



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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire de recherche

DE CHIMIE ANALYTIQUE & D'ELECTROCHIMIE

THESE

Présentée par : **M^{me} BENMANSOUR Née BABA HAMED YAMINA**

En vue de l'obtention du Diplôme de

Doctorat en Chimie

Thème

Synthèse, étude physico-chimique et activité biologique des complexes de cuivre et/ou nickel dérivés d'Hydrazone et Thiadiazole

Soutenu le

Devant le jury composé de :

GHALEM Said

Professeur à l'Université de Tlemcen

BELHAMEL Kamel

Professeur à l'Université de Bejaïa

BOURAADA Mohamed

Maître de conférence A à l'Université de Mostaganem

ARRAR Zoheir

Maître de conférence A à l'Université de Tlemcen

HAREK Yahia

Professeur à l'Université de Tlemcen

DEDICACES

Avec l'aide de Dieu tout puissant et tous les gens qui m'aiment et qui m'ont soutenu j'ai pu achever ce travail que je dédie à :

Mes Parents : merci pour l'amour, la tendresse et le soutien qu'ils m'ont donnée pendant toutes ces années.

Grâce à eux je suis arrivée à devenir ce que je suis maintenant, qu'ils trouvent dans cette thèse un témoignage d'amour, de reconnaissance et de ma plus profonde gratitude.

Mon cher Mari Karim pour sa patience, son aide et son soutien.

Mon fils Mehdi dont sa naissance et ses sourires sont venus apporter innocence, sens et espoir à ces belles années de thèse.

Mon frère Chakir et sa femme Riham pour leur présence quotidienne.

Toute ma famille, ma belle famille.

Mes meilleurs amis qui ont partagés avec moi les bons et les mauvais moments durant mes études

Tous mes professeurs qui m'ont appris avec cœur tout ce que j'ai acquis comme savoir.

Remerciement

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Analytique et Électrochimie (LCAE) de l'Université ABOU BEKR BELKAID, Tlemcen.

Nos sincères remerciements vont à Monsieur le directeur L. LARABI, Professeur à l'université de Tlemcen pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier vivement, Monsieur Y. Harek, Professeur à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté de diriger ce travail. Je lui exprime ma sincère gratitude, pour la patience dont il a fait preuve, pour me guider à accomplir cette recherche. Ces conseils et sa rigueur, m'ont poussé sur la voie d'un sens accru de la précision.

Je tiens à remercier Monsieur S. Ghalem, Professeur à l'université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également Monsieur K. Belhamel, Professeur à l'université de Bejaïa d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie encore Monsieur M. Bouraada, Maître de conférence à l'université de Mostaganem, de nous honorer de faire partie du jury.

Mes vives remerciements à Monsieur Z. Arrar Maître de conférence à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie de notre jury.

Je ne saurais oublier Madame H. Merzouk, professeur à l'université de Tlemcen de m'avoir laissé travailler dans son laboratoire de *Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition* et de m'avoir aidé.

Toute ma gratitude va à Monsieur M. Elhabiri, professeur à l'université de Starsbourg, pour toute son aide qu'il nous a apportée, et de m'avoir permis d'effectuer un stage au sein du laboratoire de Chimie Bioorganique et Médicinale.

Remerciement

Je remercie particulièrement T. Attar et A. Fellah et pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté durant mon travail de thèse et un grand merci à A. Medjdoub qui m'a aidé à faire les tests biologiques.

Que toutes les personnes du laboratoire de Chimie Analytique et Électrochimie, trouvent mes sincères remerciements.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : <i>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	6
I. LES HYDRAZONES.....	7
I.1. Synthèse des hydrazones	7
I.2. Utilisation en chimie organique.....	9
I.2.1. Comportement électrophile	10
I.2.2. Comportement nucléophile.....	13
I.3. Les hydrazones en tant que ligands	14
I.4. La stabilité des hydrazones :	16
II. THIADIAZOLES	17
II.2. Méthodes de synthèse :	18
II.2.1. Réaction de Chabrier et Coll :	18
II.2.2. A partir du thionicotinamide et chlorure de N-benzylidene-benzohydrazonoyl....	18
II.2.3. Par réaction d'un aldéhyde aromatique et l'hydrazine.....	18
II.2.4. Par réaction des tétrazoles	19
II.2.5. Par réaction des thiosemicarbazides avec les aldéhydes.....	20
III. PROPRIETES REDOX DES LIGANDS CONTENANT LES ATOMES O, N – DONNEURS ET LEURS COMPLEXES METALLIQUES	21
IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES LIGANDS CONTENANT LES ATOMES O, N – DONNEURS ET LEURS COMPLEXES METALLIQUES	26
CHAPITRE II : <i>ETUDE EXPERIMENTALE ET METHODES D'ETUDES</i>	30
I. TECHNIQUES EXPERIMENTALES D'ANALYSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES	31
I.1. Techniques de caractérisation des ligands.....	31
I.2. Méthodes générales de synthèse des ligands et des complexes.....	31
I.2.1. Synthèse des ligands	31

Table des matières

I.2.2. Synthèse des complexes	33
I.3. Méthodes d'analyses des ligands et des complexes	34
I.3.1. Spectroscopie d'adsorption moléculaire dans l'Ultraviolet et le Visible	34
I.3.2. Analyse conductimétrique	35
1.4. Techniques voltampérométrie utilisées.....	36
II. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES LIGANDS ET DE LEURS COMPLEXES	43
II.1. Prélèvements sanguins	43
II.2. Isolement des lymphocytes :	43
II.3. Préparation d'hydrazone et 1,3,4-thiadiazoles et leurs complexes de Cu et Ni:	44
II.4. Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	46
II.4.1. Comptage des lymphocytes.....	46
II.4.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT	46
II.5. Dosage des Interleukines.....	47
II.5.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2).....	47
II.5.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4).....	48
II.5.3. Dosage de l'interféron γ (INF γ)	48
II.6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes	48
II.6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes en présence des différents composés.....	48
II.6.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) des lymphocytes en présence des différents composés	48
II.6.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes en présence des différents composés	49
II.6.4. Teneurs en hydroperoxydes des lymphocytes en présence des différents composés	49
II.6.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes en présence des différents composés (Méthode de Levine et al., 1990)	49

Table des matières

II.7. Etude statistique	49
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	50
I. CARACTERISATION ET COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DU LIGAND 1-(4-DIMETHYLAMINO BENZYLIDENE)-2-(2-HYDROXY- BENZYLIDENE) HYDRAZINE (L ₁) ET SON COMPLEXE DE CUIVRE(II).....	51
I.1. Propriétés physiques et analytiques	51
I.2. Caractérisation par méthodes spectroscopiques	52
I.2.1. Spectrométrie infrarouge	52
I.2. 2. Spectrophotométrie UV-Visible :	53
I.2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (proton ¹ H)	54
I.2. 4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (carbone ¹³ C)	56
I.3. Comportement électrochimique	58
I.3.1. Le voltampérogramme cyclique du ligand (L ₁) dans le DMSO	58
I.3.2. Voltampérogramme cyclique du complexe [Cu(L ₁)] dans le DMSO	59
II. CARACTERISATIONS ET COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DU LIGAND 2,5-BIS (2-PYRIDYL)-1,3,4-THIADIAZOLE (L ₂)	64
ET SES COMPLEXES DE NICKEL(II) ET CUIVRE(II)	64
II.1. Propriétés physiques et analytiques.....	64
II.2. Caractérisation par méthodes spectroscopiques	65
II.2.1. Spectrophotométrie UV-Visible.....	65
II.2.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	67
II.3. Comportement électrochimique	67
II.3.1. Le voltampérogramme cyclique de 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L ₂) dans le DMSO	68
II.3.2. Le voltampérogramme cyclique du complexe de [Ni(L ₂)] dérivé de thiadiazole dans le DMSO	68
II.3. 3. Le voltampérogramme cyclique du complexe de [Cu(L ₂)] dérivé de thiadiazole dans le DMSO.....	72

Table des matières

III. VALORISATION BIOLOGIQUE : ETUDE IN VITRO	78
III.1. Effets biologiques in vitro 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine (L1) et son complexe [Cu(L1)]	78
III.1.1. Prolifération des lymphocytes en présence de (L ₁) et son complexe [Cu(L ₁)].....	78
III.1.2. Effets de L1 et son complexe [Cu(L1)] sur la sécrétion des cytokines.....	78
III.1.3. Effets de L ₁ et son complexe [Cu(L ₁)] sur les teneurs en glutathion réduit (GSH), en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes.....	79
III.1.4. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence L ₁ et son complexe [Cu(L ₁)]	79
III.2. Effets biologiques in vitro du 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4- thiadiazole (L ₂) et ses complexes [Cu(L ₂)] et [Ni(L ₂)].....	85
III.2.1. Prolifération des lymphocytes en présence du L ₂ et ses complexes [Cu(L ₂)] et [Ni(L ₂)]	85
III.2.2. Effets de L ₂ et ses complexes [Cu(L ₂)] et [Ni(L ₂)] sur la sécrétion des cytokines	86
III.2.3. Effets de L ₂ et ses complexes [Cu(L ₂)] et [Ni(L ₂)] sur les marqueurs du stress oxydatif des lymphocytes	86
III.2.3.1. Teneurs lymphocytaires en glutathion (GSH), en hydroperoxydes et en protéines carbonylées.....	86
III.2.4. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence de L2 et ses complexes [Cu(L2)] et [Ni(L2)].....	86
III.3 Discussion globale des résultats obtenus.....	92
CONCLUSION GENERALE	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101

LISTE DES ABREVIATIONS

L₁ : 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine

L₂ : 2,5-Bis (2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole

SAMP: (S)-1-amino-2-méthoxyméthylpyrrolidine.

RAMP : (R)-1-amino-2-méthoxyméthylpyrrolidine

IR : Infra-rouge

UV-Visible : ultra violet- visible

RMN : Résonance magnétique nucléaire

CV : Voltampérogramme (voltampérométrie) cyclique

TBAP : Perchlorate de tétra butyle ammonium

HMDE: hanging mercury drop electrode

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

CAT: Catalase.

ConA: Concanavaline A.

DNPH: Dinitrophénylhydrazine.

EDTA: Acide éthylènediaminetetraacétique.

GSH: Glutathion réduit.

HYDR : Hydroperoxydes.

IL-2: Interleukine 2.

IL-4 : Interleukine 4.

INF γ : l'Interféron-gamma.

MDA: Malondialdéhyde.

Liste des abréviations

MTT: 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

PCAR: Protéines carbonylées.

SOD: Superoxide dismutase.

IS: Indice de stimulation.

Th1/Th2: T helper cells1/ T helper cells 2.

TTL : Test de transformation lymphoblastique.

AVANT-PROPOS

Le travail expérimental de cette thèse de doctorat est réalisé au niveau de :

- Laboratoire de Chimie Analytique et d'Electrochimie, université de Tlemcen, Algerie ;
- Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition, université de Tlemcen, Algerie.
- Laboratoire de Chimie Bioorganique et Médicinale, université de Strasbourg, France.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications internationales:

Y. Baba Hamed, T. Attar, Y. Harek, H. Merzouk, L. Larabi, Electrochemical and Biological Studies of Complex of Nickel (II) with a 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (2014). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 4(3) : 1952-1959.

Y. Baba Hamed, H. Merzouk, Y. Harek, A. Medjdoub, S. Cherrak, L. Larabi, M. Narce. In vitro effects of nickel (II) and copper (II) complexes with 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on T lymphocyte proliferation and intracellular redox status (2014). Medicinal Chemistry Research.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La chimie et la biologie font aujourd'hui partie de notre environnement quotidien, ces deux disciplines étant à la croisée de nombreuses industries et de nombreux secteurs. La chimie organique d'hier s'étend aujourd'hui aux molécules biologiques, aux molécules inorganiques et aux macromolécules. Elle crée des édifices plus ou moins complexes jusqu'à l'élaboration d'une chimie supramoléculaire fondée sur des interactions diverses entre molécules et explique leurs propriétés.

Les complexes des métaux de transition ont été largement étudiés. Les chimistes ont commencé à se rendre compte que beaucoup de molécules biochimiques sont des composés de coordination impliquant un ou plusieurs ions métalliques coordonnés à des groupements organiques parfois volumineux et complexes.

La chimie des composés azotés est la source privilégiée de nombreux sujets d'étude au laboratoire. L'atome d'azote est présent dans de nombreuses molécules naturelles ou d'intérêt pharmacologique et de très nombreuses méthodes ont été mises au point pour accéder aux composés azotés, notamment hétérocycliques. Quelques-unes d'entre elles ont été explorées au laboratoire, à travers la chimie des hydrazones et celle des thiadiazoles.

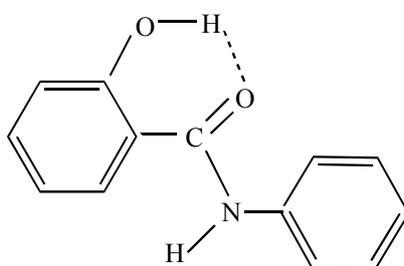
Les hydrazones et les thiadiazoles constituent une classe importante de composés qui a reçu beaucoup d'intérêts ces dernières années, à cause de leurs activités biologiques diverses [4–8]. La littérature compte plusieurs études sur les chélates métalliques, aussi bien des hydrazides que de leurs hydrazones [1-12]. Ces derniers se comportent alors, comme des ligands, c'est pour cela que les ions métalliques comme le cuivre et le nickel sont parmi les éléments essentiels présents dans beaucoup d'espèces, en l'occurrence les hydrazones et les thiadiazoles. Le cuivre(II) et le nickel(II) sont capables de réagir avec des ligands mono-, bi- et polydentés pour former des composés complexes avec diverses applications (environnementale, biologique et médicale).

Les propriétés biologiques des hydrazones et des thiadiazoles sont souvent liées à la coordination aux ions métalliques. Par exemple, la lipophilie qui commande le taux d'entrée dans la cellule, est modifiée par la coordination [13]. En outre, leurs complexes métalliques peuvent présenter une activité plus grande comparée à celle du ligand libre et quelques effets secondaires peuvent diminuer lors de la complexation. En effet, le complexe peut montrer des activités biologiques non observées avec le ligand libre. Le mécanisme d'action peut être expliqué soit par la formation d'une liaison avec un ion métallique *in vivo* ou par le fait que le complexe métallique peut jouer le rôle d'un véhicule pour l'activation du ligand comme agent

Introduction générale

cytotoxique. Par ailleurs, la coordination peut mener à une réduction significative de la résistance aux médicaments [14].

L'importance des liaisons hydrogène dans des processus biologiques et dans l'activité pharmacologique de composés a été maintes fois mise en évidence. Il est bien connu que ce sont les liaisons hydrogènes qui confèrent la structure "double hélice" à la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) [15]. On sait, par ailleurs que les composés possédant un pouvoir anesthésiant sont ceux qui présentent une aptitude à la rupture ou à la perturbation de liaisons hydrogène, puisque le mécanisme de l'anesthésie est lié à des modifications des sites d'association, plutôt qu'à la formation ou à la rupture de liaisons covalentes [16-19]. C'est ainsi, par exemple, que dans le cas de liaisons hydrogène de type N-H...O=C qui sont essentielles dans la structure des protéines, P. Hobza et coll. [19] ont montré que le chloroforme qui favorise la dissociation de ce type de liaisons hydrogène, constitue un excellent anesthésique. Certains auteurs ont tenté de corréler les activités biologiques et pharmaceutiques à des propriétés physicochimiques de certaines structures. Ils ont constaté que les liaisons hydrogène intramoléculaires ou intermoléculaires affectaient de façon remarquable les activités biologiques de ces composés. Dans ce contexte, H. Endo et coll. [20] ont observé que pour des composés tels que les anilides salicyliques de structure:



La liaison hydrogène H...O=C est responsable de l'augmentation de l'activité antibactérienne. Les exemples que nous venons de présenter, montrent bien que les liaisons hydrogène suscitent toujours un important intérêt dans les domaines de recherches chimiques, biologiques et pharmacologiques.

Par ailleurs, il a été reconnu que la nature des fragments coordonnés aux métaux de transition a une influence significative sur les propriétés chimiques, catalytiques et même physiques des complexes formés. Cette influence n'est pas seulement liée au caractère s-donneur d'atomes d'azote, du soufre ou d'oxygène présents dans les différents substituants de ligand, mais dépend aussi et surtout du caractère p-accepteur/donneur du ligand.

Introduction générale

La grande majorité des composés de type hydrazones sont d'excellents p-accepteurs pour les orbitales d des métaux de transition. Ainsi, ces deux caractères p-accepteur/donneur donnent lieu à des transferts de charge très importants entre le métal et le ligand et influencent les propriétés d'oxydoréduction des complexes contenant de tels ligands.

Notons que l'activité physiologique d'une molécule est étroitement liée à son comportement redox dans la membrane de la cellule [21]. En effet la possibilité de la capacité de transmettre des effets électroniques d'une unité redox vers un centre métallique et vice-versa est expliquée par la délocalisation des électrons π le long de la chaîne de la molécule [22].

Récemment la réactivité liée au transfert d'électrons dans les composés de coordination est devenue un large domaine de recherche en raison de la présence des ligands oxydés ou réduits dans des complexes de métaux de transition. Ces derniers ont été fréquemment trouvés comme intermédiaires ou produits des réactions faisant intervenir des transferts d'électrons métal - métal ou métal–ligand [23] et dans les processus catalytiques-rédox [24]. Ils jouent par ailleurs, un rôle central dans les métalloenzymes redox biologiques telles que la plastocyanine, le hemocyanine, l'azurine et d'autres oxydases multimétalliques.

D'autre part, les facteurs régissant la stabilisation et la déstabilisation des états d'oxydation des ions métalliques tels que le Ni(II), le Cu(I) et le Cu(II) dans divers environnements de coordination sont d'un intérêt considérable en chimie inorganique [25] et en biochimie. Par exemple, le nickel dans les états d'oxydation I et III occupe les sites actifs de certains hydrogénases et déshydrogénases [26] et peut jouer ainsi un rôle dans la mutagénicité probable des composés du nickel [27].

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit se focalisent sur la synthèse, la caractérisation et les propriétés électrochimiques de nouvelles molécules d'hydrazones et thiadiazoles et leurs complexes métalliques ainsi que leurs propriétés biologiques.

La première partie de ce manuscrit porte sur une mise au point bibliographique des hydrazones et thiadiazoles : leur utilisation en chimie organique, leur réaction en tant que ligand avec quelques métaux de transitions ainsi que leurs activités biologiques

La deuxième partie est consacrée à la description des techniques et protocoles expérimentaux mis en œuvre pour réaliser ce travail.

Introduction générale

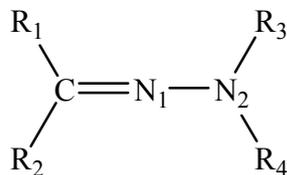
La troisième partie est réservée à l'utilisation des méthodes spectroscopiques (UV, IR, RMN ^1H et ^{13}C). En outre, des informations sur la stéréochimie de leurs complexes avec Ni(II) et Cu(II) ont été obtenues à partir des analyses élémentaires et des mesures de conductivité molaire. Il est noté que peu d'attention est accordée aux comportements électrochimiques des complexes métalliques dérivés d'hydrazones et thiadiazoles. Afin de contribuer dans ce domaine, nous avons étudié les propriétés redox des couples Ni(0)/Ni(II), Cu(II)/Cu(I) et Cu(I)/Cu(0) qui sont affectés par l'environnement donneur de ligand. Notre étude est portée également sur la capacité de ces ligands à stabiliser les états d'oxydation de Ni(II) et Cu(II) dans les complexes formés. Nous avons, aussi, essayé d'éclaircir le mécanisme du processus d'oxydation et de réduction aux moyens de la voltampérométrie cyclique sur électrode à goutte de mercure pendante (Hanging Mercury Drope Electrode, HMDE).

La dernière partie vise la valorisation des hydrazones et des thiadiazoles et leurs complexes de Cu et Ni. Pour cela, les effets biologiques de ces composés sont déterminés in vitro de ces composés. Vu l'importance du système immunitaire dans l'amplitude des effets biologiques de nombreuses substances chimiques, nous avons choisi un modèle in vitro reflétant l'immunité. Il s'agit de culture de lymphocytes, cellules immunitaires isolées à partir d'échantillons sanguins humains. Dans ce cas, les lymphocytes sont mis en culture en présence de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine et 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole à différentes concentrations. La prolifération des lymphocytes et l'état redox sont testés.

CHAPITRE I : *ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

I. LES HYDRAZONES

Les hydrazones représentent une famille de composés organiques comportant une structure de type :

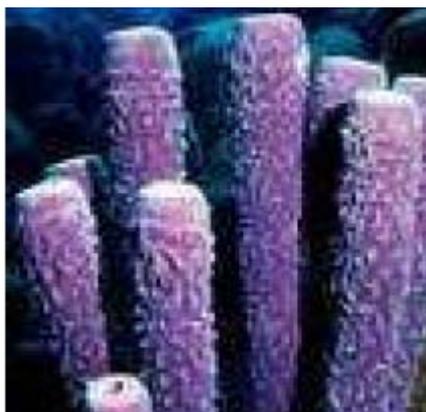


avec R= H, alkyl, aryl, hétéroaromatique

Les hydrazones sont largement présentes dans la nature. Deux exemples sont présentés: La toxine hémolytique, gyromitrine (acétaldéhyde méthylformylhydrazone) est produite par la fausse morille [28]. Des alcaloïdes contenant une fonction hydrazone ont été isolés d'une éponge marine [29] (Figure 1).



Fausse Morille



Eponge marine

Figure 1 - Exemples de sources naturelles d'hydrazones.

I.1. Synthèse des hydrazones

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 1). L'hydrazine peut subir une double condensation du composé carbonyle. De plus, l'utilisation d'hydrazines mono- ou *N,N*-disubstituées permet d'éviter cette double condensation et de synthétiser facilement les hydrazones correspondantes.

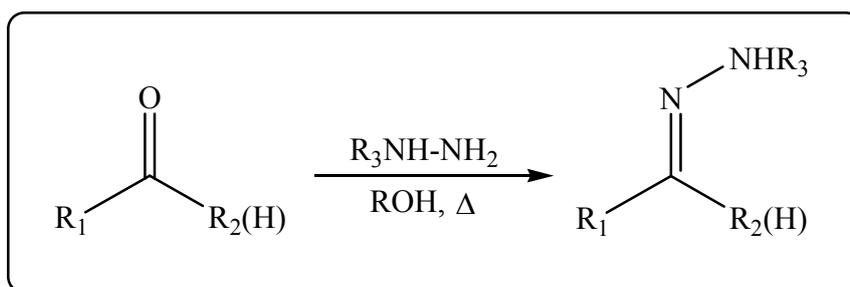


Schéma 1 - Synthèse d'hydrazone.

Des synthèses d'hydrazones peuvent être citées. Ainsi, Calinescu et Coll. ont préparé le benzothiazol-2-yl hydrazones conformément à la méthode de Katz [30], par la réaction de condensation de l'aldéhyde salicylique avec 2-hydrazinobenzothiazole, en quantités équimoléculaires, dans le méthanol, à reflux pendant 3h. Le 2-hydrazinobenzothiazole a été obtenu à partir du 2-mercaptobenzothiazole avec l'hydrazine hydratée dans le méthanol sous micro-onde pendant 1min [31] (Schéma 2).

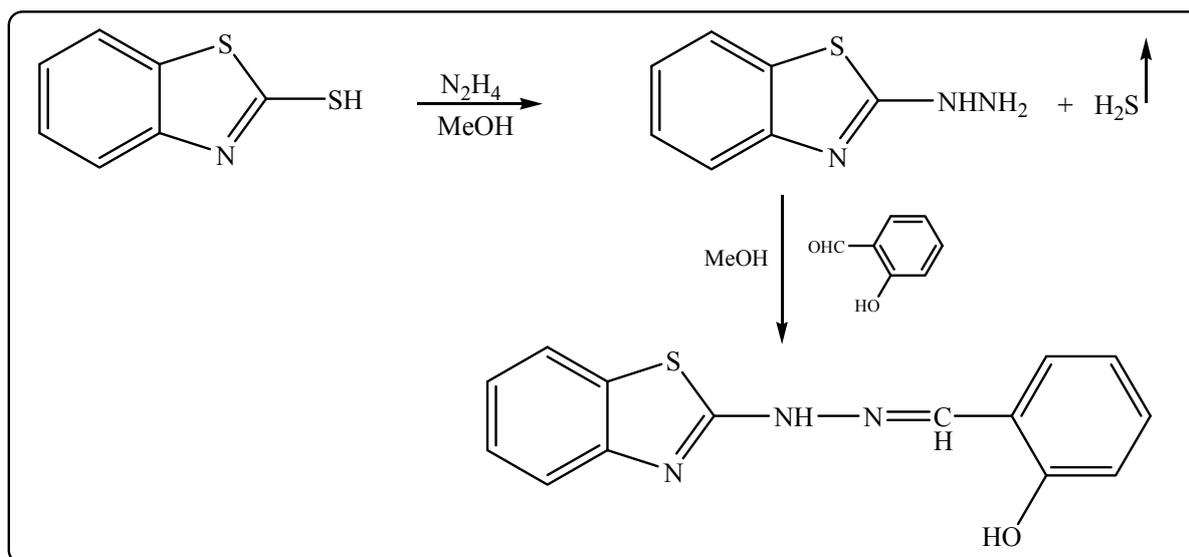


Schéma 2 - Synthèse de benzothiazol-2-yl hydrazones

Plus récemment, Andrade et Coll. [32] 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 3).

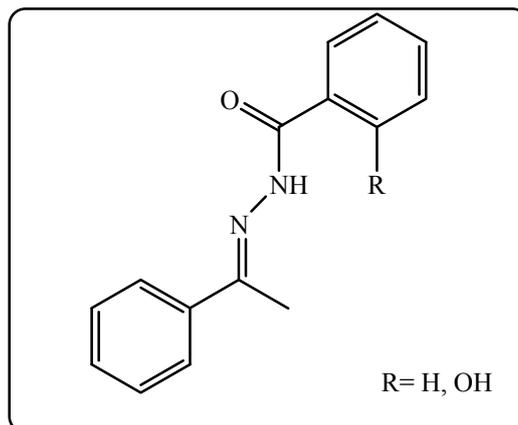


Schéma 3 - *N*-acylhydrazones .

I.2. Utilisation en chimie organique

D'un point de vue structural, les hydrazones peuvent être comparées à deux groupes fonctionnels :

- Des équivalents azotés d'énamines. Tout comme leurs analogues carbonés, elles sont nucléophiles et constituent des équivalents synthétiques d'acyl-anions :

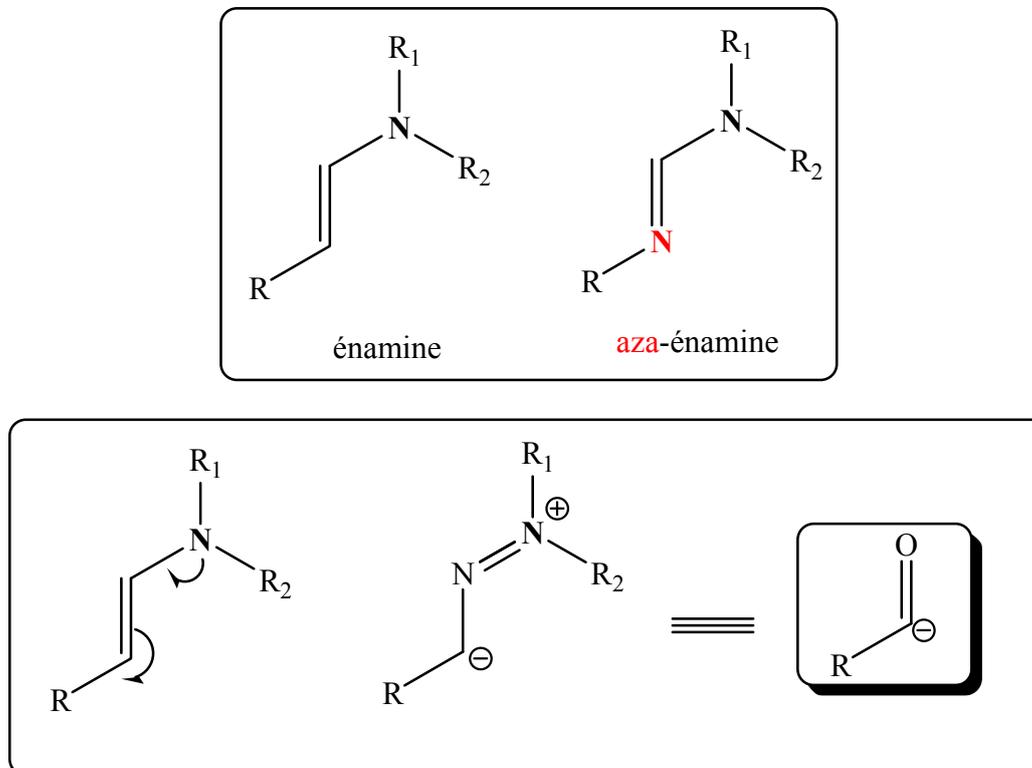


Schéma 4 - *Equivalents azotés d'énamines.*

- Des imines *N*-substituées par une amine :

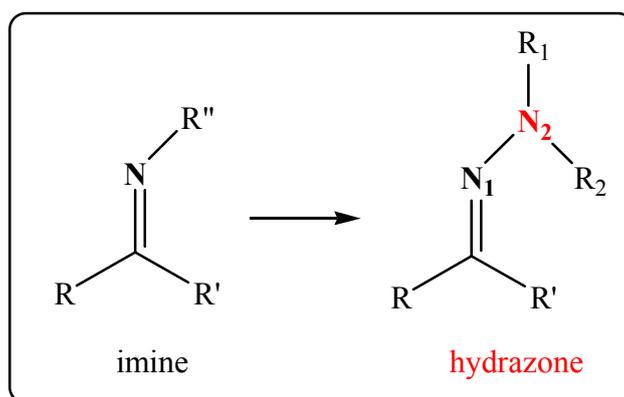


Schéma 5 - Imines *N*-substituées.

Elles possèdent donc à ce titre un caractère électrophile, semblable à celui d'un composé carbonylé.

I.2.1. Comportement électrophile

La réactivité électrophile des hydrazones est la mieux connue et la plus développée. L'une des applications récentes les plus intéressantes met en jeu des *N,N* dialkylhydrazones chirales de type SAMP et RAMP1 – nommées ainsi car elles sont dérivées de la (*S*)-1-amino- 2-méthoxyméthylpyrrolidine ou de son énantiomère (*R*). Ces hydrazones subissent des additions stéréosélectives de divers composés organométalliques [33]. Le clivage réducteur subséquent de la liaison *N-N* des hydrazines obtenues permet d'obtenir des amines fonctionnalisées avec un très bon contrôle de la diastéréo- et de l'énantiosélectivité (Schéma 6).

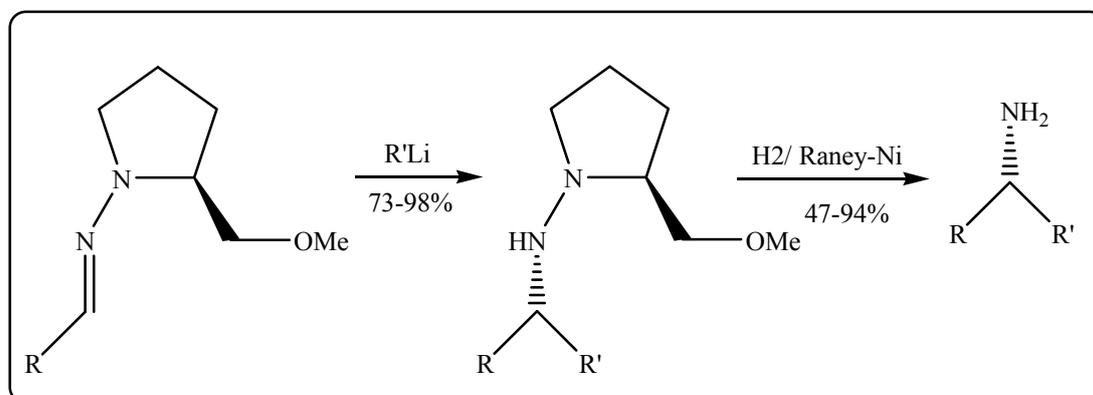


Schéma 6 - Synthèse d'amines chirales

CHAPITRE I : Etude bibliographique

Depuis quelques années, de nombreuses méthodes d'allylation asymétrique des hydrazones ont été développées. Le contrôle de la stéréosélectivité est assuré par l'utilisation, soit d'hydrazones apparentées aux SAMP et RAMP d'Enders [34], soit de ligands chiraux [35] comme les sulfoxydes [36].

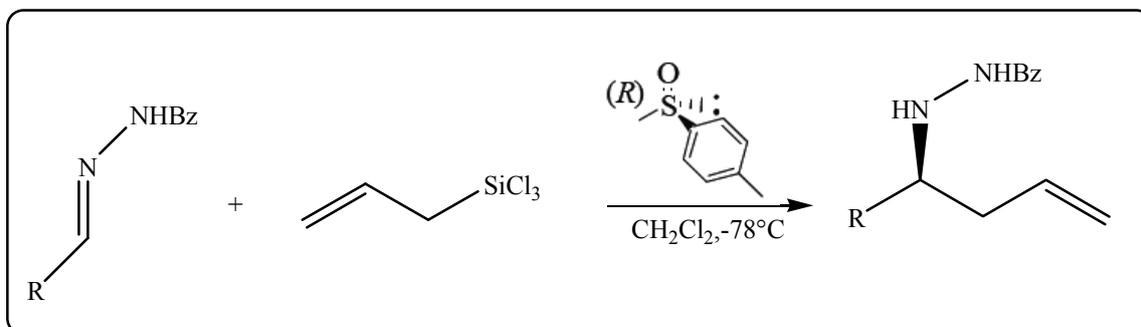


Schéma 7 - Réaction d'allylation asymétrique des hydrazones.

Plus largement, d'autres systèmes organométalliques permettent par exemple le contrôle de l'énantiosélectivité dans l'addition de vinylboronates [37], ou de l'énantiosélectivité de l'hydrocyanation des hydrazones [38].

La synthèse asymétrique des amines a été également abordée à travers des réactions d'additions nucléophiles sur des hydrazones judicieusement choisies. Ainsi, Leighton et Coll. [39] ont rapporté la synthèse et l'utilisation d'une nouvelle classe de N-hétéroaryl hydrazones dans des réactions d'allylation, de crotylation et de cinnamylation asymétrique (Schéma 8). Les réactions ont été effectuées dans CH_2Cl_2 à des différentes températures selon la nature des substituants (R, R' et Ar). Les allyles chlorosilanes constituent dans ce cas l'inducteur de chiralité.

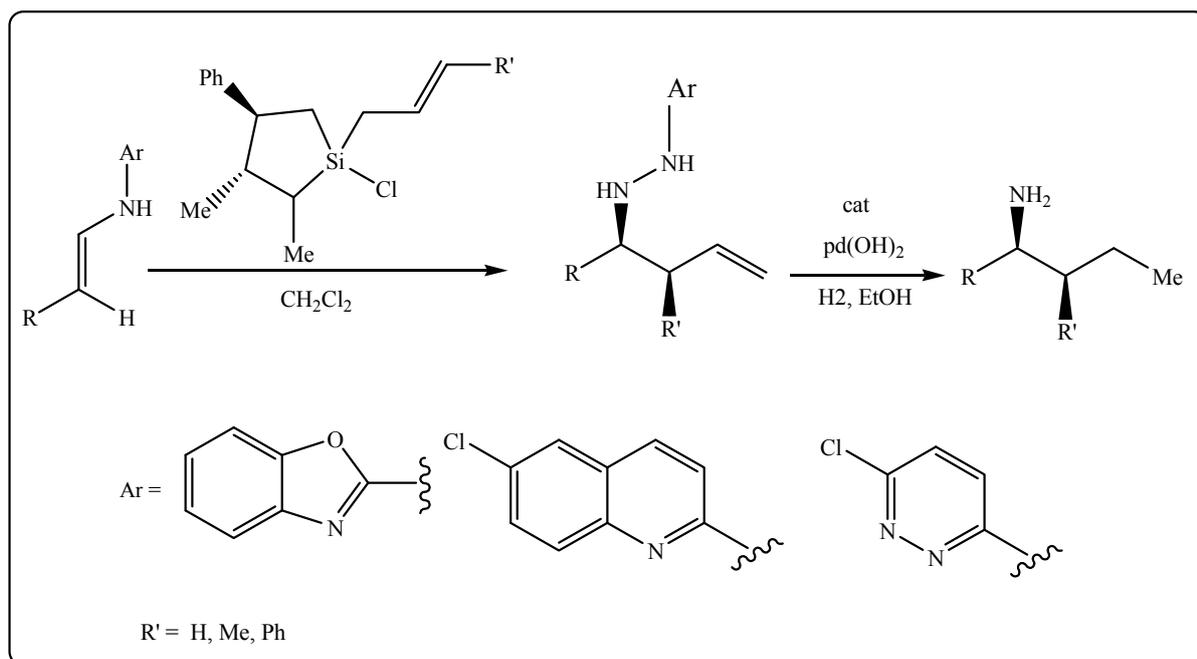


Schéma 8 - Synthèse d'amines asymétriques.

Le système hétéroaryle positionne l'allyle chlorosilane de telle sorte que la réaction devient hautement énantio (ou diastéreo) sélective. Le rendement peut atteindre 95%. Enfin, les hydrazides sont réduites de manière douce (hydrogénation $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{H}_2$) pour conduire aux amines optiquement pures.

Tsogoeva et Coll. [40] ont récemment rapporté l'utilisation de systèmes hydrazones dans des réactions de Strecker, conduisant de manière énantiosélective à des α -hydrazinonitriles.

Ces composés comme les acides correspondants ont été identifiés en tant qu'inhibiteurs potentiels d'enzymes métabolisant des acides aminés, pouvant ainsi avoir des applications en tant qu'agents antibactériens ou anti-HIV. La réaction qui a été mise au point concerne des hydrazones aliphatiques. L'hydrocyanation des hydrazones fait intervenir à -10°C , dans le dichlorométhane, le cyanure de triméthylsilane, et le BINOL-phosphate en tant qu'organocatalyseur. Les dérivés α -hydrazinonitriles sont ainsi obtenus avec de bons rendements (jusqu'à 95%) et excès énantiomériques (jusqu'à 93%). La conversion en α -hydrazinoacides en milieu acide est quantitative (Schéma 9).

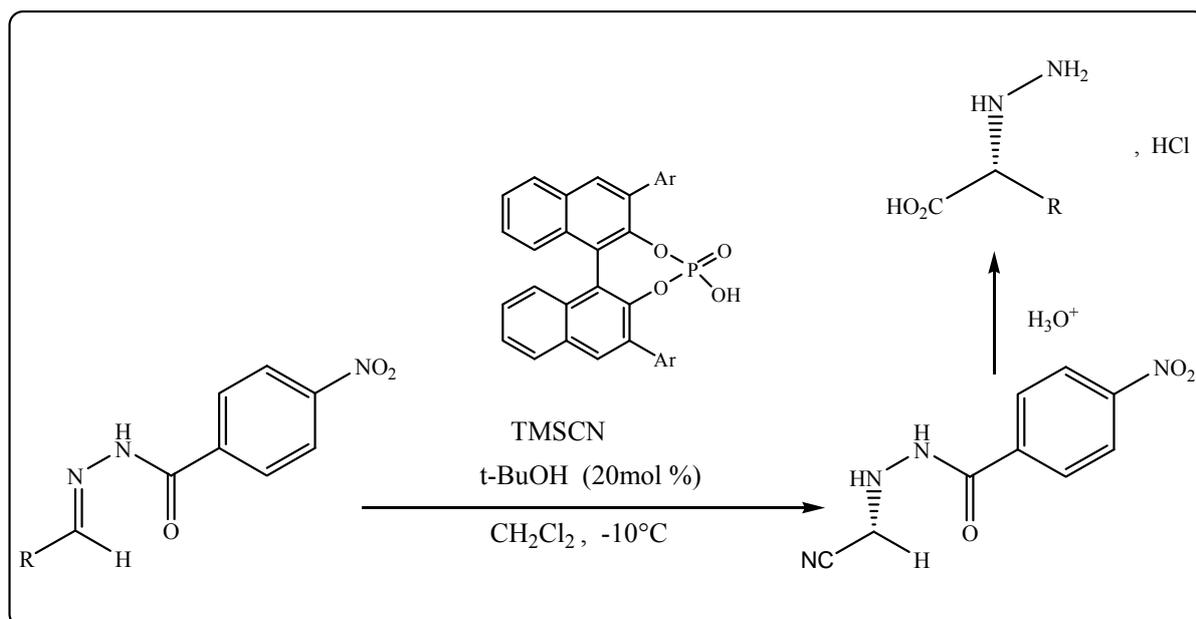


Schéma 9 - Hydrocyanation des hydrazones.

I.2.2. Comportement nucléophile

Les hydrazones *N*-monosubstituées réagissent avec divers électrophiles au niveau de l'atome d'azote terminal, dont le proton peut être facilement déplacé. Il est notamment facile de réaliser la *N*-acylation des hydrazones par l'action d'anhydrides d'acide ou de chlorures d'acyle [41].

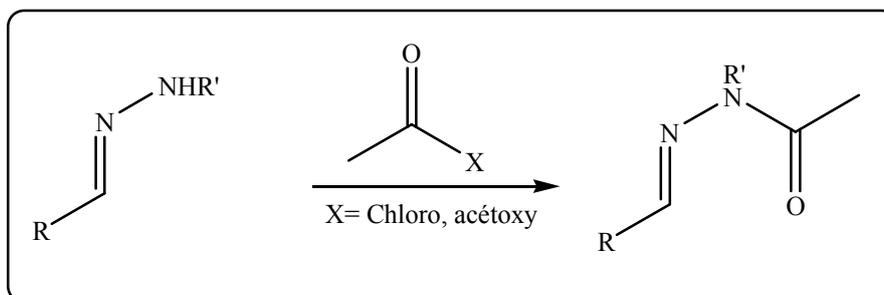


Schéma 10 - *N*-acylation des hydrazones par l'action d'anhydrides d'acide ou de chlorures d'acyle

Il est également possible d'obtenir des 1,1-dianions par double déprotonation d'hydrazones non substituées. Ces dianions peuvent ensuite réagir avec des halogénures d'alkyle pour donner des produits de *N,N*-dialkylation [42].

CHAPITRE I : Etude bibliographique

D'autre part, les protons en α de l'hydrazone, bien que moins acides qu'en α d'un carbonyle, peuvent être arrachés en milieu fortement basique. Langer a récemment exploité cette propriété pour former des oxazolopyridazines [43].

