105.

Mahmudov .K. T., Kopylovich. M. N., Pombeiro. A. J. L. Coord. Chem.Rev. (2013).Vol 257: p 1244.

Martin. M.L., Martin .G.J. Manuel de Résonance Magnétique Nucléaire. Ed.A. Zoulay. (1971).Vol 40.

Mesplède.J.,Dumoulin.M.,Marthevet.S. Tout -En- Un Chimie.Les nouveaux précis .bréal,paris. (2013).P 305-308.

Metwally.K. A., Abdel-Aziz. L. M., Lashine. E.M., Husseiny. M. I etBadawy. R.H. Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. J.Bioorg. Med. Chem. (2006). Vol14: p 8675-8682.

Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie. Annuaire des Technologies-Clés, France. (2011).

Mino. T., Ogawa. T., Yamashita. M., J.Organomet. Chem. (2003).P 665-122.

Mohan.J., Pujari. H.K.J.Indian. Chem. (1975).Vol13: p9-528.

Montville. Matthews. FDA. (2008-2012).

Références Bibliographiques

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

Nabila.A., Nadia.A.Purification, Caractérisation et Evaluation de L'activité Antimicrobienne D'une Nouvelle Molécule Bioactive Ferrocénique Synthétique Chirale.Université Constantine 1.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire. (2014). P43-73.

Pavia. D.L., Lampan.G.M., kriz.G.S. Introduction to spectroscopy. Thirded.(1971).

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

Popp. F.D. J. Heterocyclic Chem. (1984). Vol 21: p5-1641.

Prudent Practices in the Laboratory. National Academy Press, Washington D.C.(1995).P 302-303.

Quideau.S.Ph.D. La Chimie Organique dans la Conception des Médicaments Et dans leurs Modes d'Action Cours de la Licence de Chimie Moléculaire du Vivant.

Rasras.A., Al-Tel.H., Al-Aboudi.A. F., Al-Qawasmeh. R. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Cholic acid hydrazine analogues. Eur. J. Med. Chem. (2010). Vol45: p 2307–2313.

Reguig.A.M. Etude Electrochimique des complexes de quelques métaux detransitions dérivés des ligands hydrazides et hydrazones. Universiteaboubekrbelkaid – tlemcen. Faculte des sciences,departement de chimie, Laboratoire de chimie analytique et d'electrochimie. (2013).

Rosberg. M., Lendle. M., Togel. A. Chlorinated hydrocarbons. 1. Chloromethanes. In: Gerhartz. W et Yamamoto. Y.S. eds.Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th rev. Ed. New York, VCH Publishers.(1986).Vol6: p 235–257.

Ryan.K.J., Ray. CG.eds. Sherris microbiologie médicale (4e éd.). McGraw Hill. (2004).

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

Sevin. A., Brochard.F., wyart *et al.*, dunod, paris, (2012). P 389-396.

Sharpless.KB., Akashi. K., Oshima.k. Tetrahedron.Lett.(1976).Vol 29: p 2503-2506.

Silverstein. G., Robert.M. B., Clayton.C., Terence. C., Morrill *et al.*, Identification spectrométrique de composés organiques. édition de boeck. caractérisations d'absorption de composés organiques. (2004). P 311.

Singh. N.K., Agrawal. N., Aggarwal. R.C. J.Indian .Chem. (1984). Vol 23: p 5-1011.

Socrates. G. Infrared characteristic group frequency. Ed. Wiley Interscience.(1980).Vol73: p 17.

Solomons. Graham.Fryhle.Craig. Organic Chemistry. 9th ed. États-Unis: John Wiley et Sons. Inc. (2006).

Sondhi. S., Dinodia. M., Kumar. A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazine derivatives. Bioorg. Med. Chem. (2006). Vol 14: p 4657-4663.

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

Sunil.L. H., Rajurkar.V.G., Patil Pravin., Harer Priyanka.S., Navale Sampat. D., Awuti Sandip. T., et Sonawane Anand.A., Synthesis, characterization and anti-microbial evaluation of some 2-Iodo-N'-[(1E)-substituted phenylmethylidene] benzohydrazide analogues. Int. J. Pharma. Sci. Drug Res. (2010). Vol 2(2): p134-136.