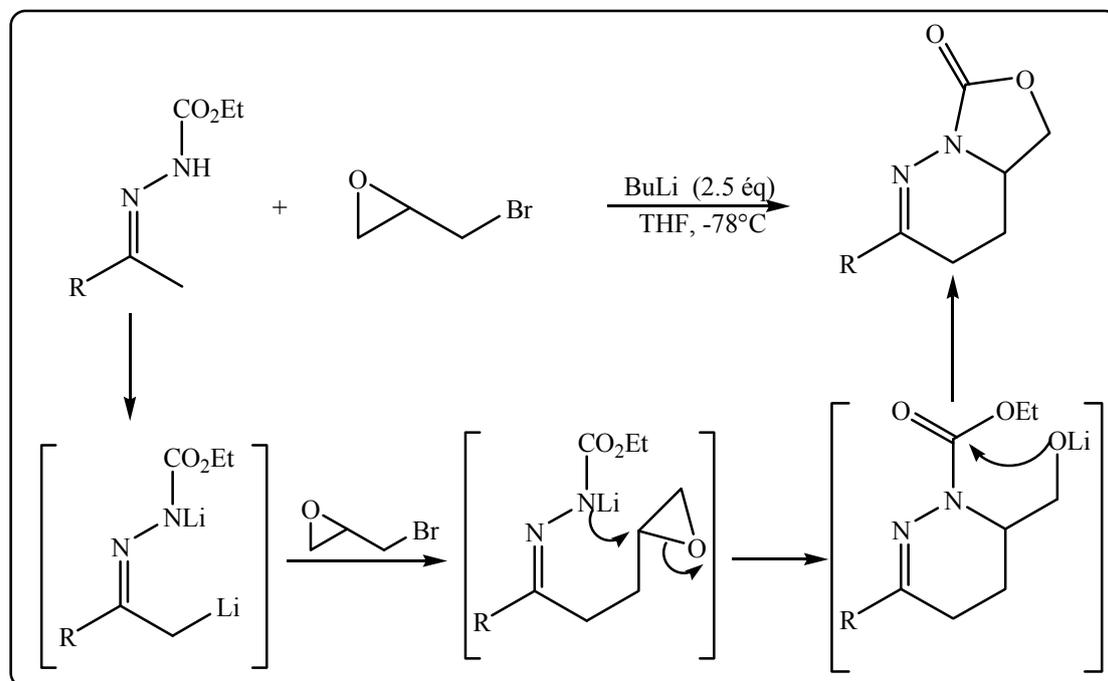


Schéma 11 – formation des oxazolopyridazines

I.3. Les hydrazones en tant que ligands

Les fonctions hydrazones dans des systèmes judicieusement choisis peuvent jouer le rôle de ligands de métaux de transition lors de réactions de couplage classiques. Quelques exemples sont donnés :

Mino et Coll. [44] ont rapporté l'utilisation de systèmes de type *N*-méthyl *N*-phénylhydrazones en tant que ligands dans des réactions de couplage croisés de Suzuki-Miyaura. C'est une réaction de couplage pallado-catalysée entre un halogénure d'aryle et un acide arylboronique.

Parmi les différentes hydrazones testées, le glyoxal bis-méthyl-*N*-phénylhydrazone **I** et la 2-pyridine carboxaldéhyde *N*-méthyl-*N*-phénylhydrazone **III** se sont avérés des ligands de choix pour ce type de couplage (Schéma 12).

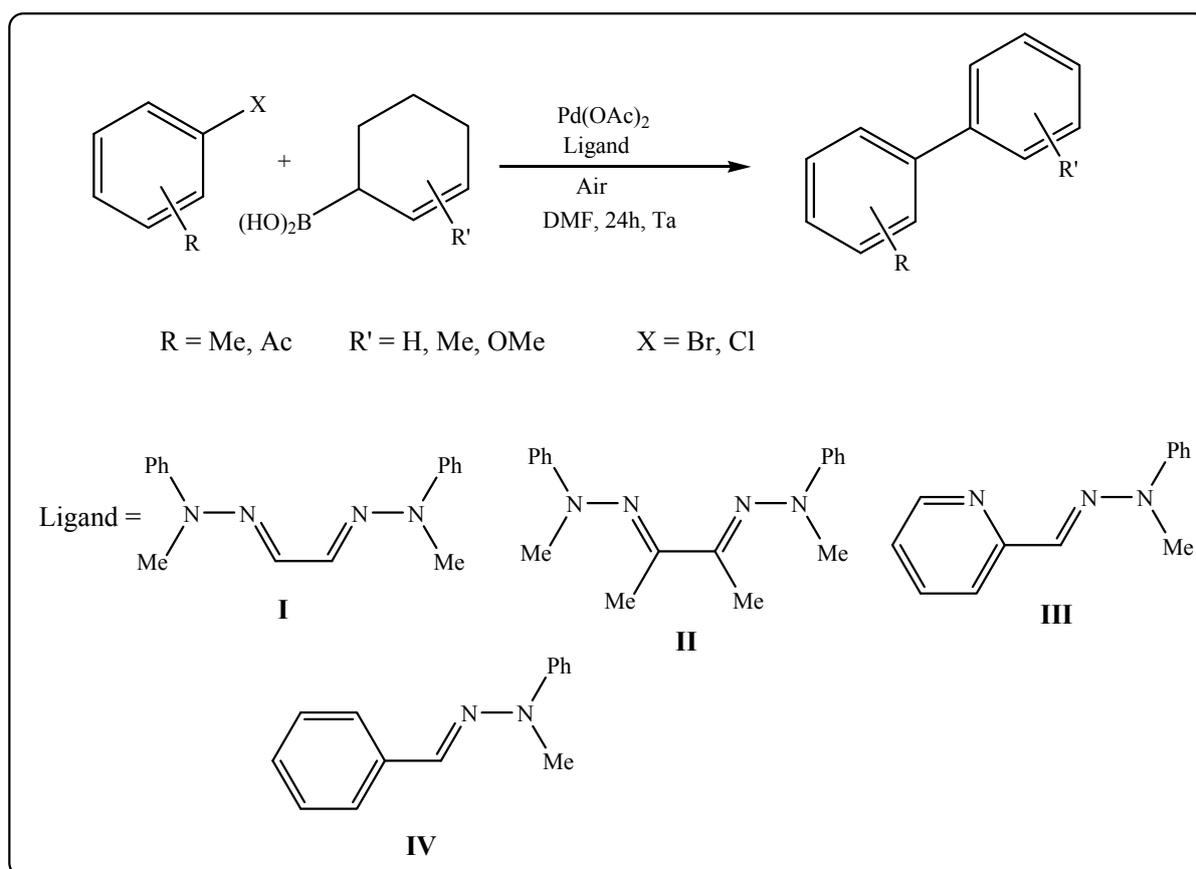


Schéma 12 - Réaction de couplage croisé de Suzuki-Miyaura.
Utilisation d'hydrazones en tant que ligands.

En particulier l'hydrazone **I** a été testée sur un ensemble d'halogénures aromatiques et d'acides arylboroniques diversement substitués pour valider la réaction. Le couplage en présence d'hydrazone **III** se fait avec des rendements quantitatifs et des « turnover » importants. Les réactions peuvent s'effectuer dans des conditions aérobies. Ces hydrazones peuvent ainsi substituer de manière efficace les ligands phosphines classiquement utilisés dans la réaction pallado-catalysée de Suzuki-Miyaura.

Un peu plus tard, le même auteur rapporte l'utilisation des glyoxal et pyridyl hydrazones en tant que ligands dans les réactions de Mizoroki-Heck [45]. Cette réaction palladocatalysée faisant intervenir un ligand phosphine est une réaction de couplage croisé entre un halogénure d'aryle et un alcène terminal. Les auteurs, en recherchant d'autres ligands pour remplacer les phosphines ont montré que cette réaction conduit aux dérivés de couplage de manière efficace en présence de l'hydrazone **V** (Schéma 13).

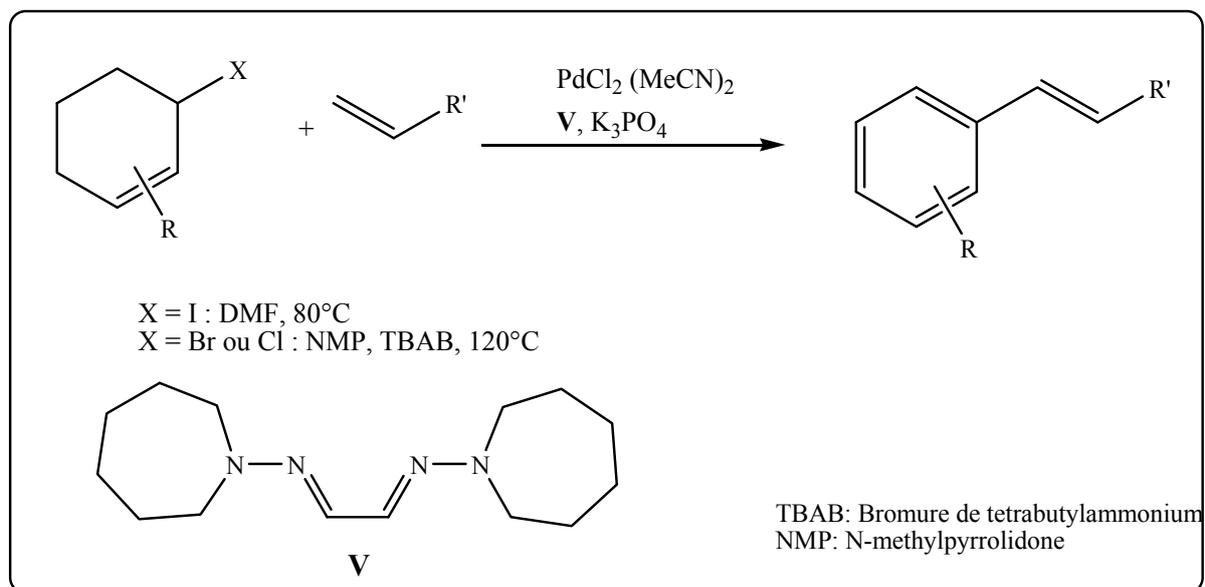


Schéma 13 - Réaction de Mizoroki-Heck.

Ainsi, les halogénures d'aryles sont couplés avec de l'acrylate de *tert*-butyle dans le DMF en présence du complexe $\text{PdCl}_2/(\text{MeCN})_2$, de l'iodure de tétrabutylammonium (activation et stabilisation des complexes $\text{Pd}(0)$), d'une base telle que le phosphate de potassium [46]. Les rendements et le turnover de la réaction sont élevés.

I.4. La stabilité des hydrazones :

Les molécules possédant une double liaison carbone-azote sont d'une importance capitale tant dans un contexte purement chimique que biologique. Les fondations de nos connaissances sur la formation et l'hydrolyse des liaisons $\text{C}=\text{N}$ se trouvent dans les travaux de Bartlett, Westheimer Rutherford entre autres [47]. Les études et les analyses cinétiques approfondies de Jencks [48] ont également impacté la connaissance des mécanismes mis en jeu lors de la formation et de l'hydrolyse de composés possédant des liaisons $\text{C}=\text{N}$.

Les hydrazones, tout comme les oximes possèdent une plus grande stabilité intrinsèque que les imines qui pourrait être expliquée par une participation de X ($=\text{O}$ ou $\text{N}-\text{R}_3$) dans la délocalisation électronique (Schéma 14).

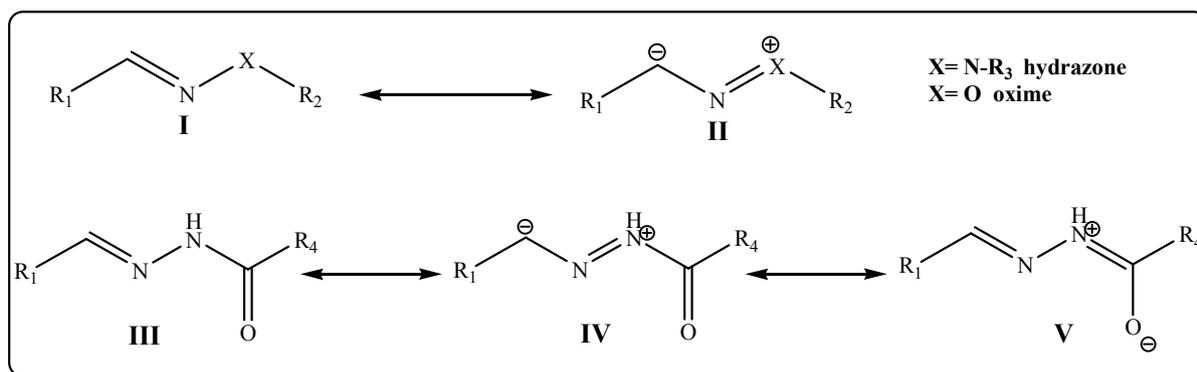
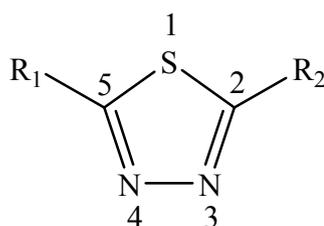


Schéma 14 - Principales formes de résonance.

La contribution de la forme de résonance **II** pour les alkyldiazones et de la forme **IV** pour les acyldiazones augmente la densité de charge négative sur l'atome de carbone, réduisant ainsi son électrophilie et par conséquent sa sensibilité à l'hydrolyse. Les hydrazones sont ainsi plus stables en général que les imines.

II. THIADIAZOLES

Des synthèses organiques par chauffage thermique et sous micro-ondes ont été effectuées pour obtenir des molécules hétérocycliques qui peuvent être employées comme des inhibiteurs de corrosion [49,52] et qui peuvent montrer des propriétés antibactériennes [53,54]. Il existe quatre types de thiadiazoles : 1,2,3-thiadiazoles, 1,2,4-thiadiazoles, les 1,2,5-thiadiazoles, les 1,3,4-thiadiazoles



Afin de faciliter la lecture, il est nécessaire de donner quelques précisions sur la nomenclature des atomes du cycle qui permet de préciser de façon univoque la position des substituants. Les atomes sont numérotés à partir du soufre afin de trouver l'atome d'azote le plus proche.

II.2. Méthodes de synthèse

Les systèmes hétérocycliques contenant le noyau thiazole n'ont cessé d'attirer l'attention des chercheurs [55-59]. Les 1,3,4-thiazoles sont réputés pour leur propriétés antifongique [60], antibactérienne [61] et inhibitrice d'enzymes [62] ou encore inhibitrices de corrosion [49-52]. Il existe de nombreuses méthodes de synthèses pour ces systèmes hétérocycliques.

II.2.1. Réaction de Chabrier et Coll

La réaction se fait en milieu aqueux avec la thionicotinamide ou la thiobenzamide, en présence du dichlorocarbamate comme oxydant. Au cours de la formation du produit il y'a précipitation du soufre qui est éliminé par filtration [63].

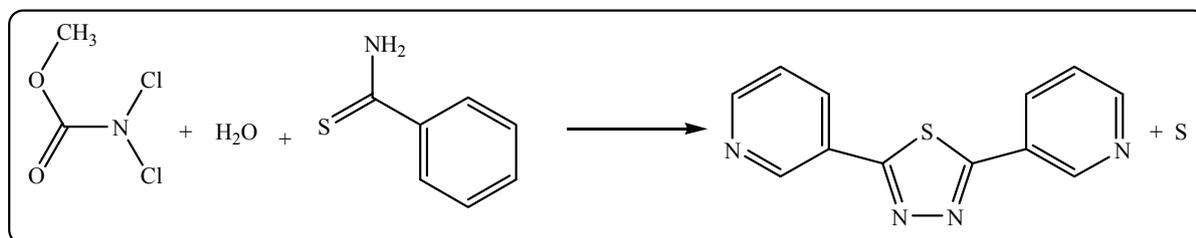


Schéma 15 – Réaction de Chabrier

II.2.2. A partir du thionicotinamide et chlorure de N-benzylidene-benzohydrazonoyl

Des 2,5- diaryl-1,3,4- thiazoles sont synthétisés par réaction de la thionicotinamide avec le chlorure de N-benzylidene-benzohydrazonoyl [64].

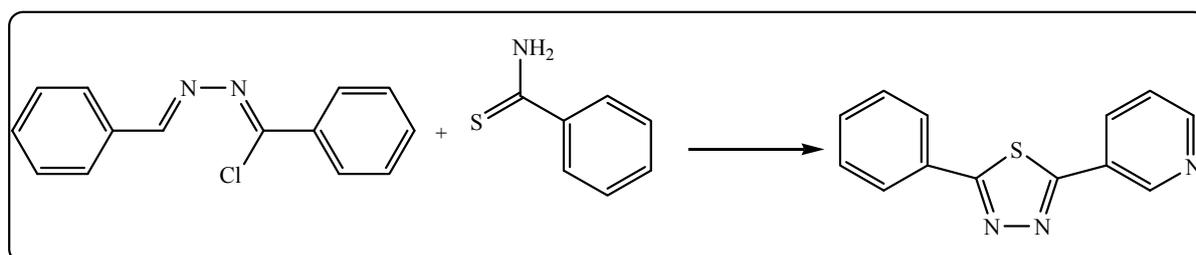


Schéma 16 – Réaction de thionicotinamide et chlorure de N-benzylidene-benzohydrazonoyl

II.2.3. Par réaction d'un aldéhyde aromatique et l'hydrazine

Cette réaction est applicable pour de nombreux substituant aromatique [65].

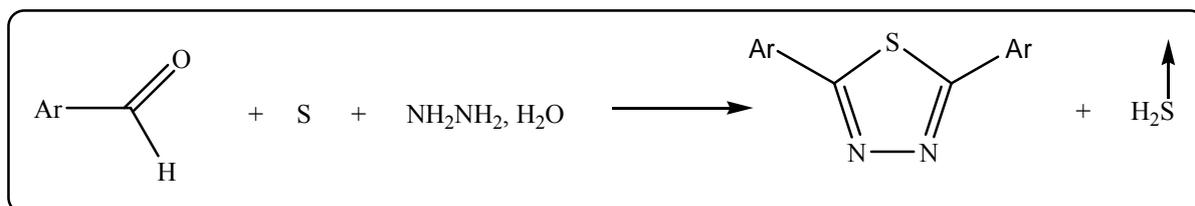


Schéma 17 – Réaction d'un aldéhyde aromatique avec l'hydrazine

II.2.4. Par réaction des tétrazoles

a) Réaction avec l'isothiocyanate de phényl

Le 2-phényl-5-phénylamino-1,3,4-thiadiazole est synthétisé par réaction du 5-phényl-tétrazole avec l'isocyanate de phényl [66].

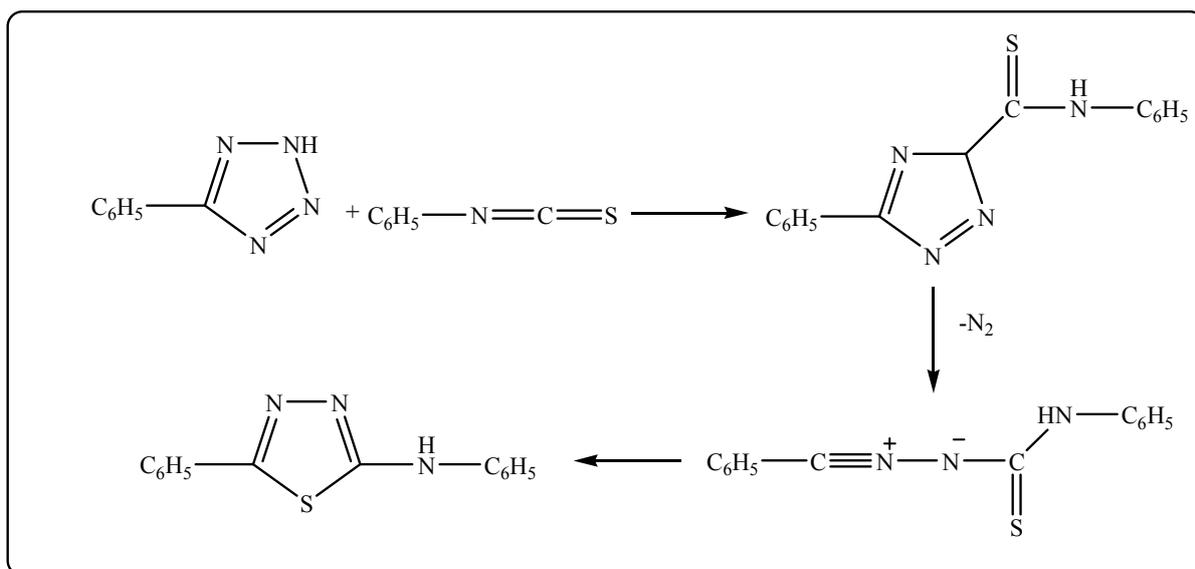


Schéma 18 – Réaction avec l'isocyanate de phényl

b) Réaction avec le chlorure de l'acide thiobenzoïque

Les 2-phényl-5-alkyl-1,3,4-thiadiazoles sont synthétisés par réaction du 2-phényl-5-alkyl-tétrazole avec le chlorure de l'acide thiobenzoïque au reflux de la pyridine.

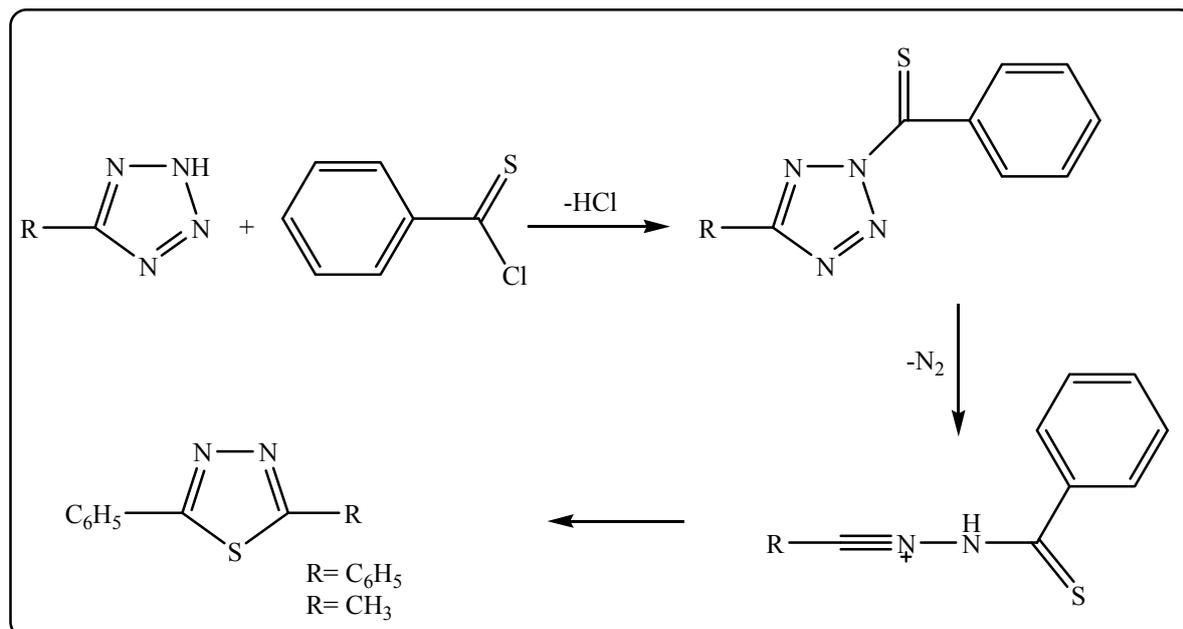


Schéma 19–Réaction avec le chlorure de l'acide thiobenzoïque

II.2.5. Par réaction des thiosemicarbazides avec les aldéhydes

Les 1,3,4-thiadiazoles sont préparés par réaction des thiosemicarbazides substitués 1 avec des aldéhydes pour donner les thiosemicarbazones substitués correspondants 2. La cyclisation du composé 2 peut être réalisée à l'aide de chlorure de fer(II) [67].

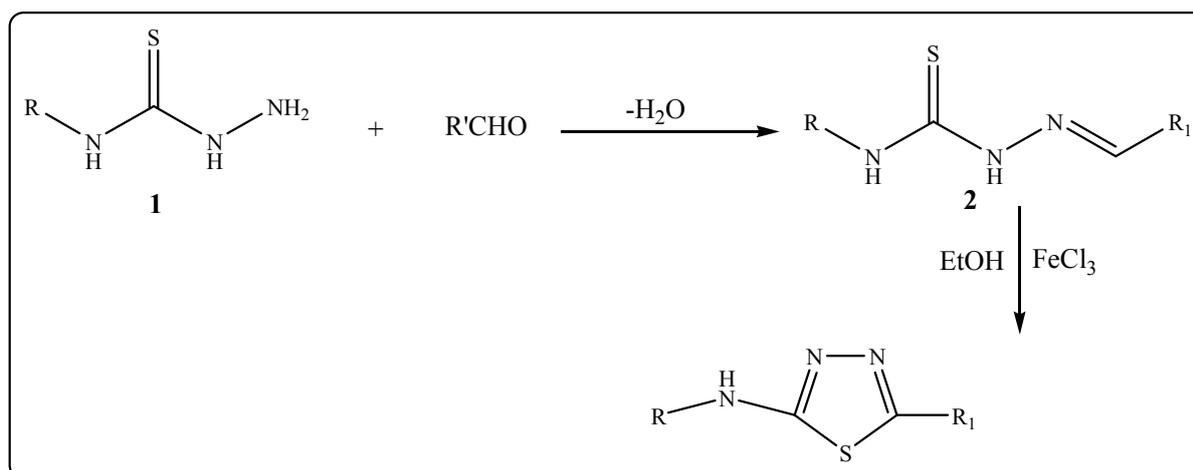


Schéma 20–Réaction avec des thiosemicarbazides avec les aldéhydes

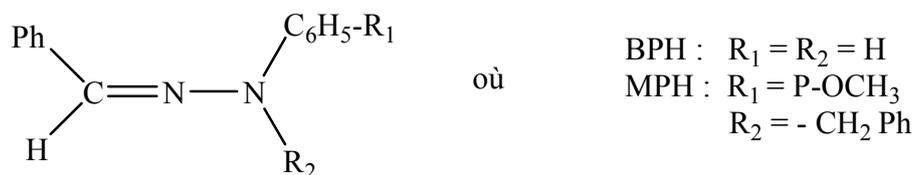
III. PROPRIETES REDOX DES LIGANDS CONTENANT LES ATOMES O, N – DONNEURS ET LEURS COMPLEXES METALLIQUES

Le comportement redox des hydrazones a attiré beaucoup d'attention en raison de leur importance en tant que précurseurs de divers composés antinéoplasiques et antidiabétique [68-70].

Au cours d'une étude sur l'oxydation électrochimique de diphéylhydrazone benzaldéhyde (DBH) en milieu neutre, Barbye et al. [71] ont pu mettre en évidence la dimérisation de ce composé en para du phényle situé sur l'azote.

Dans un autre travail, les mêmes auteurs ont identifié des produits de substitution anodique sur le carbone azométhine, en milieu nucléophile basique [72]. La vague d'oxydation de BDH centrée à un potentiel de demi-vague de 0,67 V vs Ag/AgCl en milieu neutre se trouve déplacée vers les potentiels plus négatifs en milieu basique. Dans le cas de la pyridine (nucléophile basique) le potentiel est enregistré à 0,57 V. La valeur du potentiel d'oxydation ainsi que le type de réaction subies par les espèces radicalaires issues de l'étape électrochimique, témoignent que ces espèces sont plus stable en milieu basique.

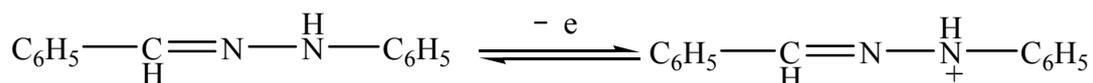
Suite à ces deux travaux, une autre étude a été menée sur l'oxydation électrochimique des hydrazones suivantes [73]:



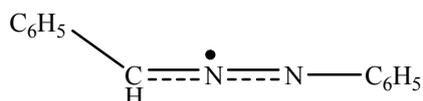
Ces deux composés ont conduit à l'obtention de différents dimères dans le cas de la phénylhydrazone (BPH), des radicaux cations, des cations stables et la formation de composés cyanés à partir de la N-benzyl paraméthoxyphénylhydrazone (MPH).

L'étude effectuée en voltammétrie cyclique (CV) pour le BPH, fait apparaitre un pic d'oxydation irréversible ; aucun pic de réduction au retour n'est obtenu, même à une vitesse de 20 Vs⁻¹. Ceci est du à la formation d'un intermédiaire très instable qui, selon les travaux effectués par Bhatnagar et Coll. [74], peut être envisagé selon la réaction suivante :

CHAPITRE I : Etude bibliographique



Ce radical, très instable en milieu neutre, se trouve probablement déprotonné de manière instantanée en milieu basique. Ce qui conduit à la formation du radical neutre



Ceci est bien compatible avec les résultats de l'électrolyse de BPH, respectivement, en milieu neutre et en milieu basique. On obtient dans le premier cas un seul dimère par couplage des deux azotes amine, et dans le deuxième cas différents dimères seront obtenus, suite à deux sortes de couplages : C-C et C-N.

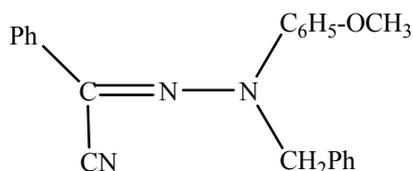
L'étude par voltammétrie cyclique du MPH, présente deux vagues d'oxydation. la première correspond à un phénomène réversible, et le mécanisme suivant est proposé :



La deuxième vague d'oxydation est de type irréversible. Le mécanisme proposé est le suivant



MPH^{2+} , très instable, se déprotonne très rapidement pour conduire au mono cation MP^+ . Ce dernier est caractérisé par électrolyse du MPH en présence de cyanure de tétraéthylammonium, qui doit jouer un rôle de nucléophile, pour isoler le dérivé cyané suivant :

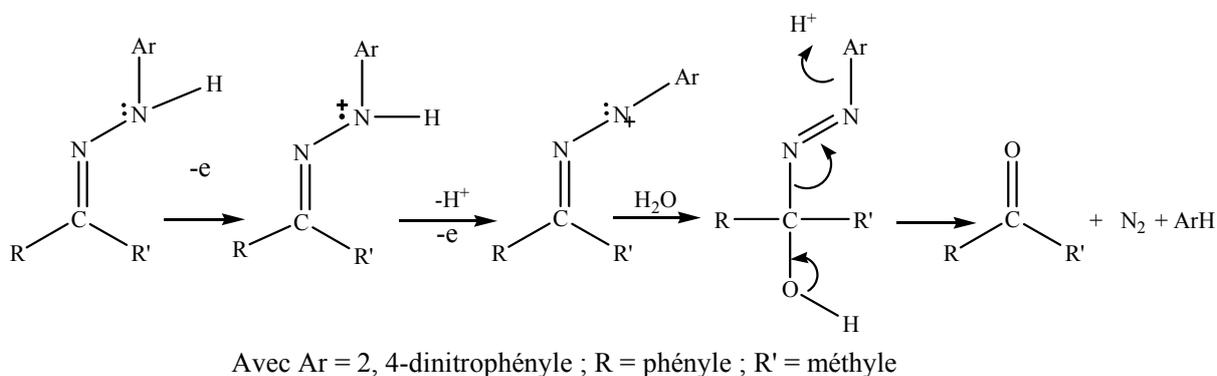


C'est le même résultat que celui du diphenylhydrazone en milieu nucléophile basique, ceci traduit une meilleure stabilité du produit généré suite à l'oxydation électrochimique de l'hydrazone d'aldéhyde avec un azote - amine disubstituée.

CHAPITRE I : Etude bibliographique

En-Chu Lin et coll. [75] ont utilisé la voltammétrie cyclique pour déterminer les potentiels d'oxydation du 2, 4-dinitrophénylhydrazone acétophénone substituée et leur dépendance structurelle. Tous ces produits montrent une vague d'oxydation irréversible, avec aucune vague de réduction au balayage inverse même à une vitesse de 500 Vs-1. Les résultats de cette étude indiquent une parfaite corrélation entre l'effet électronique attracteur (σ^+), engendré par chaque substituant sur l'acétophénone et les potentiels d'oxydation. Dans ce cas, plus l'effet électronique attracteur du substituant sur l'acétophénone est important, plus la valeur de σ^+ est grande et plus l'oxydation est difficile [76].

Suite à l'obtention de la cétone de départ, de l'azote gazeux et du produit aromatique par électrolyse, le mécanisme suivant est proposé :



Ce résultat de décomposition de l'hydrazone oxydée sur l'anode, montre la grande instabilité du produit obtenu, qui peut être expliqué par la présence d'un seul substituant (attracteur) sur l'azote et deux substituant sur le carbone.

R. Chmekh et Coll. [77] rapportent l'oxydation de N-thioamidohydrazone (NTAH) sur électrode de platine dans l'acétonitrile contenant le perchlorate de lithium comme électrolyte support. Les courbes enregistrées par voltampérométrie cyclique montrent un pic d'oxydation irréversible pour tous les composés, même à des vitesses de balayage allant jusqu'à 8000 Vs-1.

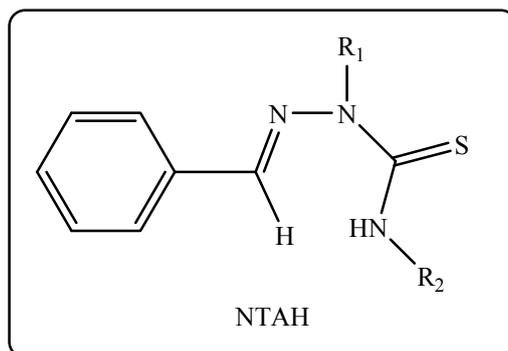


Schéma 21- *N*-thioamidohydrazone (NTAH)

Pour les hydrazones *N*-monosubstituées ($R_1 = H$), le site d'oxydation est localisé sur l'azote amine de l'hydrazone, avec un pic situé au alentour de 1,2 V, sans influence notable des substituant (R_2) sur l'azote thioamide. Lorsque l'hydrazone est *N*-disubstituée ($R_1 =$ Méthyle), le site d'oxydation est localisé sur l'azote amine thioamide, avec un pic situé à 1,9 V. Il est clair que l'ionisation de l'azote amine de l'hydrazone, lorsqu'il est disubstitué, est plus difficile. Ceci est soutenu par l'obtention des triazoles thione suite à une cyclisation intramoléculaire liant l'azote thioamide au carbone azométhine.

D'autres études plus approfondies ont utilisés des ligands et leurs complexes métalliques par voltammétrie cyclique dont quelques exemples sont donnés :

Deunf et Coll. [78] ont fait l'étude par voltammétrie cyclique d'une solution constituée à partir de la dissolution du bromure de cobalt en milieu DMF en présence d'un équivalent de 6-(Imino-2-pyridine)- β -cyclodextrine. Ils ont remarqué une nouvelle vague, d'allure réversible qui apparaît à -1,05 V. Ce comportement révèle une stabilisation thermodynamique de l'espèce de cobalt(I) électrogénérée, matérialisée par une diminution de l'intensité de la vague (et donc du nombre d'électrons engagés) et une valeur de potentiel de réduction du cobalt(II) plus positive.

D'autre comme Drew et Coll. [79,80] ont rapporté la synthèse d'une nouvelle base de schiff (7-amino-4-méthyl-5-aza-3-hepten-2-one) et l'étude électrochimique de ses complexes de Cu et Ni.

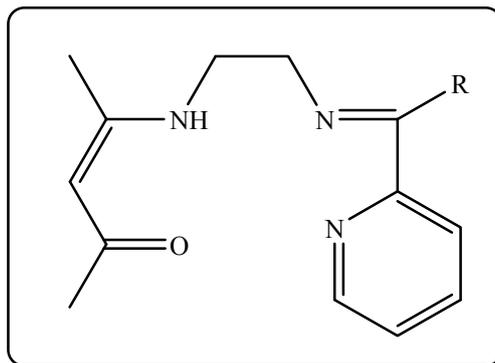


Schéma 22- 7-amino-4-méthyl-5-aza-3-hepten-2-one

Le voltampérogramme cyclique établi dans l'acétonitrile sur électrode de Pt (platine), présente une nouvelle vague d'oxydation de $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ à 1,10 V, et un autre voltampérogramme présente une vague de réduction de $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ à 1,00 V. Tous ces critères sont pour un processus à l'électrode de type irréversible.

Des travaux récentes dans notre laboratoire sur le benzenesulfonylhydrazine et son complexe de Nickel sur électrode de carbone vitreux dans le DMSO contenant le tétrabutylammonium perchlorate comme électrolyte support [81].

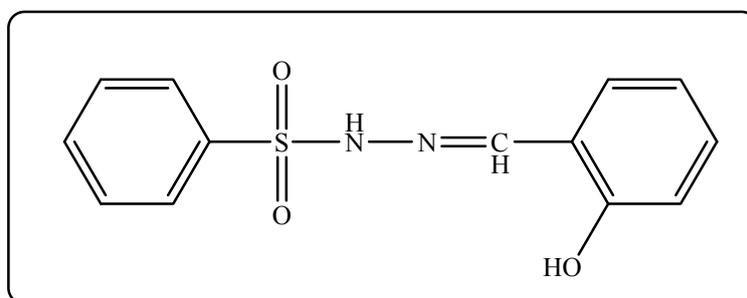


Schéma 23- benzenesulfonylhydrazine

Les courbes enregistrées par voltammétrie cyclique montrent deux pics correspondant aux valeurs de potentiel anodique E_{pa} égales à 0,58 V et 1,22 V. Le processus anodique correspondant au processus redox du ligand, est attribué à une oxydation irréversible du groupement NH. L'autre pic observé, est supposé être le résultat d'une oxydation se passant au niveau de l'ion $\text{Ni}(\text{II})$. Le processus est irréversible.

IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES LIGANDS CONTENANT LES ATOMES O, N – DONNEURS ET LEURS COMPLEXES METALLIQUES

Depuis quelques années, on assiste à travers la littérature scientifique à un intérêt concernant les familles d'hydrazones et thiadiazoles (ligands contenant les atomes O, N – donneurs) qui présentent des activités biologiques spécifiques en général reliées à la présence de ce groupement fonctionnel. Je citerai ici quelques exemples récents concernant diverses pathologies et maladies majeures en relation avec des activités antiparasitaires, anti-inflammatoires et antitumorales sont données.

Concernant l'activité antiparasitaire, Richardson et Coll. [82] ont rapporté en 2004 la synthèse et les activités antiplasmodiales d'une nouvelle famille d'aroylhydrazones. Parmi les composés synthétisés le 2-hydroxy-1-naphthylaldéhyde-4-méthyl-3-thiosemicarbazone **I** (schéma 24) présente la meilleure activité in vitro contre la souche 3D7 sensible à la chloroquine et la souche 7G8 résistante à chloroquine de *Plasmodium falciparum*. L'activité de ce type de composés est reliée à leur capacité à complexer l'ion Fe(II).

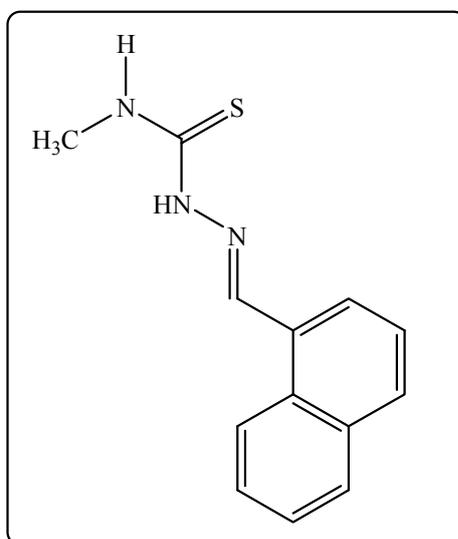


Schéma 24 - 2-hydroxy-1-naphthylaldéhyde-4-méthyl-3-thiosemicarbazone **I**.

Plus récemment, Navarro et Coll. [83] ont rapporté la synthèse, la caractérisation de complexes de platine de stérols hydrazones et leur activité biologique contre *Leishmania mexicana* un autre parasite responsable de la leishmaniose une maladie non contrôlée causant une grande morbidité parmi les populations en Afrique, Asie et Amérique Latine. L'approche développée par les auteurs consistait à examiner l'effet synergique d'une drogue de ce

CHAPITRE I : Etude bibliographique

parasite, type stérol hydrazone qui est un inhibiteur spécifique de stérol méthyltransférase, enzyme essentielle du parasite, et un métal le Pt(II). Les auteurs ont synthétisé deux ligands **II** et **III**, et caractérisés les complexes. Le complexe ligand **II**-Pt(II) présente la meilleure activité qui est bien supérieure à celle du ligand **II** seul.

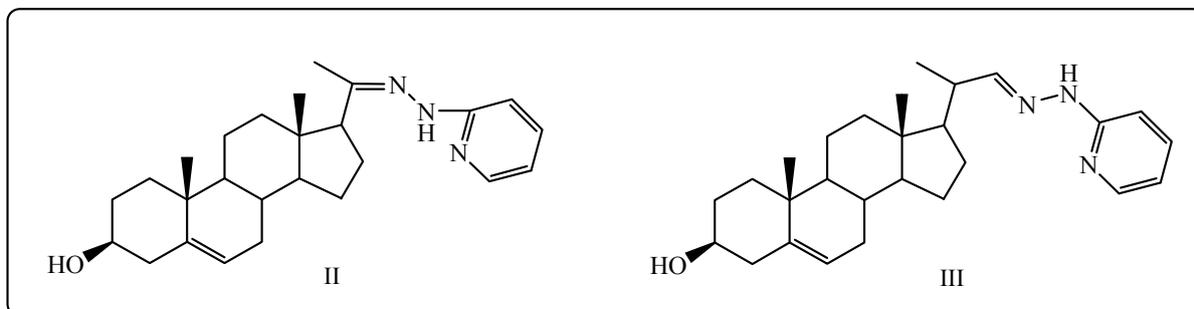


Schéma 25 - Structures des stérolhydrazones **II** et **III**.

D'autre part, de nombreux hétérocycles azotés tels que les thiadiazoles ont trouvé des applications dans les secteurs pharmaceutiques, agricoles et présentent des activités biologiques antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antitumorales et autres [84, 85].

Des tests *"in vivo"* sur les souris, ont montré que les dérivés de 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4(3H)-ones, possèdent un effet hypnotique, et agissent par dépression sur le système nerveux central CNS. En plus, ils possèdent une bonne activité anticonvulsive [86].

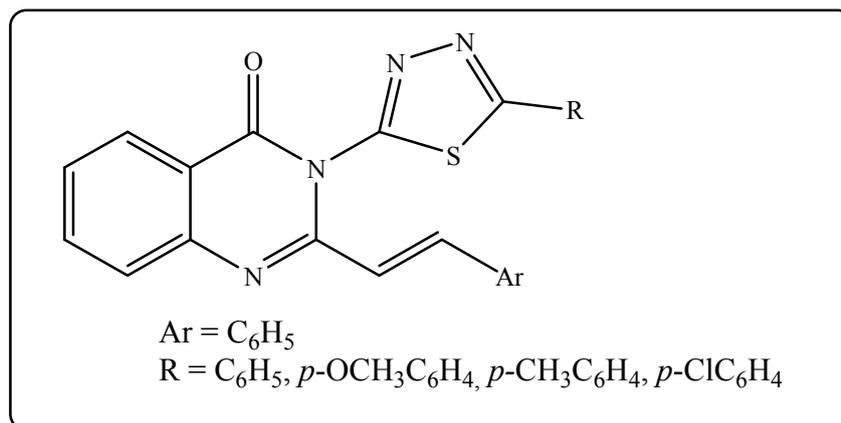


Schéma 26 - 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4(3H)-ones

Un certain nombre de composé comme le 2-amino-5-(2,4-dihydroxyphényl)-1,3,4-thiadiazole a été synthétisés et évalués pour l'activité antiproliférative [87].

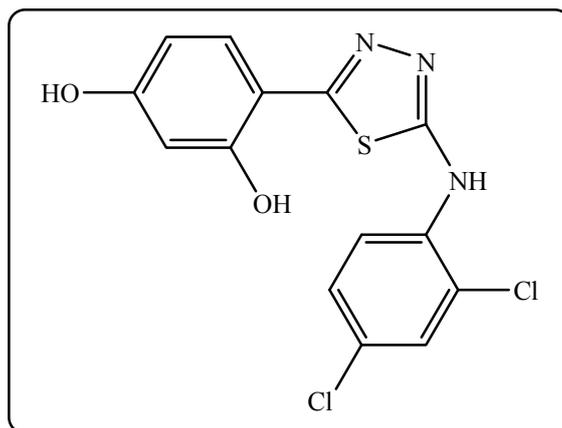


Schéma 27 – 2-amino-5-(2,4- dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole

Plus récemment, Mawar et Coll. [88] ont testés une base de schiff O- {N- α -(3-methoxy) salicyaldimino}-4-phenylthiazole (HSPT) préparée à partir de l'ortho-vanillin et de 2-amino-4-phenylthiazole et ses complexes de Cu et Ni sur des bactéries *E.coli*, *B.subtilis* et *S.aureus*. Ils ont trouvée aucune activité avec le ligand par contre une meilleure activité avec ses complexes de Cu et Ni.

D'un autre coté, une méthode très utile pour tester l'activité biologique d'autres molécules consiste en la détermination des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur la prolifération des lymphocytes mis en culture en présence d'agents mitogènes. Nous avons utilisé cette méthode, avec succès, pour tester l'activité immunomodulatrice des δ -lactones, δ -lactames, énamino- δ -lactones et énamino - δ -lactames [89].

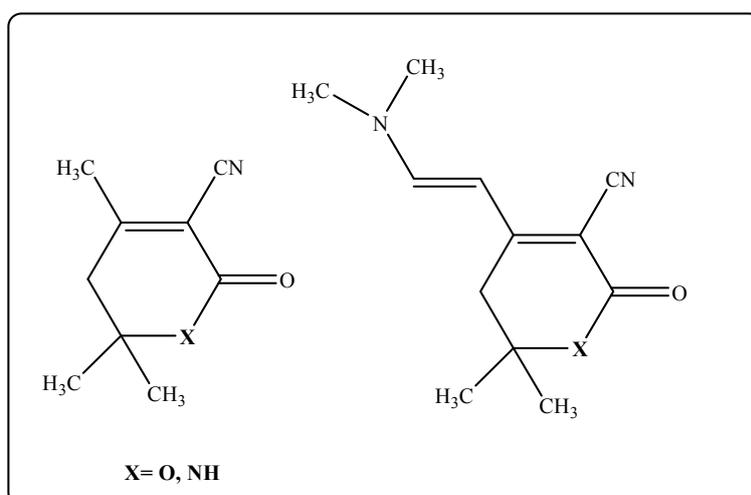


Schéma 28 – δ -lactones, δ -lactames, énamino- δ -lactones et énamino - δ -lactames

CHAPITRE I : Etude bibliographique

D'autre auteur comme Medjdoub et Coll. [90] ont testé cette même méthode sur les pesticides, famille de Mancozèbe et Métribuzine qui présentent un effet immunomodulateur important sur les deux sous-types de lymphocytes Th1 et Th2.

En effet, les lymphocytes sont des cellules sanguines très facile à isoler à partir d'un prélèvement de sang total. Un milieu de culture spécifique, le RPMI, permet de les maintenir en vie, deux à trois jours, en présence d'un agent mitogène spécifique comme la concavaline A, dans un incubateur à CO₂, à 37°C. Dans ces conditions, il est possible de tester l'effet de nombreuses substances chimiques sur la prolifération des lymphocytes et leur activité métabolique.

**CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE ET
METHODES D'ETUDES**

I. TECHNIQUES EXPERIMENTALES D'ANALYSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES

I.1. Techniques de caractérisation des ligands

La préparation des ligands et des complexes se fait par une dissolution des réactifs dans l'éthanol, celui-ci étant absolue à 98%.

L'avancement des réactions de synthèse a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaques de gel de silice 60 F254 (Merck) (40-63 μm) utilisant un mélange dichlorométhane-cyclohexane (80/20) comme éluant. Les révélateurs utilisés sont : UV (250nm), iode.

La purification se fait par chromatographie sur colonne en préparant la colonne par tassement d'une suspension de gel de silice Merck 60 (40-63 μm). On a utilisé comme éluant un mélange acétate d'éthyle -cyclohexane (20 /80).

Les spectres d'absorption dans l'infrarouge (IR) ont été enregistrés au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Spectrum one équipé d'un accessoire ATR. Seules les bandes caractéristiques sont mentionnées- ν_{max} en cm^{-1} .

Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont enregistrés avec un appareil Bruker AC 400 (400 MHz) et Bruker AC 400 (100 MHz). Les produits ont été analysés dans le chloroforme deutéré (CDCl_3). Les déplacements chimiques (δ_{H}) sont donnés en partie par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet, massif. Les données spectrales en RMN ^1H sont présentés dans l'ordre: déplacement chimique, nombre de proton, multiplicité, constantes de couplage, attribution.

Les points de fusion (P.F) ont été mesurés sur un appareil Bank Kofler HEIZBANK type WME 50-260°C et ne sont pas corrigées.

I.2. Méthodes générales de synthèse des ligands et des complexes

I.2.1. Synthèse des ligands

a)- Synthèse de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine

- Synthèse de salicylhydrazone

-Une solution de salicaldéhyde (8,1mmol, 1g) est ajoutée goutte à goutte à l'hydrazine monohydraté 98% (40,3 mmol, 2,06g). Après 1 heure d'agitation le produit obtenu est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique et séché sous vide (Schéma 31).

-Le 4-diméthylaminobenzaldéhyde (6,7mmol, 1g) solubilisé dans l'éthanol absolu (20mL) est ajouté à une solution de salicylhydrazone-éthanol (7,3mmol, 1g). Le mélange est porté au reflux pendant 3h (Schéma 31). [91,92]

Le solide jaune obtenu est purifié par chromatographie sur colonne en utilisant comme éluant un mélange (cyclohexane /acétate d'éthyle:20 /80).

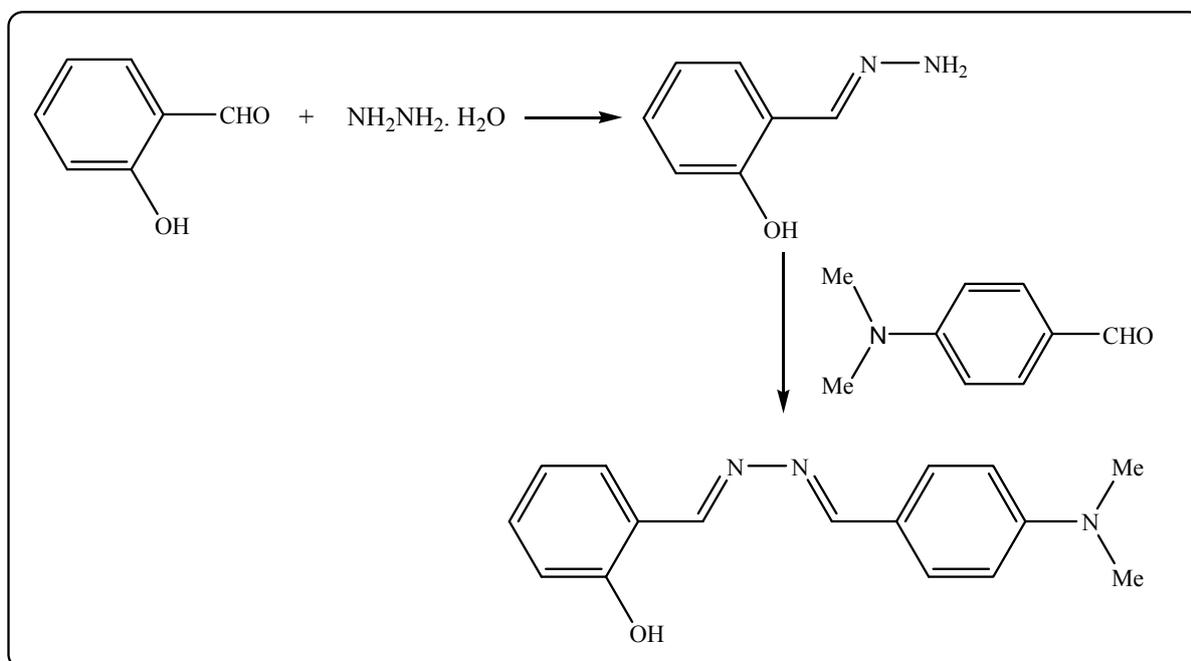


Schéma 31- Synthèse de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène)hydrazine

b. Synthèse de 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole

Un mélange de 2-Pyridine carboxaldéhyde (0,02 mole), de soufre (0,03g-atome) et d'hydrazine (0,08 moles) dans l'éthanol (20mL) est préparé dans un réacteur cylindrique en fluoropolymère placé dans l'appareil (MARS5 XP-1500 PLUS) est irradié pendant 1h (300W) à 150°C sous pression. Le résidu est dissous dans le chloroforme. La solution organique est

CHAPIRE II : Etude expérimentale et méthodes d'études

traitée avec une solution concentrée de sulfure de sodium, séchée (sulfate de magnésium), filtrée puis évaporée. Le résidu résultant est recristallisé dans l'éthanol (Schéma 32). [93]

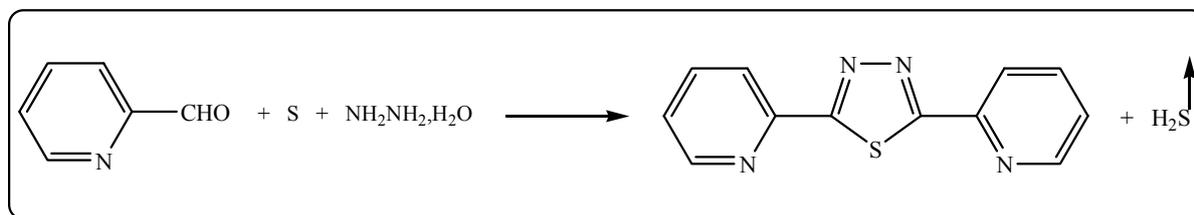


Schéma 32- Synthèse de 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole

I.2.2. Synthèse des complexes

Les sels métalliques utilisés dans ce travail sont :

Acétate de cuivre (II) mono hydraté (Cu(Ac)₂. H₂O),

Perchlorate de nickel (II) hexahydraté (Ni(ClO₄)₂.6H₂O),

Nitrate de cuivre (II) (Cu(NO₃)₂.2.5H₂O).

On obtient les différents complexes métalliques par une méthode générale de leur préparation.

Une solution de sel métallique acétate de cuivre (1 mmol) dans l'éthanol est chauffée puis additionnée à la solution de ligand 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine (1 mmol). Le mélange, dans un ballon de volume adéquat, est porté à reflux pendant trois heures. Le précipité formé est filtré, à chaud, sur verre fritté, lavé plusieurs fois par l'éthanol chaud et séché à l'air libre puis sur gel de silice dans un dessiccateur.

Sauf pour les complexes avec le perchlorate de nickel, le nitrate de cuivre et le thiadiazole sont obtenus avec une proportion de (1,5mmol (metal) : 0,42mmol (ligand)), en additionnant la solution du ligand sur celle du sel métallique. [94]

Tous les complexes préparés sont insolubles dans la plus part des solvants organiques communs, par contre, ils sont plus au moins solubles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

I.3. Méthodes d'analyses des ligands et des complexes

I.3.1. Spectroscopie d'adsorption moléculaire dans l'Ultraviolet et le Visible

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) est une technique d'un âge respectable encore très utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie. Elle a bénéficié des progrès technologiques récents – miniaturisation, fibres optiques – et des moyens de calcul apportés par l'outil informatique. De plus, c'est une technique bien adaptée aux moyens de contrôle et de validation qui permettent de produire des données de qualité reconnue et quantifiée.

a. Principe

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm).

Dans cette application, on peut considérer le rayonnement UV-VIS comme une onde électromagnétique qui transporte une énergie E liée à sa fréquence ν par la relation :

$$E = h\nu = hc / \lambda \quad (1)$$

Avec h constante de Planck ($h = 6,63 \times 10^{-34}$ J · s),

c vitesse de la lumière dans le milieu où se propage l'onde ($c = 3 \times 10^8$ m/s dans le vide),

λ longueur d'onde du rayonnement, exprimée habituellement en nanomètres (nm).

Dans l'UV-VIS, le domaine de 190-800 nm correspond à des fréquences allant de $1,6 \times 10^{15}$ Hz à $3,8 \times 10^{14}$ Hz, et des énergies de l'ordre de quelques électrons-volts (1 eV correspond à une longueur d'onde de 1 230 nm environ, donc l'UV-VIS de 200 à 800 nm correspond à des énergies de 6,5 à 1,5 eV environ). Ces énergies correspondent aux énergies de transition électronique des molécules : à température ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamentale, plusieurs états de rotation pouvant être occupés conformément à la répartition de Boltzmann. Ces molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-VIS et changer leurs états énergétiques électroniques, de vibration et de rotation ce qui explique la complexité des spectres d'absorption, même pour des molécules simples à l'état gazeux.

On comprend aussi que le nombre de photons absorbés entraîne une diminution de l'intensité du rayonnement UV-VIS transmis par le milieu, cette diminution va dépendre du nombre de molécules traversées par le rayonnement. [95]

b. Instrumentation

Les spectres d'absorption des différentes solutions du ligand ou des complexes, formés dans le DMSO, ont été enregistrés à l'aide d'un appareil spectrophotomètre Spectronic-Unicam model UV500, un dispositif optique sépare le faisceau monochromatique en deux faisceaux qui vont traverser deux cuves de mesure :

- la cuve de **mesure** où se trouve l'échantillon ;
- la cuve de **référence** qui contient en général le solvant ou une solution dont la matrice est, si possible, identique à celle des échantillons, mais sans la molécule soumise à l'analyse piloté par un ordinateur au moyen du programme *VISION 32* avec une cuve en quartz (Hellman) de trajet optique égal à 1cm.

I.3.2. Analyse conductimétrique

La conductivité molaire des espèces solides dans des solvants à température ambiante évaluée par conductimétrie permet de déterminer la nature des complexes ioniques ou neutres.

Les mesures conductimétriques ont été effectuées à l'aide d'un conductimètre du type CDM230. La concentration des complexes dissous dans le DMSO est prise égale à 10^{-3} M. Le passage de la conductivité spécifique σ (mesure affichée sur le conductimètre) exprimée en S cm⁻¹ à la conductivité molaire Λ_M , exprimée en Ω^{-1} cm² mol⁻¹ est réalisé au moyen de la formule suivante :

$$\Lambda_M = \frac{\sigma}{C_M}$$

C_M représente la concentration molaire exprimée en mole par cm³.

Donc la relation précédente devient :

$$\Lambda_M = \frac{\sigma}{10^{-6}}$$

1.4. Techniques voltampérométrie utilisées

a. Voltampérométrie cyclique :

La connaissance des caractéristiques fondamentales d'une réaction électrochimique se fait au moyen de la mesure des variations du courant en fonction du potentiel appliqué aux bornes d'une cellule d'électrolyse. La détermination expérimentale de la relation entre le courant et le potentiel d'électrode se traduit par l'obtention de figures appelées **voltampérogrammes** Elle est l'objet de la **voltampérométrie** [96].

La Figure 2 permet de situer la place de la voltampérométrie sur électrode solide parmi les autres techniques électroanalytiques

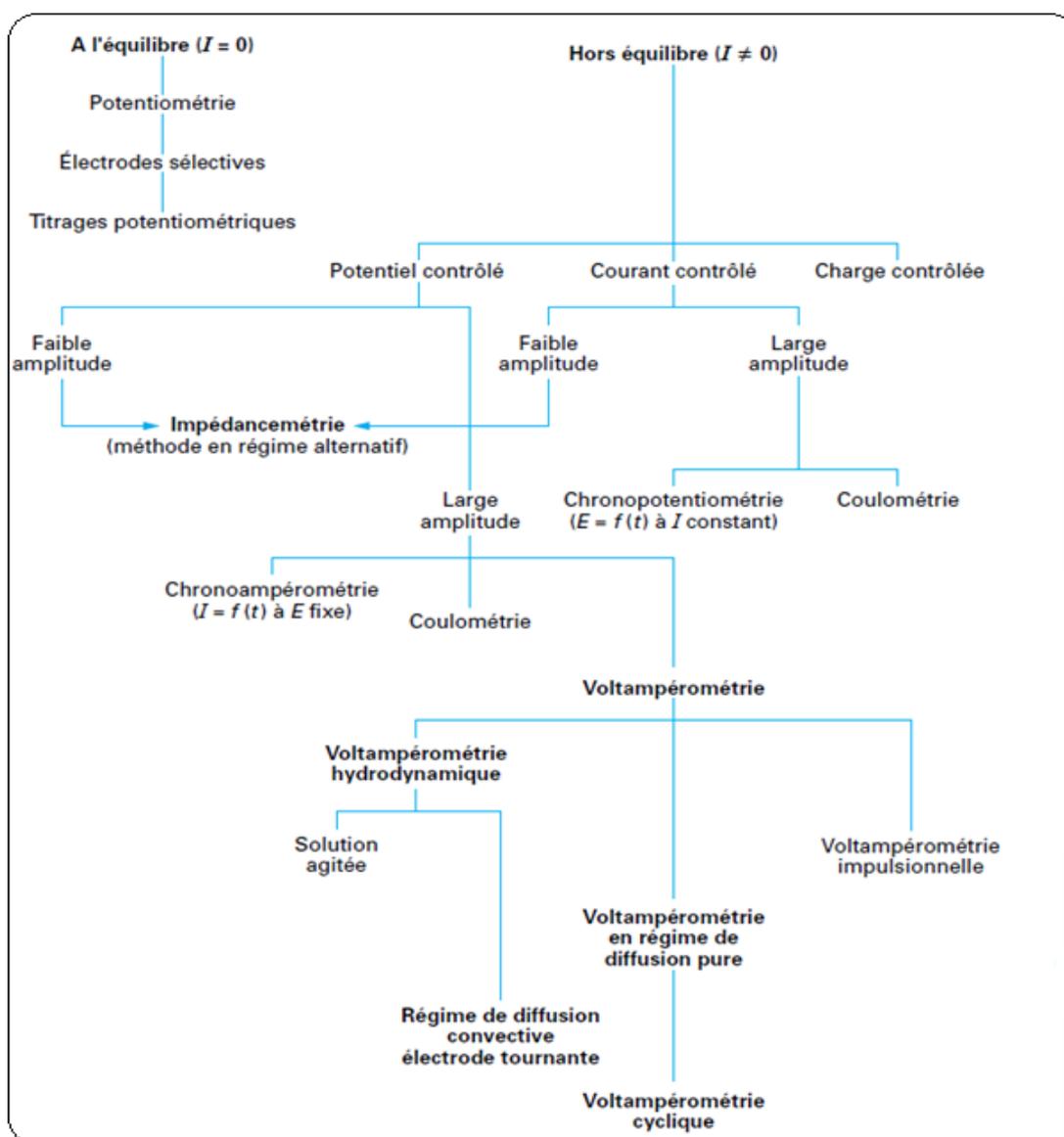
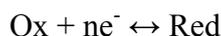


Figure 2 - Place des techniques voltampérométriques parmi les différentes techniques Electrochimiques

b. Principe

La voltampérométrie cyclique permet de connaître le comportement redox d'un système, en particulier dans le cas des composés de coordination.

Cette technique consiste à mesurer le courant d'une électrode de travail en fonction d'une différence de potentiel variable imposée entre cette électrode et une électrode de référence. Ce potentiel varie de façon linéaire entre deux valeurs limites E_i (potentiel initial) et E_f (potentiel final). Avec une vitesse de balayage v , nous avons, dans le cas de l'oxydation, $E_{(t)}=E_i +vt$ (balayage aller) et $E_{(t)}=E_i-vt$ (balayage retour) ; le potentiel étant balayé dans le sens inverse pour la réduction. D'après le voltampérogramme obtenu dans le cas d'un système réversible (Figure 3), on déduit les paramètres I_{pc} et I_{pa} correspondant respectivement au courant de pic cathodique et au courant de pic anodique ainsi que les deux potentiels associés E_{pc} et E_{pa} . Le rapport $[Ox]/[Red]$ à la surface de l'électrode obéit à tout moment à l'équation de Nernst :



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

Avec R constante des gaz parfaits, F le Faraday (96485 coulombs), T la température absolue et E^0 le potentiel standard, (Ox) et (Red) sont respectivement les activités relatives des espèces oxydante et réductrice.

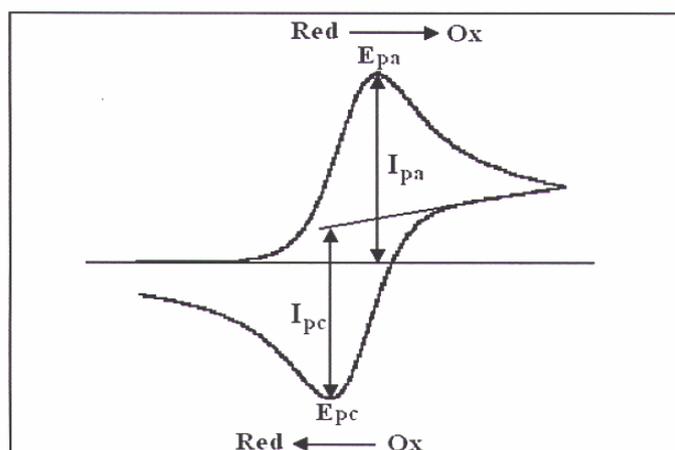


Figure 3 - Voltampérogramme cyclique pour un couple Ox-Réd réversible

CHAPIRE II : *Etude expérimentale et méthodes d'études*

Au départ, seule l'espèce Red est en solution, le potentiel initial est choisi pour qu'aucune conversion électrochimique n'ait lieu. Lorsque le potentiel augmente, l'équation de Nernst impose l'augmentation de la concentration en espèce Ox et on observe donc une augmentation du courant anodique au fur et à mesure que la conversion Red \rightarrow Ox se fait.

Le courant augmente jusqu'à ce que le potentiel devienne suffisamment positif pour que la concentration en Red soit négligeable à la surface de l'électrode. A ce moment, l'intensité diminue car la concentration en Red est uniquement maintenue par la diffusion depuis la solution.

Dans le cas d'un système rapide Ox/Red, la loi simplifiée de Nernst suffit à expliquer les différents phénomènes. Dans le cas d'un système lent, au lieu de la relation de Nernst, pour prendre en compte les vitesses réactionnelles à la surface des électrodes, on utilise la relation de Butler-Volmer [97,98]. Les expressions mathématiques du courant et du potentiel du pic ont été développées initialement pour un balayage aller par Randels et Sevcik [99] pour des systèmes rapides et par Delahay pour des systèmes lents [100]. Les travaux de Nicholson et Shain ont permis la mise au point des relations décrivant les courbes expérimentales des balayages cycliques [101]. Il existe, donc, des critères permettant de différencier ces différents systèmes en voltampérométrie cyclique [102,105].

c. Critères des processus réversible, irréversible et quasi-réversible

➤ Cas d'un système rapide (réversible)

La comparaison de l'allure des courbes cathodique et anodique permet de déterminer si l'échange électronique à l'électrode correspond à un processus réversible ou non. Ainsi, lorsque l'échange électronique à l'électrode de travail est suffisamment rapide et que les coefficients de diffusion des formes oxydantes et réductrices sont voisins, le couple est électrochimiquement réversible. Dans ce cas, le potentiel standard apparent est proche du potentiel de demi vague, $E_{1/2}$ qui est indépendant de la vitesse de balayage :

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

La séparation entre les deux pics permet de déterminer le nombre n d'électrons échangés au cours de la réaction. En effet, lors de balayages en potentiels successifs, I_{pc} décroît et I_{pa} croît

CHAPIRE II : Etude expérimentale et méthodes d'études

jusqu'à l'obtention d'un régime stationnaire (Figure 4). Dans ces conditions, à 25°C, nous avons :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{2}$$

De plus, si les produits et réactifs sont stables, on doit avoir $I_{pa}/I_{pc} = 1$ et on aura le courant de pic I_p qui est donné par la relation de Randles-Seveik :

$$I_p = (2,69 \cdot 10^{-5}) n^{3/2} AD^{1/2} C_0 v^{1/2}$$

Où A est l'aire de la surface de l'électrode (cm^2) ; D est le coefficient de diffusion de l'espèce électroactive ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ; C_0 est sa concentration au sein de la solution ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$) et v est la vitesse de balayage ($\text{V} \cdot \text{S}^{-1}$). A partir de cette relation, nous constatons que pour un système réversible, la courbe $I_p = f(v^{1/2})$ doit être linéaire.

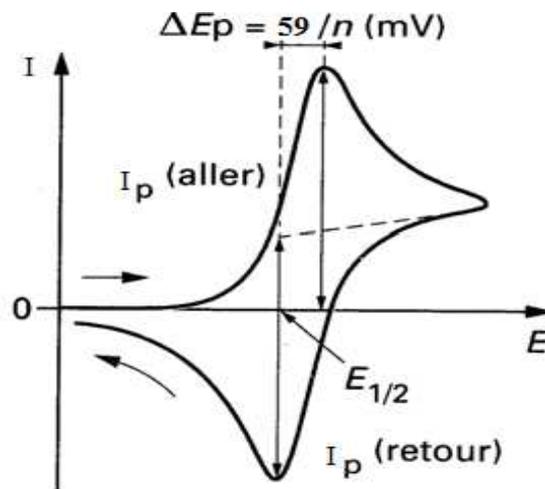


Figure 4 - Profil d'un voltampérogramme cyclique pour un système rapide

➤ Cas d'un système lent (irréversible)

Dans le cas d'un système irréversible, ΔE_p est supérieure à $0,059/n$ et le rapport I_{pa}/I_{pc} est différent de 1. Cependant, d'autres facteurs sont responsables de l'augmentation de ΔE_p tels que la vitesse de balayage, le potentiel d'inversion et la chute ohmique qui n'est pas toujours négligeable dans les milieux non aqueux. Néanmoins, la valeur $(E_{pa} + E_{pc})/2$ permet

de donner une valeur approximative réaliste du potentiel du système redox étudié permettant de montrer, l'influence des différents substituant et la nature des atomes coordonnés sur le pouvoir oxydo-réducteur de ces composés (Figure 5).

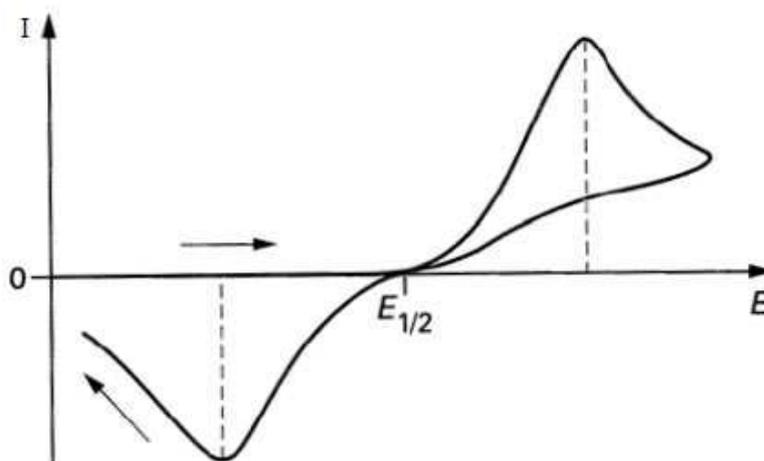


Figure 5 - Profil d'un voltampérogramme cyclique pour un système lent

E_{pa} et E_{pc} sont fonction de ν ; $E_p = f(\log \nu)$ est une droite de pente $0,03/\alpha n$ (en V) ; ΔE_p augmente avec la vitesse de balayage ;

I_p varie en $\nu^{1/2}$;

$E_p - E_{p/2} = 48/\alpha n$ (mV à 25 °C) ;

$I_{pa}/I_{pc} \neq 1$ (ou pas de pic retour) ;

$I_p = (2,99 \times 10^5) \alpha^{1/2} n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C$.

α : coefficient de transfert de charge (sans unité) ; les autres grandeurs conservent leur unité.

➤ **Cas d'un système quasi-rapide (quasi-réversible)**

L'étude de ce type de système a été réalisée par H. Matsuda et Y. Ayabe [98] qui ont qualifié de quasi-réversibles les réactions correspondant à un transfert de charge lent et pour lequel, cependant, la réaction inverse doit être prise en considération. Pour une telle réaction, l'intensité du courant n'est plus strictement linéaire vis-à-vis de la racine carrée de la vitesse de balayage. La figure 6 présente le profil du voltampérogramme cyclique obtenu

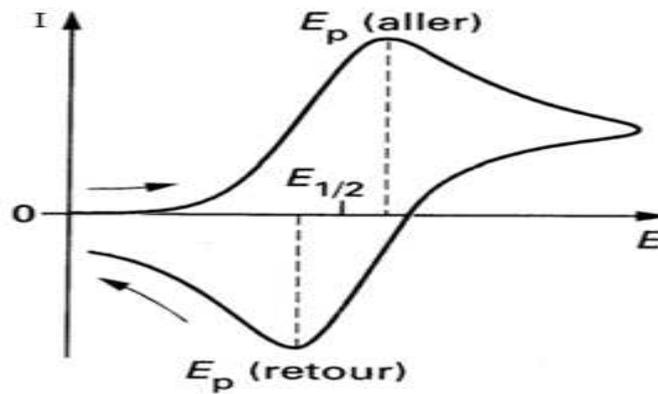


Figure 6 - Profil d'un voltampérogramme cyclique pour un système quasi-rapide

I_p augmente avec ν , mais n'est pas proportionnel à $\nu^{1/2}$;

E_{pc} se déplace vers les valeurs négatives lorsque ν augmente ;

$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ est supérieur à $59/n$ (mV) et augmente avec ν .

I_p conserve la même expression que dans le processus irréversible [106].

Dans la pratique, selon la vitesse de balayage du potentiel, un système donné peut apparaître réversible, quasi-réversible ou totalement irréversible.

d. Transfert et transport de matière

Que ce soit dans la matière solide ou la matière liquide, il est nécessaire pour étudier le transport et le transfert de matière de considérer les 3 modes suivants :

- **La diffusion** : c'est le mouvement des espèces électroactives provoqué par un gradient de concentration créé à la suite d'oxydoréduction des espèces à la surface de l'électrode ;
- **la migration** : c'est le mouvement des espèces chargées provoqué par un gradient de potentiel appliqué à l'électrode ;
- **la convection** : c'est le mouvement des espèces en solution provoqué par des forces mécaniques (exemple : agitation de la solution).

e. Instrumentation et conditions expérimentales

Les études voltamperométriques ont été réalisées avec un appareil comprenant :

- Un stand pour analyse polarographique et voltamperométrique MDE POL150.
- Un potentiostat-galvanostat Voltalab, trace lab (Radiometer Analytical).

CHAPIRE II : Etude expérimentale et méthodes d'études

Cet ensemble, interfacé à un ordinateur, est piloté par le logiciel Trace master 5.2 qui permet d'imposer les paramètres électrochimiques, la saisie des valeurs expérimentales et leur traitement. La cellule contient trois électrodes immergées dans la solution à analyser. Les trois électrodes sont:

- _ Une électrode de travail (w) de mercure (*HMDE*) sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.
- _ Une électrode de référence (R) *Ag/AgCl/KCl 3M*, dont le potentiel est constant et connu, ce qui permet ainsi de contrôler le potentiel à l'électrode de travail.
- _ Une électrode auxiliaire appelée aussi contre-électrode (C) en platine qui permet de mesurer le courant circulant dans la cellule électrochimique (Schéma 33).

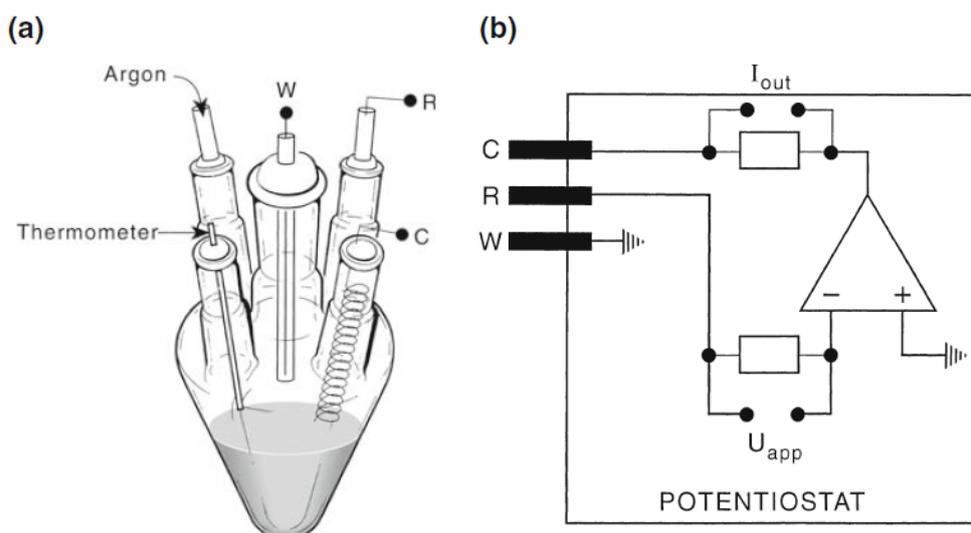


Schéma 33 - Schéma du dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé.

Les solutions des complexes obtenues à partir d'échantillons solides sous forme de poudre ont été préparées à des concentrations de 10^{-3} mol.L⁻¹ dans le DMSO en utilisant le Tétrabutyl ammonium perchlorate (TBAP) 0,1 mol.L⁻¹ comme électrolyte support totalement dissocié permettant de saturer la solution afin de ce placer en régime de diffusion pure. Elles sont désaérées, avant analyse, par barbotage d'azote, durant dix minutes environ.

II. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES LIGANDS ET DE LEURS COMPLEXES

Les molécules synthétisées au cours de ce travail de thèse ont été exploitées pour leurs activités biologiques, notamment leurs activités immunomodulatrices et antioxydantes. Une collaboration avec les équipes du Laboratoire de *Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (Faculté SNVTU, Université de Tlemcen)* a permis de mettre au point des protocoles afin de déterminer l'activité in vitro de ces composés sur les cultures de lymphocytes.

II.1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés chez des hommes sains volontaires, à jeun, au niveau de la veine du pli du coude, sur des tubes avec un anticoagulant (héparine ou EDTA). 4 ml de sang sont prélevés et servent à l'isolement des lymphocytes le jour même du prélèvement.

II.2. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes se fait par centrifugation dans un gradient de Ficoll ou Histopaque (SIGMA). Le Ficoll, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle du Ficoll (Tableau 1) se trouvent à l'interface entre le Ficoll et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes) (Figure 7). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Ficoll, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée, composée de de glucose (0,1%), CaCl₂ (5.10⁻⁵M), MgCl₂ (10⁻³M), KCl (5.10⁻³M), Tris (0.15M), NaCl (0.14M), PH 7,6. Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640 (riche en glucose et en acides aminés).

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % (colorant

CHAPIRE II : Etude expérimentale et méthodes d'études

permettant de distinguer les cellules vivantes) et 50 μ l de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée « Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10⁶ cellules/ml.

Tableau 1 : Taille et densité des cellules sanguine

	Taille (μ M)	Densité	Vitesse de sédimentation
Globules rouges ●	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.098-1.105)	
Éosinophiles	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	
Neutrophiles ●	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
Basophiles	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
Monocytes ●	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
Lymphocytes ●	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
Plaquettes	2-3	1.040	

II.3. Préparation d'hydrazone et 1,3,4-thiadiazoles et leurs complexes de Cu et Ni

Les substances L₁, CuL₁, L₂, CuL₂ et NiL₂ synthétisées selon les protocoles précédents sont utilisées pour les tests immunologiques in vitro. Ces composés sont solubilisés dans un solvant organique tel que le DMSO (dimethyl sulfoxide) pour obtenir une solution mère de 10 mM. Par la suite, des solutions de concentrations différentes [10 μ M-100 μ M -500 μ M-1 mM] sont préparées à partir de la solution mère dans le milieu RPMI 1640.

CHAPIRE II : *Etude expérimentale et méthodes d'études*

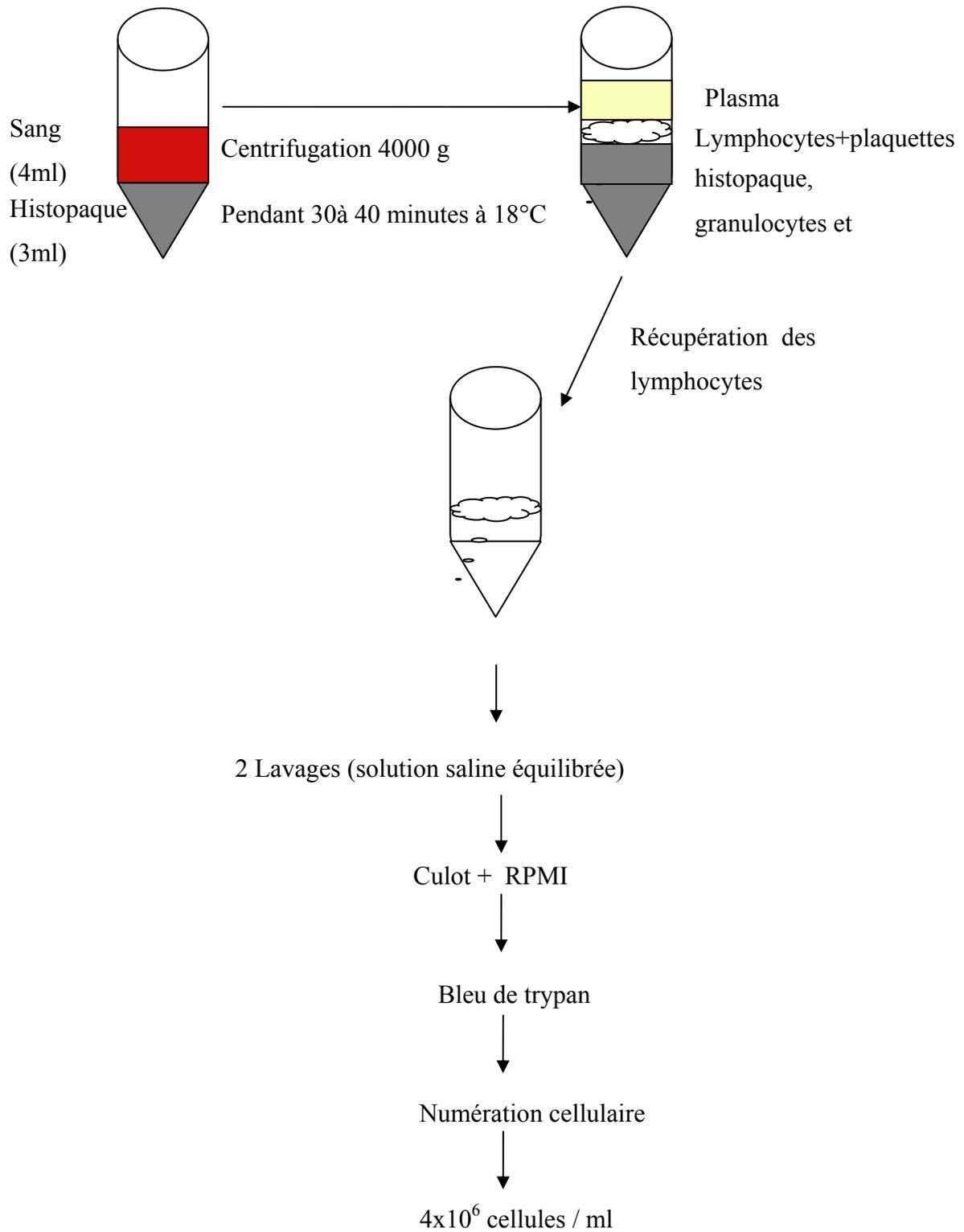


Figure 7 : Méthode d'isolement et purification des lymphocytes

II.4. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Le TTL permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaline A (Con A Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/mL. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 (µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml).

Les essais sont réalisés en triple. Afin de déterminer les effets des composés L1, L2, CuL1, CuL2, et NiL2 sur la prolifération in vitro des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence de ces composés à différentes concentrations finales (1µM-10µM-50µM-100µM). Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, 5% de CO₂.

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans des tubes secs. La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide]. La suspension cellulaire est centrifugée à 6000 tours/min pendant 15 minutes. Les cellules (culot) sont lysées aux ultrasons et le contenu intracellulaire sert aux dosages des marqueurs du stress oxydatif intracellulaire. Le surnageant sert au dosage des interleukines IL-2, IL-4 et INF-γ.

II.4.1. Comptage des lymphocytes

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules colorées au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

II.4.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée). La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de

CHAPIRE II : Etude expérimentale et méthodes d'études

référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN [107]. La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière. La suspension cellulaire est incubée en présence du MTT à 37° C, 5% CO₂ pendant 3 heures. L'addition de HCL 0.04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. L'indice de prolifération ou indice de stimulation (IS) est calculé :

$IS = \text{densité optique des cellules stimulées} / \text{densité optique des cellules non stimulées} \times 100.$

NB : Cellules stimulées: cellules prélevées des puits après les incubations.

Cellules non stimulées: cellules provenant de la suspension cellulaire initiale avant incubation.

II.5. Dosage des Interleukines

II.5.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2)

Le dosage des interleukines 2 (IL-2) se fait selon le protocole du kit ELISA (R et D System, Oxford, UK) pour IL2. Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps monoclonal anti-IL-2 et un polyclonal conjugué à la biotine. Un revêtement d'anticorps monoclonal anti-IL-2 est administré dans les micropuits de la plaque ELISA. L'IL-2 présente dans l'échantillon ou le standard, se lie aux anticorps absorbés dans les micropuits. L'anticorps anti-IL2 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté et se lie à IL2 capturés par le premier anticorps. L'anti-IL2 conjugué à la biotine non lié est enlevé pendant l'étape de lavage. La streptavidine-HRP est ajoutée et se lie à l'anti-IL2 conjugué à la biotine. Pour l'incubation suivante, la streptavidine-HRP non lié est enlevé durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP est ajoutée aux puits. Un produit coloré est formé proportionnellement à la quantité des IL2 présents dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm.

Une courbe étalon est préparée à partir du standard IL-2 fourni par le Kit de dosage (R et D system, Oxford, UK).

II.5.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4)

Le principe du dosage des interleukines 4 (IL-4) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-4 et un polyclonal anti- IL-4 conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard IL-4 (R et D System, Oxford, UK).

II.5.3. Dosage de l'interféron γ (INF γ)

Le principe du dosage de l'interféron γ (INF γ) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-INF γ et un polyclonal anti- INF γ conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2 et IL-4. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard INF γ fourni dans le Kit (R et D System Oxford, UK).

II.6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes

II.6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes en présence des différents composés

Le taux de Glutathion (GSH) est mesuré par méthode colorimétrique suivant le protocole du Kit Bioxytech GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). Les lymphocytes sont suspendus dans l'acide métaphosphorique (5%, P/V). Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, le surnageant est mélangé au tampon phosphate de potassium contenant l'acide diethylene triamine, Penta-acétique et le lubrol (pH 7,8). Le chromogène est par la suite ajouté dans le milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 25°C pendant 10min à l'abri de la lumière. La lecture se fait à 400nm. Les concentrations en GSH sont obtenues grâce à la courbe étalon préparé avec le GSH standard.

II.6.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) des lymphocytes en présence des différents composés

L'activité de l'enzyme SOD est mesurée selon la méthode d'Elstner [108] après lyse des lymphocytes. Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde (O_2^-) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de $MnCl_2$ et du mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH. La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité/ml ou Unité /mg de protéine.

II.6.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes en présence des différents composés

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène [109]. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps. Après incubation, les concentrations du H₂O₂ restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H₂O₂. La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité/ ml ou en Unité/mg de protéine.

II.6.4. Teneurs en hydroperoxydes des lymphocytes en présence des différents composés

Les hydroperoxydes sont mesurés par l'oxydation d'ions ferriques utilisant le xylénol orange (Fox2 ; kit Peroxi Detect Sigma, USA) en conjugaison avec le ROOH réducteur spécifique de la triphenylphosphine (TPP).

Cette méthode est basée sur une peroxydation rapide transformant le Fe²⁺ en Fe³⁺ en milieu acide. Les ions Fe³⁺ en présence du xylénol orange [(O-cresolsulfonphtalein-3',3''-bis (methylinodiactic acid sodium)], forment un complexe Fe³⁺-xylénol orange. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration plasmatique en hydroperoxydes à une longueur d'onde de 560 nm.

II.6.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes en présence des différents composés (Méthode de Levine et al., 1990)

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées dans le lysat lymphocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine. La réaction aboutit à la formation de la dinitrophényl hydrazone colorée. La concentration des groupements carbonylés est déterminée par lecture à des longueurs d'onde de 350 et 375 nm.