Tatum.L. A., Su.X., Aprahmian.I. Acc. Chem Res. (2014). Vol47 : p 2141.

Références Bibliographiques

Tian. B., He. M., Tang. S., Hewlett.I., Tan. Z., Li. J., Jin.Yet Yang. M.,Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. *Bioorg.Med. Chem.*(2009). Vol19: p 2162–2167.

Togni. A., Hayashi.T.Ferrocenes. VCH, Weinheim. (1995).

Turnbull. P., Kramer. J., Melling.J. *Bacillus Dans: Topley et principes Wilson de bactériologie. virologie et en immunité 8^e. ed*,Edward Arnold, Londres (1990).P 185-210.

Vicini. P., Zani. F., Doytchinova.I. Hydrazones of 1,2-benzisothiazole hydrazides: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur. J. Med. Chem.* (2002). Vol37: p 553-564.

Vireira *et al.*, Microbiocidal effect of medecinalp[mtextracts(Psidiumguajava LINN and Carica papaya LINN) upon bacteria isolâtes from fish muscle known to induce diarrhea in children.(2001).

Who model list of essential medicines.18th list. (2013).

Wilkinson. G., Rosenblum. M., Whiting.M. C., Woodward.R. B.The Structure of Iron Bis-Cyclopentadienyl. *J.The American Chemical Society.* (1952).Vol 74: p 2125–2126.

Wu. Y.J., Huo. S.Q., Zhu. Y. J. *Organomet. Chem.*(1995).Vol485: p 161.

<http://leonardvinci.e-monsite.com/medias/files/02.synthese.pdf>

https://fr.wikipedia.org/wiki/Conception_de_médicament

http://www.magritek.com/wpcontent/uploads/2013/12/Spinsolve_LabManual_Ferrocene.pdf

http://eduscol.education.fr/rnchimie/chi_org/viollon/TP6.pdf

<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/biologie-antibiogramme-7217/>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiogramme>

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/7594-escherichia-coli-e-coli-symptomes-et-traitement>

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/19259-enterobacterie-enterobacteriaceae-definition>

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/35762-morganella-morganii-definition>

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/35858-spiramycine-definition>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Imipénème>. HAS, « *TIENAM, sortie de la réserve hospitalière* » [[archive](#)], sur www.has-sante.fr, 2004.

<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/22161-amoxicilline-definition>

Zimmer. L. Conception du Médicament : identification d'une molécule à visée thérapeutique. Université Lyon 1 et Hôpitaux de Lyon et Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon. (2001). P 5-12.

Annexe

Matériels de laboratoire

1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'analyse structurale par spectrophotométrie RMN, a été réalisée au département de Chimie de l'université Frères Mentouri Constantine.



Figure 34 : Appareil ADVANCE-DPX 250 pour RMN

2. Spectroscopie infra- rouge IR

L'analyse structurale par spectrophotométrie IR, a été réalisée au département de Chimie de l'université Frères Mentouri Constantine, par le spectrophotomètre de type FTIR -8201 PC Shimadzu.



Figure 35 : Le spectromètre IR type FTIR -8201 PC Shimadzu

3. 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 36 : Spectrophotomètre UV, BIOWAVE DNA Biochrom

4. La lampe VU

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



Figure 37: La lampe UV de type UVSL-58

Les solvants organiques utilisés

- Tous les solvants utilisés 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.

1. 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 (**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.

2. 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 (**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 flame² ouverte (**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**).

Résumé

The development of new therapeutic molecules has experienced explosive momentum in recent decades, thanks to medicinal chemistry which focuses on the discovery and design of chemical compounds expressing a therapeutic activity and their development into useful drugs.

The purpose of this study is the study of the synthetic molecule 2,2-dimethyl hydrazine ferrocene methylene both the chemical plant and biological, share the therapeutic interest identified in literature ferrocene its functions and hydrazone used as such or as ligand and to achieve this research we first checked the purity of the compound in question using qualitative and quantitative methods chromatography CCM and CC then to confirm the structure of our compound, we used three techniques spectroscopic structural characterization: nuclear magnetic resonance NMR, infrared spectroscopy IR, visible and ultra-UV spectroscopy. And finally the evaluation of the antimicrobial potential of this molecule was performed with the diffusion technique on Mueller-Hinton agar medium for bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300 2S, *Bacillus Sp*, *Escherichia coli* ATCC 25922, ATCC 700603 *Klebsilla pneumonia*, *Morganella morganii* and *Enterobacteria Sp*) and Sabouraud agar medium for the fungus (*Penicillium Sp*). The results of such show that our product has an interesting antimicrobial effect on most of the strains tested.