II.7. Etude statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. CARACTERISATION ET COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DU LIGAND 1-(4-DIMETHYLAMINO BENZYLIDENE)-2-(2-HYDROXY-BENZYLIDENE) HYDRAZINE (L₁) ET SON COMPLEXE DE CUIVRE(II)

I.1. Propriétés physiques et analytiques

Le ligand 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine(L₁) et son complexe [Cu(L₁)] sont obtenus à l'état de poudre et sont stables à l'air à température ambiante.

Les tests de solubilité sur le ligand L₁ et son complexe [Cu(L₁)], les propriétés analytiques et physiques sont regroupés dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2- Tests de solubilité sur le ligand L₁ et son complexe [Cu(L₁)]

Produits	Eau	éthanol	cyclohexane	chloroforme	dichloromethane	Acétate d'éthyle	DMSO
Ligand (L ₁)	i s	s	i s	s	s	s	s
Complexe [Cu(L ₁)]	i s	i s	i s	i s	i s	i s	s

Tableau 3- propriétés analytique et physique du ligand L₁ et son complexe [Cu(L₁)]

Produits	Couleur	P.F °C	%C		%H		%N		% Cu		Λ _M [*]
			cal	exp	cal	exp	cal	exp	cal	exp	
Ligand (L ₁)	jaune	184	71,89	72,30	6,41	5,95	15,72	16,10	-	-	-
Complexe [Cu(L ₁)]	marron	>260	53,13	53,85	5,20	4,90	10,33	10,75	15,62	15,10	3,03

* : Ω⁻¹cm².mol⁻¹

Les résultats de ces deux tableaux révèlent que le ligand L₁ est soluble dans la majorité des solvants organiques usuels et insoluble dans l'eau. Contrairement au ligand, le complexe [Cu(L₁)] est insoluble dans la majorité des solvants testés et soluble dans le DMSO (Tableau 2).

La valeur de la conductance molaire, dans le DMSO, d'une solution 10⁻³M du complexe [Cu(L₁)] montre la nature non-électrolytique de ce dernier, ce qui est en accord avec la formule du complexe suggéré.

I.2. Caractérisation par méthodes spectroscopiques

I.2.1. Spectrométrie infrarouge

Les plus importantes fonctions, communes, pour le salicylhydrazone et le ligand (L_1), sont OH, C=N, N-H et N-N. Le spectre infrarouge dans le KBr du salicylhydrazone présente une bande d'absorption intense à 1617 cm^{-1} attribuée à la vibration de valence du groupement C=N, une bande d'intensité moyenne à 3450 cm^{-1} est attribuée a la vibration de valence du groupement OH phénolique associe par des liaisons hydrogène [110]. On relève aussi à 3250 cm^{-1} une bande caractéristique à la vibration NH (Figure 8), L'apparition de ces bandes à des nombre d'ondes plus basses suggère la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire de type O-H.....N (Schéma 34) entre l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle et l'atome de l'azote-imine [111].

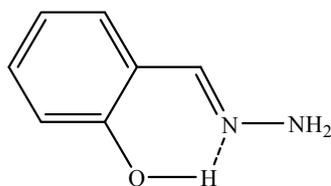


Schéma 34- Présentation des liaisons hydrogènes intramoléculaire

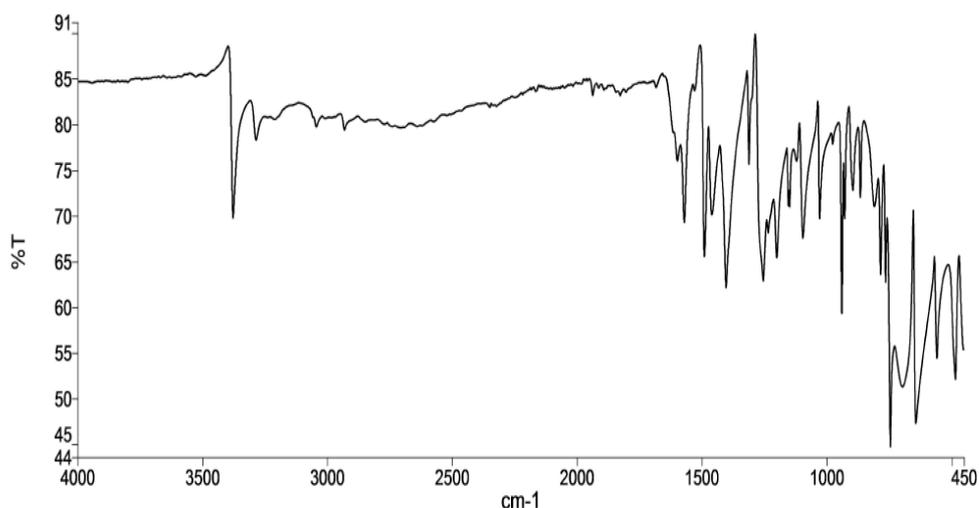


Figure 8 – Spectre Infrarouge du Salicylhydrazone

Le spectre IR du ligand L_1 présente les mêmes bandes caractéristiques du salicylhydrazone, plus une nouvelle bande à 1030 cm^{-1} assignée à la vibration de la liaison N-N (Figure 9).

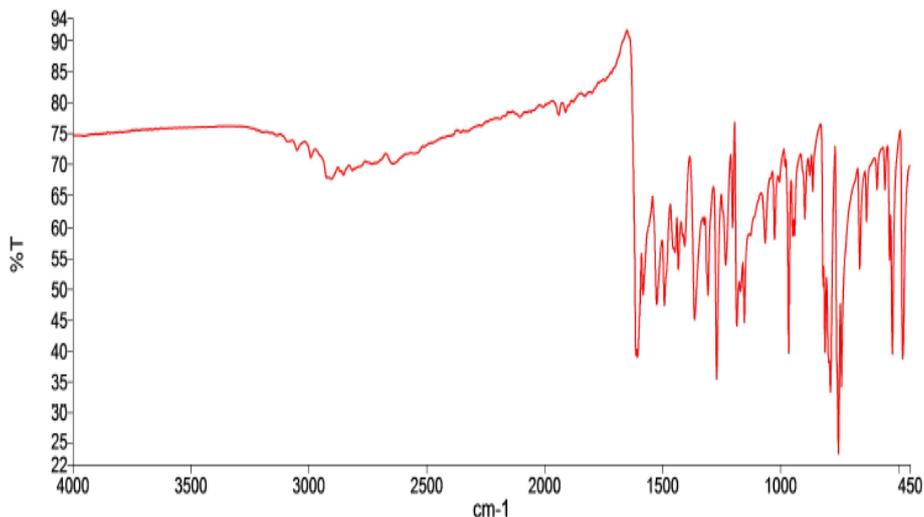


Figure 9 – Spectre Infrarouge du ligand L_1

I.2. 2. Spectrophotométrie UV-Visible

De manière générale, les spectres des composés de cuivre(II) ne présentent qu'une seule bande dans le domaine du visible [112].

Les spectres UV de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine L_1 et son complexe $[\text{Cu}(L_1)]$ ont été réalisés dans le Nujol. Une bande caractéristique de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est signalée dans l'ultraviolet à 299 nm et une deuxième bande à 378 nm signale la transition $n \rightarrow \pi^*$ pour le ligand L_1 . Dans le complexe $[\text{Cu}(L_1)]$ la bande caractérisé par la transition $n \rightarrow \pi^*$ est déplacée vers 403 nm, ceci confirme la présence du ligand dans le complexe et que la liaison métal-ligand est de nature covalente [113], une bande située à 462 nm caractéristique d'un transfert de charge métal-ligand et une autre bande de transitions d-d apparaît aux environs de 703 nm, cette dernière est assignée à la transition dont la symétrie ${}^2T_{2g} \rightarrow {}^2E_g$ spécifique aux complexes de Cu(II) dans une géométrie tétraédrique [114, 115] (Figure 10).

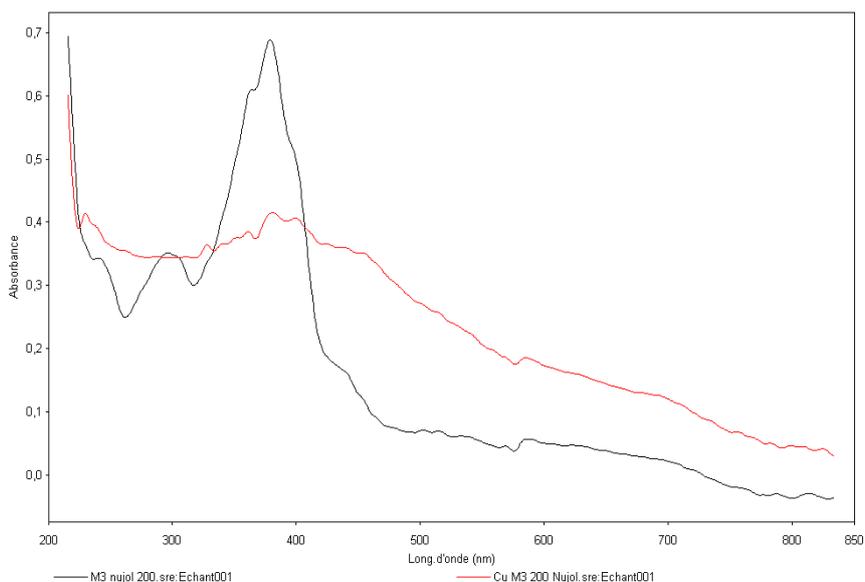


Figure 10 – Spectre UV-Visible du ligand L_1 et son complexe $[Cu(L_1)]$ dans le Nujol

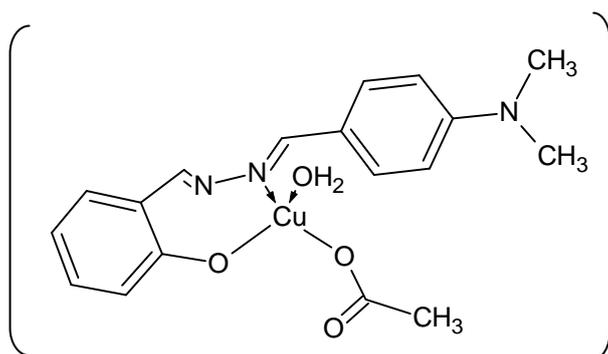


Figure 10b-Structure du complexe $[Cu(L1)(OAc)(H_2O)]$

I.2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (proton 1H)

Le spectre RMN 1H du composé salicylhydrazone, dans le chloroforme deutéré, montre un singulet à 11,08 ppm attribué au proton de groupement OH, un singulet à 7,87 ppm dû au groupement (CH=N), un multiplet se situe entre 7,24-6,86 ppm correspond au phényle intégrant 4 protons et un singulet à 5,44 ppm correspondant au proton du groupement NH (figure 11).

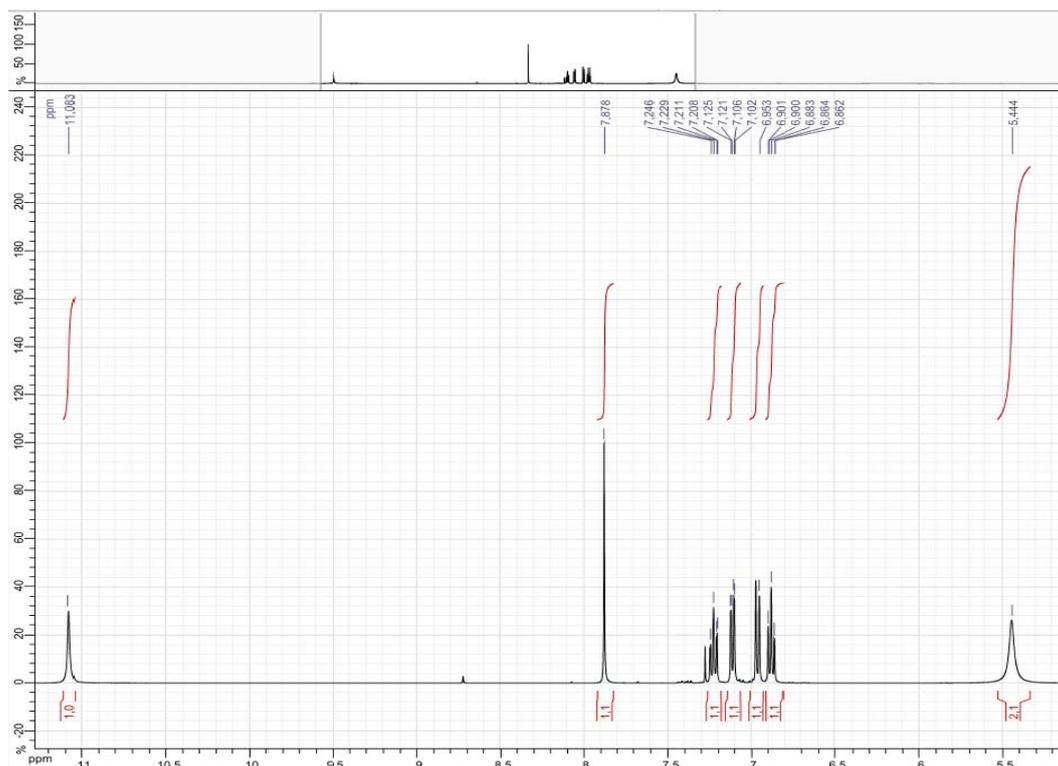


Figure 11 – Spectre RMN¹H du salicylhydrazone

Le spectre RMN ¹H du ligand 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène)hydrazine L₁ dans le chloroforme deutéré, montre un singulet attribué au proton de groupement OH à 11,94 ppm, deux singulets dû au groupement (CH=N) se trouve respectivement à 8,78 et 8,53 ppm, un multiplet qui correspond au phényle du (salicylaldehyde) intégrant 4 protons, se situe entre 7,36-7,33 ppm et un autre multiplet qui correspond au phényle du (4-aminobenzaldehyde) intégrant 4 protons se situe entre 7,03-6,74 ppm, deux triplets à 7,75 et 6,75 ppm correspondent au deux méthyles (CH₃)₂ (Figure 12).

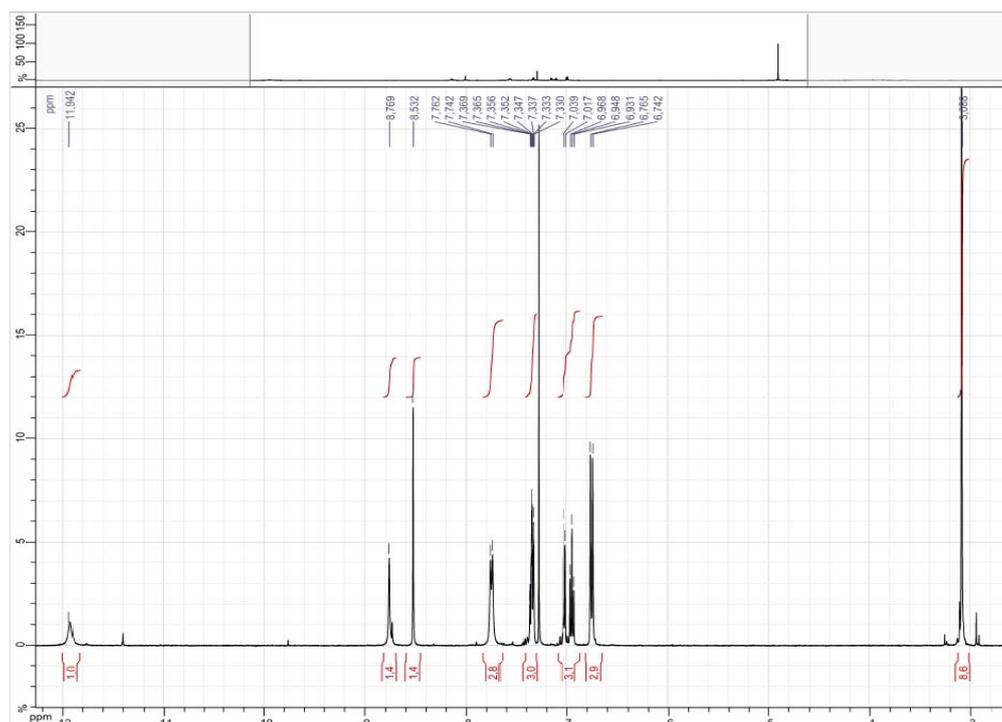


Figure 12 – Spectre RMN ^1H du ligand L_1

I.2. 4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (carbone ^{13}C)

Le spectre RMN ^{13}C permet de repérer les déplacements chimiques de certains carbones. Dans le cas du salicaldehyde, les signaux à différentes valeurs de δ : 116, 119, 129 et 146 ppm correspondent aux atomes de carbone aromatique et pour un δ de 130 ppm cela correspond au groupe azométhine ($\text{CH}=\text{N}-$) (Figure 13).

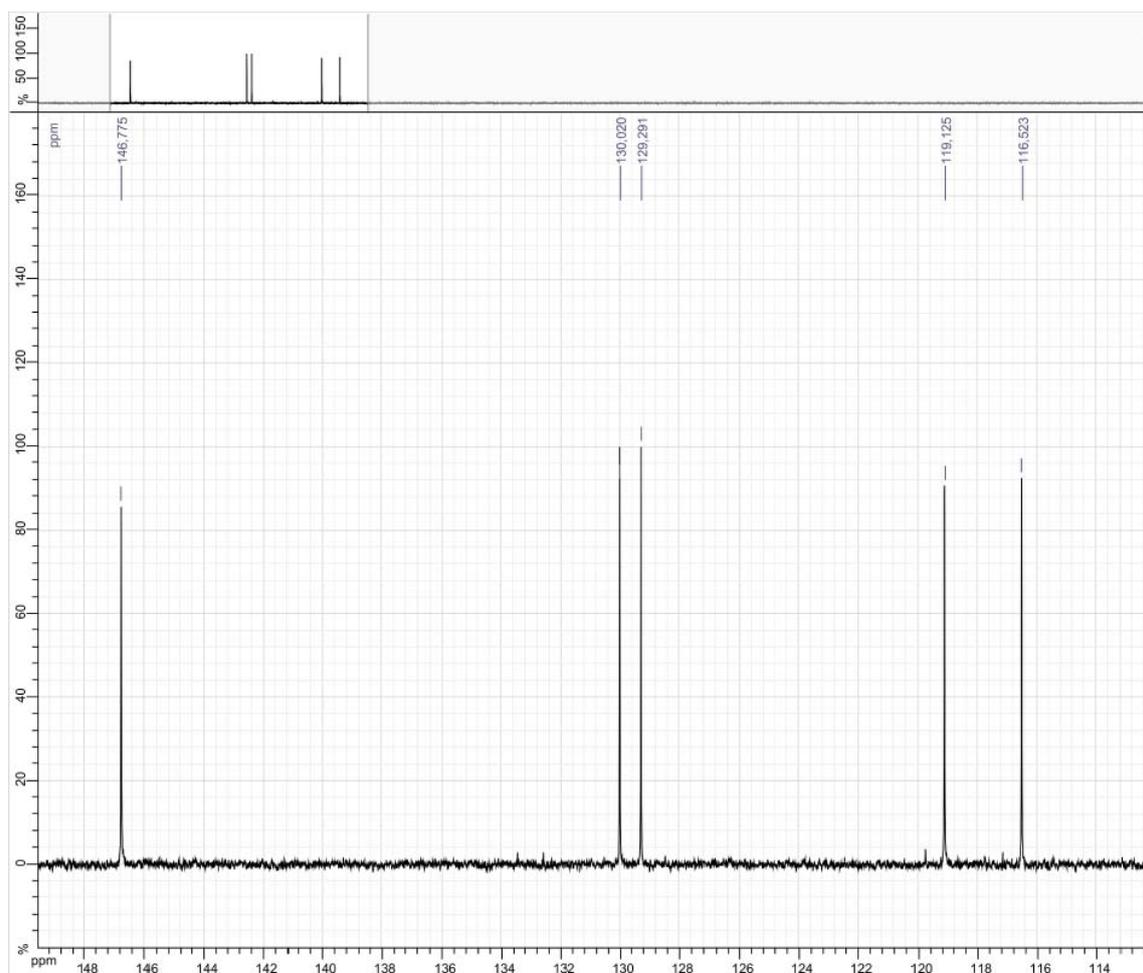


Figure 13- *Spectre ^{13}C RMN de Salicylhydrazone*

La Figure 14 montre différents signaux du ligand 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine L_1 correspondant : $\delta = 40,16$ ppm ($(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$) au diméthyl amine ; 119,33 ; 118,13 ; 130,64 et 152,72 ppm aux atomes de carbone aromatique ; 132,21 ppm au ($\text{CH}=\text{N-}$) groupe azométhine ; 119,33 ; 131,96 ; 130,57 et 162,49 ppm aux atomes de carbone aromatique.

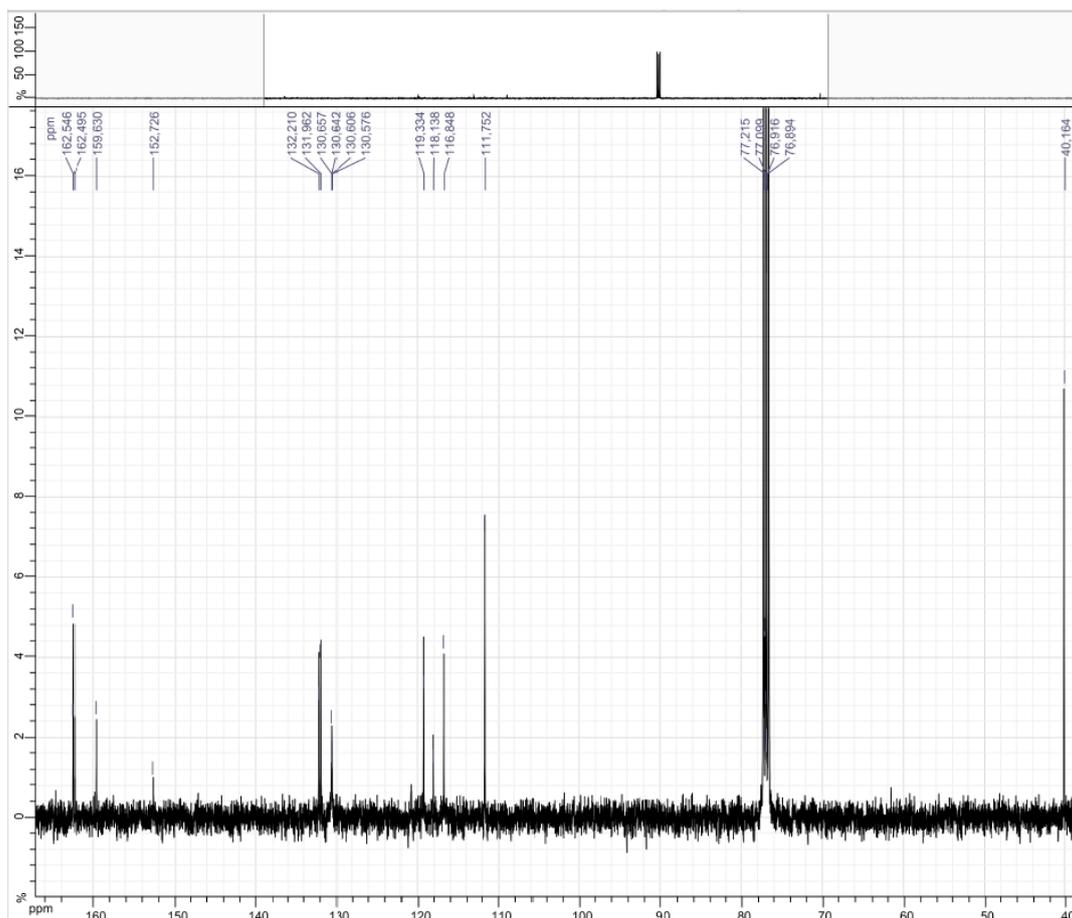


Figure 14 - Spectre ^{13}C RMN du ligand L_1

I.3. Comportement électrochimique

Le voltampérogramme cyclique du ligand 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine L_1 et son complexe $[\text{Cu}(L_1)]$ sont réalisés, sur l'électrode de mercure (HMDE), en utilisant le DMSO comme solvant en présence du perchlorate de tétrabutylammonium (TBAP) 0,1 M comme électrolyte support.

I.3.1. Le voltampérogramme cyclique du ligand (L_1) dans le DMSO

Le voltampérogramme cyclique, est établi dans le DMSO pour un intervalle de potentiel allant de 300 à -575 mV, avec une vitesse de balayage de $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Sur la figure 15, le balayage anodique et cathodique montre un pic d'oxydation situé à 40mV et un pic de réduction situé à -15 mV vs Ag/AgCl pour le ligand L_1 .

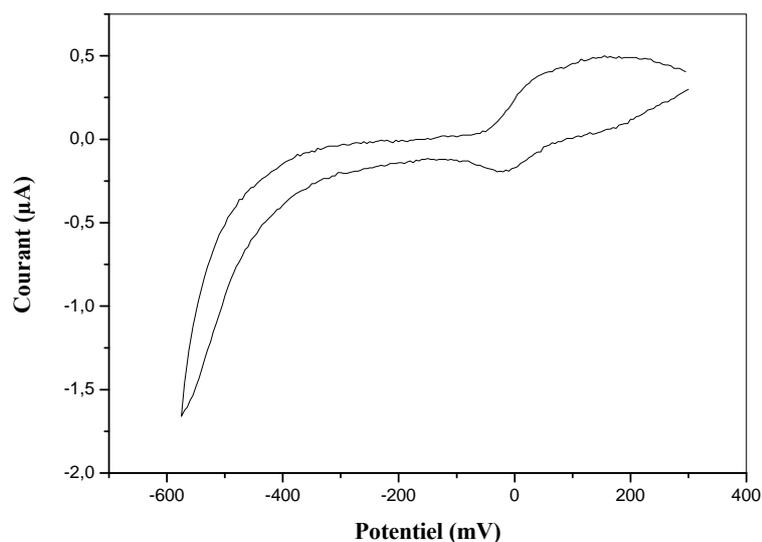


Figure 15 : Voltampérogramme Cyclique de L_1 1 mmol/L dans le DMSO-TBAP 0,1 mol/L ; sur électrode de mercure (HMDE) ; à vitesse de balayage $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

I.3.2. Voltampérogramme cyclique du complexe $[\text{Cu}(\text{L}_1)]$ dans le DMSO

Le voltampérogramme cyclique du complexe $[\text{Cu}(\text{L}_1)]$ $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ dans le DMSO avec le TBAP 0,1 mol/L est représenté sur la figure 16. Il est constitué de trois pics d'oxydations notés p_{a1} , p_{a2} et p_{a3} qui apparaissent, respectivement, aux potentiels E_{pa} égale à 225, 65 et - 275 mV et trois pics de réduction notées p_{c1} , p_{c2} et p_{c3} égale à 185, -5 et -375 mV.

Par comparaison avec le voltampérogramme du ligand libre, représenté sur la figure 15, qui comporte un seul pic d'oxydation et de réduction, nous concluons que le pic 1 correspond au couple redox $\text{Cu}(0)/\text{Cu}(\text{I})$ et le pic 3 au couple redox $\text{Cu}(\text{I})/\text{Cu}(\text{II})$ (Figure 16).

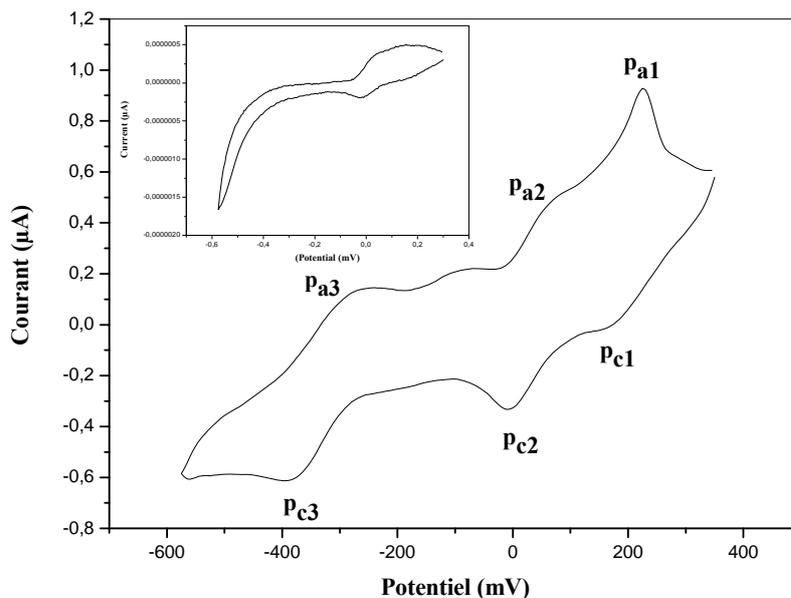


Figure 16 - Cyclic Voltampérogramme Cyclique de $[Cu(L_1)]$ $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ dans le DMSO-TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sur électrode de mercure (HMDE) ; à vitesse de balayage 25 mVs^{-1} et à 25°C La courbe interne présente le CV de L_1 ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) dans la même solution.

L'apparition des deux processus redox associés à l'oxydoréduction de Cu(II) au balayage aller retour, et la variation du potentiel (E_{pa} et E_{pc}) en fonction de la vitesse de balayage (Tableau 4 et 5), indiquent un processus irréversible au niveau du pic 1 et 3.

Tableau 4 - Variation des potentiels et des courants de pic 1 anodiques et cathodique en fonction de la vitesse de balayage pour le complexe $[Cu(L_1)]$ $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$

Vitesse de Balayage (mVs^{-1})	Racine de Vitesse de Balayage	Pic du courant (μA)		pic du potentiel (mV)		$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$
v	$v^{1/2}$	i_{pa}	$-i_{pc}$	E_{pa}	E_{pc}	
25	5	0,31	0,074	225	200	25
50	7,07	0,40	0,125	240	175	65
125	11,18	0,52	0,270	250	160	90
250	15,81	0,60	0,340	270	175	95

Tableau 5 - Variation des potentiels et des courants de pic 3 anodiques et cathodique en fonction de la vitesse de balayage pour le complexe $[Cu(L_1)]$ $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$

Vitesse de Balayage (mVs^{-1})	Racine de Vitesse de Balayage ($\text{v}^{1/2}$)	Pic du courant (μA)		pic du potentiel (mV)		$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$
v	$v^{1/2}$	i_{pa}	$-i_{pc}$	$-E_{pa}$	$-E_{pc}$	
25	5	0,11	0,14	265	380	115
50	7,07	0,19	0,23	255	385	130
125	11,18	0,33	0,42	250	390	140
250	15,81	0,46	0,60	245	395	150

Les représentations graphiques du courant anodique et cathodique du pic 1 et 3 présentent un profil linéaire en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage v à des concentrations allant jusqu'à $1,5 \text{ mmol/L}$ pour le complexe $[Cu(L_1)]$ (Figures 17, 18, 19 et 20). Ce comportement laisse suggérer que les deux processus $Cu(0)/Cu(I)$ et $Cu(I)/Cu(II)$ à l'électrode, sont contrôlés par diffusion. Il s'agit d'un régime mixte de diffusion-transfert [103].

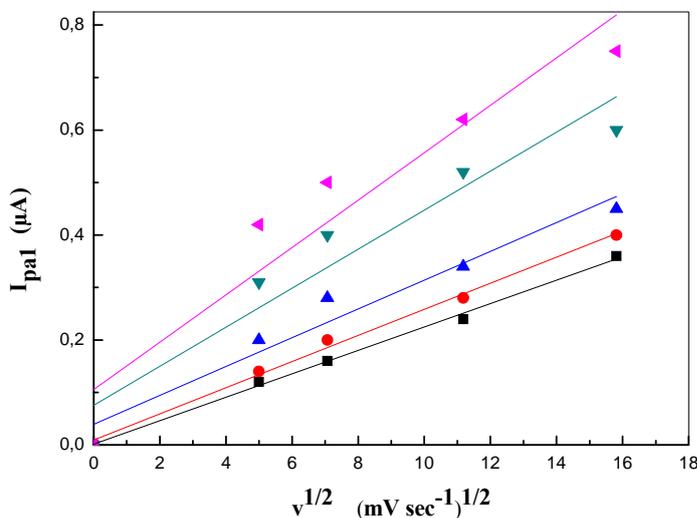


Figure 17- Variation du courant de pic anodique 1, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour différentes concentrations en $[Cu(L_1)]$ dans le DMSO-TBAP $0,1 \text{ M}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (■) 0.5 ; (●) 0.75 ; (▲) 1.0 ; (▼) 1.25 ; (◄) 1.5 mmol L^{-1}

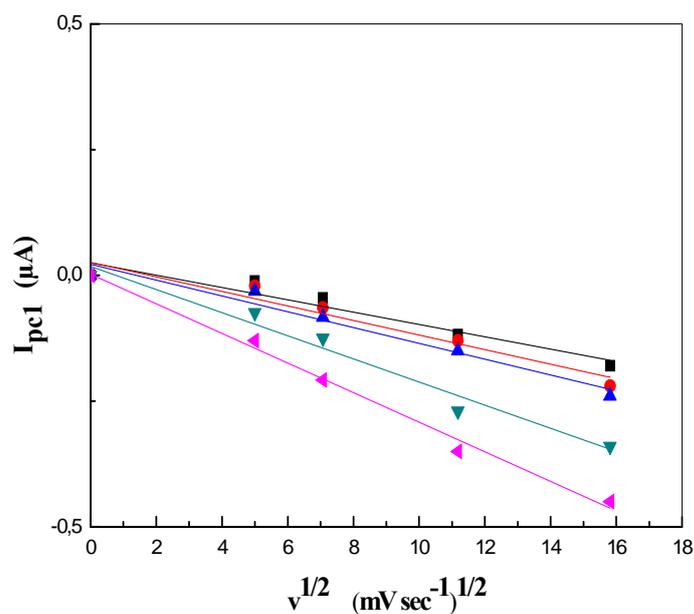


Figure 18 - Variation du courant de pic cathodique 1, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour différentes concentrations en $[Cu(L_1)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1 M ; 25 °C. (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.25; (◄) 1.5 mmol L⁻¹

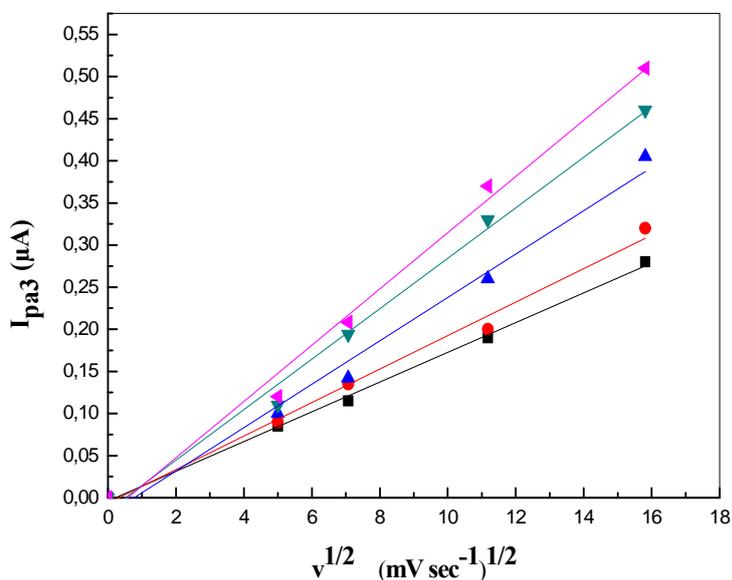


Figure 19 - Variation du courant de pic anodique 3 en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour différentes concentrations en $[Cu(L_1)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1 M ; 25 °C. (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.25; (◄) 1.5 mmol L⁻¹

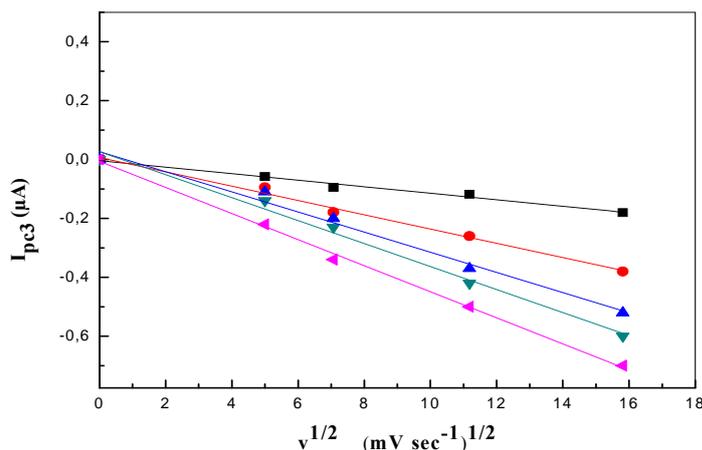


Figure 20-Variation du courant de pic cathodique 3, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour différentes concentrations en $[Cu(L_1)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1 M ; 25 °C. (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.25; (◄) 1.5 mmol L⁻¹

En faisant un balayage cyclique, nous notons une apparition progressive du premier pic de réduction en faveur du deuxième, qui devient plus important, il est de même pour le pic 3. Cependant, nous observons deux pics nets en oxydation, qui ne peuvent correspondre qu'à deux réductions, qui se sommeraient en une vague, d'où l'importance de celle-ci. En augmentant la vitesse de balayage de 25 à 500 mV s⁻¹(Figure 21), nous remarquons que le nombre de pics reste inchangé, de même que l'allure générale des courbes. Nous pouvons donc conclure à une absence de décomplexation ou de décomposition de notre composé [116]. Le courant de pic varie linéairement par rapport à la racine carrée de la vitesse de balayage, ce qui prouve qu'on est en présence d'un processus de diffusion.

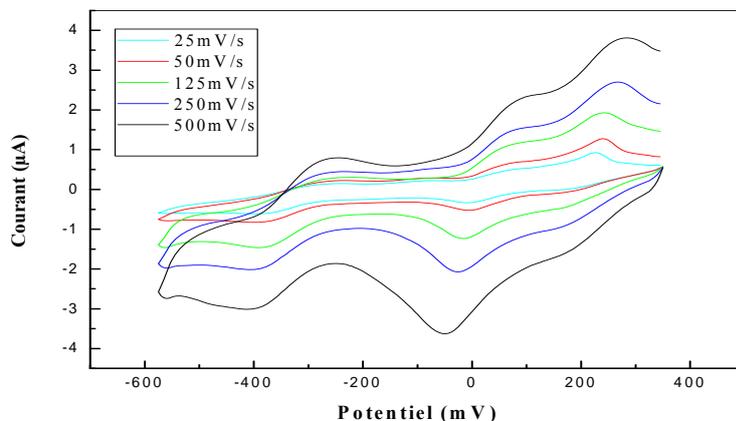


Figure 21 -Voltampérogramme cyclique de $[Cu(L_1)]$ 1,25 mmol L⁻¹ à différentes vitesses de balayage

II. CARACTERISATIONS ET COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DU
LIGAND 2,5-BIS (2-PYRIDYL)-1,3,4-THIADIAZOLE (L₂)
ET SES COMPLEXES DE NICKEL(II) ET CUIVRE(II)

II.1. Propriétés physiques et analytiques

Le ligand L₂ et ses complexes [Ni(L₂)] et [Cu(L₂)] synthétisés sont à l'état de poudre et stables à l'air à température ambiante. Les tests de solubilité sur le ligand L₂ et ses complexes [Ni(L₂)] et [Cu(L₂)] révèlent que le ligand L₂ est soluble dans la majorité des solvants organiques et insoluble dans l'eau. Contrairement au ligand, les deux complexes [Ni(L₂)] et [Cu(L₂)] sont insolubles dans la majorité des solvants usuels et soluble dans le DMSO (Tableau 2).

Les faibles valeurs du complexe [Cu(L₂)] des conductances molaires, déterminée dans le DMSO ($\Lambda_M = 28,3 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) indique une nature non-électrolytique et les valeurs élevées du complexe [Ni(L₂)] ($\Lambda_M = 52 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) montre une nature électrolytique.

Tableau 6- Tests de solubilité sur le ligand L₂ et ses complexes [Ni(L₂)] et [Cu(L₂)]

Produits	Eau	éthanol	cyclohexane	chloroforme	dichlomethane	Acétate d'éthyle	DMSO
Ligand (L ₂)	i s	s	i s	s	s	s	s
Complexe [Ni(L ₂)]	i s	i s	i s	i s	i s	i s	s
Complexe [Cu(L ₂)]	i s	i s	i s	i s	i s	i s	s

Tableau 7- propriétés analytique et physique de L₂, [Ni(L₂)] et [Cu(L₂)]

Produits	Couleur M (g/mole)	P.F °C	R%	%C		%H		%N		%S	
				Cal	Exp	Cal	Exp	Cal	Exp	Cal	Exp
Ligand (L ₂)	Blanc	218	76	60,00	60,13	3,33	3,22	23,33	23,41	13,33	13,45

II.2. Caractérisation par méthodes spectroscopiques

II.2.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Le ligand L_2 et ses complexes $[Ni(L_2)]$ et $[Cu(L_2)]$ exhibent généralement le même nombre de bandes dans l'ultra-violet, par contre l'intensité et les maximums de ces dernières sont différents.

Le spectre du ligand L_2 affiche dans l'ultraviolet une bande à 315 nm, correspondant à la transition $n \rightarrow \pi^*$. Le spectre du complexe $[Ni(L_2)]$ affiche deux bandes, la première à 254 nm correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et la deuxième bande caractérisé par la transition $n \rightarrow \pi^*$ est déplacée vers 337 nm, ceci confirme la présence de ligand dans le complexe et que la liaison métal-ligand est de nature covalente.

Le spectre visible de $[Ni(L_2)]$ montre trois bandes à 540, 635 et 707 nm. Elles sont dues, respectivement, aux transitions ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$, ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$ et ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{2g}$ caractérisant une géométrie octaédrique autour de l'ion Ni(II) [117, 118, 119] (Figure 22a). Ces bandes correspondent a des transitions d-d et de transfert de charge d'un système d^8 [120].

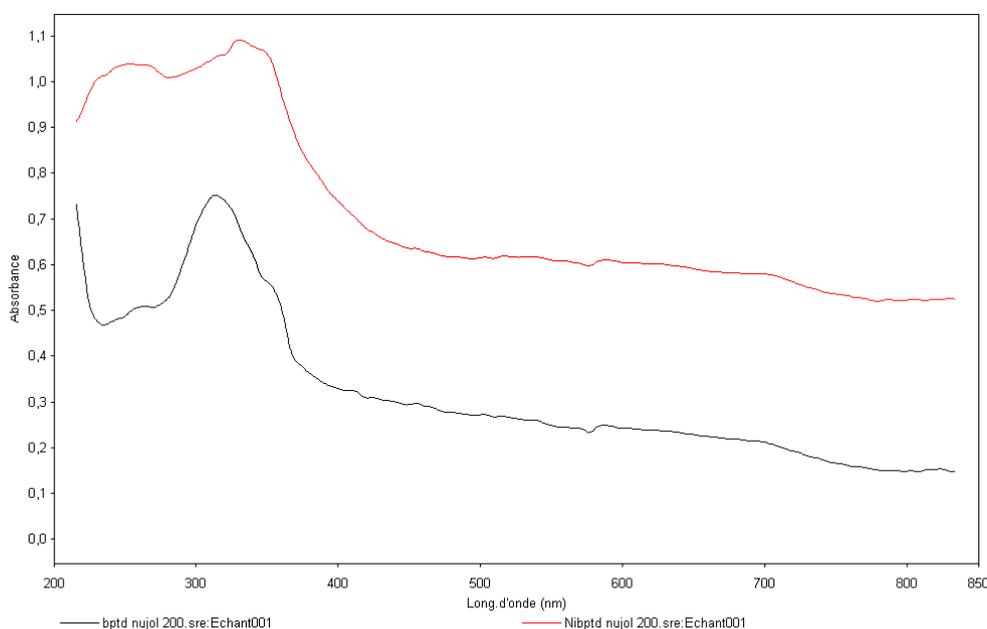


Figure 22 – Spectre UV-Visible du ligand L_2 et son complexe $[Ni(L_2)]$

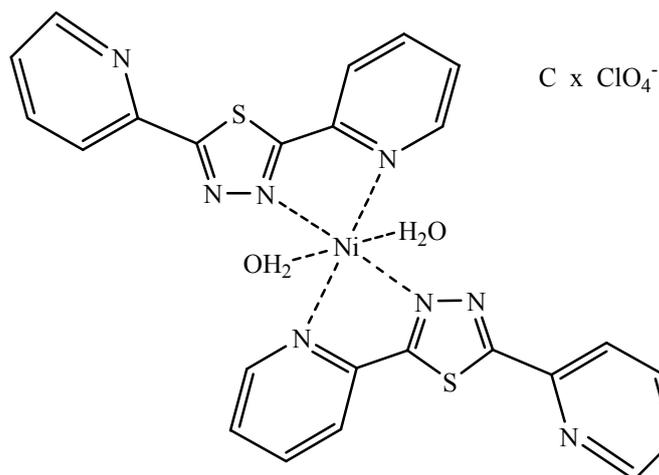


Figure 22a-Structure du complexe $[Ni(L_2)_2(H_2O)_2(ClO_4)_2]$

Dans le domaine de l’ultraviolet le spectre d’absorption électronique du complexe $[Cu(L_2)]$ (Figure 23) affiche deux bandes, la première à 319 nm sous forme d’un pic et la deuxième à 358 nm sous forme d’une bande large. Ces bandes sont attribuées respectivement aux transitions intra-ligand $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$. Dans le visible, le spectre signale deux bandes, la première aux environs de 499 nm due au transfert de charge ligand-métal et la deuxième située vers 663 nm correspond à la transition d-d ${}^2T_{2g} \rightarrow {}^2E_g$ indiquant une géométrie octaédrique autour de l’ion Cu^{2+} (Figure23a).

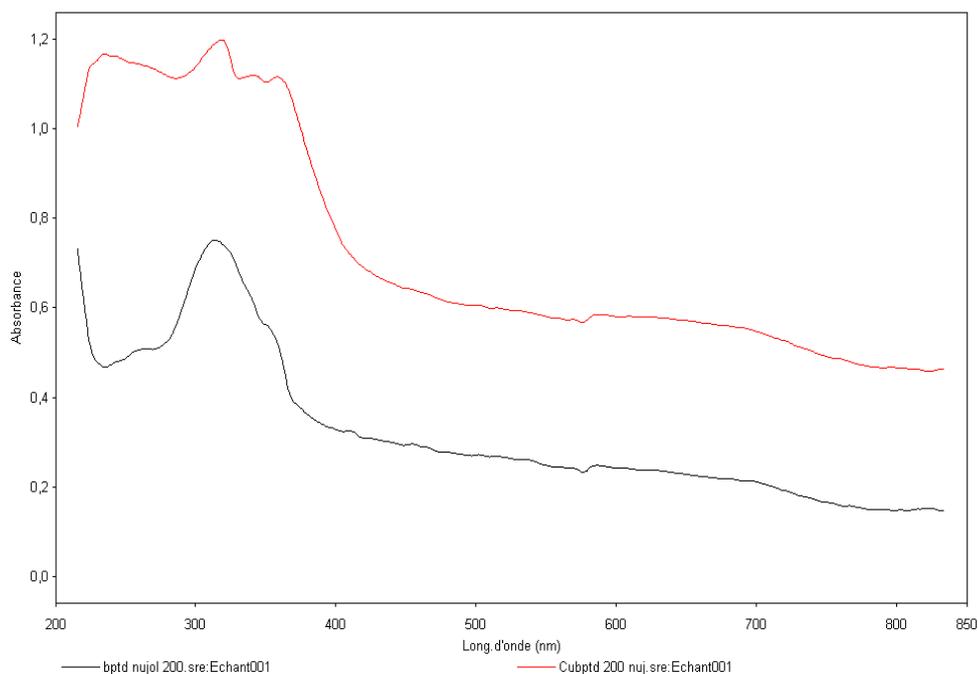


Figure 23 – Spectre UV-Visible du ligand L_2 et son complexe $[Cu(L_2)]$

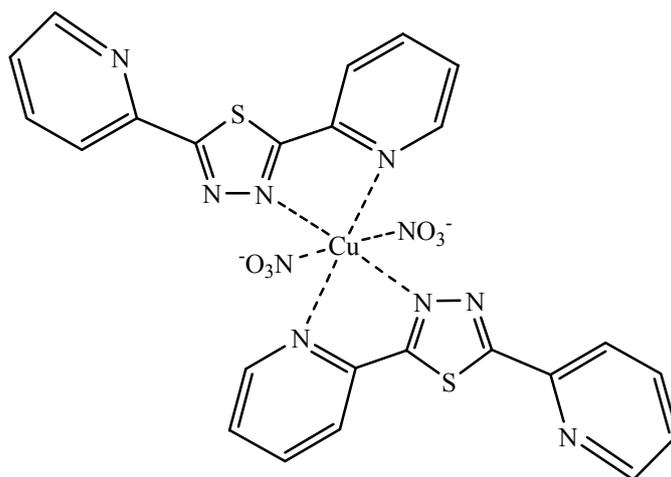


Figure 23a-Structure du complexe $[Cu(L_2)_2(NO_3)_2]$

II.2.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Les données du spectre RMN 1H du 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L_2) dans le chloroforme deutéré, montre deux doublet dédoublet le premier à 7,62 ppm intégrant 2H avec une constante de coulage égale à 6,1Hz et le deuxième à 8,07 ppm intégrant 2H avec une constante de coulage égale à 7,78 Hz . Aussi deux triplet dédoublet le premier à 8,34 ppm intégrant 2H avec une constante de coulage égale à 7,92Hz et le deuxième à 8,76 ppm intégrant 2H avec une constante de coulage égale à 3,96 Hz.

Les données du spectre RMN ^{13}C du ligand L_2 , montre différents signaux : 148,17 ppm (S-N=C-) qui correspond au carbone du cycle thiadiazole , 120,56, 126,22, 130,02 et 150,56 qui correspondent aux carbone du cycle pyridyl.

II.3. Comportement électrochimique

Le voltampérogramme cyclique du ligand L_2 , $[Cu(L_2)]$ et $[Ni(L_2)]$ est réalisé, sur l'électrode de mercure (HMDE), en utilisant le DMSO comme solvant en présence du perchlorate de tétrabutylammonium (TBAP) 0,1 M comme électrolyte support, afin de les comparer à ceux des complexes correspondants dans les mêmes conditions. Effectivement, cette comparaison nous a permis de distinguer le phénomène électrochimique relatif à l'ion métallique (Cu^{2+} et Ni^{2+}) de celui du ligand, dans le milieu considéré. Par la suite, l'étude électrochimique est particulièrement axée sur le comportement redox des ions métalliques des complexes en solution dans le DMSO.

II.3.1. Le voltampérogramme cyclique de 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L_2) dans le DMSO

Un balayage de potentiel dans la région 300-1500 mV, avec une vitesse de balayage égale à 25 mVs^{-1} , est imposé à l'électrode de mercure (HMDE) qui plonge dans les solutions de ligands 1 mmol L^{-1} dans le système DMSO-TBAP $0,1 \text{ mol/L}$.

Le voltampérogramme du ligand L_2 montre, dans la direction anodique, deux pics situés respectivement à 135mV, 1345 mV, et deux pics cathodique situés respectivement à 10 mV et 1435 mV (Figure 24).

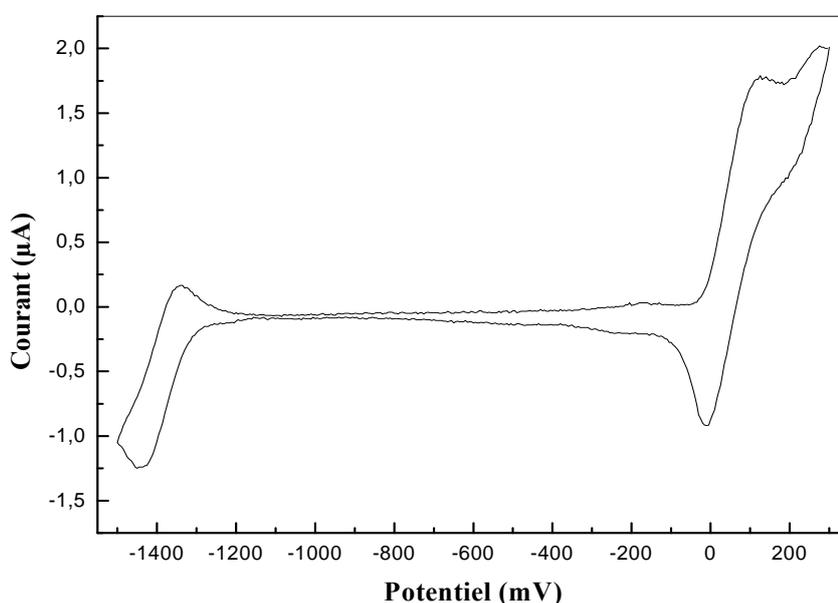


Figure 24 - Voltampérogramme Cyclique de L_2 1 mmol L^{-1} dans le DMSO-TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sur électrode de mercure (HMDE) ; à vitesse de balayage 25 mVs^{-1} et à $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Il est à mentionner que l'électrolyte support $\text{N}(\text{Bu})_4\text{ClO}_4$ dans le DMSO ne montre aucune activité redox dans le domaine de potentiel étudié. Le processus anodique sur la figure 24, correspond alors à un comportement redox du ligand.

II.3.2. Le voltampérogramme cyclique du complexe de $[\text{Ni}(L_2)]$ dérivé de thiadiazole dans le DMSO

Le voltampérogramme cyclique du complexe $[\text{Ni}(L_2)]$ déterminé dans le DMSO en présence du perchlorate de tétrabutylammonium (TBAP) $0,1 \text{ M}$ comme électrolyte support.

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Dans la direction anodique, le voltampérogramme obtenu, montre trois pics correspondant aux valeurs de potentiel anodique E_{pa} égales à 20 mV (p_{a1}), -200 mV (p_{a2}) et -1380 mV (p_{a3}) et dans la direction cathodique, trois pics correspondant aux valeurs de potentiel cathodique E_{pc} égales à -50 mV (p_{c1}), -1060 mV (p_{c2}), -1460 mV (p_{c3}).

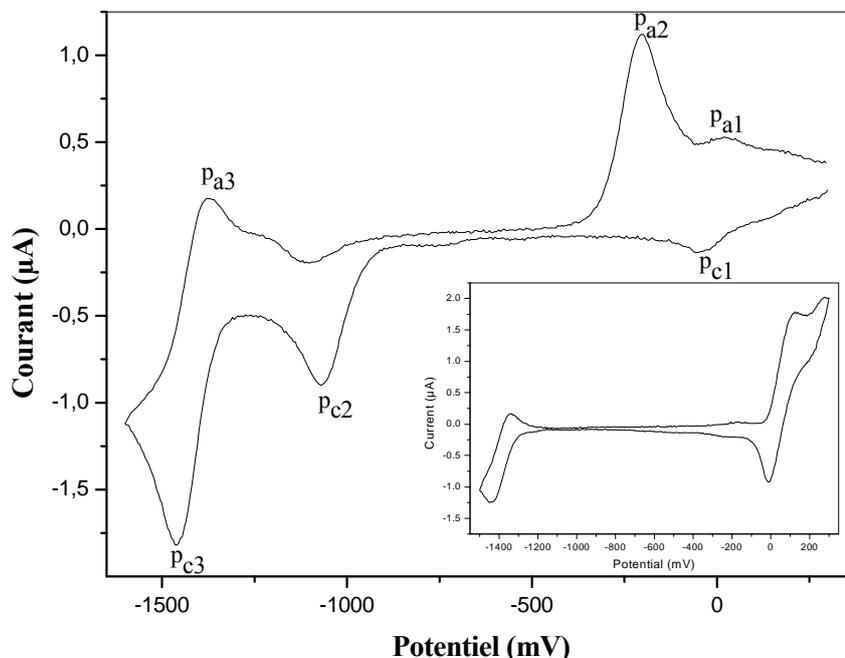


Figure 25 - Voltampérogramme Cyclique de $[Ni(L_2)]$ 2 mmol L^{-1} dans le DMSO-TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sur mercure (HMDE) ; à vitesse de balayage 25 mVs^{-1} et à $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Le processus anodique correspondant au pic 1 et le pic 3 ne peut être que le résultat d'un processus redox du ligand L_2 . L'autre pic (pic 2) observé sur la figure 25, est supposé être le résultat d'une oxydation se passant au niveau de l'ion Ni(II). Etant donné que le but principal de cette étude, est l'investigation du processus associé au pic 2 (p_{2a} , p_{2c}) est assigné au couple redox Ni(0)/Ni(II).

L'ensemble des résultats électrochimiques en l'occurrence les potentiels redox, ΔE_p (différence entre le potentiel de pic anodique et le potentiel de pic cathodique) et les rapports i_{pa}/i_{pc} (i_{pa} = courant de pic anodique, i_{pc} = courant de pic cathodique) obtenus sont classés dans le tableau 8.

Tableau 8 - Variation des potentiels et des courants de pic anodiques et cathodique en fonction de la vitesse de balayage pour le complexe $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ 2 mmol L^{-1}

v (mV/s)	$-E_{pc}$ (V)	i_{pc} (μA)	$-E_{pa}$ (V)	i_{pa} (μA)	ΔE_p (V)	$E_{pc}-E_{p/2}$ (mV)	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pc}/v^{1/2}$ ($\mu\text{A V}^{-1/2}\text{s}^{1/2}$)
25	1.07	0.78	0.20	1.09	0.87	40	1.40	5.20
50	1.08	1.27	0.19	1.38	0.89	50	1.09	5.70
125	1.10	1.92	0.16	1.88	0.93	60	0.98	5.48
250	1.13	2.80	0.14	2.48	0.99	65	0.88	5.59
500	1.14	3.85	0.11	3.55	1.03	70	0.92	5.06
1000	1.17	5.35	0.06	4.30	1.11	80	0.80	5.35

Ce couple redox étudié à différentes vitesses de balayage v , allant de 10 à 2000 mVs^{-1} , montre une variation linéaire d' i_{pa2} (pic de courant d'oxydation) avec $v^{1/2}$ pour des concentrations inférieures ou égales à 3 mmol L^{-1} (Figure 26, 27). Aussi, la pente $\Delta E/\Delta \log v$, estimée à une valeur de $0,046 \text{ V}$, est plus grande à celle caractérisant un processus réversible. Tout cela nous permet de suggérer que le processus $\text{Ni}(0)/\text{Ni}(\text{II})$ au niveau du complexe considéré pour des concentrations $\leq 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ est irréversible. On a aussi déterminé la valeur du coefficient de symétrie α , en utilisant l'équation 4 [121]. Cette valeur évaluée à $0,49$ quand n est égale à 2 , confirme la nature irréversible du processus $\text{Ni}(0)-\text{Ni}(\text{II})$ à l'électrode.

$$E_p - E_{p/2} = \frac{48 \text{ mV}}{\alpha n} \quad (T= 25^\circ\text{C})$$

Où $E_{p/2}$ est le potentiel de demi-pic et n est le nombre d'électrons mis en jeu dans l'oxydation de $\text{Ni}(\text{II})$.

Pour les valeurs E_p et $E_{p/2}$, on a utilisé le voltampérogramme du complexe en question pour une concentration de 2 mmol L^{-1} et une vitesse de balayage de 25 mV .

D'un autre côté, pour des concentrations plus élevées ($> 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) et pour des vitesses de balayage supérieures à 500 mVs^{-1} , les Figures 26 et 27 montrent que i_p augmente plus linéairement en fonction de $v^{1/2}$. Ces critères constituent la preuve d'une oxydation et

réduction irréversible accompagnée d'une réaction chimique homogène à des concentrations supérieures à $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ en ce complexe.

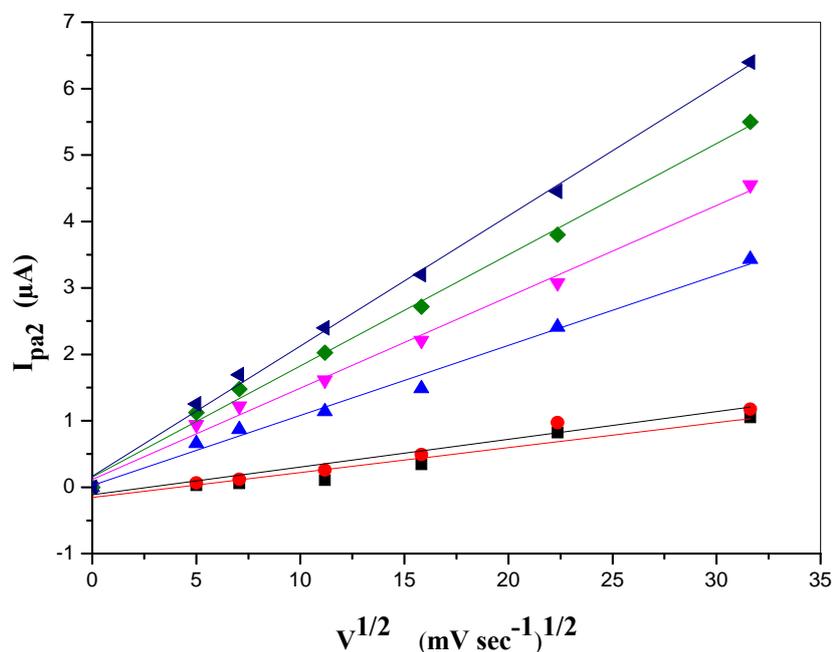


Figure 26 - Variation du courant de pic anodique 2, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1M ; 25 °C à différentes concentrations : (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.5; (◆) 2.0; (►) 2.5 mmol L^{-1}

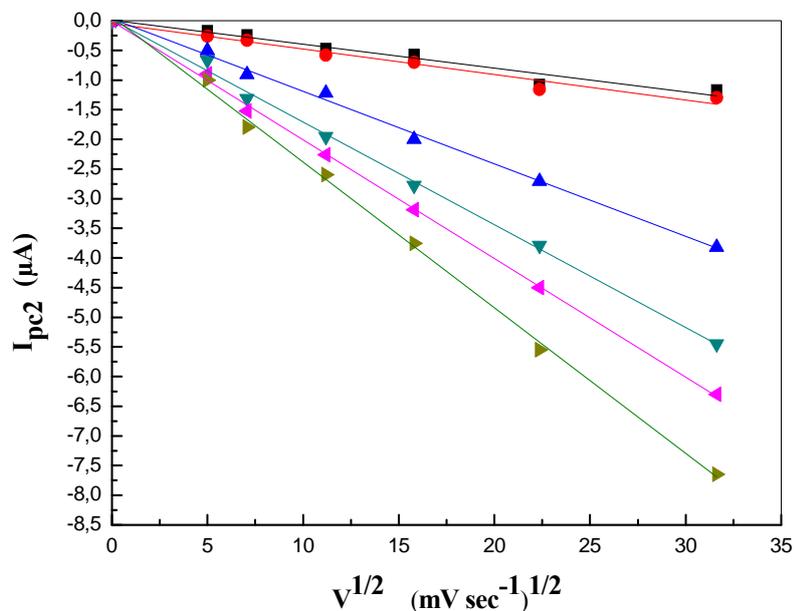


Figure 27 - Variation du courant de pic cathodique 2, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1M ; 25 °C à différentes concentrations : (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.5; (◄) 2.0; (►) 2.5 mmol L^{-1} .

D'autre part, pour le complexe $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ on remarque qu'à différentes vitesses de balayage (25, 50, 125, 250, 500, 1000), le pic anodique (p_{a2}) se déplace vers les sens positive et le pic cathodique (p_{c2}) se déplace vers le sens négative, d'où l'augmentation de ΔE_p (Figure 28).

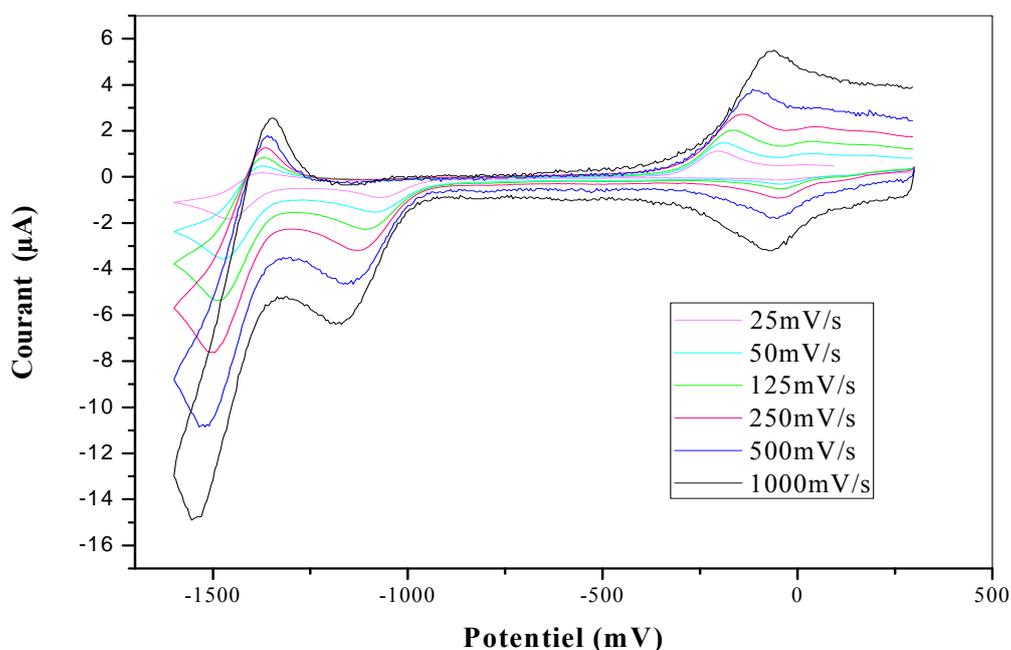


Figure 28 -Voltammogrammes Cycliques $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ 2 mmol L^{-1} dans le dans le DMSO-TBAP $0,1\text{M}$ à différentes vitesses de balayage 25, 50, 125, 250, 500, 1000 (mV sec^{-1}).

II.3. 3. Le voltampérogramme cyclique du complexe de $[\text{Cu}(\text{L}_2)]$ dérivé de thiadiazole dans le DMSO

Dans les même conditions on reporte, sur la figure 29 le voltampérogramme du complexe $[\text{Cu}(\text{L}_2)]$ déterminé dans le DMSO en présence du perchlorate de tétrabutylammonium (TBAP) $0,1 \text{ M}$ comme électrolyte support.

Le voltampérogramme obtenu, dans la direction anodique, affiche trois pics d'oxydation p_{a1} , p_{a2} , p_{a3} correspondant aux valeurs de potentiel E_{pa} égales à 270, 75, -1330 mV et dans la direction cathodique, il affiche trois pics de réduction p_{c1} , p_{c2} , p_{c3} correspondant aux valeurs de potentiel E_{pc} égales à 145, 200, -1450 mV à vitesse de balayage v égale à 25 mV s^{-1} .

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Les processus anodiques relatifs aux pics p_{a2} et p_{a3} , ainsi que les pics cathodiques p_{c2} et p_{c3} , résultent du processus redox du ligand (L_2). Ces signaux sont aussi observés sur le voltampérogramme cyclique de (L_2) seul, établi dans les mêmes conditions.

Le pic 1 observé sur la figure 29, est supposé être le résultat d'une oxydoréduction du couple $Cu(II) / Cu(0)$. Le pic cathodique p_{c1} résulte de la réduction de $Cu(II)$ en $Cu(0)$ et le pic anodique p_{a1} résulte de l'oxydation du $Cu(0)$ en $Cu(II)$.

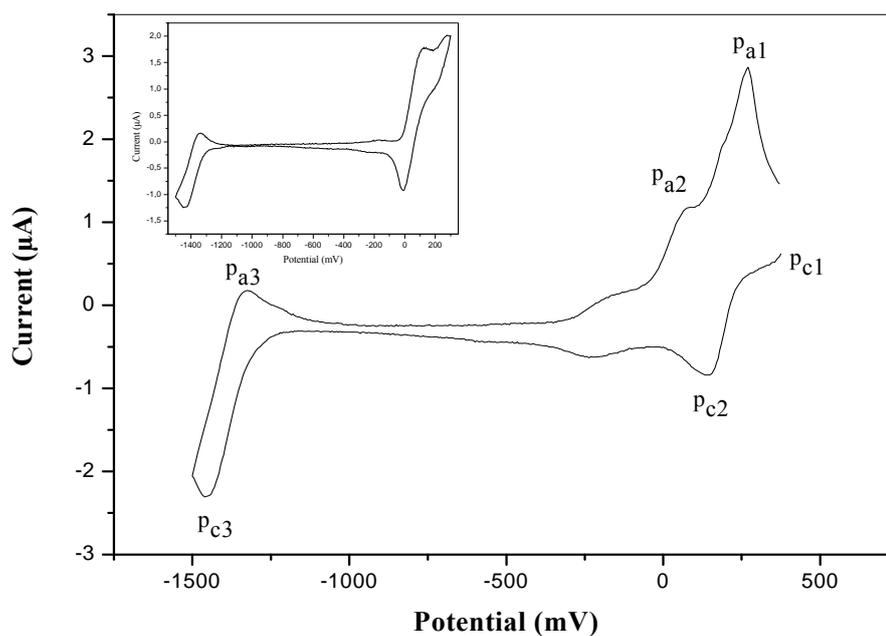


Figure 29 - Voltampérogramme Cyclique de $[Cu(L_2)]$ 1,5 mmol/L dans le DMSO-TBAP 0,1 mol/L sur mercure (HMDE) ; à vitesse de balayage 25 mVs^{-1} et à $25 \text{ }^\circ\text{C}$

D'autre part nous remarquons qu'à différente vitesse de balayage le courant à la fois cathodique et anodique augmente linéairement avec l'augmentation de la vitesse. La position du pic cathodique légèrement décalé vers le potentiel négatif et le pic anodique peu décalé vers le sens positif de la vitesse de balayage (Figure 30), ceci peut être dû, au fait que la réaction de transfert électronique est suivie par une réaction chimique [122].

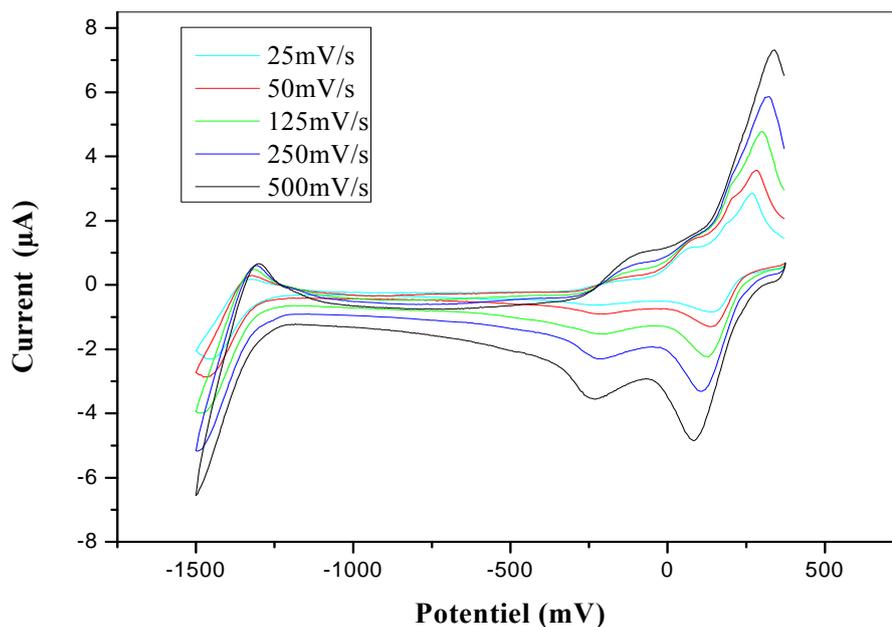


Figure 30 - Voltamogrammes Cycliques $[Cu(L_2)]$ 1,5 mmol/L dans le DMSO-TBAP 0,1M à différentes vitesses de balayage 25, 50, 125, 250, 500 ($mV\ sec^{-1}$).

Le Voltamogramme Cyclique du complexe $[Cu(L_2)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1M à différentes concentrations 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ($mmol\ L^{-1}$) à vitesse 25 ($mV\ sec^{-1}$) est enregistré dans la figure 31. Les courants cathodique et anodique (i_{pa1} , i_{pc1}) augmentent avec les concentrations de Cu (II). Ces comportements peuvent être dus à la présence d'une grande quantité d'espèces électroactives à concentration plus élevée [123, 124]. Le système suit également un mécanisme de diffusion contrôlée [125].

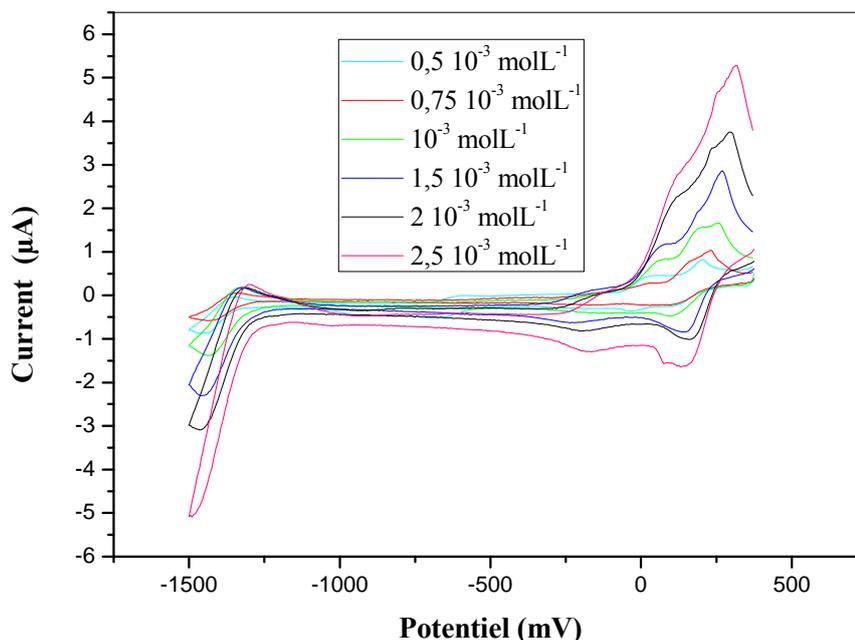


Figure 31 - Voltamogrammes Cycliques $[Cu(L_2)]$ 1,5 mmol/L dans le DMSO-TBAP 0,1M à différentes concentrations 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5 ($mmol L^{-1}$) à vitesse $25(mV sec^{-1})$.

L'ensemble des résultats électrochimiques en l'occurrence les potentiels redox, ΔE_p (différence entre le potentiel de pic anodique et le potentiel de pic cathodique) et les rapports i_{pa}/i_{pc} (i_{pa} = courant de pic anodique, i_{pc} = courant de pic cathodique) obtenus sont classés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Variation des potentiels et des courants de pic anodiques et cathodique en fonction de la vitesse de balayage pour le complexe $[Cu(L_2)]$ 1,5 mmol L^{-1}

Vitesse de Balayage (mVs-1)	Racine de Vitesse de Balayage $v^{1/2}$	Pic du courant (μA)		pic du potentiel (mV)		$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$	i_{pa} / i_{pc}
		i_{pa}	$(-)i_{pc}$	E_{pa}	E_{pc}		
25	5	1,46	0,83	270	150	120	1,74
50	7,07	1,80	1,27	280	145	135	1,41
125	11,18	2,70	2,23	300	130	170	1,20
250	15,81	3,66	3,31	320	110	210	1,10
500	22,36	5,27	4,84	340	85	255	1,08

L'étude de l'influence de la vitesse de balayage de potentiel sur le courant de pic 1 montre une relation linéaire du courant I_p en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. La représentation graphique ($I_p = f(v^{1/2})$) en figure 32 et 33, montre des droites pour des concentrations du complexe $[Cu(L_2)]$ allant jusqu'à $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. De plus, une valeur de pente égale à 0,55 déduite de la représentation graphique $\log i_p = f(\log v)$ (Figure 35), comprise dans l'intervalle 0,5-0,66 est très proche de la valeur théorique (0,5). Cela confirme que le processus de l'électrode est contrôlé par diffusion [126] et le pic de courant i_p est contrôlé par transfert de charge et transport de masse [122,127]. Le rapport entre le courant de pic d'oxydation et de réduction correspondant à i_{pa} / i_{pc} est proche de 1 ce qui correspond à un système quasi-réversibles [123, 124] (Figure 34).

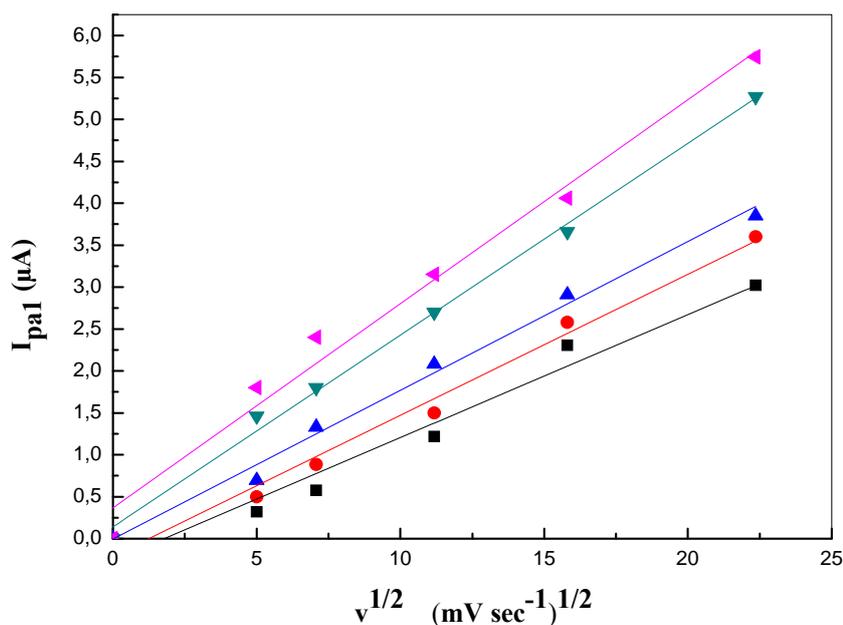


Figure 32 - Variation du courant de pic anodique 1, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour $[Cu(L_2)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1M ; 25 °C à différentes concentrations : (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (►) 1.5; (▼) 2.0 mmol L^{-1}

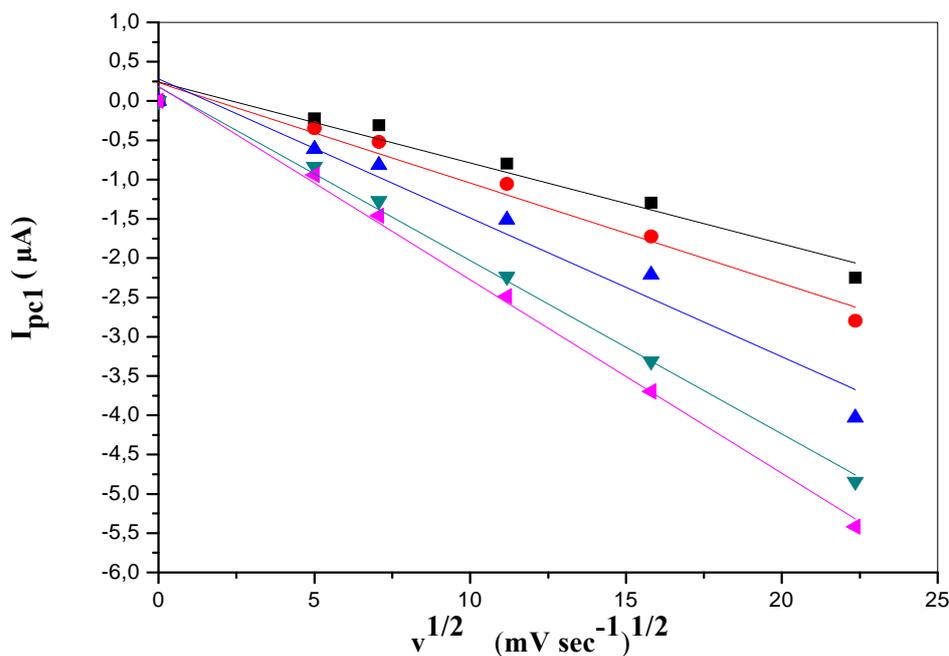


Figure 33 - Variation du courant de pic cathodique 1, en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, pour $[Cu(L_2)]$ dans le DMSO-TBAP 0,1M ; 25 °C à différentes concentrations: (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (►) 1.5; (▼) 2.0 $mmol L^{-1}$

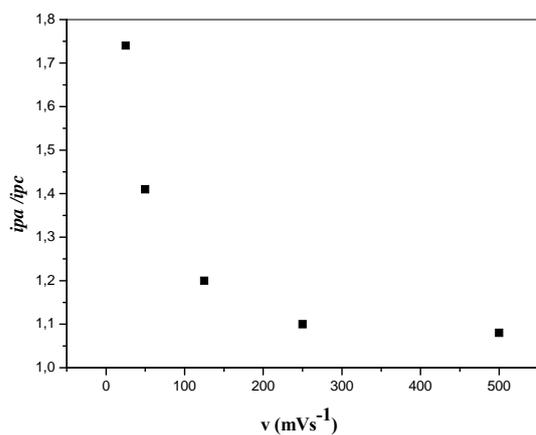


Figure 34 - Variation du courant i_{pa} / i_{pc} en fonction de la vitesse à 1,5 $mmol L^{-1}$

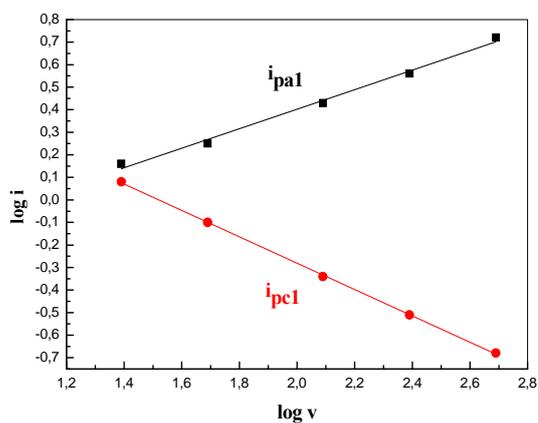


Figure 35 - Variation de $\log i_p$ en fonction de $\log v$ pour $[Cu(L_2)]$ à 1,5 $mmol L^{-1}$

III. VALORISATION BIOLOGIQUE : ETUDE IN VITRO

III.1. Effets biologiques in vitro 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine (L₁) et son complexe [Cu(L₁)]

III.1.1. Prolifération des lymphocytes en présence de (L₁) et son complexe [Cu(L₁)]

La présence du ligand L₁ dans le milieu de culture à des concentrations de 1 à 50 µM n'a aucun effet sur la prolifération lymphocytaire par rapport à la prolifération en présence de l'agent mitogène Con A seul. Par contre, il entraîne une réduction significative de la prolifération stimulée par l'agent mitogène Con A des lymphocytes humains aux concentrations plus élevées (100 µM) (Tableau 10).

Le complexe [Cu(L₁)] provoque une réduction significative de l'index de stimulation (IS) à une concentration allant de 1 µM à 100 µM.

Tableau 10 - Effets de L₁ et son complexe [Cu(L₁)] sur la prolifération in vitro (index de stimulation, IS) des lymphocytes.

	Ligand L ₁	Complexe [Cu(L ₁)]
ConA	197.50 ± 11.60 ^a	197.50 ± 11.60 ^a
ConA+ 1µM	195.73 ± 10.23 ^a	154.70 ± 10.33 ^b
ConA+ 10µM	195.66 ± 15.27 ^a	130.58 ± 8.29 ^c
ConA+50µM	190.72 ± 10.52 ^a	103.50 ± 8.22 ^d
ConA+100µM	146.52 ± 8.35 ^b	76.30 ± 6.52 ^e

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. ^{a, b, c, d, e} indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p < 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

III.1.2. Effets de L₁ et son complexe [Cu(L₁)] sur la sécrétion des cytokines

La sécrétion des cytokines IL-2 et INFγ (qui représente le phénotype Th1), et IL-4 (Th2 phénotype) est examinée après 48 h de culture.

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Les sécrétions des cytokines (IL2, INF γ et IL4) par les lymphocytes sont significativement réduites en présence du ligand L₁ à partir de 100 μ M. Dans ce cas, le ligand L₁ induit une augmentation significative du rapport Th1/Th2 représenté par le rapport (INF γ /IL-4).

Le complexe [Cu(L₁)] induit une diminution significative des IL-2 et INF γ à partir de 10 μ M, alors que l'IL-4 ne change pas. Ainsi, le rapport Th1/Th2 diminue en présence du complexe CuL₁ (Tableau 11).

III.1.3. Effets de L₁ et son complexe [Cu(L₁)] sur les teneurs en glutathion réduit (GSH), en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes

En présence du ligand L₁ les teneurs en GSH ne varient pas quelque soit la concentration utilisée. Par contre, le ligand L₁ induit une augmentation significative des teneurs intracellulaires en hydroperoxydes et en protéines carbonylées à une concentration de 100 μ M.

Le complexe [Cu(L₁)] n'entraîne aucune variation significative du contenu en GSH, en hydroperoxydes et en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes quelque soit la concentration utilisée (Figure 36, Tableau 12).

III.1.4. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence L₁ et son complexe [Cu(L₁)]

L'activité de la catalase lymphocytaire montre une diminution significative à partir de 100 μ M en présence du ligand L₁, par contre elle ne présente aucune variation en présence du complexe [Cu(L₁)] (Figure 37, Tableau 13).

Le ligand L₁ à une concentration de 100 μ M entraîne une diminution significative de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) des lymphocytes. Cependant, elle est significativement augmentée en présence du complexe [Cu(L₁)] à des concentrations croissantes (1-100 μ M).

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Tableau 11 - Sécrétion des cytokines Th1 (IL-2, INF γ) et Th2 (IL-4) par les lymphocytes en présence de L₁ et son complexe [Cu(L₁)].

	Ligand L ₁	Complexe [Cu(L ₁)]
IL-2 (Pg/mL)		
ConA	4056.50 ± 89.76 ^a	4056.50 ± 89.76 ^a
ConA+ 1 μ M	4023.16 ± 72.46 ^a	3367.30 ± 84.34 ^b
ConA+ 10 μ M	4005.60 ± 91.35 ^a	3008.29 ± 70.54 ^c
ConA+50 μ M	3978.83 ± 93.28 ^a	2562.50 ± 68.52 ^d
ConA+100 μ M	2703.78 ± 80.44 ^b	1842.31 ± 67.67 ^e
INFγ (Pg/mL)		
ConA	405.40 ± 29.63 ^a	405.40 ± 29.63 ^a
ConA+ 1 μ M	403.55 ± 24.53 ^a	328.17 ± 20.10 ^b
ConA+ 10 μ M	402.53 ± 26.48 ^a	302.02 ± 16.18 ^c
ConA+50 μ M	401.44 ± 30.04 ^a	243.27 ± 15.34 ^d
ConA+100 μ M	322.41 ± 20.01 ^b	186.31 ± 15.58 ^e
IL-4 (Pg/mL)		
ConA	45.05 ± 6.35 ^a	45.05 ± 6.35 ^a
ConA+ 1 μ M	43.21 ± 3.67 ^a	45.12 ± 4.25 ^a
ConA+ 10 μ M	42.26 ± 3.33 ^a	44.53 ± 4.52 ^a
ConA+50 μ M	41.77 ± 4.66 ^a	44.60 ± 4.67 ^a
ConA+100 μ M	31.56 ± 3.25 ^b	43.87 ± 4.17 ^a
INFγ/IL-4		
ConA	9.05 ± 0.53 ^b	9.05 ± 0.53 ^a
ConA+ 1 μ M	9.33 ± 0.32 ^b	7.27 ± 0.31 ^b
ConA+ 10 μ M	9.52 ± 0.54 ^b	6.78 ± 0.25 ^c
ConA+50 μ M	9.61 ± 0.40 ^b	5.45 ± 0.22 ^d
ConA+100 μ M	10.25 ± 0.28 ^a	4.24 ± 0.25 ^e

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0,05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

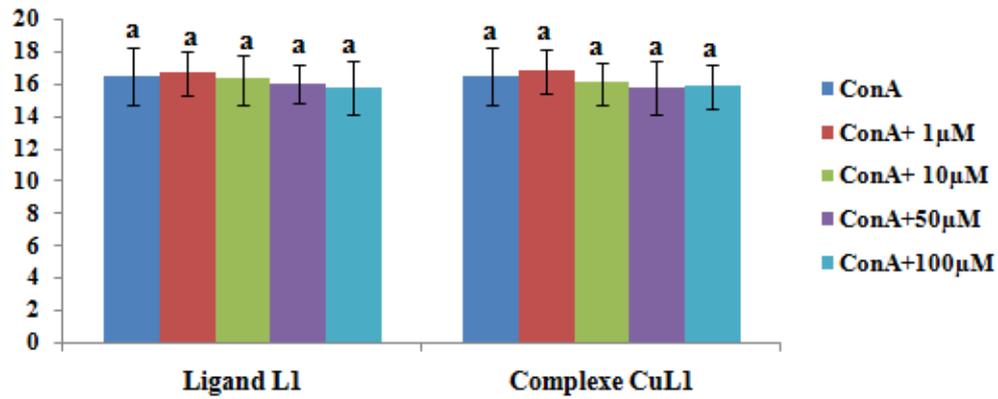
CHAPIRE III : Résultats et discussions

Tableau 12 - Teneurs intracellulaires en glutathione (GSH), hydroperoxydes et protéines carbonylées des lymphocytes en présence de L₁ et son complexe [Cu(L₁)].