شهدت تطوير جزيئات علاجية جديدة الزخم الهائل في العقود الأخيرة، وذلك بفضل الكيمياء الطبية التي تركز على اكتشاف وتصميم من المركبات الكيميائية التي تعبر عن النشاط العلاجي وتنميتها في الأدوية المفيدة.

فقد كان هدفنا من هذه الدراسة، أن ندرس جزيء ثنائي ميثيل الفيروسين الميثيلين -2،2- (R / S) الهيدرازين من حيث التركيب الكيميائي والنشاط البكتيري وإذا كان هذا الجزيء له أهمية في العلاج أولاً، ولتحقيق هذا الهدف أجرينا طريقة تنقية باستخدام الأساليب الكمية والنوعية التي يمثلها الاستشراب اللوني بالطبقة الرقيقة و الكروماتوغرافيا السائلة العمودية ومن ناحية أخرى لتأكيد هيكل المركب لدينا، استخدمنا ثلاث تقنيات:

بالرنين المغناطيسي، الأشعة تحت الحمراء التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية و تم اجراء مضادات الميكروبات للجزئ بواسطة تقنية نشرها على اغار مولر هينتون للسلاطات البكتيرية .

(*Staphylococcus aureus* 2S ATCC 43300, *Bacillus Sp*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603, *Morganella morganii*, et *Entérobactérie Sp*) وعلى اغار سابورو لفطر (البنسليوم).

نتائج هذه التجارب تبين أن المركب له تأثير مثير للاهتمام مضاد للمكروبات على معظم السلالات التي تم اختبارها.

LASSOUED Nihed	<u>Encadreur</u>
BIOUD Mebarka	Docteur MOUAS Toma Nardjes
Date de soutenance : 22 / 06/ 2015	
<u>Thème</u>	
Schéma D'élaboration d'une Molécule à Visée Thérapeutique et Application Biologique	
<u>Résumé</u>	
<p>L'élaboration de nouvelles molécules à visé thérapeutique a connu une ampleur explosive ces dernières décennies, grâce à la pharmacologie qui s'intéresse à la découverte et la conception de composés chimiques exprimant une activité thérapeutique et leur développement en médicaments utiles.</p> <p>Le but de cette étude, est l'étude de la molécule synthétique 2,2-diméthyl méthylène hydrazine ferrocène aussi bien sur le plant chimique que biologique, de par l'intérêt thérapeutique relevé dans la littérature des fonctions ferrocène et hydrazone utilisés comme telles ou en tant que ligand et afin de réaliser ce travail de recherche nous avons tout d'abord contrôlé la pureté du composé en question en utilisant des méthodes de chromatographie qualitatives et quantitatives CCM et CC, ensuite pour confirmer la structure de notre composé, nous avons utilisé trois techniques spectroscopiques de caractérisation structurale: résonance magnétique nucléaire RMN(¹H, ¹³C), spectroscopie infrarouge IR, et spectroscopie ultra-visible UV. Et enfin, l'évaluation du potentiel antimicrobien de cette molécule a été effectuée avec la technique de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton, pour les souches bactériennes (<i>Staphylococcus aureus</i> 2S ATCC 43300, <i>Bacillus Sp</i>, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsilla pneumonie</i> ATCC 700603, <i>Morganella morganii</i>, et <i>Entérobactérie Sp</i>) et sur milieu gélosé sabouraud pour la moisissure (<i>Penicillium sp</i>). Les résultats de cette dernière prouvent que notre produit a un effet antimicrobien intéressant sur la plupart des souches testées.</p>	
Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales	
<u>Membres du jury</u>	
Président du jury : Mechakra A. (Professeur – UFM Constantine).	
Rapporteur : Mouas T. N. (Maitre de Conférence B – UFM Constantine).	
Examineur : Kitouni R. (Maitre Assistant A - UFM Constantine).	