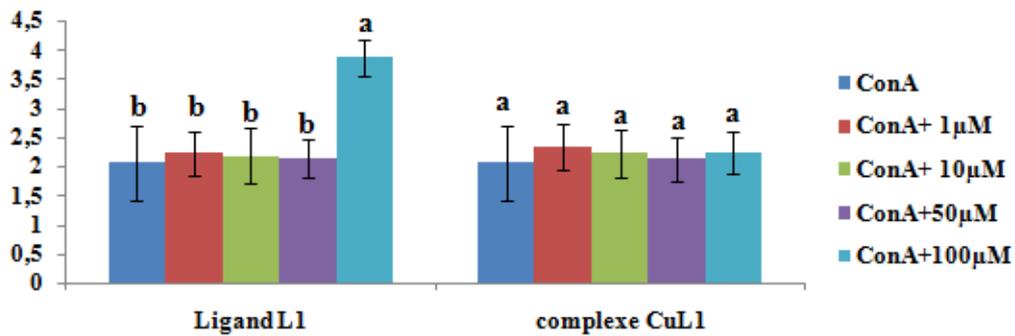
	Ligand	Complexe
	L ₁	[Cu(L ₁)]
GSH(nM/10⁶cellules)		
ConA	16.50 ± 1.76 ^a	16.50 ± 1.76 ^a
ConA+ 1µM	16.66 ± 1.32 ^a	16.80 ± 1.33 ^a
ConA+ 10µM	16.30 ± 1.55 ^a	16.04 ± 1.29 ^a
ConA+50µM	16.02 ± 1.22 ^a	15.79 ± 1.62 ^a
ConA+100µM	15.78 ± 1.63 ^a	15.88 ± 1.36 ^a
HYDP(nM/10⁶cellules)		
ConA	2.06 ± 0.63 ^b	2.06 ± 0.63 ^a
ConA+ 1µM	2.22 ± 0.37 ^b	2.33 ± 0.40 ^a
ConA+ 10µM	2.18 ± 0.48 ^b	2.22 ± 0.41 ^a
ConA+50µM	2.15 ± 0.32 ^b	2.13 ± 0.37 ^a
ConA+100µM	3.87 ± 0.31 ^a	2.24 ± 0.43 ^a
PCAR(nM/10⁶cellules)		
ConA	2.05 ± 0.35 ^b	2.05 ± 0.35 ^a
ConA+ 1µM	2.33 ± 0.44 ^b	2.02 ± 0.44 ^a
ConA+ 10µM	2.28 ± 0.30 ^b	2.13 ± 0.35 ^a
ConA+50µM	2.35 ± 0.28 ^b	2.10 ± 0.31 ^a
ConA+100µM	3.66 ± 0.21 ^a	2.17 ± 0.36 ^a

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p < 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

Teneurs en GSH des lymphocytes en présence de Ligand L1 et son complexe de cuivre



Teneurs en HYDP des lymphocytes en présence de Ligand L1 et son complexe de cuivre



Teneurs en PCAR des lymphocytes en présence de Ligand L1 et son complexe de cuivre

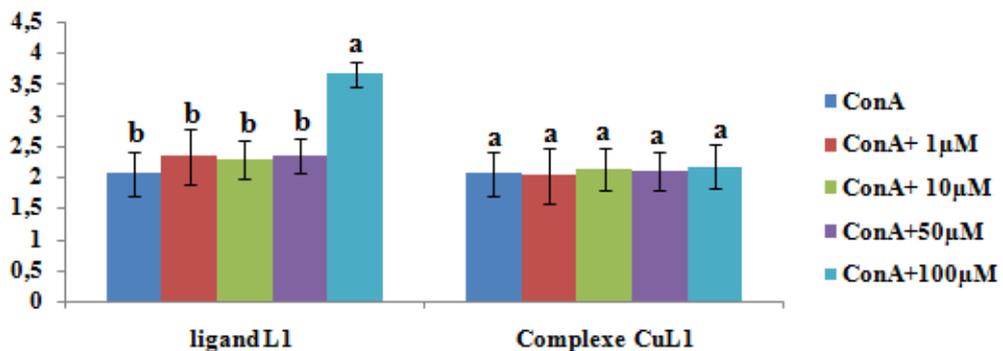


Figure 36 - Teneurs intracellulaires en glutathione (GSH), hydroperoxydes et protéines carbonylées des lymphocytes en présence de L₁ et son complexe [Cu(L₁)].

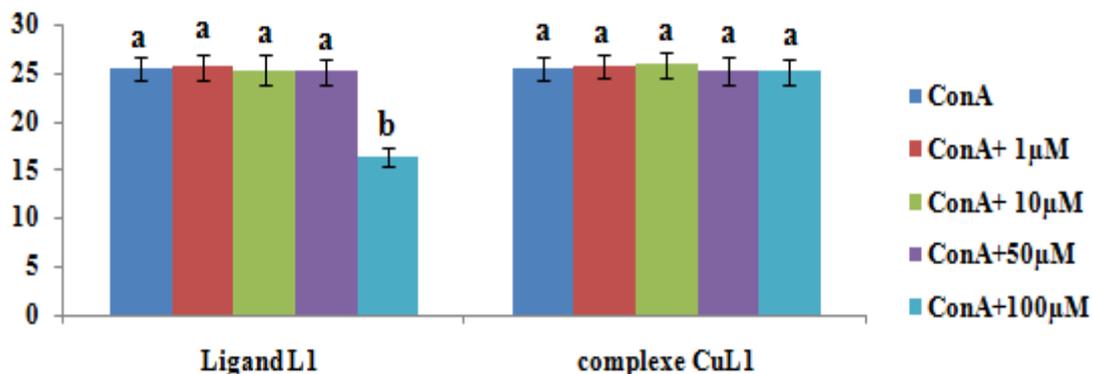
CHAPIRE III : Résultats et discussions

Tableau 13- Activités des enzymes antioxydantes des lymphocytes en présence de de L₁ et son complexe [Cu(L₁)].

	Ligand	Complexe
	L₁	[Cu(L₁)]
Catalase (U/mg)		
ConA	25.50 ± 1.26 ^a	25.50 ± 1.26 ^a
ConA+ 1µM	25.66 ± 1.38 ^a	25.73 ± 1.25 ^a
ConA+ 10µM	25.32 ± 1.52 ^a	25.82 ± 1.33 ^a
ConA+50µM	25.18 ± 1.27 ^a	25.22 ± 1.46 ^a
ConA+100µM	16.38 ± 1.02 ^b	25.23 ± 1.31 ^a
SOD (U/mg)		
ConA	82.03 ± 2.65 ^a	82.03 ± 2.65 ^e
ConA+ 1µM	80.56 ± 2.05 ^a	97.13 ± 1.66 ^d
ConA+ 10µM	81.76 ± 2.48 ^a	122.37 ± 1.68 ^c
ConA+50µM	82.33 ± 2.26 ^a	144.53 ± 2.37 ^b
ConA+100µM	52.37 ± 2.01 ^b	208.04 ± 4.57 ^a

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

Activités de la catalase des lymphocytes en présence de Ligand L1 et son complexe de cuivre



Activités de la SOD des lymphocytes en présence de Ligand L1 et son complexe de cuivre

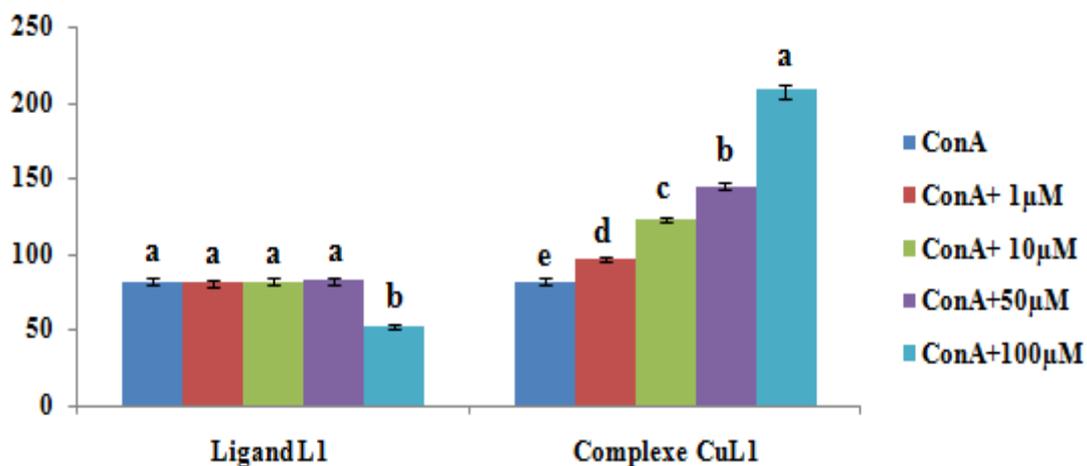


Figure 37 - Activités des enzymes antioxydantes des lymphocytes en présence de L_1 et son complexe $[Cu(L_1)]$.

III.2. Effets biologiques in vitro du 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4- thiadiazole (L₂) et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)]

III.2.1. Prolifération des lymphocytes en présence du L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)]

La prolifération des lymphocytes en présence des composés L₂, [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] est significativement variable puisque l'index de stimulation (IS) est différent selon les incubations.

Les résultats montrent que le ligand L₂ n'a aucun effet sur la prolifération des lymphocytes, à la concentration de 1 µM à 50 µM. Cependant, des concentrations de 100 µM du composé 3 induit une inhibition significative de la prolifération stimulée par l'agent mitogène Con A des lymphocytes humains (Tableau 14). Le complexe [Cu(L₂)] induit une réduction significative de l'IS à une concentration de 10 µM et plus. Le complexe [Ni(L₂)], à une concentration de 1 µM à 100 µM, entraîne une inhibition significative de la prolifération des lymphocytes stimulés par Con A, comme indiqué par la diminution du IS. Les cellules T sont plus sensibles au complexe [Ni(L₂)] à des concentrations faibles par rapport à leur réactivité avec le ligand L₂ et [Cu(L₂)].

Tableau 14- Effets in vitro de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] sur la prolifération des lymphocytes (Index de Stimulation index, IS).

	Ligand	Complexe	Complexe
	L₂	[Cu(L₂)]	[Ni(L₂)]
ConA	197.50 ± 11.60 ^a	197.50 ± 11.60 ^a	197.50 ± 11.60 ^a
ConA+ 1µM	192.57 ± 12.25 ^a	194.70 ± 10.11 ^a	142.50 ± 12.13 ^b
ConA+ 10µM	190.40 ± 13.44 ^a	150.58 ± 10.15 ^b	108.52 ± 10.34 ^c
ConA+50µM	189.37 ± 8.35 ^a	128.70 ± 6.82 ^c	78.40 ± 4.66 ^d
ConA+100µM	116.50 ± 7.03 ^b	80.40 ± 7.41 ^c	50.40 ± 4.32 ^e

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

III.2.2. Effets de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] sur la sécrétion des cytokines

La sécrétion des cytokines (IL-2 et IFN γ) est réduite en présence du ligand L₂ à la concentration de 100 μ M, et celle de l'IL-4 à 50 μ M et plus. Dans ce cas, le ligand L₂ induit une augmentation significative du rapport Th1/Th2 (IFN γ /IL-4). Les mêmes variations sont notées en présence du complexe [Ni(L₂)] mais à des concentrations plus faibles, soit 1 μ M. Cependant, en présence du complexe [Cu(L₂)], on note une diminution des IL-2 et IFN γ à partir de 10 μ M, alors que IL-4 ne change pas. Ainsi, le rapport Th1/Th2 diminue en présence du complexe [Cu(L₂)] (Tableau 15).

III.2.3. Effets de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] sur les marqueurs du stress oxydatif des lymphocytes

III.2.3.1. Teneurs lymphocytaires en glutathion (GSH), en hydroperoxydes et en protéines carbonylées

Le ligand L₂ entraîne une réduction significative des teneurs en GSH lymphocytaire à des concentrations de 100 μ M. Les complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] provoquent une diminution significative des teneurs lymphocytaires en GSH, d'une manière dose-dépendante.

Les concentrations du ligand L₂ utilisées (1 jusqu'à 50 μ M) dans les cultures des lymphocytes n'affectent pas les teneurs en hydroperoxydes et protéines carbonylées lymphocytaires ; par contre ces dernières sont augmentées en présence du ligand L₂ à une concentration de 100 μ M. Les complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)] induisent des augmentations significatives des teneurs en hydroperoxydes et en protéines carbonylées et les valeurs les plus élevées ont été obtenu par le complexe [Ni(L₂)] (figure 38, Tableau 16).

III.2.4. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)]

Le ligand L₂ entraîne une réduction significative de l'activité de la catalase et de la SOD des lymphocytes à des concentrations de 100 μ M. Le complexe [Cu(L₂)] n'affecte pas l'activité intracellulaire de la catalase mais entraîne une augmentation significative de l'activité SOD à partir de 10 μ M. Le complexe [Ni(L₂)] provoque une diminution significative des activités de la catalase et de la SOD des lymphocytes d'une manière dose dépendante (figure 39, Tableau 17).

Tableau 15 - Sécrétion des cytokines Th1 (IL-2, INF γ) et Th2 (IL-4) par les lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)].

	Ligand	Complexe	Complexe
	L₂	[Cu(L₂)]	[Ni(L₂)]
IL-2 (Pg/mL)			
ConA	4056.50 ± 89.76 ^a	4056.50 ± 89.76 ^a	4056.50 ± 89.76 ^a
ConA+ 1 μ M	3927.03 ± 102.44 ^a	4154.30 ± 114.27 ^a	2523.50 ± 112.35 ^b
ConA+ 10 μ M	3905.60 ± 111.53 ^a	3408.52 ± 110.22 ^b	2104.31 ± 110.41 ^c
ConA+50 μ M	3870.75 ± 118.52 ^a	2688.40 ± 73.85 ^c	1684.60 ± 84.56 ^d
ConA+100 μ M	2008.51 ± 122.33 ^b	1940.50 ± 87.16 ^d	1350.30 ± 64.27 ^e
INFγ (Pg/mL)			
ConA	405.40 ± 29.63 ^a	405.40 ± 29.63 ^a	405.40 ± 29.63 ^a
ConA+ 1 μ M	400.08 ± 22.45 ^a	404.88 ± 24.70 ^a	323.10 ± 12.54 ^b
ConA+ 10 μ M	392.70 ± 21.54 ^a	329.42 ± 20.04 ^b	254.36 ± 11.32 ^c
ConA+50 μ M	400.75 ± 28.22 ^a	287.50 ± 18.85 ^c	205.30 ± 10.47 ^d
ConA+100 μ M	344.56 ± 16.53 ^b	200.22 ± 17.65 ^d	172.31 ± 7.22 ^e
IL-4 (Pg/mL)			
ConA	45.05 ± 6.35 ^a	45.05 ± 6.35 ^a	45.05 ± 6.35 ^a
ConA+ 1 μ M	40.85 ± 4.53 ^a	44.82 ± 4.73 ^a	33.42 ± 2.51 ^b
ConA+ 10 μ M	39.32 ± 4.22 ^a	45.41 ± 3.65 ^a	24.65 ± 2.41 ^c
ConA+50 μ M	37.55 ± 4.03 ^b	43.50 ± 3.66 ^a	18.50 ± 1.65 ^d
ConA+100 μ M	30.77 ± 5.04 ^c	44.19 ± 4.58 ^a	14.01 ± 1.24 ^e
INFγ/IL-4			
ConA	9.05 ± 0.53 ^c	9.05 ± 0.53 ^a	9.05 ± 0.53 ^e
ConA+ 1 μ M	9.78 ± 0.40 ^c	9.03 ± 0.40 ^a	9.70 ± 0.34 ^d
ConA+ 10 μ M	9.98 ± 0.54 ^c	7.25 ± 0.34 ^b	10.36 ± 0.32 ^c
ConA+50 μ M	10.68 ± 0.22 ^b	6.34 ± 0.30 ^c	11.10 ± 0.57 ^b
ConA+100 μ M	11.26 ± 0.53 ^a	4.72 ± 0.45 ^d	12.04 ± 0.42 ^a

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm ET. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations ($p < 0,05$). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Tableau 16 - Teneurs intracellulaires en glutathione (GSH), hydroperoxydes et protéines carbonylées des lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)].

	Ligand	Complexe	Complexe
	L ₂	[Cu(L ₂)]	[Ni(L ₂)]
GSH(nM/10⁶cells)			
ConA	16.50 ± 1.76 ^a	16.50 ± 1.76 ^a	16.50 ± 1.76 ^a
ConA+ 1µM	17.03 ± 1.44 ^a	15.80 ± 1.27 ^a	10.50 ± 1.35 ^b
ConA+ 10µM	15.60 ± 2.03 ^a	10.52 ± 1.02 ^b	8.31 ± 0.48 ^c
ConA+50µM	16.75 ± 1.32 ^a	8.42 ± 0.85 ^c	6.60 ± 0.56 ^d
ConA+100µM	8.22 ± 1.03 ^b	6.10 ± 0.56 ^d	4.33 ± 0.47 ^e
HYDP(nM/10⁶cells)			
ConA	2.06 ± 0.63 ^b	2.06 ± 0.63 ^d	2.06 ± 0.63 ^e
ConA+ 1µM	2.08 ± 0.45 ^b	2.48 ± 0.50 ^d	3.10 ± 0.54 ^d
ConA+ 10µM	2.30 ± 0.54 ^b	3.42 ± 0.34 ^c	4.26 ± 0.32 ^c
ConA+50µM	2.45 ± 0.42 ^b	4.10 ± 0.25 ^b	5.30 ± 0.47 ^b
ConA+100µM	4.58 ± 0.53 ^a	5.32 ± 0.35 ^a	6.41 ± 0.52 ^a
PCAR(nM/10⁶cells)			
ConA	2.05 ± 0.35 ^b	2.05 ± 0.35 ^d	2.05 ± 0.35 ^e
ConA+ 1µM	2.45 ± 0.53 ^b	2.22 ± 0.53 ^d	3.42 ± 0.51 ^d
ConA+ 10µM	2.32 ± 0.34 ^b	3.12 ± 0.65 ^c	3.65 ± 0.41 ^c
ConA+50µM	2.55 ± 0.33 ^b	3.70 ± 0.36 ^b	4.30 ± 0.30 ^b
ConA+100µM	3.77 ± 0.54 ^a	4.28 ± 0.58 ^a	5.31 ± 0.44 ^a

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 sujets sains. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p < 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

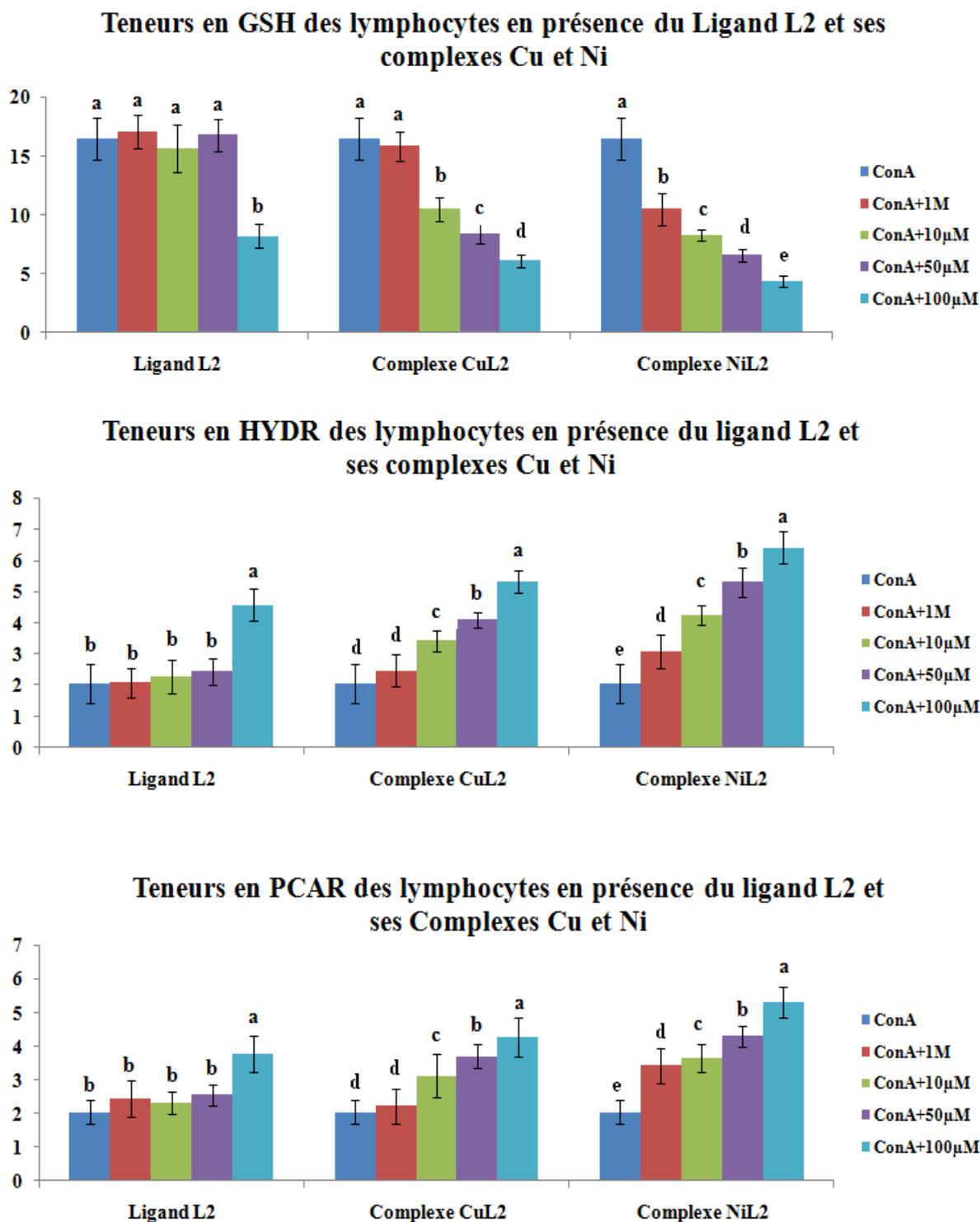


Figure 38 - Teneurs intracellulaires en glutathion (GSH), hydroperoxydes et protéines carbonylées des lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)].

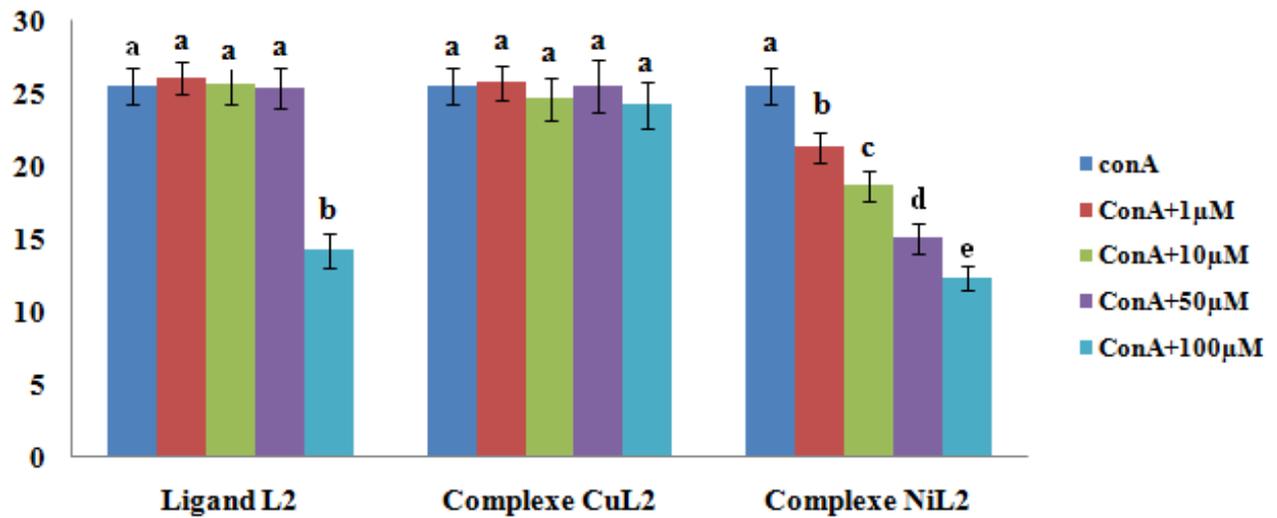
CHAPIRE III : Résultats et discussions

Tableau 17- Activités des enzymes antioxydantes des lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)].

	Ligand	Complexe	Complexe
	L₂	[Cu(L₂)]	[Ni(L₂)]
Catalase (U/mg)			
ConA	25.50 ± 1.26 ^a	25.50 ± 1.26 ^a	25.50 ± 1.26 ^a
ConA+ 1µM	26.03 ± 1.14 ^a	25.67 ± 1.21 ^a	21.30 ± 1.04 ^b
ConA+ 10µM	25.63 ± 1.43 ^a	24.58 ± 1.52 ^a	18.61 ± 1.08 ^c
ConA+50µM	25.35 ± 1.38 ^a	25.42 ± 1.80 ^a	15.04 ± 1.06 ^d
ConA+100µM	14.22 ± 1.16 ^b	24.17 ± 1.56 ^a	12.33 ± 0.87 ^e
SOD (U/mg)			
ConA	82.03 ± 2.65 ^a	82.03 ± 2.65 ^d	82.03 ± 2.65 ^a
ConA+ 1µM	82.85 ± 2.45 ^a	84.88 ± 2.50 ^d	67.10 ± 2.54 ^b
ConA+ 10µM	83.37 ± 2.54 ^a	114.42 ± 3.46 ^c	53.86 ± 1.31 ^c
ConA+50µM	81.45 ± 2.42 ^a	135.50 ± 4.88 ^b	44.70 ± 1.47 ^d
ConA+100µM	44.58 ± 153 ^b	174.22 ± 6.65 ^a	36.15 ± 1.33 ^e

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 10 sujets sains. ^{a, b, c, d, e}, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

Activité de la catalase en présence du ligand L2 et ses complexes de Cu et Ni



Activité de la SOD en présence du ligand L2 et ses complexes Cu et Ni

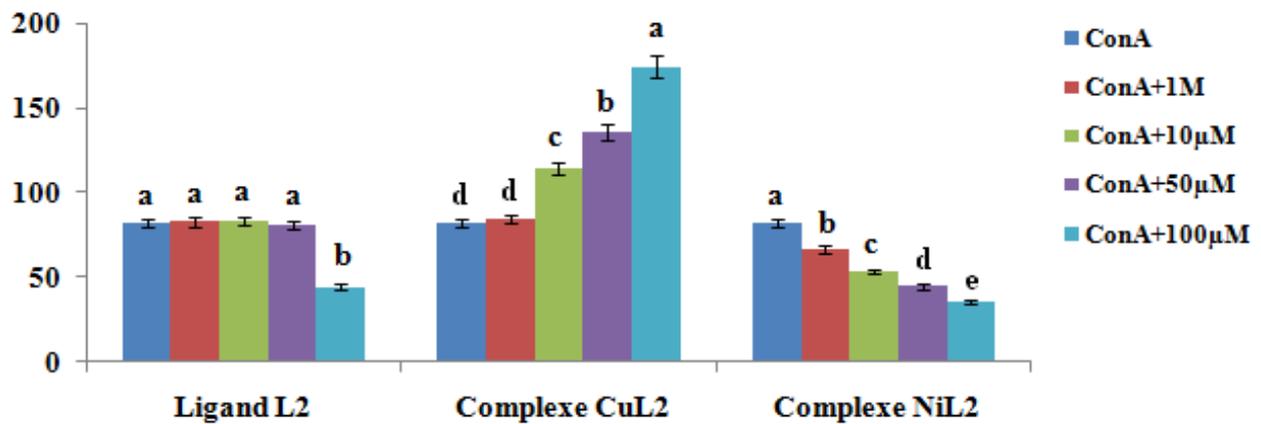


Figure 39- Activités des enzymes antioxydantes des lymphocytes en présence de L₂ et ses complexes [Cu(L₂)] et [Ni(L₂)].

III.3 Discussion globale des résultats obtenus

Les 1,3,4-thiadiazoles et les hydrazones sont des molécules intéressantes et très utilisées vu leur large spectre d'activités biologiques, incluant les propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antitumorales, antihypertensives, antioxydantes et diurétiques, à côté de leurs utilisations comme pesticides et réactifs analytiques [128, 129]. Cependant, les études réalisées sur les activités biologiques de leurs complexes métalliques restent rares. Aujourd'hui, la chimie bio-inorganique introduit un nouveau concept basé sur la formation de complexes entre un métal biologiquement actif et un ligand dont l'intérêt en chimie médicinale n'est plus discuté.

Les métaux comme le cuivre et le nickel sont retrouvés au niveau des sites actifs ou comme composants structuraux de plusieurs enzymes [130, 131]. Les activités biologiques des complexes ligands – cuivre ou nickel, dans lesquels les nicotinanilides et thiocyanates sont utilisés comme ligands, viennent d'être exploitées [132]. Ces complexes métalliques montrent des activités antimicrobiennes plus importantes que les ligands [133, 132]. Ces résultats sont très prometteurs et montrent que les complexes métalliques sont plus bioactifs. Cette potentialisation de l'effet biologique des complexes est sûrement liée à leur nature lipophile. Ceci implique une diffusion rapide des chélates à travers des membranes cellulaires à l'origine de l'effet biologique. Un autre point intéressant, mis en évidence par les études précédentes, est que les complexes de cuivre montrent une activité biologique plus importante que les complexes de nickel. Ces données suggèrent que la nature du métal joue un rôle déterminant dans l'activité biologique.

Plusieurs molécules chimiques ayant une activité biologique antitumorale et anti-inflammatoire peuvent aussi moduler l'activité des cellules immunitaires, et particulièrement les lymphocytes T, impliqués dans l'immunité cellulaire. Ainsi, certaines molécules chimiques peuvent être soit immunostimulantes soit immunodépressives, et sont donc utilisées dans le traitement des anomalies immunitaires. Cependant, les effets immunomodulateurs des complexes métalliques restent obscurs. Afin d'explorer les activités immunotropiques des ligands et des complexes, nous avons réalisé une étude in vitro.

L'étude in vitro porte sur l'évaluation des effets de différentes concentrations des ligands L_1 et L_2 et leurs complexes $[Cu(L_1)]$, $[Ni(L_2)]$ et $[Cu(L_2)]$ sur les lymphocytes humains T stimulés par un agent mitogène (la Concanavaleine A). Cette partie in vitro concerne particulièrement les modulations d'ordre immunologique induites par ces produits.

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Le suivi in vitro de la prolifération cellulaire et de la production des cytokines sont largement utilisés et sont considérés comme des techniques indispensables afin de déterminer la réponse immunitaire suite à l'exposition des cellules à différentes concentrations de ligands et leurs complexes.

L'effet immunomodulateur des cinq produits peut se traduire par une immunosuppression ou par une immunostimulation de la prolifération lymphocytaire et de la production des cytokines et/ou de l'homéostasie entre les lymphocytes Th1 (cellules à médiation immunitaire) et les lymphocytes Th2 (cellules à réponse humorale). Nous avons déjà utilisé cette méthode pour tester plusieurs substances chimiques et les résultats ont été très prometteurs [134, 135, 136].

Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, qui vise à détruire les cellules pathogènes, que ça soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les lymphocytes T se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (activation des cellules immunitaires). Les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps). L'activité des lymphocytes T est associée à la production de cytokines. En effet, les cytokines peuvent être décrites comme les hormones du système immunitaire puisqu'elles interviennent dans le dialogue entre lymphocytes et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires.

Dans l'étude in vitro, les lymphocytes totaux sont isolés à partir du sang d'hommes volontaires. L'utilisation de la concanavaline A, agent mitogène spécifique des lymphocytes T, permet d'activer seulement la prolifération des cellules T.

La prolifération lymphocytaire est significativement diminuée en présence des ligands L_1 et L_2 chez les lymphocytes humains; la plus forte immunosuppression est observée avec la plus forte concentration (100 μ M). Leurs complexes métalliques $[Cu(L_1)]$, $[Ni(L_2)]$ et $[Cu(L_2)]$ entraînent aussi une chute de la prolifération lymphocytaire d'une manière dose-dépende. On remarque qu'en présence des ligands et leurs complexes dans la culture, la prolifération des lymphocytes est diminuée malgré la présence de l'agent mitogène (ConA). Les complexes paraissent plus puissants que les ligands puisqu'ils entraînent une immunosuppression plus marquée.

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Dans notre étude, les effets de ces composés sur la production des cytokines *in vitro* sont concomitants à ceux obtenus sur la prolifération des lymphocytes. En fait, nous avons mesuré les différentes cytokines produites par les lymphocytes afin d'évaluer les propriétés fonctionnelles des lymphocytes et le phénotype dominant par le rapport Th1/Th2.

La mesure de la production des cytokines est précédemment utilisée dans différentes études comme un moyen efficace pour détecter la présence des différents types de lymphocytes, Th1 ou Th2. Comme nous l'avons signalé, les cellules Th1 sont principalement responsables de la défense cellulaire par le phénomène de la phagocytose, et ces cellules sont les effecteurs de l'immunité cellulaire, provoquant une réaction d'hypersensibilité de type retardé et l'inflammation chronique par l'intermédiaire des cytokines Th1 (IL-2, INF γ). Les lymphocytes Th2 sont responsables de la défense immunitaire humorale avec recrutement des éosinophiles, provoquant des réactions allergiques par l'intermédiaire des cytokines Th2 (IL4).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet inhibiteur exercé par les ligands L_1 et L_2 . Tout d'abord, les deux ligands L_1 et L_2 diminuent la production des IL-2 par les lymphocytes, ce qui suggère que la suppression de la prolifération lymphocytaire est due à la réduction de la production d'IL-2 comme documenté pour d'autres agents immunosuppresseurs. Il est à noter que les IL-2 présentent un facteur puissant de la croissance et la maturation des lymphocytes T. La production des IL-4 et des INF γ est également diminuée en présence de L_1 et L_2 . La diminution significative des INF γ peut augmenter le risque des infections suite à une exposition aux deux ligands. Il y a une augmentation du rapport Th1/Th2 après l'exposition aux L_1 et L_2 , il est de même pour le complexe $[Ni(L_2)]$. Ainsi, nous avons noté que le L_1 , L_2 et $[Ni(L_2)]$ induit une diminution de la production des IL-2, INF γ et IL-4 par les lymphocytes, mais le rapport Th1/Th2 est augmenté proportionnellement aux doses utilisées. Une réponse immunitaire de type Th1 est donc dominante, reflétant probablement l'effet inflammatoire de ces 3 composés. Des études antérieures ont obtenus des réponses de type Th1 ou Th2 en utilisant d'autres complexes de Nickel [137].

Une explication possible de la prédominance du phénotype Th1 plus que le Th2 dans nos cultures cellulaires exposées peut être liée à une augmentation de l'apoptose dans les lymphocytes Th2 par rapport à Th1. D'un autre côté, le ligand L_1 , L_2 et $[Ni(L_2)]$ peuvent induire une réduction de la prolifération des lymphocytes T, des différences dans le taux de prolifération entre les lymphocytes Th1 et Th2 qui peut se traduire par un déséquilibre du rapport Th1/Th2.

CHAPIRE III : Résultats et discussions

Cependant, les complexes **[Cu(L₁)]** et **[Cu(L₂)]** ont induit une réduction de l'IL-2 et INF γ , sans affecter la sécrétion d'IL-4 par les cellules T. Ceci entraîne une diminution du rapport Th1/Th2, d'où une dominance du profil Th2. Il est apparu que les complexes **[Cu(L₁)]** et **[Cu(L₂)]** sont plus actifs dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire de type Th1 que leur ligand, avec prédominance des lymphocytes de type Th2. Ceci peut avoir des implications thérapeutiques vu l'effet anti-inflammatoire des cellules Th2.

Dans notre étude in vitro, nous avons aussi évalué le statut Redox des lymphocytes. Il est important de noter que les lymphocytes exercent correctement leurs fonctions dans un état d'équilibre instauré par une balance oxydants / antioxydants. En effet, l'activité des lymphocytes est suivie de la formation de radicaux libres et de composés oxydés. Ces derniers sont normalement neutralisés par les substances antioxydantes intracellulaires, ce qui permet de maintenir un statut Redox normal favorisant une activité lymphocytaire optimale. Dans le cas où les oxydants dépassent la capacité de défense antioxydante, la cellule se trouve dans un état de stress oxydatif altérant ses activités et pouvant entraîner la mort cellulaire.

Nous avons mesuré le taux des hydroperoxydes (lipides oxydés) et des protéines carbonylées (protéines oxydées) comme marqueurs des oxydants, et le taux du glutathion réduit (GSH) et les enzymes catalase et superoxyde dismutase (SOD) comme marqueurs de la défense antioxydante. Ainsi, les résultats de notre travail montrent l'existence d'un stress oxydant intracellulaire qui se manifeste par une augmentation des taux en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, et une chute significative des teneurs en glutathion réduit (GSH) dans les lymphocytes exposées au **L₂**, **[Cu(L₂)]** et **[Ni(L₂)]**. La réduction du GSH pourrait être due à un piégeage des radicaux libres produits en excès dans les lymphocytes. Données antérieures montrent que la faible dose de Nickel a stimulé l'explosion respiratoire des neutrophiles humains par l'augmentation de la production de ROS [138]. Pour le ligand **L₁**, on a une augmentation significative des hydroperoxydes et des protéines carbonylées, sans affecter le GSH. Par contre, en présence du complexe **[Cu(L₁)]**, les teneurs en hydroperoxydes, en protéines carbonylées et en GSH ne présentent aucune variation, en faveur du maintien de l'équilibre Redox cellulaire.

Par ailleurs, une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes est entraînée par les composés **L₁**, **L₂** et **[Ni(L₂)]**. Ces composés induisent une diminution de l'activité de la catalase à 100 μ M et une diminution de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) aux concentrations de 1 à 100 μ M. Il est bien connu que les enzymes antioxydantes

CHAPIRE III : *Résultats et discussions*

peuvent être désactivées dans des conditions d'oxydations élevées, lorsque les radicaux libres sont produits en grande quantité par les cellules. Toutefois, en présence des complexes [Cu(L₁)] et [Cu(L₂)], l'activité de la catalase n'est pas affectée, et l'activité de la SOD est améliorée dans les lymphocytes.

Les complexes [Cu(L₁)] et [Cu(L₂)] provoque un stress oxydant intracellulaire. L'augmentation de l'activité enzymatique peut être en relation avec la présence du stress oxydatif intracellulaire, notamment à des concentrations fortes. En effet, l'augmentation de l'activité de l'enzyme antioxydante (SOD) peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par ces complexes.

Il faut aussi noter que le cuivre est un composant de l'enzyme SOD qui régule la concentration intracellulaire d'anion superoxyde en le convertissant en H₂O₂ [139]. H₂O₂ est par la suite chimiquement neutralisée par l'enzyme catalase [140].

La lipophilie des complexes métalliques est augmentée, ce qui peut être un facteur contribuant à l'amélioration de l'activité de ces complexes. Le Nickel est plus puissant que le cuivre pour inhiber la prolifération des lymphocytes et pour induire un stress oxydatif intracellulaire, tandis que le cuivre est plus puissant que le nickel pour l'activité contre le stress oxydatif.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Après une étude bibliographique décrite dans le premier chapitre concernant l'obtention de la fonction imine et thiadiazole faisant réagir une cétone ou un aldéhyde avec l'hydrazine, d'autres méthodes de préparation ont été décrites ainsi que leurs propriétés Redox, l'oxydation plus ou moins facile de l'azote - amine est sensible à la structure du groupement hydrazone. Cette structure dépend à son tour de la substitution du carbone azométhine et de l'amine de la fonction hydrazone. Nous avons aussi cité quelques activités biologiques de ces ligands.

A partir de ces critères nous avons pu synthétiser deux types de ligands le 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine et 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole. Nous avons décrits aussi, les méthodes de préparation des complexes dérivés de ces ligands avec les sels d'acétate de cuivre, perchlorate de nickel et nitrate de cuivre à l'exception du complexe de cuivre dérivé de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine qui est préparé en utilisant une proportion équimolaire d'acétate de cuivre et de ligand (1 : 1), les autres complexes sont obtenus avec la proportion (2 : 1) en mélangeant le sel de métal et le ligand, respectivement.

Les ligands préparés sont caractérisés par l'analyse spectrale : infrarouge, résonance magnétique nucléaire du proton et UV-visible à l'état solide et en solution dans des solvants de polarité différente.

Nous avons proposé des structures pour les complexes solides isolés sur la base des résultats de l'analyse élémentaire (carbone, hydrogène, azote, métal), des spectres UV-visible et IR. Les faibles valeurs de la conductivité molaire des complexes solides dans le DMSO indiquent qu'ils se comportent en non électrolytes.

Nous avons proposé la géométrie autour des ions métalliques sur la base des résultats des rayons X pour les complexes de $[\text{Ni}(\text{L}_2)]$ et $[\text{Cu}(\text{L}_2)]$ et les spectres électroniques pour le complexe $[\text{Cu}(\text{L}_1)]$. Le complexe du cuivre dérivé de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine possède une géométrie tétraédrique autour du cuivre. Les deux complexes de nickel et de cuivre dérivé de 2,5-Bis (2-pyridyl)-1, 3,4-thiadiazole présentent une géométrie octaédrique autour de l'ion $\text{Ni}(\text{II})$ et $\text{Cu}(\text{II})$.

Nous avons donné un intérêt particulier au comportement électrochimique de nos complexes. Le mécanisme du processus d'oxydoréduction du centre métallique est étudié par voltammétrie cyclique, sur électrode de mercure HMDE. L'oxydoréduction du centre métallique de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine est

Conclusion générale

traduit par deux pics irréversibles Cu(0)/Cu(I) et Cu(I)/Cu(II). Concernant le complexe de Ni dérivés de 2,5-Bis (2-pyridyl)-1, 3,4-thiadiazole on obtient un pic irréversible. Le processus d'oxydoréduction tend à devenir de plus en plus réversible à des vitesses de balayage de potentiel élevé. Pour le même ligand, le couple redox Cu(0)/Cu(II) correspond à un système quasi-réversible.

Pour valoriser notre travail, nous avons ajouté une partie biologique, en utilisant comme modèle expérimental *in vitro*, les lymphocytes humains considéré comme étant le modèle le plus connu et classiquement utilisé pour déterminer l'immunotoxicité de nouveaux produits chimiques, médicaments et xénobiotiques. Le premier résultat significatif de notre travail est que le 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine, 2,5- bis (2-pyridyl) -1,3,4 -thiadiazole et leurs complexes métalliques sont des immunosuppresseurs importants sur les deux sous-types de lymphocytes Th1 et Th2. Les complexes paraissent plus puissants que les ligands puisqu'ils entraînent une chute de la prolifération lymphocytaire d'une manière dose-dépendante.

Dans le même sens, les résultats de notre travail montrent l'existence d'un stress oxydant intracellulaire qui se manifeste par une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes exposés au 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine, 2,5- bis (2-pyridyl) -1,3,4 -thiadiazole et le complexe [Ni(L₂)].

Les complexes [Cu(L₁)] et [Cu(L₂)] provoquent un stress oxydant intracellulaire seulement aux concentrations élevées. L'augmentation des activités enzymatiques peut être en relation avec la présence du stress oxydatif intracellulaire, notamment à des concentrations fortes. Cependant, l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et SOD) peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par ces complexes.

Les deux ligands 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine, 2,5- bis (2-pyridyl) -1,3,4 -thiadiazole et leurs complexes métalliques sont des immunosuppresseurs. Les deux ligands L₁, L₂ et le complexe [Ni(L₂)] entraînent un profil inflammatoire avec induction d'un stress oxydatif intracellulaire pouvant altérer la fonction des lymphocytes. Cependant, les complexes [Cu(L₁)] et [Cu(L₂)] entraînent un profil anti-inflammatoire avec maintien du statut Redox de la cellule grâce à l'amélioration des défenses

Conclusion générale

antioxydantes cellulaires. Ces complexes de cuivre peuvent être utilisés pour la fabrication des médicaments visant le traitement des maladies du système immunitaire.

En perspective nous souhaitons confirmer ce travail de recherche en réalisant une étude in vivo, chez le rat Wistar, animal de laboratoire. Ceci nous permettra de voir les effets de ces substances dans tout l'organisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. Kovala-Demertzi, P.N. Yadav, M.A. Demertzis, M. Coluccia, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, 78, 347.
- [2] Z. Iakovidou, E. Mioglou, D. Mourelatos, A. Kotsis, M.A. Demertzis, A. Papagoergiou, J.R. Miller, D. Kovala-Demertzi, *Anticancer Drugs*. 2001, 12, 65.
- [3] T. Varadinova, D. Kovala-Demertzi, M. Rupelieva, M. Demertzis, P. Genova, *Acta Virologica*. 2001, 45, 87.
- [4] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzis, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 86, 555.
- [5] H. Cerecetto, M. González, *Curr. Topic. Med. Chem.*, 2002, 2, 1185.
- [6] S.K Sridhar, S.N Pandeya, J.P Stables, A. Ramesh, *Eur.J. Med. Chem.*, 2002, 129.
- [7] A. Kolocouris, K. Dimas, C. Pannecouque, M. Witvrouw, G.B Boscolos, G. Stamatiou, G. Fytas, G. Zoidis, N. Kolocouros, G. Andrei, R. Snoeck, E. DeClerq, *Bioorg. Med. Chem. Letters*. 2002, 12, 723.
- [8] G. Domagk, R. Behnisch, F. Mietzch, H. Schmidt, *Naturwissenschaften*. 1946, 33, 315.
- [9] G. Domagk, *Nordisk Medicin*. 1948, 39, 1322.
- [10] M.J. Campbell, *Coord. Chem. Rev.*, 1975, 15, 279.
- [11] S.B. Padhyé, G.B. Kauffman, *Coord. Chem. Rev.*, 1985, 63, 127.
- [12] D.X. West, A. Liberta, S.B. Padhye, R.C. Chikate, P.B. Sonawane, A.S. Kumbhar, R.G. Yerande, *Coord. Chem. Rev.*, 1993, 123, 49.
- [13] N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 10, 232.
- [14] D.X. West, A. Liberta, S.B. Padhye, R.C. Chikate, P.B. Sonawane, A.S. Kumbhar, R.G. Yerande, *Coord. Chem. Rev.*, 1993, 49, 123.
- [15] R. Buchet, C. Sandorfy, *J. Phys. Chem.* 1983, 87, 275.
- [16] T. D. Paolo, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* 1974, 52, 3612.
- [17] R. Massuda, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* 1977, 55, 3211.
- [18] P. Hobza, F. Mulder, C. Sandorfy, *J. Amer. Chem. Soc.* 1980, 103, 1360.
- [19] P. Hobza, F. Mulder, C. Sandorfy, *J. Amer. Chem. Soc.* 1982, 104, 925.
- [20] H. Endo, M. Hirota, Y. Ito, T. Takeuchi, Y. Hamada, *Bull. Chem. Soc. Japan*. 1982, 55, 1564.
- [21] R.F. Harmon, F.E. Dutton, H.D. Warren, *J. Med. Chem.* 1968, 11, 627
- [22] G.J. Palenik, D.F. Rendle, W.S. Carter, *Acta Crystallogr.* 1974, B30, 2390.
- [23] W. Kaim, *Coord. Chem. Rev.* 1987, 76, 187.

- [24] J.W. Wittaker, K.D. Karlin, Z. Tyeklar, *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman Hall, New York, 1993.
- [25] K. Nag, A. Chakravorty, *Coord. Chem. Rev.* 1980, 33, 87.
- [26] M.A. Halcrow, G. Christou, *Chem. Rev.* 1994, 94, 2421.
- [27] G.G. Fletcher, F.E. Rossetto, J.D. Turnbull, E. Nieboer, *Environ. Healt. Perspect. Suppl.* 1994, 102, 69.
- [28] D.Michelot, *J. Toxicol. Clin. Exp.* 1989, 9, 83-99.
- [29] H.Shimogawa, S.Kuribayashi, T.Teruya, K.Suenaga, H.Kigoshi,, *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 1409-1411.
- [30] L.Katz, *J. Amer. Chem. Soc.* 1951, 73, 4007- 10.
- [31] W.A. Boggust, W. Cocker, *J. Chem. Soc.* 1949, 355-62.
- [32] M.M.Andrade, T.B.Maria, *J. Comb. Chem.*, 2010, 12, 245-247.
- [33] S. E.Denmark, T.Weber, D. W.Piotrowski, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2224.
- [34] G. R. Cook, B. C.Maity, R. Kargbo, *Org. Lett.* 2004, 6, 1741.
- [35] G. R. Cook, R. Kargbo, B. C. Maity, *Org. Lett.* 2005, 7,2767.
- [36] S. Kobayashi, C. H. Ogawa, M. Konishi, Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6610.
- [37] M. Nakamura, T. Hatakeyama, K. Hara, H. Fukudome, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126,14344.
- [38] J. M. Keith, E. Jacobsen, *Org. Lett.* 2004, 6, 153.
- [39] M.I Feske, A.B. Santanilla, J.L. Leighton, *Org. Lett.* 2010, 12, 688-691.
- [40] S.B. Tsogoeva, A. Zamfir, *Org. Lett.* 2010, 12, 188-191.
- [41] H. El Khadem, Z. M. El-Shafei, M. M. Mohammed-Ali, *J. Org. Chem.* 1964, 29, 1565.
- [42] E. M. Kaiser, F. E. Henoch, C. R. Hauser, *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 7287.
- [43] T. T. Dang, U. Albrecht, K. Gerwien, M. Siebert, P. Langer, *J. Org. Chem.* 2006, 71, 2293.
- [44] T. Mino, Y. Shirae, M. Sakamoto, T. Fujita, *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 2191-2194.
- [45] T. Mino, Y. Shirae, Y. Sasai, M. Sakamoto, T. Fujita, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 6834-6839.
- [46] G.A. Grasa, R. Singh, E.D. Stevens, S.P. Nolan, *J. Organomet. Chem.*, 2003, 687, 269.
- [47] (a) J. B. Conant, P.D.Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, 54, 2881-2899. (b) F.H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 1962-1965. (c) E.G.R. Ardagh, F.C. Rutherford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, 57, 1085-1088.
- [48] E.H. Cordes, W.P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2843-2848.
- [49] F.bentiss, M.Traisnel, M.Lagrenée, *J.Appl.Electrochem.*, 2001, 31 ,41.

- [50] M. Lagrenée, B. Mernari, M. Bouanis, M. Traisnel, F. Bentiss, *Corros.Sci.*, 2002, 44, 573.
- [51] M. El Azhar, B. Mernari, M. Traisnel, F. Bentiss, M. Lagrenée, *Corros.Sci.*, 2001, 43, 2229.
- [52] F. bentiss, M. Lebrini, H. Vezin, M. Lagrenée, *Mat.Chem.Phys.*, 2004, 87, 18.
- [53] G. Mazzone, F. Bonima, G. Puglisi, R. Arrigo. Reina, C. Cosentino, G. Blandino, *Il Farmaco. Ed. Sci.*, 1982, 37, 685.
- [54] P. R. Naik, S. N. Pandeya, P. N. Singh, *Pharmakeutike*. 1991, 4, 44.
- [55] D. Nardi, A. Tajna, R. Pennini, *J. Heterocyclic. Chem.*, 1975, 12, 139.
- [56] G. Ciurdu, M. Ciuciu, *J. Prack. Chem.*, 1979, 321, 320.
- [57] M. V. Costa, A. Brembilla, D. Roizard, P. Lochem, *J. Heterocyclic.Chem.*, 1991, 28, 1541.
- [58] U. Rose, *J. Heterocyclic. Chem.*, 1992, 29, 551.
- [59] A. Orjales, M. Bordel, V. Rubio, *J. Heterocyclic.Chem.*, 1995, 32, 707.
- [60] K. Ijichi, M. Fajiwara, H. Nnagano, Y. Mutsumoto, *J. Heterocyclic.Chem.*, 1976, 13, 421.
- [61] T. Marita, K. Yoshino, T. Kanazawa, *Arzneimittel-Forsh.* 1982,32,1037.
- [62] (a) K. Herjindu, *Acta .Cienc. Indica. Chem.*, 20,35(1994) ; (b) L.V.G.N.Reddy, V. Hariprasad, *Ind. J. Chem. Sect. Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 1996, 35, 499.
- [63] P.Chabrier, S. H. Renard, K. Smarzewska, *Bull. Chem. Soc. Fr.* 1949, 237.
- [64] F. Mosset, D. R. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1987, I, 982.
- [65] G. Mazzone, G. Puglisi, F. Bonima, *J. Heterocyclic. Chem.*, 1983, 20,1399.
- [66] R. Huisgen, H. J. Strurnet, M. Seidel, *Chem. Ber.*, 1961, 94, 1555.
- [67] G. Werber, F. Buccheri, M. Gentile. L. Librici, *J. Heterocyclic .Chem.*, 1977,14, 853.
- [68] G. Dusinsky, *Pharmazie*. 1953, 8, 897.
- [69] W. U. Malik, R. N. Goyal, V. K. Mahesh, V. Verma, *J. Electranal. Chem.*, 1975, 62, 451.
- [70] H. G. Garg, R. A. Sharma, *J. Med. Chem.*, 1969, 12, 1122.
- [71] G. Barbey, M. Genies, M. Libert, C. Caillet, *Bull. Soc. Chim.*, 1973, 1942.
- [72] G. Barbey, C. Caillet, *Tetrahedron Lett.*, 1974, 15 (18), 1717.
- [73] B. Lameille, G. Barbey, C. Caillet, *Electrorhim. Acta.*, 1984, 29, 339.
- [74] I. Bhatnagar, M. V. George, *J. Org. Chem.*, 1967, 32, 2252.
- [75] En-Chu Lin, Michael R. Van De Mark, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 1176.
- [76] R. E. Gawley, *J. Org. Chem.*, 1981, 46, 4595.
- [77] R. Chmekh, I. Tapsoba, H. Medini, E. Maisonhaute, M.L. Benkhoud, K. Boujlel, J.

Electroanal. Chem., 2007, 85, 599.

[78] O. Buriez, C. Cannes, J-Y. Nédelec, J. Périchon, *J. Electroanal. Chem.*, 2000, 495, 57.

[79] I.C. Santos, M. Vilas-Boas, M.F.M. Piedade, C. Freire, M.T. Duarte, B. De Castro, *Polyhedron*. 2000,19, 655.

[80] B. Sarkar, S. Konar, C.J. Gómez-Garcia, A. Ghosh, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 11611.

[81] A. Reguig, M. M. Mostafa, L. Larabi, Y. Harek, *J. Appl. Sci.*, 2008, 8, 3191.

[82] A. Walcourt, M. Loyevsky, D.B. Lovejoy, V.R. Gordeuk, D.R. Richardson, *Int. J. Biochem. Cell. Bio.*,2004, 36, 401-407.

[83] G. Visbal, E. Marchan, A. Maldonado, Z. Simoni, M. Navarro, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 547-554.

[84] A. Tanveer, AK. Singh, N. Jaiswal, D. Singh , *Int .Res.J. Pharmacy.*, 2012, 3:69–82.

[85] SL. Vasoya, DJ. Paghdar, PT. Chovatia, Joshi. *J. Sci. Islam. Repub. Iran.*, 2005, 16:33–36.

[86] V. Jatav, P. Mishra, S. Kashaw , J. Stables, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, 1, 7.

[87] J. Matysiak, A. Opolski, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14: 4483-4489.

[88] N. K. Mawar, A. Joshi, O. Ram, V. Chowdhary, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences.*, 2014, 3, 1900-1909.

[89] Y. Baba Hamed, A. Medjdoub, B. Mostefa Kara, H .Merzouk, D .Villemin, M. Narce. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360: 23–33.

[90] A. Medjdoub, SA. Merzouk, H. Merzouk, FZ. Chiali, M. Narce. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011, 101, 27-33.

[91] B. Singh, A. Pandey, *Liquid Crystals*. 2010, 37, 57–67.

[92] C. Sousa, C. Freire, B. de Castro, *Molecules* 2003, 8, 894.900.

[93] M. Lebrini, F. Bentiss, M. Lagrenée, *J. Heterocyclic Chem.* 2005, 42, 991.

[94] F. Bentiss, M. Lagrenée, J. P. Wignacourt, E. M. Holt, *polydron* .2002, 21, 403- 408.

[95] D. Di. Benedetto, P. Breuil, *Techniques de l'Ingénieur Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible*. 2014, 2, 2795.

[96] B. Tremillon, *Electrochimie analytique et réactions en solution*.1993,83.

[97] W.H .Reinmuth, *J.Am.Chem.Soc.* 1957, 79, 6358.

[98] H. Matsuda, Y. Ayabe, *Zeit-Eleektrochem.*, 1955, 59, 494.

[99] T. Yamada, T. Osa, T. Matsue, *Chem. Lett.*, 1987, 1611.

[100] J. Y. Lee, T.C. Tan, *J. Electrochem. Soc.*, 1990, 137, 1402.

[101] L. M. Abrantes, J. P. Corriera, *J. Surf. Coat. Tech.*, 1998, 107, 142.

- [102] R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, 1965, 37(11), 1351.
- [103] A. J. Bar, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*, 2001.
- [104] R. Greef, R. Peat, L. M. Reter, D. Pletcher, J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, 1st Edition, John Wiley and Sons Publishers, 1985.
- [105] F. Bedioui, *Voltampérométrie. Théorie et mise en oeuvre expérimentale, technique de l'ingénieur*, réf:2126.
- [106] J. Wang, *Analytical Electrochemistry.*, 2000.
- [107] T. Mosmann, *J Immunol Methods.*, 1983, 65, 55–63.
- [108] E. F. Elstner, R. J. Youngman, W. Obwald, *Methods of Enzymatic Analysis*.1983, 3, 293-302.
- [109] H. Aebi, *Methods of Enzymatic Analysis*.1974, 673-684.
- [110] C. Sousa, C. Freire et B.de Castro, *Molecules*. 2003, 8, 894-900.
- [111] Bullock and H.A. Tajmir-Riahi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1978, 36.
- [112] M.S.Masoud, M. F. Amira, A. M. Ramadan, G. M. El-Ashry, *Spectrochimica Acta Part A.*, 2008, 69,230-238.
- [113] A.Marcu, A.Stanila, O.Cozar, L.David ; *Journal of optoelectronics and materials*.2008, 10, 830-833.
- [114] E. Pappalardo, *J. Mol. Spectroscopy.*, 1961, 6, 554.
- [115] O.G. Holmes, D.S. Mc Clure, *J. Chem. Phys.*? 1957, 26, 1686.
- [116] P. Guerriero, D. Ago, P.A. Vigato, U. Casellato, *Inorg. Chim. Acta.*, 1988, 6, 141.
- [117] F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry, A comprehensive Text Book, 3rd Edition, Interscience, New York*. 1972, 863.
- [118] A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*. 1968.
- [119] L. Sacconi, *Coord. Chem. Revs.*, 1966, 1(1-2), 192.
- [120] G.G. Mohamed and Z. H. Abd El-Wahab, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2003, 73, 347-359.
- [121] R.S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, 1964, 36, 706.
- [122] F.R. Perez, L. Basaez, J. Belmar, P. Vanisek, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2005,50, 575.
- [123] A.J. Bard, L.R. Faulkner, JohnWiley and Sons, New York. 1980, 228.
- [124] C.M.A; Brett, O. Brett, *Electrochemistry in the presence of convective flow*.1998, 145, 1994-1999.
- [125] G.D. Christian, *Analytical Chemistry, 6th edition, John Wiley and Sons, New York, USA*. 2004.

- [126] M. Mascus, , F. Parients, Q.Wu, A. Toffanin, J.P. Shapleigh, H.D. Abruna, *Anal. Chem.*,1996, **68**, 3128.
- [127] J .Wang, *Analytical Electrochemistry, Wiley-VCH,Inc., New York*. 1948, 1.
- [128] S.L.Vasoya, D.J.Paghdar, P.T.Chovatia, H.S. Joshi, *J Sci I R Iran.*, 2005, 16, 33-36.
- [129] A. Tanveer, A. K.Singh, N. Jaiswal, D. Singh, *Int. Res. J. Pharmacy.*, 2012, 3, 69-82.
- [130] F.A. Cotton, G.Wilkinson, *Advanced inorganic chemistry, 5th edn. Wiley, New York*, 1988, 1358–1371
- [131] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Pergamon Press, Oxford*. 1984, 1392–1420.
- [132] A. Balan, R.F.N. Ashok, M .Vasanthi, R .Prabu, A .Paulraj, *Int. J. Life Sci .Pharm Res.*, 2013, 3,67–75.
- [133] R.N.Patel, N.Singh, K.K.Shukla, V.L.N.Gundla, U.K.Chauhan, *Spectrochim Acta A.*, 2006, 63, 21–26.
- [134] S.A. Merzouk, M. Saker, K. Briksi Reguig, N.Soulimane, H. Merzouk, B.Guermouche , A. Y. Berrouiguet, A.Hichami, M.Narce, N.A.Khan, *Lipids*. 2008, 43, 485–497.
- [135] A. Medjdoub, S.A.Merzouk, H. Merzouk, F.Z. Chiali, M. Narce, *Pestic Biochem Physio.*, 2011, 101, 27–33.
- [136] Y.Baba Hamed, A. Medjdoub, B. Mostefa Kara, H. Merzouk, D. Villemin, M. Narce, *Mol Cell Biochem.*,2012, 360, 23–33.
- [137] V. D’Anto` , R.Valletta, M. Amato, H. Schweik, M. Simeone, S.Paduano, S.Rengo, G. Spagnuolo, *The Open Dent J.*, 2012, 6, 177–181.
- [138] R.Ciubar, A.Cimpean, D.Iordachescu, *Rev.Roum.Chim.*, 2006, 51, 1169–1173.
- [139] Z.K. Roughead, L.K. Johnson, J.R. Hunt, *J. Nutr.*, 1999,129, 1368–1376
- [140] W.Ma, I. Nunes, H.S.C. Young, A. Spector, *Free Radical .Biol. Med.*, 2006, 40, 335–340

Résumé

Les composés azotés dérivés d'hydrazones et de thiadiazoles représentent une classe importante de ligands dans la chimie de coordination des métaux de transition. Ils présentent un large spectre d'activités biologiques. Leurs applications dans le domaine de la pharmacologie n'ont pas été suffisamment étudiées. La voltammétrie cyclique a fourni l'évidence pour la stabilisation de l'état d'oxydation élevé pour différents métaux de transition. Le présent travail est consacré à la synthèse, la caractérisation et la détermination de l'activité biologique de 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine, de 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole et leurs complexes de Ni(II) et Cu(II). Ces composés sont caractérisés sur la base de l'analyse élémentaire, analyses spectroscopiques (UV-Visible, IR et 1H-RMN) et mesures de conductivité. Le comportement électrochimique de ces complexes est étudié dans le DMSO par voltammétrie cyclique (CV), électrode de mercure (HMDE). Ces complexes présentent un pic irréversible pour les différents couples redox utilisés. Les effets de ces composés à différentes concentrations sont testés in vitro sur les lymphocytes humains T. Cette partie in vitro concerne particulièrement les modulations d'ordre immunologique induites par ces produits. Nos résultats montrent que les ligands et leurs complexes entraînent une immunosuppression, une réduction de la synthèse des cytokines inflammatoires et une modulation du statut Redox des lymphocytes. Les effets sont plus marqués avec les complexes comparés aux ligands. En conclusion, ces complexes peuvent être utilisés en immunothérapie.

Mots clés: 1-(4-diméthylaminobenzylidène)-2-(2-hydroxybenzylidène) hydrazine, 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole, complexes de Ni(II), Cu(II), voltammétrie cyclique, lymphocytes, cytokine, statut redox.

Abstract

Nitrogen compounds, hydrazone and thiadiazole derivatives, represent a significant class of ligands in the coordination chemistry of transition metals. They have a wide spectrum of biological activities. Their applications in the field of pharmacology have not been sufficiently studied. Cyclic voltammetry provided evidence for stabilizing transition metals of different high state oxidation. The present work is devoted to the synthesis, characterization and determination of the biological activity of 1-(4-dimethylaminobenzylidene)-2-(2-hydroxybenzylidene) hydrazine, 2,5-Bis (2-pyridyl) -1, 3,4-thiadiazole and their complexes of Ni (II) and Cu (II). These compounds are characterized on the basis of the elemental analysis, spectroscopic analysis (UV-Vis, IR and 1H-NMR) and conductivity measurements. The electrochemical behavior of these complexes is studied in DMSO by cyclic voltammetry (CV), mercury electrode (HMDE). These complexes have an irreversible peak for various redox couples used. The effects of these compounds at different concentrations were tested in vitro on human T lymphocytes. This part, in vitro, particularly concerns immunological modulations induced by these products. Our results show that the ligands and their complexes involve suppression, reduction of the inflammatory cytokines synthesis and modulation of lymphocytes redox status. The effects are more marked with complex compared to ligands.

Key words: 1-(4-dimethylaminobenzylidene) -2 (2-hydroxybenzylidene) hydrazine, 2,5-Bis (2-pyridyl) -1, 3,4-thiadiazole and their complexes of Ni (II) and Cu (II), cyclic voltammetry, lymphocytes, cytokine, redox status.

ملخص

مركبات النيتروجين المستمدة من الهيدرازون و الثياديازول تمثل فئة هامة في الكيمياء التناسقية للفلزات الانتقالية. يمثلون مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية. تطبيقاتها في مجال الصيدلة لم يدرس بما فيه الكفاية. وقد قدمت الفولتومتريّة الحلقية الأدلة لاستقرار الحالة العالية لأكسدة مختلف المعادن الانتقالية. ويخصص هذا العمل إلى التوليف و توصيف و تحديد النشاط البيولوجي ل 1-(4-ديميثيلامينوبنزيليدين)-2-(2-هيدروكسي بنزيليدين)، هيدرازون، هيدرازين، 2,5 (2-بيس بيريديل)، 1,3,4 ثياديازول، التحليل الطيفي و القياسات الموصلية. تمت دراسة السلوك الكهروكيميائي من هذه المجمعات من قبل DMSO باستعمال الفولتامترية الحلقية، قطب الزئبق؛ هذه المعقدة لديها ذروة غير رجعية في مختلف أزواج الأكسدة المستخدمة.

تم اختبار هذه المركبات بتركيزات مختلفة لخلايا اللعابية البشرية مخبريا، يتناول هذا الجزء المخبري تحديدا تعديلات المناعة الناجمة عن هذه المنتجات. نتائجنا تظهر ان الروابط و معقداتها سبب في كبت المناعة و تخفيض تركيب السيتوكينات الالتهابية و تعديل وضع أكسدة الخلية و الأثار تكون أكثر وضوحا مع المعقدات مقارنة مع المركبات. في الختام هذه المجمعات يمكن استخدامها في العلاج المناعي.

كلمات البحث: 1-(4-ثنائي الميتيل بنزيليدين)-2-(2-هيدروكسي بنزيليدين) هيدرازين، 2,5 (2-بيس بيريديل)، 1,3,4 ثياديازول مركب Ni(II)، Cu (II)، الفولتامترية الحلقية، الخلايا اللعابية، السيتوكين، وضع أكسدة الخلية.

In vitro effects of nickel (II) and copper (II) complexes with 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on T lymphocyte proliferation and intracellular redox status

Yamina Baba Ahmed · Hafida Merzouk ·
Yahia Harek · Amel Medjdoub · Sabri Cherrak ·
Lahcen Larabi · Michel Narce

Received: 20 March 2014 / Accepted: 17 June 2014 / Published online: 24 July 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract This work focused on the study of the in vitro effects of different concentrations of copper and nickel complexes of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on the proliferative responses of human mitogen-stimulated lymphocytes, the Th1-(IL-2, $\text{INF}\gamma$) and Th2-(IL-4) cytokine secretion and the intracellular oxidant/antioxidant status. The results showed that the ligand (**1**) and its copper (**2**) and nickel (**3**) complexes significantly reduced lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner. **1** and **3** decreased IL-2, $\text{INF}\gamma$ and IL-4 secretion with a shift away to Th1 phenotype. **2** reduced IL-2 and $\text{INF}\gamma$ with a shift away to Th2 phenotype. Modulation of immune response was accompanied by an intracellular oxidative stress. Metal complexes have stronger immunomodulating action than their ligand. Nickel was more potent than copper for inhibiting the lymphocyte proliferation and for inducing intracellular oxidative stress, while copper was more potent than nickel for activity against oxidative stress. 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole copper and nickel complexes

could be of use as a therapy for disorders that involve an inappropriately activated immune response.

Keywords 1,3,4-Thiadiazole · Cytokines · Lymphocytes · Metal complexes · Oxidative stress

Introduction

1,3,4-thiadiazole derivatives have gained great importance due to their diverse biological properties including antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antitumor, anti-hypertensive, and diuretic activities, besides they used as pesticides and analytical reagents (Vasoya *et al.*, 2005; Tanveer *et al.*, 2012). To our knowledge, studies on the biological and pharmaceutical activities of their metal complexes are, however, absent in the literature. The biologically metal ion complexes with different ligands are recently developed in the field of bioinorganic chemistry. These metal complexes begin to attract the attention of medicinal chemists. Metal ions such as nickel and copper are found either at the active sites or as structural components of several enzymes (Cotton and Wilkinson, 1988; Greenwood and Earnshaw, 1984). The biological activities of nickel and copper mixed-ligand complexes containing nicotinilide and thiocyanate as ligands have been previously reported (Balan *et al.*, 2013). These metal complexes show an enhanced antimicrobial activity (Patel *et al.*, 2006; Balan *et al.*, 2013). The results are quite promising and the antimicrobial data reveal that the complexes are more bioactive. The enhanced activity of the metal complexes may be ascribed to the increased lipophilic nature of the complexes, their chelation effects and to their faster diffusion through the cell membrane. Another interesting result observed previously is that the

Y. B. Ahmed · Y. Harek · L. Larabi
Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry,
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, BP119,
University ABOU-BEKR BELKAÏD, 13000 Tlemcen, Algeria

H. Merzouk (✉) · A. Medjdoub · S. Cherrak
Laboratory of Physiology, Physiopathology and Biochemistry of
Nutrition, Department of Biology, Faculty of Natural and Life
Sciences, Earth and Universe, University ABOU-BEKR
BELKAÏD, 13000 Tlemcen, Algeria
e-mail: hafidamerzouk_2@hotmail.com

M. Narce
INSERM UMR 866, 'Lipids Nutrition Cancer', Faculty of Life,
Earth and Environment Sciences, University of Burgundy,
21000 Dijon, France

copper complexes show higher activity than the nickel complexes. These results suggested that the nature of the metal and the coordinated metal ion play significant roles in the biological activity.

On the other hand, many chemical substances have immunomodulatory activity beyond their antimicrobial properties. Inflammatory reactions, phagocytosis, natural cytotoxicity, cytokine production, antibody responses, and cellular immunity are immune mechanisms that may be modulated by therapeutic doses of antimicrobial agents (Labro, 2000).

Immune responses are important for protection from various infections and maintaining health. Any changes in the immune responses are likely to alter the health status leading to several diseases. The most relevant cells involved in the immune response are T helper (Th) lymphocytes (Delves *et al.*, 2006). A loss of T-cell homeostasis is linked to the development of several immune diseases. Th lymphocytes represent two functional cells, Th1 and Th2 lymphocytes differing in their cytokine expression. Th1 lymphocytes are associated with cell-mediated immunity and the killing of intracellular pathogens, while Th2 are related to humoral immunity and antibody production. Cytokines are involved in signaling between cells during an immune response.

There are several indications that reactive oxygen species (ROS) may act as cellular second messenger and it has been demonstrated that the proliferation, the activation, the cytokine secretion, and T-cell homeostasis are regulated by the formation of intracellular ROS (Allen and Tresini, 2000; Cope, 2002). The intracellular production of ROS by lymphocytes could be assayed by the determination of some oxidants such as hydroperoxides and carbonyl proteins which are maintained at low concentrations by an active antioxidant defense including reduced glutathione (GSH), catalase, and superoxide dismutase activities (De La Fuente and Victor, 2000). Oxidative stress and depletion of GSH in human T-cells were shown to impair IL-2 production, which is known to stimulate T-cell proliferation (Hadzic *et al.*, 2005).

In vitro cell proliferation in response to polyclonal mitogens is one of the most commonly used procedures in assessing cell-mediated immune responses. Our research group had used this method for the evaluation of potential pharmaceutical and immunomodulatory activities of several chemical substances and pesticides (Merzouk *et al.*, 2008; Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012).

No information is currently available about the effects of metal complexes of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on lymphocyte function including proliferation, cytokine production, and intracellular redox status although immunomodulatory effects of metal ions have been previously reported.

Copper (Cu) is an essential trace element in human immune system. Cu deficiency increases susceptibility to pathogens and leads to reduced T lymphocyte activation and cytokine production (Flynn, 1984; Rhee *et al.*, 2002). The immunosuppressive activity of Cu chelates has been previously reported (Anderson and Tomasi, 1984). Nickel ion has been shown to affect the immunity inducing impaired cell proliferation (Ciubar *et al.*, 2006; D'Antò *et al.*, 2012).

With the aim of obtaining novel metal complexes of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole with pharmaceutical applications, we report herein the synthesis of nickel and Cu complexes of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole and their effects as immunomodulatory agents. For synthesis, we used well known methods to obtain heterocyclic molecules which can be used as corrosion inhibitors (Lebrini *et al.*, 2005; Bentiss *et al.*, 2011) and which can exhibit antimicrobial and antibacterial activities (Mazzone *et al.*, 1982). In these heterocyclic molecules, a number of symmetrically 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazoles are quickly prepared by the reaction of aromatic aldehyde on hydrazine hydrate in the presence of sulfur under microwave irradiation.

In this work, the effects of Cu and nickel complexes of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole on human lymphocyte ability to proliferate and to produce cytokines in response to mitogenic stimuli were studied. Also, we described the metal complexes capacity to modulate the intracellular oxidant/antioxidant status.

Materials and methods

Synthesis

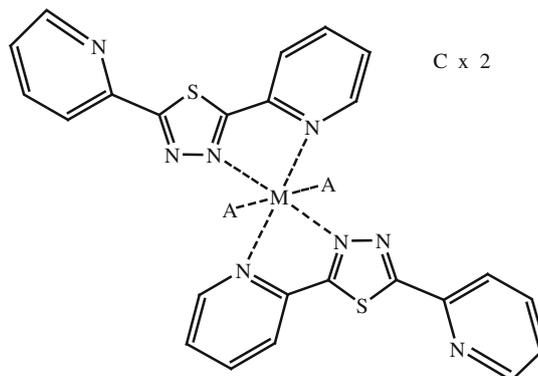
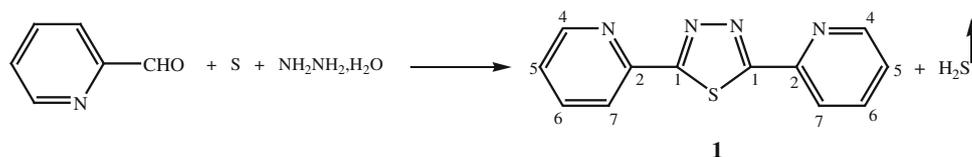
Reactants

All reactants and solvents were of analytical grade. Hydrazine, 2-Pyridinecarboxaldehyde, DMSO, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and Bu_4ClO_4 (TBAP) were purchased from Sigma-Aldrich and Fluka, respectively.

Synthesis of the ligand

The ligand, compound **1**: 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (bptd) was synthesized as previously described (Lebrini *et al.*, 2005). In general, a mixture of 2-Pyridinecarboxaldehyde (0.02 mol), sulfur (0.03 g-atom) and hydrazine hydrate (0.08 mol) in ethanol (20 mL) was introduced into a fluoropolymer cylindrical flask placed in a MARS5 XP-1500 PLUS CEM multimode microwave reactor and irradiated for 1 h (300 W) at 150 °C under pressure (Fig. 1). After cooling, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in chloroform. The chloroform solution was shaken with a concentrated sodium sulfide solution

Fig. 1 Molecular structures of the studied thiazazole–metal complexes



2: M= Cu, A= NO₃⁻

3: M= Ni, A= H₂O, C = ClO₄⁻

(to remove most of the sulfur), with water, dried (magnesium sulfate), filtered, and then evaporated by rotary evaporation. The resulting residue was crystallized from ethanol. It was obtained as a white solid; mp 218–219 °C; IR (KBr) ν_{\max} 1580, 156¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.62 (d, J = 6.1 Hz, 2H); 8.07 (d, J = 7.78 Hz, 2H); 8.34 (t, J = 7.92 Hz, 2H); 8.76 (t, J = 3.96 Hz, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 171.14 (C, C-1), 148.17 (CH, C-2), 150.30 (CH, C-4), 126.22 (CH, C-5), 138.02 (CH, C-6), 120.56 (CH, C-7); Anal. Calcd. for C₁₂H₈N₄S: C, 60.00; H, 3.33; N, 23.33; S, 13.33. Found: C, 60.13; H, 3.32; N, 23.41; S, 13.27.

Synthesis of the complexes

Cu(NO₃)₂·5H₂O (1.5 mmol, 0.35 g) in 8 mL of water was added to (0.42 mmol, 0.1 g) of ligand dissolved in 8 mL of EtOH. The solution was filtered and after 24 h the blue compound **2** crystallized at r.t. crystals were washed with water and dried under vacuum (Bentiss *et al.*, 2002).

C₁₂Cu_{0.5}H₈ClN₅O₃S, $Z = 4$, $a = 7,7369(11)$ Å, $b = 8,9126(13)$ Å, $c = 19,191(3)$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 93,644(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, space group $P2_1/c$.

Ni(ClO₄)₂·6H₂O (1.5 mmol, 0.55 g) in 8 mL of water was added to (0.42 mmol, 0.1 g) of ligand dissolved in 8 mL of EtOH. The solution was filtered and after 24 h the colorless compound **3** crystallized at r.t. Crystals were washed with water and dried under vacuum.

C₁₂Ni_{0.5}H₁₀ClN₄O₅S, $Z = 2$, $a = 10,9085(15)$ Å, $b = 11,0524(15)$ Å, $c = 13,2823(19)$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 101,055(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, space group $P2_1/n$.

The identification of these complexes was well documented by Bentiss *et al.* (2002).

Biological methods

Lymphocyte proliferation assay

In this study, we recruited 20 healthy men aged from 30 to 35 years. All subjects gave informed consent to the participation, and none were diabetic or obese, none were taking any medications, or had any concurrent illness likely to affect immune system. Blood samples were collected, after an overnight fast (12 h), by venipuncture in heparinized vacutainers. Lymphocytes were isolated from blood samples using Histopaque 1077 (Sigma) as we have previously reported (Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012). Lymphocyte solution was prepared in RPMI 1640 culture medium (Gibco, USA) at a concentration of 10⁶ cells/mL. Cells were cultured in RPMI supplemented with 25 mM HEPES buffer, 10 % heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), 2-mercaptoethanol (5 × 10⁻⁵M), penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (100 µg/ml) with or without Concanavalin A (ConA, T-cell specific mitogen, Sigma, St Louis, MO, USA), at 37 °C and 5 % CO₂ for 48 h. The compounds synthesized **1**, **2**, and **3** were added to cultures at different concentrations (1–100 µM) after initial dissolution in DMSO (final solvent concentration <1 %). After incubation, cell viability was controlled by trypan blue exclusion test, and was found to be unaffected by exposure of lymphocytes to any concentration used in this study (over 80 %). Lymphocyte

proliferation was assayed by the method of Mossman (1983) using MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich). Lymphocyte proliferation was expressed as stimulation index (SI):

$$\text{SI} = (\text{optical density at 565 nm of mitogen-stimulated cells} / \text{optical density of non-stimulated cells}) \times 100.$$

Cytokine production

Interleukins (IL-2, IL-4) and interferon- γ (INF γ) were assayed in culture supernatants using ELISA kits (R & D System, Oxford, UK). The Th1/Th2 ratio was determined as the INF γ /IL-4 ratio.

Lymphocyte oxidant/antioxidant markers

GSH measurement GSH levels in sonicated lymphocyte supernatants were measured using a Bioxytech GSH-400 kit (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA) as we have previously reported (Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012).

Determination of lymphocyte hydroperoxides Lymphocyte hydroperoxide contents (marker of lipid oxidation) were determined using a PeroxiDetect kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, USA), as we have previously reported (Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012).

Determination of lymphocyte carbonyl proteins Lymphocyte carbonyl proteins (markers of protein oxidation) were assayed by the 2,4-Dinitrophenyl hydrazine reaction (Carbonyl protein kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), as we have previously reported (Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012).

Determinations of lymphocyte antioxidant enzyme activities Lymphocyte catalase and superoxide dismutase activities were determined by established methods. Briefly, catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was measured by spectrophotometric analysis of the rate of hydrogen peroxide decomposition at 240 nm (Catalase assay Kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, USA). Enzyme activity was expressed as U/mg of protein. The activity of SOD was measured by the inhibition of xanthine oxidase activity related to the reduction of water-soluble tetrazolium salt (SOD assay Kit, Sigma-Aldrich GmbH, Switzerland) and expressed as U/mg of protein. Protein content was determined using a Lowry protein kit.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. After verification of the Gaussian distribution or log transformation of the data,

multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test (STATISTICA, version 4.1, Statsoft, Paris, France). The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

In vitro effects of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole—metal complexes on human lymphocyte proliferation

Mitogen-stimulated lymphocyte proliferations as expressed by SI, in the presence or the absence of compounds **1**, **2**, and **3** are shown in Table 1.

The results showed that the compound **1** did not affect ConA- stimulated lymphocyte proliferation at the concentration of 1–50 μM . However, **1** decreased lymphocyte proliferation at 100 μM . The compound **2** was found to induce a statistical reduction of SI at concentrations of 10 μM and over. A significant inhibition of lymphocyte proliferation was obtained in response to the compound **3** at concentrations of 1–100 μM as shown by the decrease in SI dose dependently. T-cells were more sensitive to **3** at low concentrations compared to their reactivity with **2** and **1**.

Effects of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole—metal complexes on IL-2, IL-4 and INF γ release

The secretion of cytokines IL-2 and INF γ (for Th1 phenotype), and IL-4 (for Th2 phenotype) was examined at 48 h of culture (Table 2). IL-2 and INF γ release were significantly decreased by **1** at 100 μM , by **2** at 10 μM and over, and by **3** at 1 μM and over dose dependently. It was observed that the compound **1** induced a significant reduction in IL-4 secretion at 50 and 100 μM while **3** induced a significant and progressive reduction in this cytokine at 1 μM and over. However, IL-4 release was not affected in response to the compound **2**.

To determine whether the exposure to compounds **1**, **2**, and **3** induced a shift in the Th1/Th2 balance, we calculated the ration between the production of INF γ , the prototypic Th1 cytokine, and the production of IL-4, the prototypic Th2 cytokine. The ratio INF γ /IL-4 was significantly enhanced by **1** at 50 and 100 μM and by **3**, dose dependently. However, the compound **2** was found to induce a significant decrease in Th1/Th2 ratio at 10–100 μM .

Effects of 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole—metal complexes on lymphocyte redox status

Lymphocyte reduced GSH levels did not change in response to the compound **1** at the concentrations of 1–50 μM . However, significant reduction in GSH contents

Table 1 In vitro effects of thiadiazole metal complexes on the proliferative response (stimulation index, SI) of mitogen conA stimulated human lymphocytes

	1 Thiadiazole	2 Thiadiazole copper complexes	3 Thiadiazole nickel complexes
ConA	197.50 ± 11.60 ^a	197.50 ± 11.60 ^a	197.50 ± 11.60 ^a
ConA + 1 μM	192.57 ± 12.25 ^a	194.70 ± 10.11 ^a	142.50 ± 12.13 ^b
ConA + 10 μM	190.40 ± 13.44 ^a	150.58 ± 10.15 ^b	108.52 ± 10.34 ^c
ConA + 50 μM	189.37 ± 8.35 ^a	128.70 ± 6.82 ^c	78.40 ± 4.66 ^d
ConA + 100 μM	116.50 ± 7.03 ^b	80.40 ± 7.41 ^c	50.40 ± 4.32 ^e

The values are mean ± SD of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test

a, b, c, d, e Indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$)

was noted in response to higher concentrations of **1** (100 μM), **2**, and **3** were found to induce a significant decrease in intracellular GSH levels dose dependently (Table 3).

The presence of the compound **1** in the culture at 1–50 μM did not modify lymphocyte hydroperoxide and carbonyl protein levels (Table 3). However, a significant rise in intracellular hydroperoxide and carbonyl protein levels was observed in response to **1** at 100 μM. Intracellular hydroperoxides and carbonyl proteins increased gradually by **2** and **3**; the highest values were obtained with **3**.

Effects 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole—metal complexes on lymphocyte cellular antioxidant enzyme activities

A statistical reduction in lymphocyte catalase and SOD activities was shown in response to **1** only at 100 μM concentration (Table 4). **2** had no effect on lymphocyte catalase activity at any concentrations, but it enhanced SOD activity at 10–100 μM. **3** was found to induce a significant fall in catalase and SOD activities at 1–100 μM dose dependently.

Discussion

Our current study demonstrated that 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole metal complexes have stronger immunomodulating action than their ligand. To the best of our knowledge, the immunomodulating activity of these compounds was not documented previously. In vitro lymphocyte proliferation and cytokine production after mitogen stimulation are a useful technique to evaluate lymphocyte function. Immunomodulators are biological response modifiers that suppress or stimulate lymphocyte proliferation and change Th1-(cell mediated) and Th2-(humoral) associated cytokine secretion. They are able to modulate

multiple intercellular and intracellular molecular signals involved in the immune system. We have previously used this methodology to test several chemical substances and the results were quite promising (Merzouk *et al.*, 2008; Medjdoub *et al.*, 2011; Baba Hamed *et al.*, 2012).

In this study, we observed an immunosuppressive effect induced by **1**, **2**, and **3** on lymphocyte response. This effect was weak with the ligand and strong with metal complexes. Previous results have suggested enhanced biological function in response to other metal complexes (Patel *et al.*, 2006; Balan *et al.*, 2013). Since cell viability was not affected by compounds **1**, **2**, and **3**, an immunosuppressive or antiproliferative mechanism is then considered.

Lymphocyte proliferation is a basic phenomenon involved in most immunological events. The first signal is provided by the binding of antigens or mitogens to cell surface receptors, followed by a number of plasma membrane-associated events including the activation of phospholipase C with the generation of the second messengers inositol triphosphate and diacylglycerol, Ca²⁺ mobilization, protein kinase C, and tyrosine kinase activation, substrate and ion transport into cell, and secretion of cytokines (Altman *et al.*, 1990). IL-2 is a potent T lymphocyte growth factor (Cantrell and Smith, 1984). IL-2 quantification provided confirmation on lymphocyte proliferation since T-cell growth was associated with the production of IL-2. In our study, the three compounds used decreased IL-2 secretion. The three compounds might be expected to influence any step of the processes leading to proliferation, as documented for other immunosuppressive agents (Takezawa *et al.*, 2006; Pourrajab *et al.*, 2012; Alex *et al.*, 2013). In addition, the antiproliferative effect of the 1,3,4-thiadiazole in an in vitro culture system has been previously documented (Chauvière *et al.*, 2003; Pourrajab *et al.*, 2012). It has been reported that Cu as CuSO₄ inhibits the capacity of human lymphocytes to proliferate in response to mitogens due to an inhibitory effect on helper T-cell function (Lipsky, 1981). It has also been reported

Table 2 Cytokine secretion by ConA –stimulated T lymphocytes and INF γ /IL-4 ratio (Th1/Th2) in the presence of thiazole metal complexes

	Thiazole	Thiazole copper complexes	Thiazole nickel complexes
IL-2 (Pg/mL)			
ConA	4056.50 \pm 89.76 ^a	4056.50 \pm 89.76 ^a	4056.50 \pm 89.76 ^a
ConA + 1 μ M	3927.03 \pm 102.44 ^a	4154.30 \pm 114.27 ^a	2523.50 \pm 112.35 ^b
ConA + 10 μ M	3905.60 \pm 111.53 ^a	3408.52 \pm 110.22 ^b	2104.31 \pm 110.41 ^c
ConA + 50 μ M	3870.75 \pm 118.52 ^a	2688.40 \pm 73.85 ^c	1684.60 \pm 84.56 ^d
ConA + 100 μ M	2008.51 \pm 122.33 ^b	1940.50 \pm 87.16 ^d	1350.30 \pm 64.27 ^e
INF γ (Pg/mL)			
ConA	405.40 \pm 29.63 ^a	405.40 \pm 29.63 ^a	405.40 \pm 29.63 ^a
ConA + 1 μ M	400.08 \pm 22.45 ^a	404.88 \pm 24.70 ^a	323.10 \pm 12.54 ^b
ConA + 10 μ M	392.70 \pm 21.54 ^a	329.42 \pm 20.04 ^b	254.36 \pm 11.32 ^c
ConA + 50 μ M	400.75 \pm 28.22 ^a	287.50 \pm 18.85 ^c	205.30 \pm 10.47 ^d
ConA + 100 μ M	344.56 \pm 16.53 ^b	200.22 \pm 17.65 ^d	172.31 \pm 7.22 ^e
IL-4 (Pg/mL)			
ConA	45.05 \pm 6.35 ^a	45.05 \pm 6.35 ^a	45.05 \pm 6.35 ^a
ConA + 1 μ M	40.85 \pm 4.53 ^a	44.82 \pm 4.73 ^a	33.42 \pm 2.51 ^b
ConA + 10 μ M	39.32 \pm 4.22 ^a	45.41 \pm 3.65 ^a	24.65 \pm 2.41 ^c
ConA + 50 μ M	37.55 \pm 4.03 ^b	43.50 \pm 3.66 ^a	18.50 \pm 1.65 ^d
ConA + 100 μ M	30.77 \pm 5.04 ^c	44.19 \pm 4.58 ^a	14.01 \pm 1.24 ^e
INF γ /IL-4			
ConA	9.05 \pm 0.53 ^c	9.05 \pm 0.53 ^a	9.05 \pm 0.53 ^e
ConA + 1 μ M	9.78 \pm 0.40 ^c	9.03 \pm 0.40 ^a	9.70 \pm 0.34 ^d
ConA + 10 μ M	9.98 \pm 0.54 ^c	7.25 \pm 0.34 ^b	10.36 \pm 0.32 ^c
ConA + 50 μ M	10.68 \pm 0.22 ^b	6.34 \pm 0.30 ^c	11.10 \pm 0.57 ^b
ConA + 100 μ M	11.26 \pm 0.53 ^a	4.72 \pm 0.45 ^d	12.04 \pm 0.42 ^a

The values are mean \pm SD of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test

a, b, c, d, e Indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$)

that exposure to nickel ions caused a dose dependent inhibition of cell proliferation, cell damage, and reduction of viability was apparent from 500 μ M to 5 mM (D'Antò *et al.*, 2012). Nickel concentrations used in the present study do not fall in the toxic range and our present data confirm these previous findings.

Our findings showed that the relationships between immune effects and the induction of an intracellular oxidative stress by these compounds were evident at high concentrations for the ligand **1** (100 μ M) and at lower concentrations for copper complex **2** (10 μ M) and for nickel complex **3** (1 μ M). In addition, the immunosuppression by **2** was less aggressive on T-cells compared to **3**, and was associated with a stimulation of the intracellular antioxidant defense (SOD activity) and an anti-inflammatory effect as shown by Th1/Th2 cytokine profiles.

Cytokines are important protein mediators of the immune response. Type 1 cytokines (IL-2 and INF γ) promote pro-inflammatory immune responses, whereas type 2 cytokines (IL-4) promote anti-inflammatory and antibody

dependent immune responses. Dysregulated Th1/Th2 cytokine production and defects in Th1 or Th2 subsets have been implicated in the progression of multiple immune disorders. As a result, there is a great interest in using type 1 and type 2 cytokines as markers of human immune function. In our study, the compounds **1** and **3** decreased the secretion of IL-2, IL-4, and INF γ in activated lymphocytes and were potent at skewing this balance away from Th2 toward Th1 suggesting a pro-inflammatory effect. It has been shown that nickel stimuli significantly inhibit in vitro INF γ production by T-cells (Marigo *et al.*, 2003), and our results were in agreement with these data. However, the compound **2** induced a reduction in IL-2 and INF γ secretion without affecting IL-4 release by activated T-cells. Consequently, the Th1/Th2 balance was shifted toward a Th2 cytokine response in the presence of **2** suggesting an anti-inflammatory effect.

It appeared that metal complexes were more active in inhibiting Th1 type responses than their ligand. Indeed, nickel complexes have a more pronounced inhibitory effect

Table 3 Cellular GSH, hydroperoxide, and carbonyl protein contents of stimulated T lymphocytes in the presence of thiadiazole metal complexes

	Thiadiazole	Thiadiazole copper complexes	Thiadiazole nickel complexes
GSH(nM/10 ⁶ cells)			
ConA	16.50 ± 1.76 ^a	16.50 ± 1.76 ^a	16.50 ± 1.76 ^a
ConA + 1 μM	17.03 ± 1.44 ^a	15.80 ± 1.27 ^a	10.50 ± 1.35 ^b
ConA + 10 μM	15.60 ± 2.03 ^a	10.52 ± 1.02 ^b	8.31 ± 0.48 ^c
ConA + 50 μM	16.75 ± 1.32 ^a	8.42 ± 0.85 ^c	6.60 ± 0.56 ^d
ConA + 100 μM	8.22 ± 1.03 ^b	6.10 ± 0.56 ^d	4.33 ± 0.47 ^e
HYDP(nM/10 ⁶ cells)			
ConA	2.06 ± 0.63 ^b	2.06 ± 0.63 ^d	2.06 ± 0.63 ^e
ConA + 1 μM	2.08 ± 0.45 ^b	2.48 ± 0.50 ^d	3.10 ± 0.54 ^d
ConA + 10 μM	2.30 ± 0.54 ^b	3.42 ± 0.34 ^c	4.26 ± 0.32 ^c
ConA + 50 μM	2.45 ± 0.42 ^b	4.10 ± 0.25 ^b	5.30 ± 0.47 ^b
ConA + 100 μM	4.58 ± 0.53 ^a	5.32 ± 0.35 ^a	6.41 ± 0.52 ^a
PCAR(nM/10 ⁶ cells)			
ConA	2.05 ± 0.35 ^b	2.05 ± 0.35 ^d	2.05 ± 0.35 ^e
ConA + 1 μM	2.45 ± 0.53 ^b	2.22 ± 0.53 ^d	3.42 ± 0.51 ^d
ConA + 10 μM	2.32 ± 0.34 ^b	3.12 ± 0.65 ^c	3.65 ± 0.41 ^c
ConA + 50 μM	2.55 ± 0.33 ^b	3.70 ± 0.36 ^b	4.30 ± 0.30 ^b
ConA + 100 μM	3.77 ± 0.54 ^a	4.28 ± 0.58 ^a	5.31 ± 0.44 ^a

The values are mean ± SD of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test

a, b, c, d, e Indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$)

on Th2-type responses than the ligand, while Cu complexes had no effects on Th2 lymphocytes.

The regulation of immune response by redox processes is well known. The functional activation of T lymphocytes is dependent of ROS concentrations and a shift in the intracellular GSH redox state (Droge, 2002). Low concentrations of superoxide and hydrogen peroxide were shown to increase the production of IL-2 by mitogen-stimulated T-cells (Los *et al.*, 1995). However, high dose of hydrogen peroxide inhibited T-cell proliferation (Los *et al.*, 1995).

Our results on redox markers revealed that lymphocytes exposed to the compounds **1**, **2**, and **3** were submitted to an oxidative stress characterized by an increase in hydroperoxides and carbonyl proteins and a significant fall in GSH levels in a dose-dependent manner. These variations were strong with **3**. Interestingly, some of the potent thiadiazoles were found to enhance ROS production in immune cells (Pourrajab *et al.*, 2012). Previous data showed that low dose of Nickel stimulated the respiratory burst of human neutrophils by increasing ROS production (Ciubar *et al.*, 2006).

Table 4 Antioxidant enzyme activities of stimulated T lymphocytes in the presence of thiadiazole metal complexes

	Thiadiazole	Thiadiazole copper complexes	Thiadiazole nickel complexes
Catalase (U/mg)			
ConA	25.50 ± 1.26 ^a	25.50 ± 1.26 ^a	25.50 ± 1.26 ^a
ConA + 1 μM	26.03 ± 1.14 ^a	25.67 ± 1.21 ^a	21.30 ± 1.04 ^b
ConA + 10 μM	25.63 ± 1.43 ^a	24.58 ± 1.52 ^a	18.61 ± 1.08 ^c
ConA + 50 μM	25.35 ± 1.38 ^a	25.42 ± 1.80 ^a	15.04 ± 1.06 ^d
ConA + 100 μM	14.22 ± 1.16 ^b	24.17 ± 1.56 ^a	12.33 ± 0.87 ^e
SOD (U/mg)			
ConA	82.03 ± 2.65 ^a	82.03 ± 2.65 ^d	82.03 ± 2.65 ^a
ConA + 1 μM	82.85 ± 2.45 ^a	84.88 ± 2.50 ^d	67.10 ± 2.54 ^b
ConA + 10 μM	83.37 ± 2.54 ^a	114.42 ± 3.46 ^c	53.86 ± 1.31 ^c
ConA + 50 μM	81.45 ± 2.42 ^a	135.50 ± 4.88 ^b	44.70 ± 1.47 ^d
ConA + 100 μM	44.58 ± 1.53 ^b	174.22 ± 6.65 ^a	36.15 ± 1.33 ^e

The values are mean ± SD of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test

a, b, c, d, e Indicate significant differences obtained with different incubations ($p < 0.05$)

GSH is critical for cellular protection such as detoxification of ROS, conjugation, and excretion of toxic molecules and control of inflammatory cytokine cascade. GSH depletion in cells leads to impairment of the cellular defense against ROS and may result in oxidative injury. In our study, we observed decreased concentration of GSH in lymphocytes exposed to the three compounds. It might be due to enhanced free radical scavenging in treated lymphocytes.

Indeed, intracellular antioxidant enzyme activities, catalase and SOD, were decreased in the presence of compounds **1** and **3**. It is well known that antioxidant enzymes may be consumed or inactivated in high oxidative conditions. However, in the presence of the compound **2**, catalase activity was not affected and SOD activity was enhanced in lymphocytes.

Cu ion is a component of the enzyme SOD which regulates the intracellular concentration of superoxide anion by converting it into H₂O₂ (Roughead *et al.*, 1999), after which H₂O₂ is chemically neutralized by catalase (Ma *et al.*, 2006). An increase in SOD activity by any substance is therefore related to enhanced protection against oxidative stress. Despite high SOD activity in lymphocytes treated with **2**, oxidative stress markers were increased suggesting that free radicals production exceeded their scavenging.

It was interesting to note that the ligand **1**-induced inhibition of lymphocyte proliferation and intracellular oxidative stress at 100 μM, while Cu and nickel

complexes, **2** and **3**, were active at 10 and 1 μM , respectively. The lipophilicity of metal complexes is increased which may be a contributing factor for the enhanced activity of these complexes. Nickel was more potent than Cu for inhibiting the lymphocyte proliferation and for inducing intracellular oxidative stress, while Cu was more potent than nickel for activity against oxidative stress.

In conclusion, the ligand 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole and its metal complexes were found to be potent immunosuppressive. The compounds **1** and **3** inhibit in vitro T-cell proliferation, IL-2, IL-4, and IFN γ secretion with a shift away from Th2 response to Th1 phenotype. The compound **2** induced a reduction in lymphocyte proliferation and in IL-2 and IFN γ secretion with a shift away to Th2 phenotype. These changes were associated to significant modifications of oxidative stress biomarkers, which were more pronounced with metal complexes than the ligand. We suggested that these metal complexes could be used as treatment of disorders that involve an inappropriately immune response.

Acknowledgments This work was supported by the Algerian Research Investigation Office (PNR-ATRSS). The authors thank Bentiss and collaborators for the structural identification of metal complexes. The authors have no conflicting financial interests.

References

- Alex J, Shah CS, Kumar SS, Alex AT, Maliyakkal N, Moorkoth S, Mathew JE (2013) Synthesis, in vitro anticancer and antioxidant activity of thiadiazole substituted thiazolidin-4-ones. *Acta Pharm* 63:397–408
- Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463–499
- Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T (1990) Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 48:227–360
- Anderson WL, Tomasi TB (1984) Suppression of lymphocyte proliferation by copper-albumin chelates. *J Biol Chem* 259:7602–7606
- Baba Hamed Y, Medjdoub A, Mostefa Kara B, Merzouk H, Villemin D, Narce M (2012) 5,6-Dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate in vitro human T lymphocyte function. *Mol Cell Biochem* 360:23–33
- Balan AMKR, Ashok RFN, Vasanthi M, Prabu R, Paulraj A (2013) Mixed ligand complexes of nickel(II), copper(II) and zinc(II) with nicotinilide and thiocyanate. *Int J Life Sci Pharm Res* 3:67–75
- Bentiss F, Lagrenée M, Wignacourt JP, Holt EM (2002) Complexes of cobalt(II), nickel(II) and copper(II) with a thia ligand; 2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole: structural identification. *Polyhedron* 21:403–408
- Bentiss F, Mernari B, Traisnel M, Vezin H, Lagrenée M (2011) On the relationship between corrosion inhibiting effect and molecular structure of 2,5-bis(n-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives in acidic media: AC impedance and DFT studies. *Corros Sci* 53:487–495
- Cantrell DA, Smith KA (1984) The interleukin 2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224:1312–1316
- Chauvière G, Bouteille B, Enanga B, De Albuquerque C, Croft SL, Dumas M, Périé J (2003) Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead. *J Med Chem* 46:427–440
- Ciubăr R, Cîmpean A, Iordăchescu D (2006) Effects of nickel(II) on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Rev Roum Chim* 51:1169–1173
- Cope AP (2002) Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res* 4:197–211
- Cotton FA, Wilkinson G (1988) *Advanced inorganic chemistry*, 5th edn. Wiley, New York, pp 1358–1371
- D'Antò V, Valletta R, Amato M, Schweik H, Simeone M, Paduano S, Rengo S, Spagnuolo G (2012) Effect of nickel chloride on cell proliferation. *The Open Dent J* 6:177–181
- De La Fuente M, Victor VM (2000) Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 78:49–54
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I (2006) *Roitt's essential immunology*, 11th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
- Flynn A (1984) Control of in vitro lymphocyte proliferation by copper, magnesium and zinc deficiency. *J Nutr* 114:2034–2042
- Greenwood NN, Earnshaw A (1984) *Chemistry of the elements*. Pergamon Press, Oxford, pp 1392–1420
- Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM (2005) The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol* 175:7965–7972
- Labro MT (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clin Microbiol Rev* 13:615–650
- Lebrini M, Bentiss F, Lagrenée M (2005) Rapid synthesis of 2,5-disubstituted 1,3,4-thiadiazoles under microwave irradiation. *J Heterocycl Chem* 42:991–997
- Lipsky PE (1981) Modulation of human antibody production in vitro by D-penicillamine and CUS04: inhibition of helper T cell function. *J Rheumatol* 7:69–73
- Los M, Dro GEW, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol* 25:159–165
- Ma W, Nunes I, Young HSC, Spector A (2006) Catalase enrichment using recombinant adenovirus protects $\alpha\text{TNF-1}$ cells from H2O2. *Free Radical Biol Med* 40:335–340
- Marigo M, Nouer DF, Santos Genelhu MC, Malaquias LCC, Pizziolo VR, Costa ASV, Martins-Filho OA, Alves-Oliveira LF (2003) Evaluation of immunologic profile in patients with nickel sensitivity due to use of fixed orthodontic appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 124:46–52
- Mazzone G, Bonina F, Puglisi G, Arrigo-Reina R, Cosentino C, Blandino G (1982) Synthesis and biological evaluation of some 5-aryl-2-amino-1,3,4-oxa(thia)diazoles. *Farmaco Sci* 37:685–700
- Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M (2011) Effects of mancozeb and metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pestic Biochem Physio* 101:27–33
- Merzouk SA, Saker M, Briksi Reguig K, Soulimane N, Merzouk H, Guermouche B, Yahia Berrouguet A, Hichami A, Narce M, Khan NA (2008) N-3 polyunsaturated fatty acids modulate in vitro T cell function in type I diabetic patients. *Lipids* 43:485–497
- Mossman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Patel RN, Singh N, Shukla KK, Gundla VLN, Chauhan UK (2006) Synthesis, characterization and biological activity of ternary copper(II) complexes containing polypyridyl ligands. *Spectrochim Acta A* 63:21–26
- Pourrajab F, Forouzannia SK, Tabatabaee SA (2012) Novel immunomodulatory function of 1,3,4-thiadiazole derivatives with leishmanicidal activity. *J Antimicrob Chemother* 67:1968–1978

- Rhee YS, Hermann JR, Burnham K, Arquitt AB, Toecker BJ (2002) The effects of chromium and copper supplementation on mitogen-stimulated T cell proliferation in hypercholesterolaemic postmenopausal women. *Clin Exp Immunol* 127:463–469
- Roughead ZK, Johnson LK, Hunt JR (1999) Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed varying concentrations of iron, zinc and copper. *J Nutr* 129:1368–1376
- Takezawa R, Cheng H, Beck A, Ishikawa J, Launay P, Kubota H, Kinet JP, Fleig A, Yamada T, Penner R (2006) A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte Ca²⁺ influx and cytokine production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity. *Mol Pharmacol* 69:1413–1420
- Tanveer A, Singh AK, Jaiswal N, Singh D (2012) Synthesis and pharmacological activity of 1,3,4-thiadiazole derivatives: a review. *Int Res J Pharmacy* 3:69–82
- Vasoya SL, Paghdar DJ, Chovatia PT, Joshi HS (2005) Synthesis of some new thiosemicarbazide and 1,3,4-thiadiazole heterocycles bearing benzo[b] thiophene nucleus as a potent antitubercular and antimicrobial agents. *J Sci Islam Repub Iran* 16:33–36

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbpsc.org

Section A: Chemical Sciences

CODEN (USA): JCBPAT

Research Article

Electrochemical and Biological Studies of Complex of Nickel (II) with a 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole

Y. Baba Hamed¹, T. Attar^{1,2*}, Y. Harek¹, H. Merzouk³, L. Larabi¹

¹Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, Faculty of sciences, University AbouBekrBelkaid, Tlemcen 13000, Algeria.

²University Center of Naâma 45000, Algeria.

³Laboratory of Physiology, Physiopathology and Biochemistry of Nutrition, Faculty of NaturalandLifeSciences,EarthandUniverse, University AbouBekrBelkaid, Tlemcen 13000, Algeria.

Received: 06 May 2014; **Revised:** 13 June 2014; **Accepted:** 25 June 2014

Abstract: The synthesis and characterization of 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L1) derived from Hydrazine and 2-Pyridinecarboxaldehyde and their Ni(II) complexes are reported. The electrochemical behavior of the Ni(II) complexes was investigated in DMSO by cyclic voltammetry using hanging mercury drop electrode (HMDE). The obtained results showed that the complexes displayed Ni(0)/Ni(II) couples irreversible waves. A biological study was also carried out to determine the in vitro effects of different concentrations of nickel complexes of the ligand (L1) on the proliferative response of human mitogen-stimulated lymphocytes.

Keyword: 1, 3, 4-thiadiazole, nickel complex, cyclic voltammetry, HMDE, lymphocytes

INTRODUCTION

Thiadiazoles are an important class of heterocyclic compounds that exhibit diverse applications in several fields like organic synthesis, pharmaceutical and biological applications¹⁻⁵. Among the different thiadiazoles, 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L₁) are well known in the literature, their preparation

depend on the reaction of aromatic aldehyde on hydrazine hydrate in presence of sulphur under microwave irradiation⁶. Thiodiazoles synthesis permit to be react with different metals such as Ni(II) in the goal to study their electrochemical behavior. It's well established that transition metals are easily susceptible to oxidation and reduction because of their ability to easily change oxidation state. Also, coordination chemistry of transition metals complexes in a high oxidation state is an area of considerable importance because of their biological significance as redox enzymes models⁷. In order to make a contribution in this area, the couple Ni(0)/Ni(II) electrochemical properties are studied, oxidation process mechanism is investigate using the cyclic voltammetry on the mercury electrode. Because of their large area of biological activity, this work is not yet described in the literature, and consists to study the effect of ligand 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L_1) and his complex Ni on the lymphocyte proliferation.

EXPERIMENTAL

Reactants: All reactants and solvents were of analytical grade. Hydrazine-2-Pyridinecarboxaldehyde, DMSO, Ni(ClO₄)₆·6H₂O and Bu₄ClO₄(TBAP) were purchased from Sigma-Aldrich and Fluka respectively.

Measurements: A MDE 150 Stand Polarographic (Radiometer Copenhagen) Tracelab 50, controlled by the computer software Trace-master 5 through a Polarographic analyser POL 150 was used. Electrochemical measurements of the ligand (L_1) and its Ni(II) complex (NiL_1) were carried out by cyclic voltammetry in DMSO solutions containing 0.1 M TBAP as supporting electrolyte. A conventional three electrode cell was used. The working electrode was a hanging mercury drop electrode (HMDE), potentials are expressed versus the Ag/AgCl (3M) electrode separated from the test solution by a bridge containing the solvent/supporting electrolyte. The auxiliary electrode was a Pt wire. Pure N₂ was bubbled through the cell to deaerated the solution.

Preparation of ligand and complex: 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole (L_1) was synthesized as previously described⁸.

Complex (NiL_1): Ni(ClO₄)₆·6H₂O (1.5 mmol, 0.55g) in 8 mL of water was added to (0.42 mmol, 0.1g) of ligand dissolved in 8 mL of EtOH. The solution was filtered and after 24h the colorless compound (I) crystallized at r.t. crystals were washed with water and dried under vacuum.

C₁₂Ni_{0.5}H₁₀ClN₄O₅S, Z = 2, a = 10, 9085(15) Å, b = 11,0524(15) Å, c = 13,2823(19) Å, α = 90°, β = 101,055(3)°, γ = 90°, space group P2₁/n.

Lymphocyte proliferation assay: In this study, we recruited 20 healthy men aged from 30 to 35 years. All subjects gave informed consent to the procedure, and none were diabetic or obese, were taking any medications, or had any concurrent illness likely to affect immune system. Blood samples were collected, after an overnight fast (12 hours), by venipuncture in heparinized vacutainers. Lymphocytes were isolated from blood samples using Histopaque 1077 (Sigma) as we have previously reported^{9,10}. Lymphocyte solution was prepared in RPMI 1640 culture medium (Gibco, USA) at a concentration of 10⁶ cells/mL. Cells were cultured in RPMI supplemented with 25 mM HEPES buffer, 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol (5·10⁻⁵M), penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (100 µg/ml) with or without concanavalin A (Con A, T-cell specific mitogen, Sigma, St Louis, MO, USA), at 37°C and 5% CO₂ for 48h. The compounds synthesized L_1 and NiL_1 were added to cultures at different

concentrations (1 μ M to 100 μ M) after initial dissolution in DMSO (final solvent concentration < 1%). After incubation, cell viability was controlled by trypan blue exclusion test, and was found to be unaffected by exposure of lymphocytes to any concentration used in this study (over 80%). Lymphocyte proliferation was assayed by the method of Mosmann (1983) using MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich). Lymphocyte proliferation was expressed as stimulation index (SI):SI=(optical density at 565 nm of mitogen-stimulated cells/optical density of non-stimulated cells) X 100.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical studies: The electrochemical properties of ligand 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole(L₁) and its Ni(II) complex in DMSO solutions were investigated. The electrochemical behavior of NiL₁ is shown in Figure 1, the potential range is +300 mV to -1600 mV at the sweep rate 25 mV sec⁻¹. From the voltammogram, it is clear that the electrode surface materials suffered two oxidation and two reduction steps. The peaks originated by the oxidation steps are represented as p_{a1}, p_{a2} and p_{a3} and those generated by the reduction are p_{c1}, p_{c2} and p_{c3}. Potentials of the oxidation peaks are 20, -200 and -1380mV, and those of reduction peaks are -50, -1060 and -1460mV, respectively. P_{a2} and p_{c2} is assigned to the oxidation and reduction of the central metal Ni (II) complex. P_{a1}, p_{a3}, p_{c1} and p_{c3} are observed in 130, -1340, 10 and -1430 mV respectively as the corresponding ligand, inset in **Figure 1**.

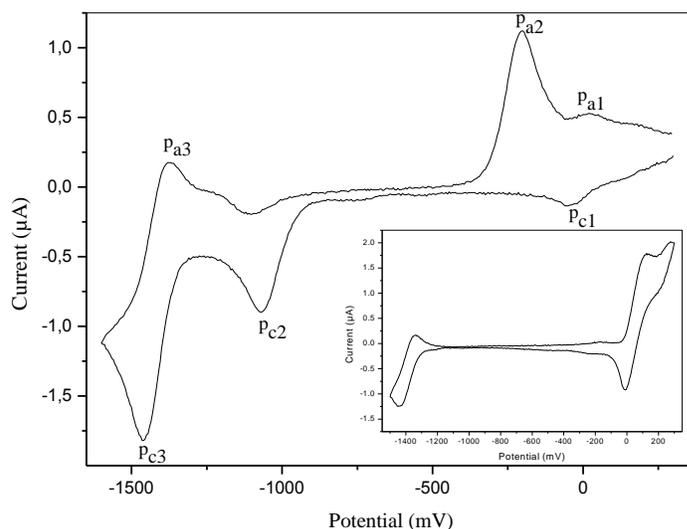


Fig.1: Cyclic voltammogram of 2 mM Ni(bptd)₂(H₂O)₂(ClO₄)₂ in DMSO solution containing 0.1 M TBAP as a supporting electrolyte, recorded over a HMDE electrode at scan rate of 25 mVsec⁻¹. Inset shows the c.v. of bptd (1mM) in the same solution.

Since the principal goal of the anodic and cathodic study was to investigate the peak 2 process, which is the only peak arising directly from the oxidation of nickel (II), further details concerning the other peaks will not be presented here. The electrochemical irreversibility of this process was confirmed by the fact

that, in the range of sweep rates from 300 to -1600 mV sec⁻¹, the slope dE/dlogv (for the complex) has a value of 46 mV, which is larger than those values expected for reversible processes. Furthermore, the oxidation and reduction peak currents (I_{pc2} , I_{pa2}) of the nickel(II) complex were linear with $v^{1/2}$ over the entire range of studied sweep rates at a complex concentration up to 2mM. This result indicates that the process is diffusion controlled. The value of the symmetry coefficient ($\alpha=0.41$) has been evaluated by the expression $(E_p - E_{p/2} = 48/\alpha n)^{11}$ when $n=2$, which confirmed the irreversible nature of the electrode process Ni(0)/Ni(II). Where, $E_{p/2}$ is the half-peak potential, n is the total number of electrons involved in the reaction.

Analysis of the voltammetric data for the second c.v wave indicates that the anodic to cathodic peak separation, $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, has a larger value than what would be expected for a irreversible two-electron transfer process and varies with scan rate cf, **Table 1**.

Table-1: Cyclic voltammetric data for the first c.v wave of 2 mM Ni(bptd)₂(H₂O)₂(CLO₄)₂ in DMSO solution as a function of scan rate.

v (mVsec ⁻¹)	$-E_{pc}$ (V)	i_{pc} (μ A)	$-E_{pa}$ (V)	i_{pa} (μ A)	ΔE_p (V)	$E_{pc} - E_{p/2}$ (mV)	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pc}/v^{1/2}$ (μ A V ^{-1/2} sec ^{1/2})
25	1.07	0.78	0.20	1.09	0.87	40	1.40	5.20
50	1.08	1.27	0.19	1.38	0.89	50	1.09	5.70
125	1.10	1.92	0.16	1.88	0.93	60	0.98	5.48
250	1.13	2.80	0.14	2.48	0.99	65	0.88	5.59
500	1.14	3.85	0.11	3.55	1.03	70	0.92	5.06
1000	1.17	5.35	0.06	4.30	1.11	80	0.80	5.35

This suggests that the electrode reaction is not perfectly Nernstian. On the other hand, the unit ratio of anodic to cathodic currents, i_{pa}/i_{pc} constancy of the peak width, $E_{pc} - E_{p/2}$ and the peak current function, $i_{pc}/v^{1/2}$ with variation of the potential scan rate, v, indicate that the electrode reaction corresponds to a irreversible two electron transfer process. Thus, taking into account the electrochemical inactivity of the ligand 2,5-Bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole, the electrode reaction is attributed to the Ni(II)/Ni(0), redox couple.

In the other hand, the **Figure 2 and Figure 3** shows that at higher complex concentration and for $v > 500$ mV sec⁻¹ the increase of I_{pa1} with $v^{1/2}$ was less than linear. These results indicate that the complex oxidation and reduction occurs via an irreversible electron transfer followed by a chemical reaction at complex concentration > 1.5 mmol L⁻¹.

Figure 4 shows the cyclic voltammograms for Ni(bptd)₂(H₂O)₂(CLO₄)₂ at HDME electrode at the scan rates of 25, 50, 125, 250, 500 and 1000 mV sec⁻¹ in between the potential range 300 to -1600 mV. It can be seen that the oxidation-reduction behaviors showed the same trends with the variation of scan rates. Peak currents gradually increased. The peak p_{a2} significantly moved to the positive direction and the peak p_{c2} moved to the negative potential direction. As a result, differences in peak potentials ΔE_p gradually increased. Analogous movement of peaks relevant to p_{a1} , p_{a3} , p_{c1} , and p_{c3} were also observed on Ni complex at different scan rates.

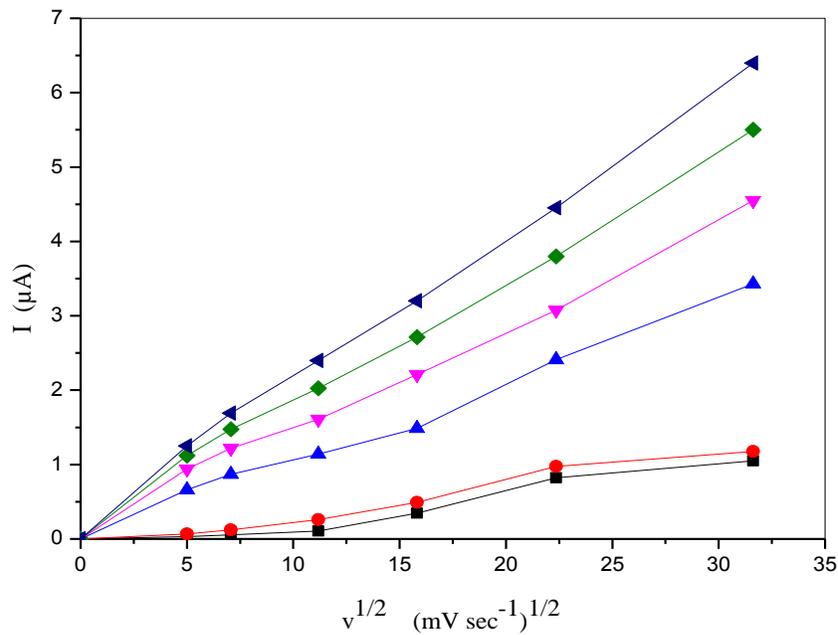


Fig. 2: Variation of the anodic peak currents, I_{pa} , versus $v^{1/2}$ for various $Ni(bptd)_2(H_2O)_2(CLO_4)_2$ concentrations: (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.5; (◆) 2.0; (►) 2.5 mmol L⁻¹.

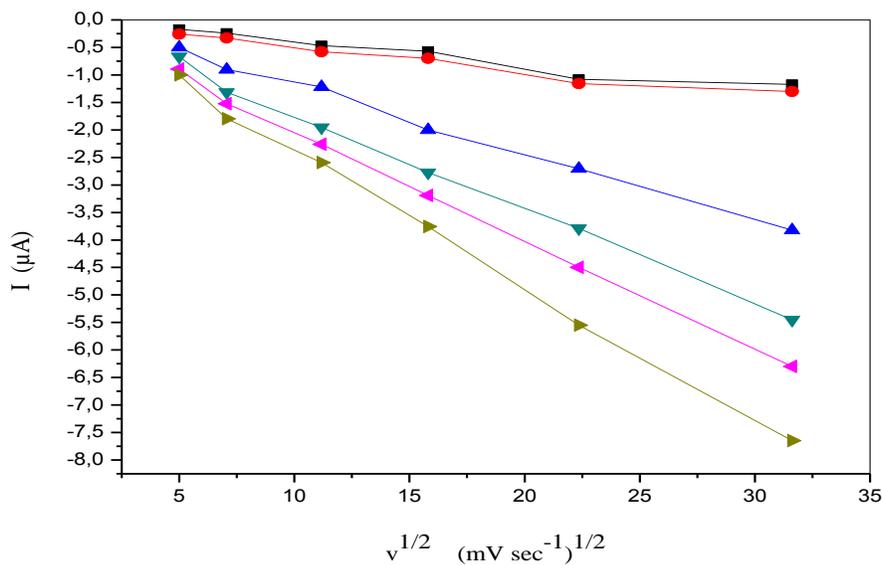


Fig. 3: Variation of the cathodic peak currents, I_{pc} , versus $v^{1/2}$ for various $Ni(bptd)_2(H_2O)_2(CLO_4)_2$ concentrations: (■) 0.5; (●) 0.75; (▲) 1.0; (▼) 1.5; (◄) 2.0; (►) 2.5 mmol L⁻¹.

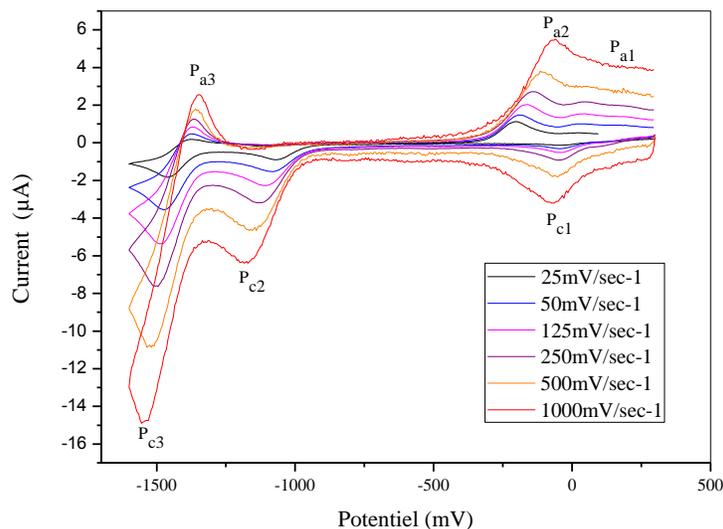


Figure 4: Cyclic voltammogram of 2 mM $\text{Ni}(\text{bptd})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CLO}_4)_2$ containing 0.1 M TBAP as a supporting electrolyte in DMSO solution, recorded over a HMDE electrode at various potential scan rates.

Lymphocyte proliferation studies: Mitogen stimulated lymphocyte proliferations as expressed by stimulation index (SI), in the presence or the absence of compounds L_1 and NiL_1 are shown in figure 5. The results showed that the compound **1** had no effect on lymphocyte proliferation at the concentration of 1 μM to 50 μM . However, concentrations of 100 μM of L_1 induced a significant inhibition of Con A-stimulated human lymphocyte proliferation. The compound NiL_1 at concentrations of 1 μM to 100 μM resulted in a significant inhibition of Con A-stimulated lymphocyte proliferation as shown by the decrease in SI dose dependently. T cells were more sensitive to NiL_1 at low concentrations compared to their reactivity with L_1 .

In this study, we observed an immunosuppressive effect induced by L_1 and NiL_1 on lymphocyte response. This effect was weak with the ligand and strong with metal complexes. Previous results have suggested enhanced biological function in response to other metal complexes^{12,13}. Since cell viability showed no differences between cultures without and with compounds L_1 and NiL_1 an immunosuppressive or antiproliferative mechanism is considered likely.

Lymphocyte proliferation is a basic phenomenon involved in most immunological events. The first signal is provided by the binding of antigens or mitogens to cell surface receptors, followed by a number of plasma membrane-associated events including the activation of phospholipase C with the generation of the second messengers inositol triphosphate and diacylglycerol, Ca^{2+} mobilization, protein kinase C and tyrosinekinase activation, substrate and ion transport into cell, and secretion of cytokines¹⁴. The two compounds might be expected to influence any step of the processes leading to proliferation, as documented for other immunosuppressive agents¹⁵. In addition, the antiproliferative effect of the 1,3,4-thiadiazole in an in vitro culture system has been previously documented^{16,17}. It has also been reported that exposure to nickel ions caused a dose dependent inhibition of cell proliferation, cell damage and reduction

of viability was apparent from 500 μM to 5 mM ¹⁸. Nickel concentrations used in the present study do not fall in the toxic range and our present data confirm these previous finding.

The values are means \pm SD of triplicate assays from 10 healthy subjects. Multiple comparisons were performed using ANOVA followed by the least significant difference (LSD) test a, b, c indicate significant differences obtained with different incubations ($P < 0.05$).

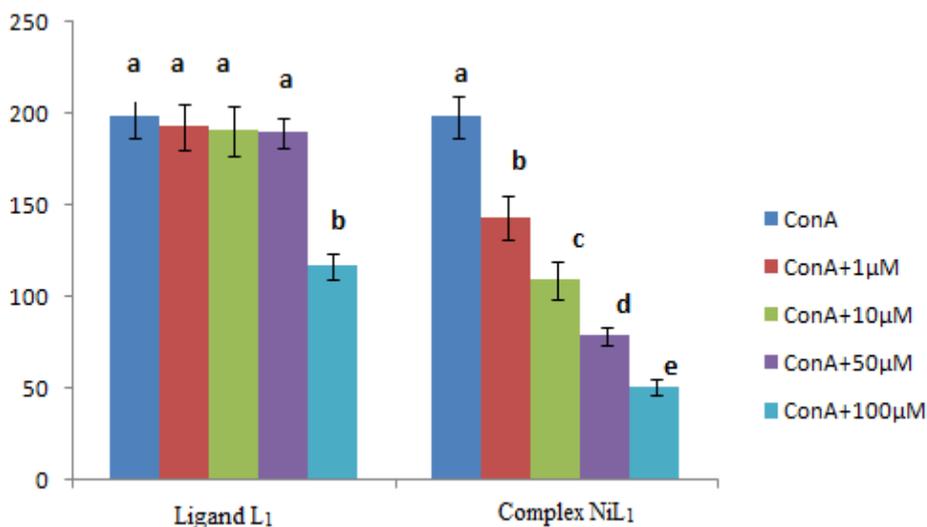


Figure 5: In vitro effects of Thiadiazole (L_1) and metal complexes (NiL_1) on the proliferative response (stimulation index, SI) of mitogen-concanavalin A stimulated human lymphocytes.

CONCLUSION

An electrochemical studies of the ligand and his complex Ni is conducted, the oxidation process mechanism of the metallic center is investigate using cyclic voltammetry, on the mercury electrode. The complex is insoluble in most of organic solvents, but soluble in DMSO. Cyclic voltammetry data show that the Ni (II) complex display Ni(0)/Ni(II) irreversible process. The ligand 2,5-Bis (2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole and its metal complexes were immunosuppressive. The compounds L_1 and NiL_1 inhibit in vitro T cell proliferation.

REFERENCES

1. T. Teraji, K. Sakane, J. Cota, *Eur. Pat.* 1980, 13, 762.
2. E. Ores et al. *Actaphysioll. Acad. Sci. Huges.* 1961, 10, 95.
3. K. Hoggarth, P. Rathghab, *J. Indian Chem. Soc.* 1975, 52, 750; *Chem. Abstr.* 1961, 72, 127345.
4. A. Tanveer, A. K. Singh, N. Jaiswal, D. Singh, *Int Res J Pharmacy* .2012, 3, 69-82.
5. S. L. Vasoya, D. J. Paghdar, P. T. Chovatia, H. S. Joshi, *J Sci IR Iran* .2005, 16, 33-36.
6. F. Bentiss, M. Traisnel, M. Lagrenée, *J. Appl. Electrochem.* 2001, 31, 41.

7. F. Bentiss, M. Lebrini, H. Vezin, M. Lagrenée, Mater.Chem. Pphys.2004, 87, 18.
8. F. Bentiss, M. Lagrenée, J. P. Wignacourt, E. M. Holt, *polydron* .2002, 21,403- 408.
9. A.Medjdoub, S. A. Merzouk, H. Merzouk, F. Z. Chiali, M. Narce, *Pesticide BiochemPhysio* 2011, 101, 27-33.
10. Y. Baba Hamed, A. Medjdoub , B. Mostefa Kara, H. Merzouk, D.Villemin, M.Narce, *Mol Cell Biochem*. 2012, 360, 23-33.
11. A.J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods, Fundamentals and applications*, Wiley, New York, 1980.
12. M. K.R Balan, R. F. N. Ashok, M. Vasanthi, R. Prabu , A. Paulraj, *Int J Life SciPharma Res*.2013, 3, 67-75.
13. R. N. Patel, N. Singh, K. K. Shukla, V. L. N.Gundla, U. K. Chauhan, *SpectrochimActa*.2006, 63, 21-26.
14. A.Altman, K. M. Coggeshall, T. Mustelin, *AdvImmunol*. 1990, 48, 227-360.
15. F. Bourrajab, S. K. Forouzanni, S. A. Tabatabaee, *J AntimicrobChemother* 2012, 67, 1968–1978.
16. R. Takezawa , H. Cheng, A. Beck, J. Ishikawa, P. Launay, H. Kubota, J. P. Kinet, A. Fleig, T. Yamada, R. Penner, *MolPharmacol* .2006, 69, 1413–1420.
17. G. Chauvière, B. Bouteille, B. Enanga, C. De Albuquerque, S. L. Croft, M. Dumas, J. Périé. *J Med Chem*. 2003, 46, 427-40.
18. V. D’Antò, R.Valletta, M.Amato, H.Schweik, M.Simeone, S.Paduano, S.Rengo, G. Spagnuolo. *The Open Dentistry Journal* .2012, 6,177-181.

*** Corresponding author: T. Attar;**

Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, Faculty of sciences, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria.