



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Echahid Hamma Lakhdar-El OUED
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Etudes expérimentales et théoriques de l'activité biologique
des Principes actifs des fruits de Pomelo**

Présenté par :

M^{elle} Azzouz Imane.

M^{elle} Hacheffa Chaima.

M^{elle} Mesbahi Houda.

M^{elle} Regaz Nour Elhouda.

Devant le jury composé de :

Président : Dr. GHANIA Ahmed.

M.C.B, Université d'El Oued.

Examinatrice : Dr. ZEGHIB Khaoula.

M.C.B, Université d'El Oued.

Promoteur : Dr. LANEZ Elhafnaoui.

M.C.B, Université d'El Oued.

Année Universitaire : 2022/2023.

Remerciements



Tout d'abord, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements au Tout-Puissant **ALLAH**, qui nous a illuminés et a ouvert les portes du savoir, et qui nous a accordé la volonté et le courage nécessaires pour élaborer ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à Monsieur **Pr. LANEZ Touhami**, directeur du laboratoire de recherche VTRS à l'université d'El Oued, pour avoir mis à notre disposition tous les moyens et techniques nécessaires, et également pour avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude envers notre superviseur, Docteur **LANEZ Elhafnaoui**, pour avoir accepté de guider ce travail, pour sa générosité, sa bienveillance, son encouragement, son soutien constant et sa confiance en notre égard tout au long de la préparation de ce travail.

Nos remerciements vont également à l'ingénieur du laboratoire VTRS, Monsieur **TELIBA Ali**, pour son précieux soutien, ses encouragements et ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous remercions chaleureusement Docteur **ADIKA Aicha** pour son aide dans les tests antibactériens.

Nos remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du laboratoire VTRS, en particulier aux doctorantes **SAADA Zahra**, **DJARALLAH Marwa** et **BENINE Aida...**

Nous tenons à exprimer notre gratitude envers le personnel administratif de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, sous la direction du doyen de la faculté, Monsieur **ZAATER Abdelmalek**, ainsi que du chef du département de biologie moléculaire et cellulaire, le Docteur **TLILI M. Laid**, et à l'ensemble du corps enseignant de la faculté.

Nous remercions Monsieur **LAICHE Omar Touhami** pour ses encouragements et son soutien.

Nous exprimons notre reconnaissance envers le directeur du PTAPC Ouargla **CRAPC** pour avoir facilité le processus d'analyse chimique par RMN.

Enfin, nous sommes extrêmement reconnaissants envers le Docteur **ALIA Fatima**, qui nous a soutenus et prodigué des conseils tout au long de notre parcours universitaire.



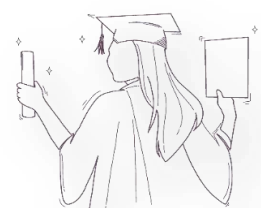
Dédicace

En témoignage de ma gratitude, je dédie cet humble travail et le fruit de mes efforts à ceux que Dieu Tout-Puissant nous a recommandés dans Son Livre.

*Au cher qui a travaillé dur et veillé tard pour mon confort, à celui qui m'a élevé et a pris soin de moi, à celui qui m'a amené à ce moment, il a eu le premier crédit pour que j'atteigne ce niveau, mon bien-aimé Baba "**Azouz Boubaker**".*

*A celle que le dieu tout-puissant a placé le ciel sous ses pieds et l'a chérie dans son cher livre, celui qui m'a appris la constance, peu importe les circonstances, je ne peux pas te remercier comme je le devrais, ma bien-aimée Maman "**Ouarda Deliba**" Au soleil de ma vie, la lumière de mon cœur, la lumière de mes ténèbres, à la source de la tendresse, ma chère grand-mère," **Laabidia Karoum**". Que Dieu vous donne santé, bonheur et longue vie*

*Aux femmes, à la chose la plus précieuse que Dieu m'ait donnée, mes chères sœurs : **Taouba** et sa chère fille **Anfal, Asmaa, Safia** A mon soutien permanent dans la vie, mes frères : **Abdel Moneim, Othman, Abdel Hay** A tous mes amis, parents, chères tantes et oncles, à tous ceux qui m'aiment et je les aime, à tous ceux qui ont eu un impact sur ma vie et dont le cœur se souvient À celui qui était le propriétaire du crédit pour nous, et qui ne lésine pas sur nous avec son soutien et ses conseils dans notre voyage de recherche, mon superviseur, "**Dr : LANEZ Elhafnaoui**"*



Imane



Dédicace

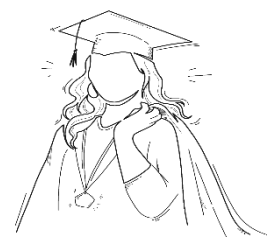
A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.

*A mon cher père **HACHEFA Mahmoud**, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*A ma chère mère **CHAOUIA Aicha**, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur. Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.*

*A mon cher frère **Ahmed Dhia Eddine**, qui m'a toujours soutenu, réconforté et encouragé tout le long de mes études. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

*A mes chères sœurs **Amira** et **Djihane**, mes bougies qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Elles m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*



Chaima 



Dédicace

*Avec l'aide du **Allah** Tout-Puissant qui a tracé le chemin de vie, j'ai pu réaliser ce travail auquel je me suis consacré*

*À la bougie qui s'est allumée pour éclairer le chemin de ma vie, mon cher père **Mesbahi Ismail**, que Dieu le protège pour moi*

*A celle dont sa supplication a été le secret de ma réussite, au symbole de l'amour et au baume de vie guérissant pour la créature la plus précieuse et la plus belle de l'univers, ma mère, **Mesbahi Soumaia**, que Dieu la protège pour moi.*

*A mes chères soeurs **Rahma** et ses fils "**Ammar, Muhammad Al-Eid, Tasnime**", **Raja'a, Raihana** pour leurs encouragements constants et leur soutien moral*

*A mes chers frères **Shouaib, Soufiane**, et mes jumeaux **Abdaljalil** et **Abdellatif** pour leur soutien et leurs encouragements.*

À ma chère grand-mère, mes tantes et nièces, ainsi qu'à toute ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, je leur souhaite encore plus de succès



Houda



Dédicace

Je remercie Dieu Tout-Puissant de m'avoir aidé dans ma vie et dans l'accomplissement de ce travail.

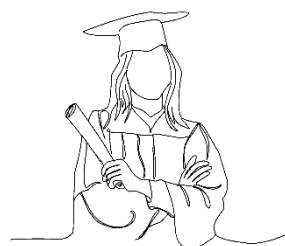
*Je dédie ce travail à tous mes proches. En priorité, mes parents qui m'ont soutenu moralement et financièrement mon père **Regaz Abdel kader** et Ma mère **Merah Zouhaira**, que chacun d'entre eux est chaleureusement remercié et peut trouver ici la confirmation de ma gratitude.*

*Mes sincères salutations à ma chère sœur : **Ouidade** et son époux **Iliyas**, ainsi qu'à ses chers enfants **Maria**, **Amina** et **Haroun**.*

*Et mes chers frères : **Diaa El-Din**, **Yahya**, **Zakaria**, **Hassen**, je leur souhaite plein succès. J'adresse mes salutations à la grande famille : mes tantes, leurs maris, leurs fils, mes oncles et leurs femmes ainsi que leurs enfants.*

Je salue mes amis dans ce travail et à tous ceux qui ont contribué à m'aider de près ou de loin, que Dieu vous protège.

Enfin, mes chaleureuses salutations à tous les étudiants du Département de Biologie en particulier du Département de Biochimie Appliquée : 2022/2023



Nour Elhouda 

Résumé :

Agrumes "pamplemousse" est l'un des fruits les plus consommés dans le monde, de sorte que notre étude sur l'activité biologique des substances actives extraites de la croûte a été limitée. Lorsque nous avons sélectionné un échantillon de la région (Blida), les résultats ont montré un rendement de 3,5 % de la substance active (Naringine)

La pureté a été confirmée par des essais de chromatographie en couche mince utilisant du méthanol comme solvant où nous avons enregistré R_f (0,7407). Et le test du naringine sous lumière ultraviolette et rouge et un test de résonance magnétique nucléaire une correspondance avec le naringine de référence et dans le test de chromatographie liquide à haute performance nous avons enregistré un pic avec une pureté de 60%.

L'objectif principal de ces travaux est d'évaluer l'efficacité in vitro et in silico des naringine anticancéreux, antidiabétiques, anti-inflammatoires et antibactériens. La méthode théorique de "amarrage moléculaire" confirme donc les résultats obtenus.

Dans la partie in vitro, les résultats ont été confirmés pour surpasser naringine sur acarbose à IC_{50} (6.02 μ M/ml) et ΔG (-34.52KJ.mol⁻¹) et nous avons enregistré l'activité anticancéreuse avec l'ADN ΔG (-30.17KJ.mol⁻¹), le sérum d'albumine bovin ΔG (-32.27KJ.mol⁻¹) et l'activité anti-inflammatoire IC_{50} (495.39 μ M) et ΔG (26.03kj.mol⁻¹). Et l'activité antibactérien avec Escherichia coli IC_{50} (9x103 μ M) et ΔG (-31.79KJ.mol⁻¹) et avec Staphylococcus aureus IC_{50} (10x10³ μ M) et ΔG (-26, 42KJ.mol⁻¹).

Dans la partie in silico, nous avons enregistré des résultats similaires à la partie in vitro où dans le test antidiabétique IC_{50} (5.67 μ M) et ΔG (-29.92KJ.mol⁻¹) Ceci est le résultat d'une association naringine avec trois acides de liaisons hydrophobes TRP59 TYR62 ASP300 et 8 acides aminés de liaisons hydrogène TRP59 GLN63 HIS299 ASP300, un test anticancéreux avec l'ADN IC_{50} (25.95 μ M) et ΔG (-26.16 KJ.mol⁻¹) le résultat de cette association nous obtenons 4 liaisons hydrogène avec des acides aminés DA12 DA10 DA11 DC12 et avec du sérum albumine bovin IC_{50} (17.69 μ M) et ΔG (27.08 KJ.mol⁻¹) où naringine a été lié par quatre liaisons hydrogène avec les acides aminés suivants GLU125 THR121 ASP118 LYS116 et dans test anti-inflammatoire IC_{50} (6.86 μ M) et ΔG (-29.42KJ.mol⁻¹) liaison par des liaisons hydrophobes avec des acides ASN43 ARG44 PHE64 TYR122 PRO542 et liaison par des liaisons hydrogène avec des acides aminés ASN43 ARG44 ARG61 ILE124 ASP125 et dans des test antibactériens avec E. coli IC_{50} (10.74 μ M) et ΔG (-28.34KJ.mol⁻¹) où les contrôles hydrophobes sont associés à 3 acides aminés ASN46 ARG76 ILE78 et liaisons hydrogène ASN46 ASP49 GLU50 ASP73 GLY77 THR165 et avec le staphylococcus aureus IC_{50} (18.11 μ M) et ΔG (-27.21KJ.mol⁻¹) et association étroite avec les liaisons hydrophobes avec les acides aminés THR165 LYS195 et les liaisons hydrogène avec les acides aminés suivants TYR37 GLN38 GLY86 THR164 TYR216 ASN242 ASP244.

Les résultats de l'amarrage moléculaire ont été confirmés par la dynamique moléculaire de la naringine antidiabétique dans un temps estimé à 1000 ps, où elle a été étudiée par trois critères, y compris root mean square déviation RMSD, montrant une stabilité le long de l'étude à 0,10-0,15 nm. Root mean square fluctuation RMSF a montré une valeur de 0,5 Å, Par le critère de liaison hydrogène nous avons observé une constante dans le nombre de liaisons 6-5 sur la durée de l'étude et donc les résultats de la partie in silico ont été confirmés.

Mots clés : pamplemousse, naringine, acarbose, ADN, Sérum albumine bovine (BSA), Docking moléculaire, dynamique moléculaire, IC50, ΔG .

Abstract:

Citrus "grapefruit" is one of the most consumed fruits in the world, so our study on the biological activity of active substances extracted from the rind was limited. When we selected a sample from the region (Blida), the results showed a yield of 3.5 % of the active substance (Naringin).

The purity was confirmed by thin layer chromatography tests using methanol as solvent where we recorded Rf (0.7407). And the naringin iron test under ultraviolet and red light showed and a nuclear magnetic resonance test a correspondence with the reference naringin and in the high-performance liquid chromatography test we recorded a peak with a purity of 60%.

The main objective of this work is to evaluate the invitro and in silico efficacy of anticancer, antidiabetic, anti-inflammatory and antibacterial naringin. The theoretical method of "molecular docking" confirms the results obtained.

In the invitro part, the results were confirmed to outperform naringin on acarbose at IC50 (6.02 μ M/ml) and ΔG (-34.52KJ.mol⁻¹) and we recorded the anticancer activity with DNA ΔG (-30.17KJ.mol⁻¹), bovine serum albumin ΔG (-32.27KJ.mol⁻¹) and anti-inflammatory activity IC50 (495.39 μ M) and ΔG (26.03KJ.mol⁻¹). and antibacterial activity with Escherichia coli IC50 (9x10³ μ M) and ΔG (-31.79KJ.mol⁻¹) and with Staphylococcus aureus IC50 (10x10³ μ M) and ΔG (-26.42KJ.mol⁻¹).

In the Insilco part, we recorded similar results to the invitro part where in the antidiabetic test IC50 (5.67 μ M) and ΔG (-29.92KJ.mol⁻¹) This is the result of an association naringin with three acids of hydrophobic bonds TRP59 TYR62 ASP300 and 8 amino acids of hydrogen bonds TRP59 GLN63 HIS299 ASP300, an anticancer assay with DNA IC50 (25.95 μ M) and ΔG (-26.16 KJ.mol⁻¹) the result of this association we obtain 4 hydrogen bonds with amino acids DA12 DA10 DA11 DC12 and with bovine serum albumin IC50 (17.69 μ M) and ΔG (27.08 KJ.mol⁻¹) where naringin was bound by four hydrogen bonds with the following amino acids GLU125 THR121 ASP118 LYS116 and in anti-inflammatory test IC50 (6.86 μ M) and ΔG (-29.42KJ. mol⁻¹) binding through hydrophobic bonds with ASN43 ARG44 PHE64 TYR122 PRO542 acids and binding through hydrogen bonds with ASN43 ARG44 ARG61 ILE124 ASP125 amino acids and in antibacterial assay with E. coli IC50 (10.74 μ M) and ΔG (-28.34KJ.mol⁻¹) where hydrophobic controls are associated with 3 amino acids ASN46 ARG76 ILE78 and hydrogen bonds ASN46 ASP49 GLU50 ASP73 GLY77 THR165 and with Staphylococcus aureus IC50 (18.11 μ M) and ΔG (-27.21KJ.mol⁻¹) and close association with hydrophobic bonds with THR165 LYS195 amino acids and hydrogen bonds with the following amino acids TYR37 GLN38 GLY86 THR164 TYR216 ASN242 ASP244.

The molecular docking results were confirmed by the molecular dynamics of the anti-diabetic naringin in an estimated time of 1000 ps, where it was studied by three criteria, including root mean square deviation RMSD, showing stability along the study at 0.10-0.15 nm. root mean square fluctuation RMSF showed a value of 0.5 Å, By the criterion of hydrogen bonding we observed a constant in the number of bonds 6-5 over the duration of the study and therefore the results of the in-silico part were confirmed.

Keywords: grapefruit, naringin, acarbose, DNA, bovine albumin serum (BSA), molecular docking, molecular dynamics, IC50, ΔG .

ملخص:

تعتبر الحمضيات "الزنباع" من بين الفواكه الأكثر استهلاكاً في العالم لهذا اقتصرنا على دراسة النشاط البيولوجي للمواد الفعالة المستخلصة من القشور. حيث اخترنا عينة من منطقة (البليدة) أظهرت النتائج مردود بنسبة 3.5% من المادة الفعالة (نارينجين).

تم التأكد من نقاوة عن طريق اختبار كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستعمال الميثانول كمذيب حيث سجلنا $R_f (0.7407)$ واختبار تحديد النارينجين تحت الأشعة فوق البنفسجية والأشعة الحمراء واختبار الرنين المغناطيسي النووي أظهرت تطابق مع النارينجين المرجعي وفي اختبار الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء سجلنا ذروة واحدة بنقاء 60%.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو التقييم المخبري والحاسوبي فعالية النارينجين المضادة للسرطان، المضادة للسكري، المضادة للالتهابات والمضادة للبكتيريا. ولذلك تؤكد طريقة "الالتحام الجزيئي" النظرية النتائج التي تم الحصول عليها.

في الجزء المخبري أكدت النتائج تفوق النارينجين على الكربوز بقيمة $\Delta G (-34.52 \text{ KJ.mol}^{-1})$ $\text{IC}_{50} (6.02 \mu\text{M/ml})$ وسجلنا نشاط مضاد للسرطان مع الحمض النووي $\Delta G (-30.17 \text{ KJ.mol}^{-1})$ ومع مصل ألبومين البقر $\Delta G (-32.27 \text{ KJ.mol}^{-1})$ ونشاط مضاد للالتهاب $\text{IC}_{50} (495.39 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-26.03 \text{ KJ.mol}^{-1})$ وكذلك نشاط مضاد للبكتيريا مع الإشريكية

القولونية $\text{IC}_{50} (9 \times 10^3 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-31.79 \text{ KJ.mol}^{-1})$ والمكورات العنقودية الذهبية $\text{IC}_{50} (10 \times 10^3 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-26.42 \text{ KJ.mol}^{-1})$

وفي الجزء الحاسوبي سجلنا نتائج مماثلة للنتائج الجزء المخبري حيث ان في الاختبار المضاد للسكري $\text{IC}_{50} (5.67 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-29.92 \text{ KJ.mol}^{-1})$ وهذا نتيجة ارتباط النارينجين مع ثلاثة أحماض بروابط كارهة للماء TRP59 TYR62 ASP300 و ارتباط 8 أحماض أمينية بروابط هيدروجينية من بينهم TRP59 GLN63 HIS299 ASP300 و اختبار المضاد للسرطان مع الحمض النووي $\text{IC}_{50} (25.95 \mu\text{M})$ و $\Delta G (26.16 \text{ KJ.mol}^{-1})$ نتيجة هذا الارتباط نحصل على 4 روابط هيدروجينية مع الأحماض الأمينية DA12 DA10 DA11 DC12 و مع مصل ألبومين البقر $\text{IC}_{50} (17.69 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-27.08 \text{ KJ.mol}^{-1})$ حيث تم ارتباط النارينجين عن طريق أربعة روابط هيدروجينية مع الأحماض الأمينية التالية GLU125 THR121 ASP118 LYS116 وفي الاختبار المضاد للالتهاب $\text{IC}_{50} (6.86 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-29.42 \text{ KJ.mol}^{-1})$ (ارتباط عن طريق روابط كارهة للماء مع الأحماض ASN43 ARG44 PHE64 TYR122 PRO542 و ارتباط عن طريق روابط هيدروجينية مع الأحماض ASN43 ARG44 ARG61 ILE124 ASP125 و في الاختبار المضاد للبكتيريا مع الإشريكية القولونية $\text{IC}_{50} (10.74 \mu\text{M})$ و $\Delta G (28.34 \text{ KJ.mol}^{-1})$ حيث ارتباط بروابط كارهة للماء مع 3 أحماض أمينية ASN46 ARG76 ILE78 و ارتباط بروابط هيدروجينية GLY77 ASP73 GLU50 ASP49 ASN46 THR165 و مع المكورات العنقودية الذهبية $\text{IC}_{50} (18.11 \mu\text{M})$ و $\Delta G (-27.21 \text{ KJ.mol}^{-1})$ و ارتباط وثيق بروابط كارهة للماء مع الأحماض الأمينية THR165 LYS195 و ارتباط بروابط هيدروجينية مع الأحماض الأمينية التالية TYR37 GLN38 GLY86 THR164 TYR216 ASN242 ASP244.

تم تأكيد نتائج الالتحام الجزيئي عن طريق الديناميكية الجزيئية للنارينجين المضاد للسكري في زمن يقدر ب 1000 ps حيث تم دراستها بثلاث معايير من بينها الجذر المتوسط للانحراف التربيعي أظهرت ثبات على طول مدة الدراسة بنسبة 0.10-0.15 nm وبمعيار متوسط الجذر التربيعي أظهرت قيمة 0.5 Å° بمعيار الروابط الهيدروجينية لاحظنا ثبات في عدد الروابط 5-6 على طول مدة الدراسة وبهذا تم تأكيد نتائج الجزء الحاسوبي.

الكلمات المفتاحية: الزنباع، النارينجين، الكربوز، الحمض النووي، مصل الألبومين البقري، الالتحام الجزيئي، الديناميكية الجزيئية، ΔG ، IC_{50} .

LISTE DES ABREVIATIONS

α : Alpha

β : Beta

ΔE : Différence d'énergie

ΔG : Énergie libre de liaison

μl : Microlitre

μM : Micromolaire

$\text{\AA}$: Angstrom

Abs : Absorbance

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique

ADMET : absorption, distribution, métabolisme, excrétion, et toxicité

ADT: AutoDockTools

ATCC: American Type Culture Collection

BSA : Sérum albumine bovin

C : Concentration

$^{\circ}C$: Degrés Celsius

CCM : Chromatographie sur couche mince

COX-2 : Cyclooxygénase-2

DO : Densité Optique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNSA : Réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique

DL50 : Dose létale 50

E : énergie

EDTA : Acide éthylène Diamine Tétra acétique

FAO: Food and Agriculture

g: gramme

HPLC : Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance

IC₅₀ : Concentration causant une inhibition 50 % d'une activité

IR : infrarouge

K : Potassium

K : Constante de liaison

KCl : Chlorure de potassium

Kg : Kilo gramme

KJ : Kilo joule

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

M: Mole

MDS : la simulation de dynamique moléculaire.

min : Minute

mg : milligramme

Na : Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium

NaH₂PO₄ : Phosphate de sodium monobasique

nm : Nanomètre

PDB : Protein Data Bank

pH : Potentiel Hydrogène

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

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

T° : Température

TLR : Solution de lyse des globules rouges

TLB : Solution de lyse des globules blancs

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

UV : Ultra-violet

V : Volume

Vis : Visible

VTRS : Valorisation et Technologie des Ressources sahariennes

Liste de figures :

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure amoxicilline	14
Figure 2	Structure gentamicine	14
Figure 3	Origine génétique de la pamplemousse <i>citrus paradisi</i>	27
Figure 4	Pamplemousse <i>citrus paradisi</i>	30
Figure 5	Structure chimique de naringine	31
Figure 6	Structure chimique l'héspéridine	32
Figure 7	Structure chimique des limonides	32
Figure 8	Structure chimique de vitamine C	33
Figure 9	Structure de naringine	38
Figure 10	Biosynthèse de naringine	40
Figure 11	Schéma du protocole générale de docking	46
Figure 12	Page d'accueil du serveur SwissADME	48
Figure 13	Page d'accueil du serveur Protox	49
Figure 14	Pamplemousse	59
Figure 15	Les croûtes de pamplemousse pendant le séchage	60
Figure 16	Poudre de croûtes sec	60
Figure 17	Montage d'évaporation a pression réduit	61
Figure 18	Montage de chauffage	61
Figure 19	Montage de cristallisation	62
Figure 20	Étapes impliquées dans l'extraction d'ADN	67
Figure 21	Échantillons de sang de poulet dans un tube de microfuge	68
Figure 22	La disparition de la coulure rouge du sang	68
Figure 23	Spectre électronique d'échantillon d'ADN extrait	69
Figure 24	Structure de naringine optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)	78
Figure 25	Structure de : Diclofénac (a), Amoxicilline (b) et Acarbose (c) extraites de la base de données DrugBank	79
Figure 26	Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine	85
Figure 27	Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine	86

Figure 28	Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)	87
Figure 29	Spectre UV du naringine extrait (Linge noire) et de naringine référence (Linge rouge)	88
Figure 30	Spectre RMN du ^1H de naringine	89
Figure 31	Spectre RMN du ^{13}C de naringine	90
Figure 32	Spectres d'absorption UV-visible de 1 mM de naringine en absence et en présence de concentrations croissantes d'ADN (a) et de BSA (b) dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à un pH de 7.2 et à température de 298 K	91
Figure 33	Les droites de régression linéaire de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[\text{ADN}]$ (a) et $1/[\text{BSA}]$ (b) ont été utilisés pour calculer les constantes de liaison de naringine l'ADN et BSA	92
Figure 34	Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Acarbose (b)	94
Figure 35	Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ (a) et $1/[\text{Acarbose}]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison	96
Figure 36	Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Diclofénac (b)	98
Figure 37	Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ (a) et $1/[\text{Diclofénac}]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison	100
Figure 38	Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne	101
Figure 39	Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline	104
Figure 40	Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ et $1/[\text{Amoxicilline}]$ utilisées pour calculer les constantes de liaison	106
Figure 41	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe ADN	118
Figure 42	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe BSA	119
Figure 43	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l' α -amylase	121
Figure 44	Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase	121

Figure 45	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le cyclooxygénase-2	123
Figure 46	Présentation 2D et 3D du ligand diclofénac avec le cyclooxygénase-2	124
Figure 47	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli	127
Figure 48	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli	127
Figure 49	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le S. aureus	128
Figure 50	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le S. aureus	128
Figure 51	Visualisation du complexe naringine_α-amylase dans une boîte d'eau après la simulation de dynamique moléculaire	130
Figure 52	RMSD du complexe naringine_α-amylase et du α-amylase	131
Figure 53	RMSF du complexe naringine_α-amylase	132
Figure 54	Nombre moyen de liaisons hydrogène entre le naringine et l'α-amylase	133

Liste de tableaux :

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Classification de <i>citrus x paradisi</i>	28
Tableau 2	Production de pamplemousse dans le monde en 2020	29
Tableau 3	Composition biochimique moyenne du pamplemousse	31
Tableau 4	Composition pour 100 g des fruits du <i>citrus x paradisi</i>	34
Tableau 5	Caractéristiques des principaux de pamplemousse	35
Tableau 6	Matériels de laboratoire	58
Tableau 7	Produits chimiques	59
Tableau 8	Rapport d'absorbance de l'ADN isolé	70
Tableau 9	Structure SMILES des ligands étudiées	74
Tableau 10	Classification des produits chimiques selon leurs toxicités	77
Tableau 11	Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire	80
Tableau 12	Les paramètres de Docking sélectionnés pour les récepteurs cible	82
Tableau 13	Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre électroniques UV-VIS de la (figure 32)	91
Tableau 14	Constante de liaison et énergie libre de liaison pour le naringine avec l'ADN et le BSA à partir des données UV à pH= 7.2 et T = 298 K	92
Tableau 15	Valeurs des absorbances tirées à partir du test d'alpha-amylase	93
Tableau 16	Activité antidiabétique de naringine et acarbose par le test d'inhibition de l'α-amylase	94
Tableau 17	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l'alpha-amylase calculées à partir des données UV-Vis	96
Tableau 18	Valeurs de absorbances tirées à partir du test anti-inflammatoire	97
Tableau 19	Activité de naringine et Diclofénac par le test anti-inflammatoire	99
Tableau 20	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Diclofénac avec le sérum albumine bovine calculées à partir des données UV-Vis	100

Tableau 21	Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre E. coli et S. aureus	102
Tableau 22	Valeurs des absorbances triées à partir du test antibactérien	103
Tableau 23	Activité antibactérienne de naringine et amoxicilline par le test d'inhibition de E. coli et S. aureus	104
Tableau 24	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Amoxicilline avec les deux types des bactéries calculées à partir des données UV-Vis	106
Tableau 25	Caractéristiques générales des composés étudiés	109
Tableau 26	Propriétés physico-chimiques des composés étudiés	109
Tableau 27	Caractéristiques de lipophilicité des composés étudiés	110
Tableau 28	Caractéristiques de solubilité dans l'eau des composés étudiés	110
Tableau 29	Paramètres pharmacocinétiques des composés étudiés	111
Tableau 30	Règle de druglikeness et score de biodisponibilité des composés étudiés	112
Tableau 31	Propriétés de chimie médicinale des composés étudiés	113
Tableau 32	Les profils de toxicité in silico des composés étudiés	116
Tableau 33	Les paramètres de liaison obtenue par amarrage moléculaire de naringine avec l'ADN et le BSA	117
Tableau 34	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et acarbose avec l' α -amylase	119
Tableau 35	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et diclofénac avec le cyclooxygénase-2	122
Tableau 36	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et amoxicilline avec l'E. coli et le S. aureus cyclooxygénase-2	124
Tableau 37	Comparaison des paramètres de liaison et d'IC50 pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire.	128

Sommaire :

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste Des Abreviations..... I

Liste de tableaux 4

Liste de figure 7

Sommaire

Introduction générale

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les activités biologiques

I. Etude l'activité antidiabétique :..... 6

I.1. Définition du diabète sucré : 6

I.2. Classification de diabète sucré : 6

I.3. Mécanisme de l'activité antidiabétique 7

I.4. Traitement du diabète : 8

II. Etude l'activité antibactérienne :..... 10

II.1. Généralités sur les bactéries :..... 11

II.2. Généralités sur les antibiotiques :..... 11

II.3. Mécanisme :..... 12

II.3.1. Inhibition enzymatique, première :..... 12

II.3.2. Altération des sites de liaison :..... 13

II.3.3. Diminution de la perméabilité cellulaire..... 13

II.3.4. Pompes d'efflux 13

II.4. Traitement :..... 14

III. Etude l'activité anticancéreux :	15
III.1. L'ADN une cible moléculaire des anticancéreux :	15
III.2. Objectif :	15
III.3. Mécanismes :	16
III.4. Chimiothérapie pour le cancer :	16
III.4.1. Chimiothérapie standard	16
III.4.2. Limites de la chimiothérapie traditionnelle :	18
III.4.3. Traitements spécialisés :	19
III.4.4. Traitements antisens :	20
III.4.5. Immunothérapie :	20
III.5. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes :	20
IV. Etude activité antiinflammatoire :	20
IV.1. Principe :	21
IV.2. Types d'inflammation :	21
IV.3. Les anti-inflammatoires :	22
IV.4. Mécanisme de l'activité anti-inflammatoire :	22
IV.5. Médicaments anti-inflammatoires :	23

Chapitre II : Généralités sur le pamplemousse et la naringine

I. Généralité sur le pamplemousse

I.1. Historique et origine d'agrumes :	26
I.2. Généralités et définitions :	27
I.3. Taxonomie citrus paradis	28
I.4. Nomenclature :	28
I.5. Répartition géographique :	28
I.6. Production du pamplemousse :	29
I.7. Description botanique :	30
I.8. Compositions du pamplemousse :	30
I.9. Valeurs nutritives du pamplemousse :	31
I.10. Effets thérapeutiques du pamplemousse :	34

I.11. Variétés du pamplemousse :	35
I.12. Utilisations de pamplemousse :	36
II- Généralité sur la naringine.....	37
II.1. Historique et origine naringine :	37
II.2. Définition et structure de naringine :	38
II.3. Sources de naringine :	38
II.4. Description de la naringine :	39
II.5. Biosynthèse de naringine :	39
II.6. Pharmacocinétique et toxicité de naringine :	40
II.6.1. Pharmacocinétique :	40
II.6.2. Toxicité :	41
II.7. Effets thérapeutiques de naringine :	42
II.8. Bio applications de naringine :	43

Chapitre III : Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisée

I. Spectroscopie d'absorption dans le domaine UV-Visible :	45
I.1. Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible :	45
I.2. Loi de Beer-Lambert :	45
II. L'amarrage moléculaire :	46
II.1. Principe :	46
II.2. Les étapes de Docking :	47
II.2.1. Amarrage moléculaire avec l'AutoDock Tools :	47
II.2.2. Modélisation du potentiel énergétique :	47
III. SwissADME:	48
IV. Protoc.	48
Références bibliographiques	50

Partie II: Expérimentale

Chapitre 1: Matériels et Méthodes

I. Matériels :	57
----------------	----

I.1. Réactifs utilisés :	57
I.2. Matériels de laboratoire :	58
I.3. Produits chimiques :	59
II. Méthodes :	59
II.1. Extraction de Naringine :	59
II.2. Rendement d'extraction :	62
II.3. Caractérisation du Naringine :	63
II.3.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :	63
II.3.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :	64
II.3.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :	64
II.3.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :	65
II.3.5. Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :	65
II.4. Méthodes d'évaluation In Vitro des activités biologiques :	66
II.4.1. Évaluation de l'activité anti-cancéreux :	66
II.4.2. Evaluation in vitro de l'activité antidiabétique :	71
II.4.3. Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire :	71
II.4.4. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne :	72
II.5. Méthodes d'évaluation In Silico des activités biologiques :	73
II.5.1. Évaluation ADMET et de la similitude médicamenteuse :	73
II.5.2. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :	77
II.5.3. Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire :	83

Chapitre 2 : Résultats et Discussion

I.1. Caractérisation :	85
I.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :	85
I.1.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :	85
I.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :	86
I.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :	87
I.1.5. Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :	88
I.2. Évaluation In Vitro des activités biologiques :	90

I.2.1. Évaluation de l'activité anti-cancéreux :	90
I.2.2. Évaluation de l'activité antidiabétique :	93
I.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire :	97
I.2.4. Évaluation de l'activité antibactérien :	101
I.3. Évaluation In Silico des activités biologiques :	107
I.3.1. Prédiction des propriétés ADMET et la similitude médicamenteuse :	107
I.3.2. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :	116
I.3.3. Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire :	130
Conclusion générale et prespective	
Références bibliographiques	138

Introduction générale

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales sont utilisées pour traiter diverses maladies. Selon des études, 70 à 80 % de la population mondiale utilise des plantes médicinales à des fins thérapeutiques.([GHERMAOUI & TERNANE, 2022](#)).

Le pamplemousse, un hybride d'agrumes, est apparu pour la première fois en 1649. Il est né dans les Caraïbes d'un croisement entre un pomelo et une orange douce.

Effets thérapeutiques du pamplemousse Le pamplemousse est un fruit qui présente d'excellents avantages pour la santé. Elle possède des propriétés hypoglycémiantes ([Jung et al, 2004](#)). Il réduit le cholestérol ([Gorinstein et al, 2004](#)). Il possède des propriétés anti-inflammatoires ([Benavente et Castillo, 2008](#)). C'est un puissant antioxydant ([Wang et Yu, 2005](#)). Propriétés anticancéreuses ([Billami Sarah,2021](#)).

Les écorces d'agrumes le pamplemousse sont riches en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes et en acides phénoliques. Elles possèdent des caractéristiques biologiques. L'extraction de composés actifs à partir des écorces a fortement suscité l'intérêt des scientifiques pour leur utilisation en tant qu'antioxydants naturels et conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.([Hamidi & Limam, 2018](#)).

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de la naringine, une flavanone glycosidique naturelle qui présente diverses activités biologiques, notamment un effet anti-inflammatoire, un effet anticancéreux, un effet antidiabétique et un effet antibactérien.([BOUANINI, 2019](#)).

Quel est l'effet des composés actifs des peelings Le pamplemousse ? Quelles sont les bonnes méthodes d'extraction adoptées pour extraire ces composés sensibles ? Quelles sont leurs structures et leurs caractéristiques ? Ces composés ont-ils un avenir dans le traitement des tumeurs et des perspectives d'adoption en tant que médicament dans le traitement de diverses maladies ? Quel est le pourcentage de concordance entre les différentes études approuvées dans le cadre du développement de médicaments?

Le manuscrit sera donc organisé comme suit:

Le premier chapitre : nous présenterons l'étude de la théorie des activités biologiques.

Deuxième chapitre : Généralités sur Le pamplemousse et les naringine.

Troisième chapitre : étude théorique des techniques expérimentales utilisées précédemment.

Enfin, Pour améliorer notre étude théorique, nous avons présenté une partie appliquée pour l'évaluer biologiquement avec les tests suivants, où nous avons appliqué le test anticancer avec l'ADN et l'albumine de sérum bovin, le test antidiabétique avec α -amylase et un test anti-inflammatoire avec l'albumine de sérum bovin.

Introduction Générale

L' α -amylase et un test anti-inflammatoire avec de l'albumine de sérum bovin, en plus d'un test antibactérien avec deux souches différentes E. coli et Staphylococcus aureus.

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :
Les activités biologiques

I. Etude l'activité antidiabétique :

Compte tenu de la complexité de la maladie, qu'elle soit génétique ou métabolique, et de sa forte prévalence mondiale, la découverte de nouvelles molécules antidiabétiques plus efficaces et moins coûteuses constitue aujourd'hui un champ de recherche très intéressant.

La médecine traditionnelle gagne en popularité et de nombreux diabétiques y ont recours régulièrement. Plus de 1200 espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle ont des propriétés antidiabétiques. Cependant, la majorité d'entre elles n'ont pas encore fait l'objet de rapports scientifiques. La commercialisation des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète sucré et de leurs dérivés est un aspect important de ce domaine.

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires, dont plus de 200 ont une activité hypoglycémique. Ainsi, un certain nombre de groupes, tels que les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les glycosides, les polysaccharides, les peptidoglycanes, les acides aminés et autres, obtenus à partir de diverses sources végétales, semblent avoir des effets particulièrement importants dans le traitement du diabète ([KRAZA, 2021](#)).

I.1. Définition du diabète sucré :

Le diabète sucré est une maladie métabolique qui affecte le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines et se caractérise par une hyperglycémie chronique due à un défaut de sécrétion et/ou d'action de l'insuline. Il se caractérise par une élévation persistante du taux de sucre dans le sang, ainsi que par une polydipsie, une polyurie, une asthénie, une polyphagie, une perte de poids ou une obésité, et des troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma mortel ([KRAZA, 2021](#)).

I.2. Classification de diabète sucré :

➤ Le diabète de type 1 (anciennement insulino-dépendant DID) :

Représente environ 10 % des cas de diabète et apparaît le plus souvent chez les enfants ou les jeunes adultes, en raison d'une destruction auto-immune des cellules de Langerhans pancréatiques. L'hyperglycémie survient lorsque seulement 10 à 20 % des cellules sont fonctionnelles. Elle est associée à une carence en insuline ([KRAZA, 2021](#)).

➤ **Le diabète de type 2 (anciennement appelé le diabète non insulino-dépendant DNID) :**

C'est le type de diabète le plus courant, représentant près de 90 % de tous les cas diagnostiqués. Ce type de diabète est plus fréquent chez les adultes de plus de 40 ans, mais il est de plus en plus fréquent chez les jeunes. Elle est courante et représente 90 % de tous les cas de diabète. Maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie causée par une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, en particulier les muscles, et une diminution de la capacité du foie à produire du glucose.

➤ **Le diabète gestationnel :**

Il s'agit d'un trouble de tolérance au glucose qui provoque une hyperglycémie de gravité variable et qui commence ou est diagnostiqué pendant la grossesse. Ce type de diabète est habituellement transitoire et disparaît quelques semaines après l'accouchement. Cependant, il y a 50% de chance de développer un diabète permanent dans une grossesse ultérieure. Les femmes qui développent le diabète gestationnel sont plus susceptibles de développer le diabète de type 2 plus tard dans la vie.

➤ **Autres types de diabète : le diabète secondaire (spécifique) :**

Le diabète sucré peut se développer à la suite d'une pancréatite (pancréatite chronique ou aiguë, tumeur, hémochromatose), de maladies endocriniennes (phéochromocytome, acromégalie, syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, tumeurs pancréatiques et endocrines digestives), ou de dysfonctionnements des cellules génétiques (Diabète de maturité et diabète mitochondrial). Il peut également entraîner la production de médicaments, de composés chimiques ou de composés toxiques.

I.3. Mécanisme de l'activité antidiabétique :

Les médicaments antidiabétiques sont utilisés pour contrôler la glycémie chez les patients atteints de diabète. Ils agissent en ciblant différents mécanismes impliqués dans la régulation de la glycémie. Les principaux mécanismes d'action des médicaments antidiabétiques comprennent :

1. Augmentation de la sensibilité à l'insuline : Les médicaments qui augmentent la sensibilité à l'insuline, tels que les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), les agonistes des récepteurs du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et les thiazolidinediones, améliorent la capacité des cellules à utiliser l'insuline pour réguler la glycémie. (Blough et al., 2015)

2. Augmentation de la sécrétion d'insuline : Les médicaments qui augmentent la sécrétion d'insuline, tels que les sulfonylurées et les méglitinides, stimulent les cellules bêta du pancréas à libérer plus d'insuline pour réguler la glycémie.

3. Inhibition de la production de glucose : Les médicaments qui inhibent la production de glucose par le foie, tels que la metformine, réduisent la quantité de glucose produite par le foie et augmentent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques.(Neumiller, 2011)

4. Réduction de l'absorption de glucose : Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, tels que l'acarbose, réduisent l'absorption de glucose par le tractus gastro-intestinal en inhibant l'activité des enzymes qui décomposent les glucides complexes en glucose.(Neumiller, 2011)

5. Régulation du métabolisme des graisses : Les inhibiteurs de la lipase pancréatique, tels que l'orlistat, réduisent l'absorption des graisses alimentaires et favorisent la perte de poids chez les patients diabétiques en surpoids.(Inzucchi et al., 2015)

Ces mécanismes d'action sont souvent combinés pour obtenir un effet maximal sur la régulation de la glycémie. Cependant, il est important de noter que les médicaments antidiabétiques peuvent également avoir des effets indésirables, tels que l'hypoglycémie et la prise de poids.(Toribio, 2011)

I.4. Traitement du diabète :

➤ Traitements non médicamenteux :

Le traitement du diabète de type 1 repose sur la prescription vitale d'insuline associée à la diététique, l'activité physique, l'autosurveillance, l'éducation et le suivi médical régulier. La réduction du poids et l'activité physique régulière (adaptée et contrôlée) ont un effet positif avéré sur le contrôle de la glycémie, ce dernier ayant un effet positif sur la résistance à l'insuline. Le traitement primaire du diabète de type 2 repose sur une alimentation équilibrée et l'exercice. Les fonctions musculaires et articulaires diminuent les dépôts de graisse, en particulier les dépôts abdominaux, liés à la résistance à l'insuline et ses conséquences avec une perte de poids fréquente.

➤ Traitements médicamenteux :

• Médicaments hypoglycémiques pris par voie orale :

Dans moins de la moitié des cas, les médicaments oraux contre le diabète normalisent la glycémie. Ils n'ont aucun effet régressif sur les lésions installées et sont contre-indiqués en insuffisance rénale et hépatique. Leurs effets secondaires ne sont pas négligeables. Les cliniciens qui prennent en charge des diabétiques de type 2 insuffisamment contrôlés par le seul régime ont accès à cinq classes d'antidiabétiques oraux avec des effets hypoglycémiques par différents mécanismes d'action :

- ✓ **Les sulfamides hypoglycémians (Glibenclamide) :** stimulent la sécrétion d'insuline sans influencer sa synthèse.
- ✓ **Les biguanides (la metformine) :** réduisent l'insulino-résistance en favorisant l'action de l'insuline sur les tissus cibles, en inhibant la néoglucogenèse hépatique et en diminuant l'absorption intestinale du glucose sans aucun effet sur la sécrétion d'insuline.
- ✓ **Les inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales représentés par l'acarbose et le miglitol :** ralentissent l'absorption digestive des glucides complexes.
- ✓ **Les glitazones :** ce sont des molécules qui augmentent la sensibilité à l'insuline et la fonction β cellulaire.
- ✓ **Les glinides :** ce sont des insulino-sécréteurs.
- **Administration d'insuline :**

Dans le cas où le traitement oral du diabète échoue chez un diabétique de type 2, il semble que l'insulinothérapie devrait être lancée dès que possible pour préserver le capital insulino-sensible restant. Dans ce cas, l'insulinothérapie permet une amélioration significative du contrôle glycémique. Dans les cas où les antidiabétiques oraux sont contre-indiqués (insuffisance rénale, foie...), une insulinothérapie définitive est clairement nécessaire.

Les préparations insuliniques sont classées en fonction de leur durée d'action, de leur durée d'action et du temps d'activité maximal. L'individualisation de l'insulinothérapie devrait être fondée sur les objectifs thérapeutiques, le mode de vie, l'alimentation, l'âge, la santé générale, la motivation, la capacité de reconnaître l'hypoglycémie et les compétences d'autogestion. Malgré tous les médicaments, traitements et mesures hygiéniques et diététiques disponibles aujourd'hui, contrôler le taux de glucose dans le sang d'un patient diabétique reste difficile.

➤ **Nouvelles classes de médicaments antidiabétiques :**

Les nouveaux agents antidiabétiques utilisent des systèmes de régulation qui n'ont jamais été utilisés dans le traitement du diabète : l'incrétine et les systèmes endocannabinoïdes. Les incrétines sont des hormones peptidiques qui sont produites par la muqueuse digestive pendant le passage des aliments à travers le tube digestif et jouent un rôle dans la satiété.

Les incrétines les plus connues sont le peptide insulino-tropique dépendant du glucose (GIP) et le peptide glucagon-1 (GLP-1). Les incrétines sont des hormones peptidiques qui augmentent la sécrétion d'insuline en potentialisant l'effet du glucose. Pendant le passage des nutriments, les cellules endocriniennes de l'épithélium intestinal les libèrent.

De plus, en raison de leur courte demi-vie, ces hormones sont rapidement dégradées en métabolites inactifs par l'enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). L'attention des scientifiques a été attirée sur la préservation de cette enzyme pendant son développement.

- ✓ Analogues du LPG-1 qui résistent à la dégradation par l'enzyme DPP-4, ce qui permet de contrôler la glycémie et joue un rôle positif dans le contrôle du poids ;
- ✓ Inhibiteurs du DPP-4 qui retardent la dégradation du GLP-1.

➤ **Traitement du diabète par les produits naturels dérivés de plantes :**

L'utilisation de plantes médicinales sous diverses formes, brutes ou préparées, s'est considérablement développée. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80 % de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie pour ses soins de santé, ce qui semble être une solution acceptable. La capacité des plantes à produire une large gamme de substances naturelles est l'une de leurs caractéristiques les plus distinctives. En effet, en raison de leur abondance en métabolites secondaires, ces substances végétales ou produits de synthèse botanique représentent près d'un quart de l'ensemble des remèdes actuellement disponibles.

La médecine traditionnelle, qui repose sur l'utilisation de plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies, dont le diabète sucré, est une pratique ancestrale encore utilisée aujourd'hui.

Plusieurs études ethnopharmacologiques et expérimentales ont été menées dans le monde entier pour identifier les plantes antidiabétiques utilisées dans les différentes pharmacopées traditionnelles ([KRAZA, 2021](#)).

À ce jour, près de 1123 espèces végétales ont été identifiées comme ayant des propriétés hypoglycémiques et antihyperglycémiques. Ces plantes sont classées en 725 genres et 183 familles, dont les plus étudiées sont les Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Liliaceae, Poaceae, Cucurbitaceae, Moraceae, Rosaceae et Euphorbiaceae.

II. Etude l'activité antibactérienne :

La méthode de diffusion en gélose a été utilisée pour tester la sensibilité des bactéries aux extraits d'alcaloïdes. Les méthodes de diffusion par disque ou par trou sont utilisées dans les tests d'activité antibactérienne in vitro. Le diamètre de la zone d'inhibition autour des puits (ou des disques) après 24 heures de culture à une température suffisante est utilisé pour déterminer

l'activité antibactérienne. Les souches bactériennes sont ainsi classées comme sensibles, très sensibles, extrêmement sensibles ou résistantes (KAROUI et al., 2022).

II.1. Généralités sur les bactéries :

➤ *Escherichia coli* :

Escherichia coli est un membre de la famille des Enterobacteriaceae. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif, qui ne forme pas de spores et ne possède pas d'oxydase. *E. coli* fait partie de la microflore commensale de l'homme et de nombreux autres animaux.

C'est une bactérie qui colonise le tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux), ainsi que des reptiles. Son habitat principal est le tube digestif.

L'environnement constitue l'habitat secondaire d'*E. coli*. Contrairement à l'habitat primaire, il est plutôt défavorable à leur survie (MERABET & SEKHSOUKH, 2020).

➤ *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des bactéries aérobies-anaérobies, facultatives, gram-positives, sphériques (coques), très résistantes dans l'environnement mais peu exigeantes en culture.

Staphylococcus aureus est l'une des bactéries les plus courantes en pathologie humaine. C'est un germe commensal de la flore cutanée et digestive que l'on retrouve dans les fosses nasales chez environ 20 % des personnes et chez 30 % de la population générale de façon temporaire.

II.2. Généralités sur les antibiotiques :

➤ Mode d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques agissent généralement comme des bactéricides (ils tuent les bactéries) ou des bactériostatiques (ils inhibent la croissance bactérienne et détruisent les bactéries).

Les bactériocines (elles tuent les bactéries) ou les bactériostatiques (elles inhibent la croissance bactérienne et tuent les bactéries). Une bêtalactamine, par exemple, est bactéricide car elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne. Sans cette barrière, les bactéries meurent. D'autres antibiotiques perturbent les processus chimiques internes de la cellule, entraînant la mort de la bactérie. Les antibiotiques plus récents, tels que les quinolones, provoquent le déroulement de l'ADN bactérien en interférant avec une enzyme bactérienne qui permet à la molécule d'ADN de s'insérer dans une petite cellule. Par conséquent, la bactérie ne peut pas se diviser ou produire les enzymes nécessaires à son activité normale et meurt (MERABET & SEKHSOUKH, 2020).

➤ **Mécanisme de résistance aux antibiotiques :**

Certains antibiotiques sont naturellement résistants à certaines bactéries. Cependant, la résistance est souvent acquise. Les bactéries développent une résistance en incorporant un "facteur de résistance" dans leurs gènes, ce qui rend les antibiotiques inefficaces. Cette résistance peut être rapidement transmise à d'autres bactéries par l'intermédiaire de petits morceaux de matériel génétique appelés plasmides. Les gènes résistants peuvent être intégrés dans des unités d'ADN appelées transposons, ce qui leur permet de sauter d'un site d'ADN à un autre ([MERABET & SEKHSOUKH, 2020](#)).

II.3. Mécanisme :

II.3.1. Inhibition enzymatique, première :

➤ **La production de p-lactamase est la première :**

Les p-lactamases dégradent la liaison amide sur l'anneau lactame pour rendre les p-lactamines inactives. Les transposons portent les gènes Bla, qui peuvent être chromosomiques, plasmidiques ou transférables. ([Alioua & Bouamoucha, n.d.](#))

➤ **Production de pénicillinase :**

Les bactéries ont une résistance intégrée en raison de la nature spécifique à l'espèce des pénicillinases chromosomiques. Les bactéries acquièrent une résistance grâce aux pénicillinases plasmidiques.

➤ **Les P-lactamases chromosomiques :**

Connues sous le nom de céphalosporinases sont produites naturellement par diverses espèces, notamment *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* sp.

➤ **Enzymes qui inactivent les aminoglycosides :**

Trois types d'enzymes - acétyltransférase, nucléotidyltransférase et phosphotransférase - ont été identifiés comme étant capables d'inactiver les aminoglycosides. Le plus souvent, les plasmides contiennent les gènes codant pour ces enzymes.

➤ **Enzymes qui rendent le chloromphénicol inactif :**

Une chloromphénicol acétyltransférase codée par un plasmide peut inactiver le chloromphénicol. L'antibiotique est rendu inactif par l'acyltransférase, ce qui l'empêche de se fixer sur la cible visée.

II.3.2. Altération des sites de liaison :

➤ **Modification de la protéine de liaison à la pénicilline (PLP) :**

En modifiant les gènes chromosomiques ou en ajoutant de nouveaux gènes qui expriment de nouvelles PLP, ce phénomène diminue l'affinité de la cible (PLP) pour les -lactamines. (Alioua & Bouamoucha, n.d.)

➤ **Modification des sites de liaison des ribosomes :**

Les effets antibactériens des macrolides, des aminoglycosides ou du chloramphénicol peuvent être diminués par une modification intracellulaire de la sous-unité ribosomale ciblée de la cellule bactérienne. Les antibiotiques qui ne peuvent plus s'attacher au site ribosomal sont incapables de supprimer la synthèse des protéines ou la croissance bactérienne à la suite de cette modification.

➤ **Transformation du précurseur du peptidoglycane :**

Les entérocoques deviennent résistants aux glycopeptides lorsque le D-Ala terminal du précurseur du peptidoglycane est transformé en un groupe lactate.

➤ **Modification de l'ADN topoisomérase et de l'ADN gyrase :**

L'ADN gyrase est une enzyme nécessaire à l'action des quinolones. La résistance est provoquée par des modifications accidentelles d'un seul acide aminé de l'ADN gyrase. Il en va de même pour les mutations de la topoisomérase IV.

➤ **Modifications des enzymes cibles :**

La résistance est également provoquée par des modifications de la dihydroptéroate réductase et de la dihydroptéroate synthétase résistante à la liaison avec les sulfamides.

II.3.3. Diminution de la perméabilité cellulaire :

En modifiant la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie, on réduit l'admission de l'antibiotique à son emplacement. Les porines des bactéries à Gram négatif peuvent être modifiées, ce qui peut limiter ou empêcher la capacité de l'antibiotique à atteindre son site d'action. (Alioua & Bouamoucha, n.d.)

II.3.4. Pompes d'efflux :

En pompant activement l'antibiotique hors de la bactérie, l'antibiotique ne peut pas atteindre son site d'action. Les cellules bactériennes contiennent naturellement des transporteurs d'efflux pour une variété de médicaments, ce qui augmente considérablement la résistance naturelle des bactéries à de nombreux traitements antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition

aux antibiotiques favorise la surexpression mutationnelle des transporteurs, ce qui accroît la résistance bactérienne. (Alioua & Bouamoucha, n.d.)

II.4. Traitement :

➤ Amoxicilline :

Est utilisée pour traiter les infections bactériennes à Gram positif telles que la pneumonie, la bronchite et la gonorrhée, ainsi que les infections des oreilles, du nez, de la gorge, des voies urinaires et de la peau, ainsi que certaines bactéries à Gram négatif. L'amoxicilline appartient à une classe d'antibiotiques connue sous le nom de pénicilline-like (bêta-lactame) (Promoting the Quality of Medicines, 2017).

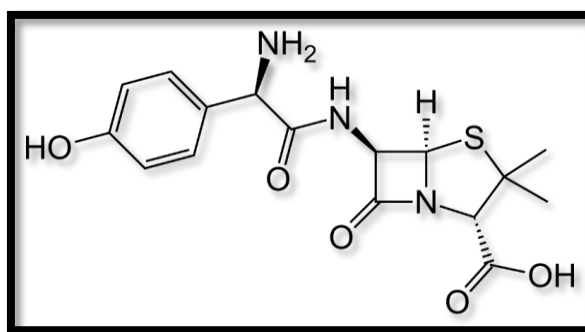


Figure 1: Structure amoxicilline

➤ La gentamicine :

(Gentalline®) appartient à la famille des aminoglycosides, dont le chef de file est la streptomycine, découverte en 1944. Un complexe d'oligosaccharides avec un noyau de désoxystreptamine a été produit par la fermentation d'actinomycètes monospores du genre Micromonospora et sert de principe actif. Un mélange de trois substances ayant essentiellement la même activité est appelé gentamicine. (BochatonC, Rochegude S, 2004)

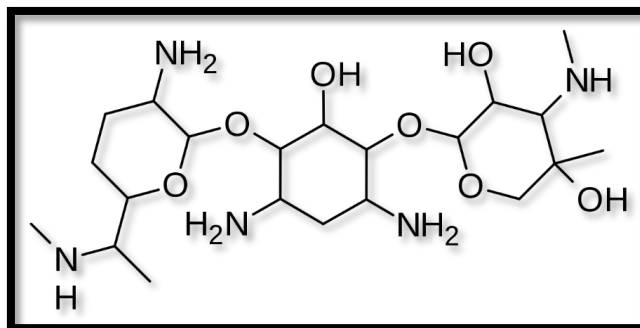


Figure 2: Structure gentamicine

III. Etude l'activité anticancéreux :

Le cancer se définit par la présence de cellules anormales qui prolifèrent de manière incontrôlée. Ce groupe de cellules attaque et détruit l'organe dans lequel il est implanté et a la capacité de se propager à d'autres parties du corps (processus connu sous le nom de métastases).

Il a été démontré que le composé alcaloïde inhibe l'invasion, la métastase et l'angiogenèse en modifiant l'activité de divers enzymes et facteurs de transcription ([KAROUI et al., 2022](#)).

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

La principale cible intracellulaire des médicaments anticancéreux est l'ADN. De nouveaux médicaments plus efficaces qui ciblent l'ADN, endommagent les cellules cancéreuses, empêchent la division cellulaire, voire les tuent, pourraient accélérer le processus de découverte et de développement de médicaments. On a donc découvert qu'il était utile d'étudier l'interaction des composés métalliques avec l'ADN afin de mieux comprendre leurs propriétés pharmacologiques. En conséquence, des mécanismes complexes expliquant les processus allant de la production de lésions dans l'ADN jusqu'à la mort cellulaire sont désormais disponibles, ce qui ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de nouveaux agents anti-tumoraux plus sélectifs et plus efficaces ([KAROUI et al., 2022](#)).

III.2. Objectif :

Dans le meilleur des cas, le traitement du cancer vise à trouver un remède ou, à défaut, à retarder le plus longtemps possible l'évolution de la maladie tout en soulageant ses symptômes. Les traitements locorégionaux (chirurgie, radiothérapie) et les traitements médicamenteux systémiques (chimiothérapie, immunothérapie, hormonothérapie) sont les deux principales modalités de traitement du cancer. La chirurgie permet de poser le diagnostic anatomopathologique et de déterminer le caractère localisé ou non de la tumeur. Elle garantit un contrôle localisé en toutes circonstances et le traitement des types confinés. La radiothérapie, forme de traitement localisé, agit en provoquant des ionisations dans l'environnement cellulaire. L'hormonothérapie a pour objectif de mettre les cellules cancéreuses dans un état de quiescence et d'empêcher leur prolifération plutôt que de détruire les cellules cancéreuses. Le blocage du récepteur et l'empêchement de la libération de l'hormone endogène sont les deux méthodes utilisées dans l'hormonothérapie. Nous aborderons plus tard l'immunothérapie, une stratégie qui consiste à renforcer le système immunitaire de l'organisme. Nous nous concentrerons ici sur la chimiothérapie. ([Jegham, 2009](#)).

III.3. Mécanismes :

Les anticancéreux sont des médicaments qui ont pour objectif de tuer ou d'arrêter la croissance des cellules cancéreuses. Ils agissent en ciblant différents mécanismes impliqués dans la division cellulaire, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. (Hanahan & Weinberg, 2011). Les principaux mécanismes d'action des anticancéreux comprennent :

1. Inhibition de la division cellulaire : Certains anticancéreux, tels que les taxanes et les vinca-alcaloïdes, agissent en bloquant la division cellulaire en interférant avec la formation des microtubules, qui sont des structures essentielles pour la séparation correcte des chromosomes lors de la division cellulaire. (Aslam et al., 2014).

2. Inhibition de la synthèse de l'ADN : Les agents alkylants, tels que le cyclophosphamide, le cisplatine et la busulfan, fonctionnent en ajoutant des groupes alkyles à l'ADN, ce qui perturbe la structure de l'ADN et empêche la réplication de l'ADN.

3. Inhibition de la synthèse des protéines : Les inhibiteurs de la synthèse des protéines, tels que les agents anti-métabolites comme le 5-fluorouracile et le méthotrexate, agissent en perturbant la synthèse des protéines nécessaires à la croissance et à la survie cellulaire.

4. Inhibition de la signalisation des récepteurs : Les anticorps monoclonaux, tels que le trastuzumab et le rituximab, agissent en se liant aux récepteurs de la surface cellulaire, ce qui empêche la signalisation qui favorise la croissance cellulaire.

5. Induction de l'apoptose : Les agents induisant l'apoptose, tels que les inhibiteurs de la kinase, agissent en déclenchant la mort cellulaire programmée, qui est un processus essentiel pour éliminer les cellules endommagées ou anormales.

Ces mécanismes d'action sont souvent combinés pour obtenir un effet maximal sur la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Cependant, il est important de noter que les anticancéreux peuvent également avoir des effets indésirables sur les cellules saines, ce qui peut entraîner des effets secondaires tels que la toxicité hématologique et la neuropathie périphérique. (Longley & Johnston, 2005).

III.4. Chimiothérapie pour le cancer :

III.4.1. Chimiothérapie standard :

La chimiothérapie est principalement utilisée pour traiter les tumeurs malignes étendues ou les métastases cachées potentielles. Il s'agit d'un traitement systémique. Pour provoquer la mort des cellules cancéreuses, les médicaments chimiothérapeutiques fréquemment utilisés font appel à des modes d'action variés et complémentaires. Leur découverte a souvent été accidentelle. C'est le cas des premiers agents découverts, comme l'actinomycine D et les moutardes à l'azote, qui ont été

découverts accidentellement lors de recherches sur les gaz de combat. Ensuite, on a découvert que ces substances étaient toxiques pour la moelle osseuse chez l'animal, ce qui indique une fonction anti-proliférative.

En revanche, d'autres médicaments ont fait l'objet d'études plus logiques. Pour "piéger" la thymidylate synthétase, l'une des enzymes cruciales de la synthèse de l'ADN, le 5-fluorouracile a été mis au point. Plus de 40 000 produits chimiques sont examinés chaque année sur un système de lignées cellulaires créées in vitro grâce aux efforts de l'Institut national du cancer à Bethesda.

La méthodologie pour isoler un composé cytotoxique actif est très complexe, et une autre méthode de recherche ciblée est la synthèse en laboratoire d'analogues de molécules déjà identifiées, afin d'améliorer leur index thérapeutique (réduction des effets secondaires, augmentation de l'activité antitumorale). Si l'approche sur la molécule elle-même n'est pas rationnelle (tout composé peut être testé, qu'il soit d'origine synthétique ou naturelle), la méthodologie pour isoler un composé cytotoxique actif est très complexe. La chimiothérapie du cancer peut être mieux comprise en gardant à l'esprit quelques idées clés.

Dans une tumeur, seules les cellules appelées "cellules souches", qui peuvent se reproduire éternellement, constituent une menace. Ce sont elles que l'on veut éliminer. Le processus de mort "naturelle" se déroule sans aide extérieure pour les autres cellules, y compris celles qui se différencient et celles qui se multiplient mais ne se reproduisent pas ou seulement pour une courte durée.

Il n'y a pas de substances que l'on ne trouve que dans les cellules cancéreuses ; tous les médicaments sont quelque peu toxiques pour les cellules normales.

La majorité des médicaments pénètrent dans la cellule maligne lorsqu'elle se divise, perturbant ainsi le processus complexe de la division cellulaire. Par conséquent, les cellules quiescentes seront à peine touchées. En revanche, les tissus sains extrêmement actifs (tels que les cellules sanguines, les muqueuses et la peau) seront vulnérables et devront être régénérés. Chaque produit chimique a une toxicité non hématologique et une toxicité hématologique plus ou moins importante. Certains médicaments n'ont d'effet qu'à un moment précis du cycle cellulaire, alors que d'autres sont efficaces à tout moment.

L'ADN nucléaire altéré dans sa composition, sa structure ou sa disposition spatiale est le point d'impact de la majorité des médicaments chimiothérapeutiques anticancéreux. En chimiothérapie, les concepts de dose et de voie d'administration sont cruciaux. Les principaux médicaments de chimiothérapie traditionnelle sont les suivants Les antimétabolites : Les D (méthotrexate, antipuriques et antipirimidines) empêchent la synthèse des acides nucléiques, étape initiale nécessaire à toute prolifération cellulaire.

Le cisplatine, les nitrosourées et les alkylants (cyclophosphamide) sont des substances qui peuvent se lier de façon covalente à l'ADN.

Les substances réversibles se liant à l'ADN comprennent l'actinomycine D et les intercalants (doxorubicine).

Les agents qui coupent les brins d'ADN comprennent la bléomycine, qui oxyde l'ADN, et l'étoposide, qui modifie la topoisomérase II.

Poisons du fuseau cellulaire : Les Ds comptent parmi les médicaments anticancéreux les plus populaires et les plus efficaces. On distingue les taxanes et les alcaloïdes de la pervenche, comme la vincristine. L'interaction directe avec la tubuline est à l'origine de la toxicité des alcaloïdes de la pervenche. Ils empêchent les cellules d'entrer en phase S en se fixant aux dimères de tubuline et en empêchant leur polymérisation en microtubules. C'est sur les microtubules que les taxanes se fixent le plus fréquemment. Les taxanes stabilisent les microtubules, contrairement aux alcaloïdes de la pervenche, qui ont tendance à les déconstruire. En phase G2, Ds bloque le cycle cellulaire.(Jegham, 2009).

III.4.2. Limites de la chimiothérapie traditionnelle :

La majorité des médicaments de chimiothérapie étant des agents antiprolifératifs, ils ciblent les processus qui distinguent les cellules proliférantes des cellules non proliférantes plutôt que les caractéristiques qui distinguent les cellules cancéreuses des cellules normales. Ne le sont pas. Il n'est donc pas surprenant que les médicaments anticancéreux endommagent les cellules de la moelle osseuse ou de la lumière intestinale, car ces cellules, bien que saines, connaissent une croissance rapide. Chaque procédure de chimiothérapie est susceptible d'endommager les tissus sains, ce qui entraîne des effets secondaires négatifs qui limitent le traitement. Les effets secondaires les plus fréquents de la chimiothérapie anticancéreuse sont les suivants : effets secondaires gastro-intestinaux (nausées, vomissements, mucosite et diarrhée) ; toxicité pour la moelle osseuse (leucopénie, anémie et thrombocytopénie) ; neurotoxicité (paresthésie, neuropathie et douleur) ; néphrotoxicité ; effets secondaires dermatologiques, toxicité pour la reproduction et pour les gonades. En outre, plusieurs médicaments anticancéreux présentent une toxicité particulière pour un ou plusieurs organes en raison de leur mode d'action ou de leur métabolisme. La formation de résistances primaires et acquises aux médicaments chimio thérapeutiques constitue un problème clinique important. En effet, un nombre croissant de cancers présentent une résistance innée à de nombreux médicaments cytotoxiques, parmi les plus puissants utilisés dans le traitement du cancer. D'autres tumeurs, initialement sensibles, développent une résistance non seulement au traitement qu'elles ont reçu initialement, mais aussi à des médicaments qui n'ont pas

encore été développés. D'autres approches thérapeutiques plus efficaces et plus ciblées sur les cellules cancéreuses ont été développées grâce à la recherche scientifique.(Jegham, 2009).

III.4.3. Traitements spécialisés :

Les chercheurs ont récemment réussi à créer quelques nouvelles approches thérapeutiques axées sur l'identification des sites précis où les médicaments cytotoxiques agiront. Ces méthodes ciblent logiquement les cellules tumorales et bénéficient d'un indice thérapeutique plus fort en tirant parti des défauts biologiques uniques des cellules tumorales. Les médicaments ciblés qui ont fait l'objet du plus grand nombre de recherches sont les suivants :

- Bloquer ou modifier les signaux qui régulent la croissance et la survie des cellules tumorales (par exemple, en inhibant la transduction des signaux).

Cibler les antigènes tumoraux ou stimuler le système immunitaire pour qu'il attaque les cellules tumorales.

- Activer les gènes suppresseurs de tumeurs.

- Bloquer la surexpression de gènes spécifiques (traitements anti-sens).

- Interférence avec la transduction des signaux.

La prolifération, la viabilité, la réplication, le métabolisme, la différenciation et la mort des cellules sont tous régulés par la signalisation intracellulaire, qui peut être activée de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule. Les récepteurs transmembranaires sont également responsables de plusieurs autres processus importants, notamment l'angiogenèse, l'adhésion cellulaire et la motilité. Les récepteurs à tyrosine kinase, les récepteurs à sérine kinase, les récepteurs couplés aux protéines G, le TNF (Tumor Necrosis Factor) et d'autres récepteurs font partie de ce groupe. La surexpression et l'activation de ces récepteurs constituent une étape cruciale dans le développement et la propagation du cancer.

De nombreuses tumeurs malignes, notamment le cancer du pancréas avancé, le carcinome rénal, le cancer de la tête et du cou et le cancer du côlon, surexpriment le récepteur tyrosine kinase erbB 1 (communément appelé HER 1 ou EGFR). Dans les tumeurs malignes qui surexpriment l'EGFR, l'inhibition de l'EGFR empêche la prolifération des cellules cancéreuses et réduit la croissance tumorale. Voici quelques exemples de méthodes thérapeutiques permettant de bloquer ce récepteur:

Le récepteur peut être rendu inaccessible en le reliant à un anticorps monoclonal ; il peut également être rendu inactif en attachant un minuscule produit chimique au domaine tyrosine kinase intracellulaire du récepteur.

Lorsqu'un poison se lie au domaine extracellulaire du récepteur et pénètre dans la cellule, le récepteur tue la cellule ;

La fixation d'une molécule antisens sur le récepteur empêche la transmission du signal en aval du récepteur.

Un anticorps monoclonal chimérique appelé cetuximab (Erbix®) a une affinité plus élevée pour le récepteur de l'EGF que son ligand naturel. Il est utilisé dans le traitement du cancer du côlon métastatique.(Jegham, 2009).

III.4.4. Traitements antisens :

En empêchant la production de certaines séquences d'ARN, les techniques antisens empêchent la croissance des cellules en stoppant la synthèse des protéines. Le brin d'ARN messager qui code pour une protéine particulière forme une liaison complémentaire avec l'oligonucléotide antisens. Le complexe "ARN messager/oligonucléotide antisens" empêche l'ARN de transférer de déchiffrer le code, ce qui empêche la production de la protéine.(Jegham, 2009).

III.4.5. Immunothérapie :

Les approches utilisées en immunothérapie comprennent les vaccins peptidiques qui activent les réponses immunitaires anticancéreuses, l'immunisation génétique qui crée une immunité contre un antigène tumoral particulier et les anticorps monoclonaux qui ciblent les antigènes tumoraux. Les traitements géniques font également l'objet de recherches ; ils activent des gènes suppresseurs de tumeurs particuliers qui auraient subi des mutations au cours du processus de transformation maligne.(Jegham, 2009).

III.5. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes :

Plusieurs études ont été menées pour démontrer les propriétés anticancéreuses des flavonoïdes: Les flavonoïdes réduisent le risque et l'incidence de plusieurs types de cancer, notamment le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer de la prostate, le cancer de l'estomac et le cancer du sein. Une consommation accrue d'isoflavones a été associée à une diminution du risque de cancer lié aux œstrogènes et de maladie vasculaire. Les flavonoïdes ont également des effets sur le cancer du larynx et de l'œsophage.

IV. Etude activité antiinflammatoire :

L'inflammation est la réponse d'un tissu vivant vascularisé à une agression physique, chimique ou biologique afin de le maintenir. Elle peut parfois être néfaste en raison de l'agressivité du

pathogène, de sa persistance, de la perturbation du processus inflammatoire ou d'une quantité ou d'une qualité anormale des cellules impliquées dans l'inflammation.

Les médicaments anti-inflammatoires constituent un groupe diversifié de produits chimiques utilisés pour traiter les réactions inflammatoires et les maladies qui en découlent ([KAROUI et al., 2022](#)) .

IV.1. Principe :

La dénaturation des protéines est une cause bien connue d'inflammation qui conduit à une variété de maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines indique un potentiel évident d'activité anti-inflammatoire. Nous avons utilisé le test d'inhibition thermique de la dénaturation des protéines pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes ([ASSILA et al., 2022](#)).

IV.2. Types d'inflammation :

Selon Amroun (2021), l'inflammation est classée en trois étapes selon la durée du processus inflammatoire : inflammation aiguë, inflammation chronique et inflammation subaiguë, qui est la période de transition entre la forme aiguë et la forme chronique.

➤ Inflammation aiguë:

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate et adaptative avec une spécificité limitée causée par une variété de stimuli nocifs, tels que l'infection et les dommages tissulaires causés par un traumatisme. C'est un mécanisme important de la réponse immunitaire innée qui commence rapidement et les symptômes peuvent durer quelques jours, comme la cellulite ou la pneumonie aiguë.

L'inflammation aiguë est une affection instable ; elle se résout ou persiste ; si la réponse inflammatoire persiste pendant une période prolongée, elle peut se transformer en une affection chronique qui dure plusieurs semaines, mois, voire des années. Cela provoque une inflammation chronique, qui peut prédisposer à une variété de maladies chroniques telles que le cancer, les pathologies auto-immunes et les pathologies métaboliques.

➤ Inflammation chronique:

Inflammation chronique est la principale cause de décès dans le monde, avec des maladies inflammatoires chroniques tuant trois personnes sur cinq ; il est également connu comme inflammation lente et à long terme, et il dure pendant plusieurs mois à plusieurs années.

La chronicité peut être causée par la persistance d'un agent pathogène qui provoque une inflammation aiguë, l'exposition à un faible niveau d'un irritant spécifique ou d'un corps étranger

qui ne peut pas être éliminé, un trouble auto-immun, un défaut dans les cellules responsables de la médiation de l'inflammation, et les inducteurs inflammatoires et biochimiques qui causent le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial.

L'inflammation chronique est non seulement une cause primaire de ces maladies, mais elle est aussi un facteur clé dans leur pathogénie.

IV.3. Les anti-inflammatoires :

Les anti-inflammatoires sont des substances qui agissent sur le gonflement et la douleur et qui ciblent des molécules clés dans la physiopathologie de la réaction : PLA2, lipoxygénase, cyclooxygénase, cytokines, et ne sont utilisés que lorsque les processus de réactions inflammatoires sont exagérés par rapport à la cause initiale ; leurs principaux inconvénients sont une mauvaise tolérance digestive et un large éventail de contre-indications ([ASSILA et al., 2022](#)).

➤ Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) :

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont une classe de médicaments de structure chimique homogène dont le noyau de base est le prégnane. Sont de puissants anti-inflammatoires aux propriétés immunomodulatrices, analgésiques, antipyrétiques et antiallergiques. Ils constituent le traitement le plus efficace des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes.

➤ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une classe de médicaments qui ont des effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires à fortes doses. Ils sont utilisés avec succès depuis plus de 3 000 ans et sont encore utilisés quotidiennement par des millions de patients dans le monde.

➤ Les anti-inflammatoire d'origine naturelle :

Les plantes médicinales sont des médicaments d'origine végétale utilisés depuis longtemps par la médecine populaire pour traiter les maladies inflammatoires, la fièvre, la douleur, etc. Au moins une partie de la plante possède des propriétés médicinales. L'activité anti-inflammatoire de ces plantes est due à leur forte concentration en métabolites bioactifs secondaires. Métabolites bioactifs secondaires : polyphénols, en particulier flavonoïdes, stérols, alcaloïdes, coumarines,

IV.4. Mécanisme de l'activité anti-inflammatoire :

Les médicaments anti-inflammatoires sont utilisés pour réduire l'inflammation dans différentes conditions pathologiques telles que l'arthrite, les maladies auto-immunes, les allergies et les

maladies cardiovasculaires. Les principaux mécanismes d'action des médicaments anti-inflammatoires comprennent :

1. Inhibition de la synthèse des prostaglandines : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), tels que l'aspirine et l'ibuprofène, agissent en inhibant l'activité de l'enzyme cyclooxygénase (COX), qui est impliquée dans la synthèse des prostaglandines, des médiateurs de l'inflammation. (Seidenberg, 1999).

2. Inhibition de la synthèse des cytokines : Les corticostéroïdes, tels que la prednisone et la dexaméthasone, agissent en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Seidenberg, 1999).

3. Inhibition de la migration des cellules inflammatoires : Les antagonistes des récepteurs des leucotriènes, tels que le montélukast, agissent en bloquant l'effet des leucotriènes, des substances impliquées dans la migration des cellules inflammatoires vers les tissus (Barnes, 1998).

4. Inhibition de l'activité des neutrophiles : Les inhibiteurs de la phosphodiesterase-4 (PDE-4), tels que la roflumilast, agissent en réduisant l'activité des neutrophiles, des cellules inflammatoires qui libèrent des enzymes qui endommagent les tissus (Church et al., 2010).

5. Inhibition de l'activité des mastocytes : Les antagonistes des récepteurs de l'histamine, tels que la cétirizine, agissent en bloquant l'effet de l'histamine, une substance libérée par les mastocytes qui provoque la dilatation des vaisseaux sanguins et l'augmentation de la perméabilité capillaire.

Ces mécanismes d'action sont souvent combinés pour obtenir un effet maximal sur l'inflammation. Cependant, il est important de noter que les médicaments anti-inflammatoires peuvent également avoir des effets indésirables, tels que des saignements gastro-intestinaux pour les AINS et une suppression du système immunitaire pour les corticostéroïdes.(Szczeklik et al., 2000).

IV.5. Médicaments anti-inflammatoires :

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui sont utilisés pour réduire l'inflammation dans différentes conditions pathologiques telles que l'arthrite, les maladies auto-immunes, les allergies et les maladies cardiovasculaires. Les principaux types de médicaments anti-inflammatoires comprennent :

1. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) : Ce sont des médicaments qui inhibent l'activité de l'enzyme cyclooxygénase (COX), qui est impliquée dans la synthèse des prostaglandines, des médiateurs de l'inflammation. Les AINS comprennent l'aspirine, l'ibuprofène, le naproxène et le diclofénac.(Seidenberg, 1999).

2. Les corticostéroïdes : Ce sont des hormones stéroïdes produites naturellement par le cortex surrénalien. Les corticostéroïdes synthétiques, tels que la prednisone et la dexaméthasone, réduisent l'inflammation en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).([Barnes, 1998](#)).

3. Les inhibiteurs de la phosphodiesterase-4 (PDE-4) : Ce sont des médicaments qui réduisent l'activité des neutrophiles, des cellules inflammatoires qui libèrent des enzymes qui endommagent les tissus. Les inhibiteurs de la PDE-4 comprennent la roflumilast et l'apremilast.

4. Les antagonistes des récepteurs des leucotriènes : Ce sont des médicaments qui bloquent l'effet des leucotriènes, des substances impliquées dans la migration des cellules inflammatoires vers les tissus. Les antagonistes des récepteurs des leucotriènes comprennent le montélukast et le zafirlukast. ([Szczeklik et al., 2000](#)).

5. Les inhibiteurs de l'interleukine-6 (IL-6) : Ce sont des médicaments qui réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6. Les inhibiteurs de l'IL-6 comprennent le tocilizumab et le sarilumab. ([McInnes & Schett, 2011](#)).

Ces médicaments anti-inflammatoires sont souvent combinés pour obtenir un effet maximal sur l'inflammation. Cependant, il est important de noter que les médicaments anti-inflammatoires peuvent également avoir des effets indésirables, tels que des saignements gastro-intestinaux pour les AINS et une suppression du système immunitaire pour les corticostéroïdes.

Chapitre II :

Généralités sur le

pamplemousse et la

naringine

I. Généralité sur le pamplemousse :

I.1. Historique et origine d'agrumes :

L'agrumes et son histoire reproductive est l'un des sujets de grand intérêt. Intéressant pour les historiens et les anciens voyageurs des mondes oriental et occidental. Les agrumes sont un fruit relativement ancien. Des graines d'agrumes (pavot) ont été trouvées lors de fouilles en Mésopotamie, suggérant que la variété a été découverte il y a au moins quatre mille ans. J'ai également trouvé des preuves qui jettent un doute sur la connaissance des agrumes chez les anciens Égyptiens, car des échantillons d'agrumes ont été trouvés dans des sépultures de pharaon du 12ème siècle avant JC.

Il existe de bonnes preuves que dans les anciennes civilisations orientales, il existait de nombreuses variétés d'agrumes, même si la popularité des différentes variétés n'était pas égale. Le plus commun est l'agrumes, dont le fruit est utilisé dans différentes cérémonies religieuses. Les agrumes se sont progressivement répandus et ont été déplacés de leurs terres d'origine vers d'autres parties du monde antique en raison des guerres entre empires. Quant à l'orange, certains chercheurs attribuent sa propagation aux navigateurs portugais en raison de la similitude de son nom avec les oranges. Celui du Portugal. Cependant, il est prouvé qu'elle a suivi le même chemin que l'orange amère, car la distinction botanique entre les oranges et les coquelicots n'était pas claire au cours de la période susmentionnée. Au lieu de cela, les chercheurs les ont traditionnellement regroupés en un seul type dont le fruit varie entre aigre-doux, ce qui conduit à l'idée que l'absence d'oranges peut être due à sa propagation et à son transfert sous le nom de pavot ou d'orange amère ([Yssaade et Medaouar, 2018](#)).

Arabes vers les pays qu'ils ont traversés ou sur lesquels ils ont gouverné. Puis s'est propagé au reste du monde pendant l'ère suivante de l'Empire arabe. Les principaux centres d'origine se situeraient sous une ligne allant du nord-est de l'Inde au nord du Myanmar et au sud de l'île de Hainan. De cette zone, les agrumes se sont propagés vers l'est de l'Inde, l'archipel malaisien et le sud de la Chine. La propagation des agrumes dans le monde a été très lente. L'orange amère, le citron et l'oranger n'ont été introduits dans le bassin méditerranéen que vers le milieu du XIIe siècle, et les mandariniers ont été introduits au XIXe siècle.

I.2. Généralités et définitions :

➤ Le pamplemousse « *Citrus paradisi* »

Le capitaine anglais de la Compagnie des Indes orientales, Philip Shaddock, aurait apporté des graines de pamplemousse indonésien à la Barbade en 1649. L'espèce s'est répandue dans les Caraïbes et a produit des fruits plus petits que l'original. En effet, le pamplemousse est un agrume hybride. Il est né dans les Caraïbes d'un croisement entre un pomelo et une orange douce (Spiegel et Goldschmidt, 1996). Le pamplemousse est également connu sous le nom de citron de la Barbade, ou *Shaddock* en anglais (Tonelli et Gallouin, 2013).

Le pamplemousse est le plus grand des agrumes, mesurant 15 à 30 centimètres de diamètre et pesant plusieurs kilos. De forme piriforme, sa peau est lisse ou granuleuse, de couleur jaune clair à verte, et épaisse. Sur cette peau, on trouve de nombreuses poches d'essence colorées par des caroténoïdes et visibles à l'œil nu. L'albêdo est large avec 16 à 18 quartiers bien séparés. La pulpe peut être blanche, rose, voire plus colorée selon les espèces. Elle possède des pépins plus ou moins gros, ovoïdes et pointus, qui sont pointus et mono-embryonnés (Blaisot, 2016).

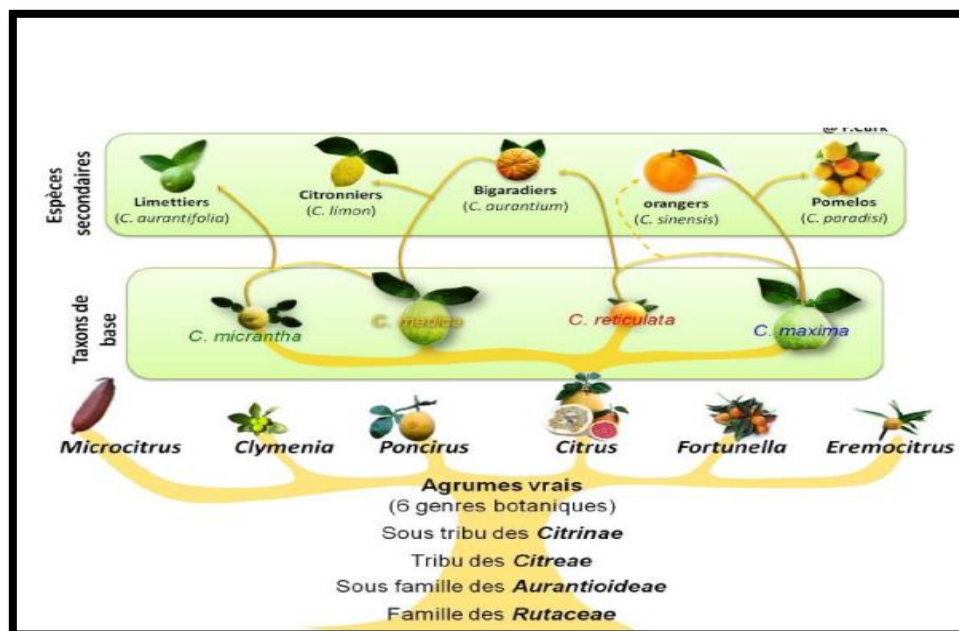


Figure 3: Origine génétique de la pamplemousse *citrus paradisi*

I.3. Taxonomie *citrus paradisi* :**Tableau 1:** Classification de *citrus x paradisi* (Aswini et al, 2012).

Règne	Végétal
Embranchement	Magnoliophytes
Classe	Magnoliposida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus x paradisi</i>

I.4. Nomenclature :

L'hybridation est la fécondation croisée de l'ovule d'une plante par du pollen d'une autre plante de la même espèce. Ce qui est notre cas, Hybride entre *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*, membre du groupe des pamplemoussiers.

- ❖ *Aurantium maximum* Burm., depuis 1755, qui n'est autre que le basionyme de *Citrus maxima*.
- ❖ *Citrus grandis* (L.) Osbeck, depuis 1757.
- ❖ *Citrus aurantium* var. *grandis* L., depuis 1753, qui est le basionyme de *Citrus grandis*.
- ❖ *Citrus aurantium* var. *decumana* L., ou *Citrus decumana* L., depuis 1763 (Billami Sarah, 2021)

I.5. Répartition géographique :

Le pamplemoussier a été découvert en Europe au XII^e siècle et était connu des Chinois 2 000 ans avant notre ère. On ne connaît pas le détail des étapes qu'il a pu franchir au cours des siècles, vraisemblablement parce qu'il n'était pas consommé.

Il est cultivé aux États-Unis, en Israël, en Argentine, à Chypre, au Mexique, à Cuba, en Afrique du Sud et dans d'autres pays du monde. Il existe dix cultivars en Europe et en Afrique du Nord. Les États-Unis (Floride) sont le premier producteur de pamplemousses, suivis par Israël.

Citrus paradisi est originaire des Antilles et a été introduit en Floride au début du XIXe siècle. Sa culture commerciale a débuté vers 1885, puis quelques décennies plus tard en Californie, en Arizona et au Texas (Hodgson, 1967).

I.6. Production du pamplemousse :

✓ Dans le monde :

La production mondiale de pamplemousse 2020 :
Selon les données de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) pour 2020, la production mondiale de pamplemousses s'élève à environ 7,3 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs de pamplemousses sont la Chine, les États-Unis, le Mexique, la Thaïlande et l'Inde. Voici les chiffres de production de pamplemousse pour ces pays en 2020 (<https://www.tridge.com/fr/intelligences/pomelo/production>).

Tableau 2: Production de pamplemousse dans le monde en 2020

	Pays	Pays %	Production (2020)
	Chine	53.12%	4.95 M
	Vietnam	8.94%	833.40 K
	Etats-Unis	5.56%	518 K
	Mexique	5.27%	490.83 K
	Afrique du Sud	4.47%	416.12 K
	Thaïlande	3.06%	284.75 K
	Soudan	2.87%	267.50 K
	Turquie	2.55%	238.50 K

✓ En Algérie :

Les agrumes ont une importance économique dans de nombreux pays. Il en est de même pour l'Algérie, où ils sont une source d'emploi et d'activité économique tant dans le secteur agricole que dans les différentes branches auxiliaires. (Conditionnement, emballage, transformation, transport, etc....) (Fadhila et Chaouchi, 2021).

Sur le plan social, l'agrumiculture emploie en moyenne 140 jours/ha/an, sans compter ceux générés par l'environnement de ce secteur (Traitement, commercialisation). Le verger agrumicole algérien se concentre essentiellement dans les plaines littorales et subtropicales, où les conditions

pédoclimatiques sont favorables. Selon ce même auteur les principales zones agrumicoles sont localisées comme suit :

- La plaine de la Mitidja.
- Le périmètre de la Mina et du Cas Chélif.
- Le périmètre de l'Habra.
- La plaine d'Annaba.
- La plaine de Skikda.

I.7. Description botanique :

Le pamplemoussier est un grand arbre qui peut atteindre 10 mètres de haut et 8 mètres de large. Les feuilles sont ovales, avec un bord légèrement denté vers l'extrémité pointue, et elles ont un pétiole ailé en forme de cœur. Les feuilles sont des Rutacées, comme celles de la plupart des arbres de la famille des Rutacées. (Tonelli et Gallouin, 2013;) (Dupont et Guignard, 2015).

Le pamplemousse est le plus grand des agrumes, mesurant 15 à 30 centimètres de diamètre et pesant plusieurs kilos. De forme piriforme, sa peau est lisse ou granuleuse, de couleur jaune clair à verte, et épaisse. Sur cette peau, on trouve de nombreuses poches d'essence, qui sont colorées par des caroténoïdes visibles à l'œil nu. Son albédo (peau blanche sous l'écorce du fruit) est important et comporte 16 à 18 quartiers bien séparés. La pulpe peut être blanche, rose, voire plus colorée selon les espèces. Elle présente une variété de gros pépins ovoïdes et pointus qui sont mono-embryonnés. (Blaisot, 2016).



Figure 4: Pamplemousse *citrus paradisi*

I.8. Compositions du pamplemousse :

Selon Morton (1987), des analyses réalisées en Californie, au Texas, en Floride, à Cuba et en Amérique centrale ont révélé la composition biochimique moyenne du pamplemousse. Les résultats sont exprimés dans le Tableau :

Tableau 3: Composition biochimique moyenne du pamplemousse (Morton 1987).

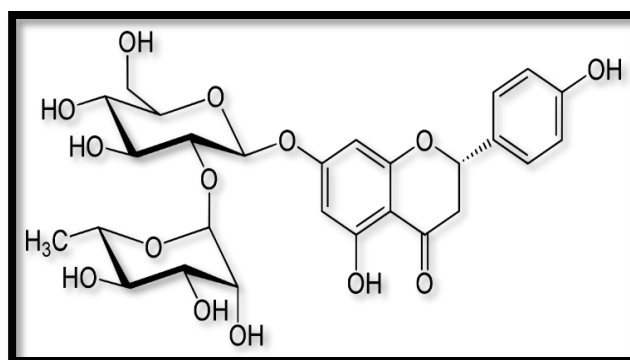
Composition pour 100g	Pulpe	Jus	Ecorce
Calorie (Kcal)	34.4 - 46.4	37 - 42	316
Humidité (g)	87.5 - 91.3	89.2 - 90.4	17.4
Protéine (g)	0.5 - 1.0	0.4 - 0.5	0.4
Lipide (g)	0.06 - 0.20	0.1	0.3
Glucide (g)	8.07 - 11.5	8.8 - 10.2	80.6
Fibre (g)	0.14 - 0.77	Traces	2.3
Cendre (g)	0.29 - 0.52	0.2 - 0.3	1.3

I.9. Valeurs nutritives du pamplemousse :

Les fruits sont riches en eau, en glucides, en fibres, en minéraux et en vitamines, en particulier celles qui sont solubles dans l'eau. La valeur nutritionnelle des fruits varie fortement en fonction de leur nature, des conditions de croissance et du moment de leur consommation. (Tonelli et Gallouin, 2013).

➤ Flavonoïdes :

Présents dans tout le fruit, mais principalement dans le mésocarpe. Leur concentration est la plus élevée dans les fruits mûrs fraîchement cueillis, qui contiennent 14,5 % de citro-flavonoïdes. Le principal flavonoïde est la naringine, qui représente environ 7,2 g/100 g du fruit à pleine maturité. Elle se trouve à raison de 490 à 4100mg/100g dans le mésocarpe et de 1070 à 2240 mg/100g dans les graines. (Zhang, 2007).

**Figure 5:** Structure chimique de naringine (Faiza & Souad, 2020).

L'hespéridine, un autre citro-flavonoïde composé du groupe rutinosyl (parti osidique) et de l'hespéridine (partie aglycone), se trouve à des concentrations plus faibles que la naringine (0-20 mg/100g) (Zhang, 2007). Dans le mésocarpe du pomelo. On la trouve également à une concentration de 29,5 mg/100g dans l'épicarpe du pomelo (Zhang, 2007 ; Baron et coll, 2016).

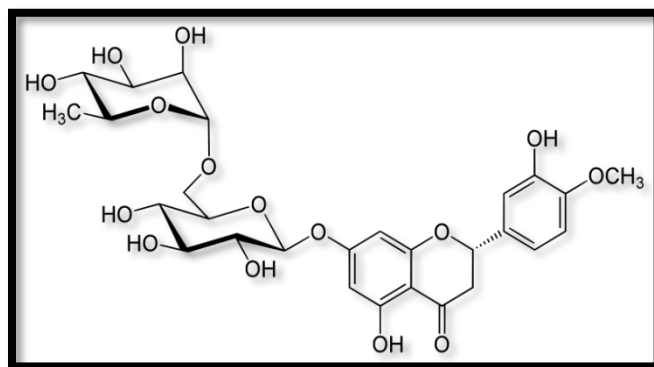


Figure 6: Structure chimique de l'hespéridine (Faiza & Souad, 2020).

➤ Les limonoïdes :

Les limonoïdes sont des triterpènes présents dans les fruits des agrumes. Ils sont responsables du **goût amer** des jus d'agrumes après leur pressage (Bruneton, 2009). Les limonoïdes sont également présents, dans une moindre mesure, dans le mésocarpe du pamplemousse, à des concentrations comprises entre 0,31 et 0,87 % du poids sec du fruit. Les limonoïdes se trouvent principalement sous forme d'aglycone dans les graines immatures, mais au fur et à mesure que le fruit mûrit, des formes hétérosidiques peuvent apparaître (Ozaki et coll, 1991). La présence de limonoïdes sous forme d'acide limonoïque peut être observée dans le mésocarpe (Bruneton, 2009).

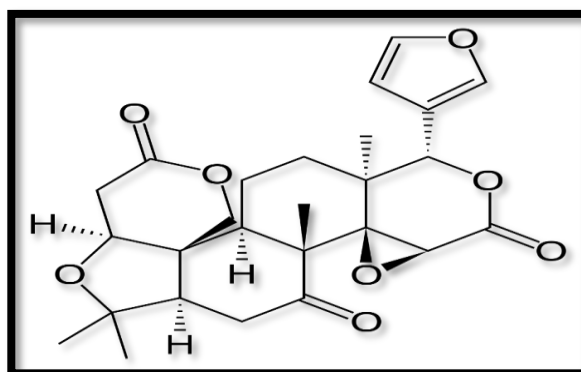


Figure 7: Structure chimique des limonoïdes (Faiza & Souad, 2020).

➤ **Vitamine C :**

La vitamine C, également connue sous le nom d'acide L-ascorbique, a la formule chimique $C_6H_8O_6$ et est l'un des antioxydants hydrosolubles les plus importants présents dans les fluides intra- et extracellulaires. (Compartiments hydrophiles) (Vertuani et al, 2004). Il s'agit d'une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur, à la lumière UV et à l'oxygène. Le corps humain ne pouvant la synthétiser, elle doit être obtenue principalement par l'alimentation (fruits et légumes frais). Les besoins de l'organisme en vitamine C augmentent pendant la croissance, la grossesse, l'allaitement et chez les patients diabétiques (Fain, 2004).

La vitamine C est un puissant antioxydant, et elle travaille avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour neutraliser les radicaux libres (Cheick, 2006).

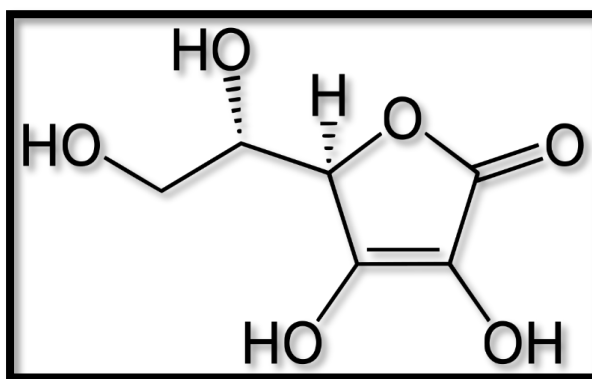


Figure 8: Structure chimique de vitamine C (Faiza & Souad, 2020).

➤ **Fibres (pectine) :**

Les pectines sont des polysaccharides complexes qui contiennent des acides -Dgalacturoniques et qui sont abondants dans les jeunes fruits charnus. Elles sont d'abord insolubles et confèrent aux tissus une certaine rigidité. Au fur et à mesure que le fruit mûrit (Bruneton, 2016). Ils sont dégradés en sucres et en acides. Les agrumes, en particulier les pamplemousses et les citrons, ont une teneur en pectine plus élevée, allant de 36,0 1,46 mg/g à 86,4 3,36 mg/g dans les écorces d'agrumes (Zou et al, 2016).

➤ **Autres substances :**

Le pomelo (*citrus x paradisi*) est riche en eau. C'est aussi une bonne source de potassium, avec une teneur en potassium de 147 mg/100g, ainsi qu'une source de calcium et de phosphore (USDA, 2001).

Tableau 4: Composition pour 100 g des fruits du *citrus x paradisi*
(<https://www.agripedia.nc/ressources-vegetales/plantes-alimentaires/fruits/pomelos/les-pomelos>).

Composition	Valeurs (pour 100g du <i>citrus x paradisi</i>)
Eau	88.1 g
Calcium	22 mg
Magnésium	9 mg
Phosphore	18 mg
Potassium	135 mg
Vitamine C	31.2 mg

I.10. Effets thérapeutiques du pamplemousse :

Le pamplemousse est un fruit qui présente d'excellents avantages pour la santé.

✓ **Elle possède des propriétés hypoglycémiantes :**

Une étude sur des animaux diabétiques a révélé que les niveaux de glucose dans le sang étaient significativement réduits après l'injection de naringine. Par conséquent, ce composé peut jouer un rôle important dans la prévention de l'hyperglycémie (Jung et al, 2004).

En effet, une étude sur des personnes obèses atteintes du syndrome métabolique a révélé que la consommation d'un demi-pamplemousse par jour avant chaque repas pendant 12 semaines entraînait une perte de poids (Fujioka et Greenway, 2006).

✓ **Il réduit le cholestérol :**

Une étude sur des patients d'hypercholestérolémiques a révélé que la consommation de deux pamplemousses par jour avait la capacité de réduire les niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sang (Gorinstein et al, 2004).

✓ **Il possède des propriétés anti-inflammatoires :**

Les flavonoïdes des agrumes ont des propriétés anti-inflammatoires, selon plusieurs études (Benavente et Castillo, 2008).

✓ **C'est un puissant antioxydant :**

Le pamplemousse est riche en vitamine C et en naringine, un flavonoïde présent uniquement dans les agrumes et extrêmement bénéfique dans la lutte contre les radicaux libres (qui provoquent l'oxydation des tissus et des cellules de notre corps, accélérant le vieillissement). Il contient

également des limonoïdes, que l'on trouve principalement dans ses graines et son jus et qui sont connus pour leurs importantes capacités antioxydantes (Wang et capacités antioxydantes) (Wang et Yu, 2005).

✓ Propriétés anticancéreuses :

Plusieurs études ont établi un lien entre la consommation d'agrumes, dont le pamplemousse, et la prévention de certains types de cancer, notamment les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du côlon, de la bouche et du pharynx. Selon l'une de ces études, la consommation modérée d'agrumes (1 à 4 portions par semaine) diminue le risque de cancer du tube digestif et de l'appareil respiratoire. Dans le cas du cancer du pancréas, les études restent controversées. En revanche, les chercheurs ont découvert que les personnes qui consommaient davantage de pamplemousse blanc présentaient un risque plus faible de cancer du poumon (Billami Sarah, 2021).

I.11. Variétés du pamplemousse :

Le pamplemousse se décline en de nombreuses variétés cultivées, chacune ayant sa propre couleur, sa propre saveur et sa propre forme. La plupart des variétés d'Extrême-Orient ne sont cultivées que dans leur pays d'origine, où les conditions climatiques permettent au fruit de mûrir. Les fruits sont juteux, mais amers et remplis de graines. Ils sont appréciés et utilisés dans la cuisine traditionnelle. Des variétés améliorées, moins amères et plus sucrées mais moins juteuses, sont cultivées en Extrême-Orient et dans d'autres parties du monde. (Billami Sarah, 2021).

Tableau 5: Caractéristiques des principaux de pamplemousse
(<https://www.agripedia.nc/ressources-vegetales/plantes-alimentaires/fruits/pomelos/les-pomelos>).

	Marsh	Redblush	Ruby	Shambar	Star Ruby	Thompson
Origine	Semis Duncan	Mutation Thompson	Mutation Thompson	Mutation Marsh	Mutation Ruby	Mutation Mars
Couleur	Jaune	Rose	Jaune	Rose	Rose	Rose
Poids (g)	460	440	530	590	540	510
Diamètre (mm)	101	86	96	101	91	92
Hauteur (mm)	101	91	104	117	108	108

Epaisseur de l'écorce du fruit (mm)	9	9	9	10	9	6
Graines (n)	5	9	9	2	2	5
Jus (%)	44	52	48	45	57	50
Acidité (g)	1.03	1.03	1.07	1.1	1.03	1.03
Sources solubles	7.5°	7.7°	7.6°	7.7°	7.5°	7.5°

I.12. Utilisations de pamplemousse :

L'huile essentielle extraite des fleurs de pamplemousse est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'insomnie et comme tonique. Sa pulpe serait un acide efficace pour traiter les troubles urinaires. Des extraits de feuilles de *Citrus paradisi* ont été testés pour leur activité antibiotique (Morton et al., 1987).

L'écorce de pamplemousse est utilisée en confiserie et constitue une source importante de pectine pour la conservation d'autres fruits. L'huile d'écorce est utilisée dans la préparation de boissons comme arôme (Morton et al., 1987).

Il est utilisé pour fabriquer l'extrait de pépins de pamplemousse, qui est à la fois un antibiotique et un complément alimentaire. Ce dernier est composé de plusieurs éléments, dont des polyphénols (par exemple, la quercétine) (Cordonnier, 2015).

Le pamplemousse a également des effets négatifs. Il est vrai qu'un inhibiteur d'enzyme augmente les effets secondaires et la toxicité de certains médicaments utilisés pour traiter le cancer du sein (Chabbosse et Derbré, 2015).

II . Généralités sur la naringine :

II.1. Historique et origine naringine :

La naringine a été découverte dans les fleurs des pamplemoussiers poussant à Java par De Vry en 1857, mais il n'a pas publié ses résultats à l'époque. De Vry et Hoffman, et plus tard Will, ont mené des recherches approfondies sur ce "nouveau composé" dans les années qui ont suivi. Le nom naringine est très probablement dérivé du terme sanskrit "narangi", qui signifie "orange". Elle Les agrumes et les pamplemousses, les haricots, les cerises, le cacao, l'origan et les tomates en contiennent tous. Le jus de pamplemousse en contient jusqu'à 800 mg/L. Asahina et Inubuse ont découvert la structure chimique de la naringine en 1928 ([Bharti et al., 2014](#)).

La naringine se trouve principalement dans le jus de pamplemousse, de cédrat vert et de leurs variétés ; elle a de nombreuses fonctions biologiques et est largement utilisée dans les domaines de la médecine, de l'alimentation et de la santé.

La naringine est largement utilisée dans les domaines de la médecine, de la nutrition et des cosmétiques. Elle possède une large gamme d'activités biologiques. La naringin a été obtenue dans les années 1930 par Harvey et Rygg en utilisant la méthode d'isolation et d'extraction.

L'extraction et l'isolement. Ils ont également établi une méthode colorimétrique pour déterminer la naringine. Ils ont également établi une méthode colorimétrique pour déterminer la naringin, qui a servi de base aux recherches suivantes. Booth et d'autres chercheurs ont mené des études systématiques sur les métabolites de la naringine.

Naringine. Hagen et d'autres chercheurs ont établi une méthode de chromatographie basée sur la fluorescence pour déterminer la naringin dans les années 1960. Hagen et d'autres chercheurs ont mis au point une méthode de chromatographie basée sur la fluorescence pour la détermination de la naringine. En outre, l'activité biologique de la naringin a été évaluée. L'activité biologique de la naringine a été évaluée. On a constaté qu'elle améliorait l'ascite, l'œdème pulmonaire expérimental, le péritoine et l'oxygénation. À l'heure actuelle, Les méthodes actuelles d'extraction de la naringine comprennent l'extraction à l'eau chaude, l'extraction alcaline, la précipitation acide et l'extraction par solvant organique. La naringine est extraite par précipitation acide et par solvant organique. Des études sur l'activité des produits pharmaceutiques ont été menées et ont montré sa gamme d'activités biologiques ([Wang et al., n.d.](#)).

II.2. Définition et structure de naringine :

La naringine (formule moléculaire $C_{27}H_{32}O_{14}$, poids moléculaire 580,4 g/mol) est un glycoside de flavanone que l'on trouve dans les raisins et les agrumes. Elle a le goût amer distinct du jus de pamplemousse (Alam et al., 2014).

Naringine (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside) qui possède des propriétés biologiques et pharmacologiques intéressantes. La naringine est un composé amer composé de naringénine, un aglycone, et de néohespéridose attaché au groupe hydroxyle en C-7. La naringine est actuellement inscrite au registre des substances aromatiques, ce qui permet son utilisation sans restriction dans les aliments. Récemment, l'efficacité de la naringine dans le traitement du diabète et de ses complications a suscité un regain d'intérêt (Srinivasan et al., 2019).

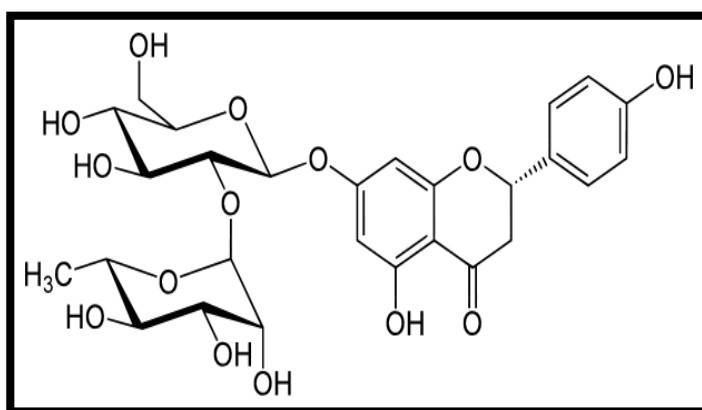


Figure 9: Structure de naringine (Bouanini, 2019)

II.3. Sources de naringine :

La naringine est l'un des citro-flavonoïdes les plus abondants isolés à partir de l'écorce d'oranges communes :

- Citrus aurantium L.= l'oranger amer.
- C. sinensis =l'oranger doux.
- C. unshiu Citrus limon = le citronnier.
- Citrus aurantifolia = le limettier (Citron vert).
- Citrus paradisi (maxima) = le pamplemoussier.
- Citrus reticulata = la mandarine.
- Citrus medica= Citron.

Et d'autres espèces du genre Citrus (appartenant à la famille des Rutacées). Aussi ; dans des genres Fabacées, Bétulacées, Lamiacées et Papilionacées (l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*..)) ([Bouanini, 2019](#)).

II.4. Description de la naringine :

Origine : Pamplemousses

Dénomination chimique:

(7-[[2-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl) - β -D-glucopyranosyl]] oxy] -2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) -4H-1-benzopyran-4-one)

Formule moléculaire : C₂₇H₃₂O₁₄ ; **MW**, 580.53 ; **CAS**, 10236-47-2.

Propriétés :

Poudre cristalline de couleur blanche à jaune clair. Insoluble dans les solvants non polaires, y compris la benzine de pétrole, l'éther, le benzène et le chloroforme, mais soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acide acétique, les solutions alcalines faibles et l'eau chaude. Fusion.

Point de congélation : 83 °C, contenant 6 à 8 cristaux d'eau ; 171 °C, contenant 2 cristaux d'eau. Cristalline. Rotation optique spécifique : 19D-82° (dans une solution d'éthanol) ([Wang et al., n.d.](#)).

II.5. Biosynthèse de naringine :

Biosynthèse de la naringine par la voie des phénylpropanoïdes : La voie des phénylpropanoïdes commence par un acide aminé essentiel, qui est un effet associé de la voie du shikimate. La voie des phénylpropanoïdes produit un large éventail de produits finaux, notamment des flavonoïdes, des tanins et des lignines. La représentation de la voie des phénylpropanoïdes est maintenant accordée. Les sept premières étapes enzymatiques catalysées de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ouvrent la voie à la synthèse de la naringine. L'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) convertit la phénylalanine en acide cinnamique dans la première étape. La désamination de la phénylalanine produit de l'acide cinnamique et de l'ammoniaque. La cinnamate 4-hydroxylase (C4H) initie ensuite la conversion de l'acide cinnamique en p-coumarate. L'enzyme 4-coumarate CoA-ligase (4CL) convertit le p-coumarate en p-coumararoyl CoA. L'ensemble de la voie des phénylpropanoïdes conduit à la synthèse du p-coumaroyl CoA. La voie se divise ensuite en flavonoïdes, stilbènes, proanthocyanines, flavonols et anthocyanines. La chalcone synthase (CHS) et la chalcone isomérase (CHI) sont des enzymes qui catalysent la séparation des phénylpropanoïdes dans la biosynthèse des flavonoïdes. En outre, la catalyse de l'uridine

diphosphoglucoseflavanone 7-O-glucotransférase (UF7GT) produit une variété de métabolites (Sharma et al., 2019).

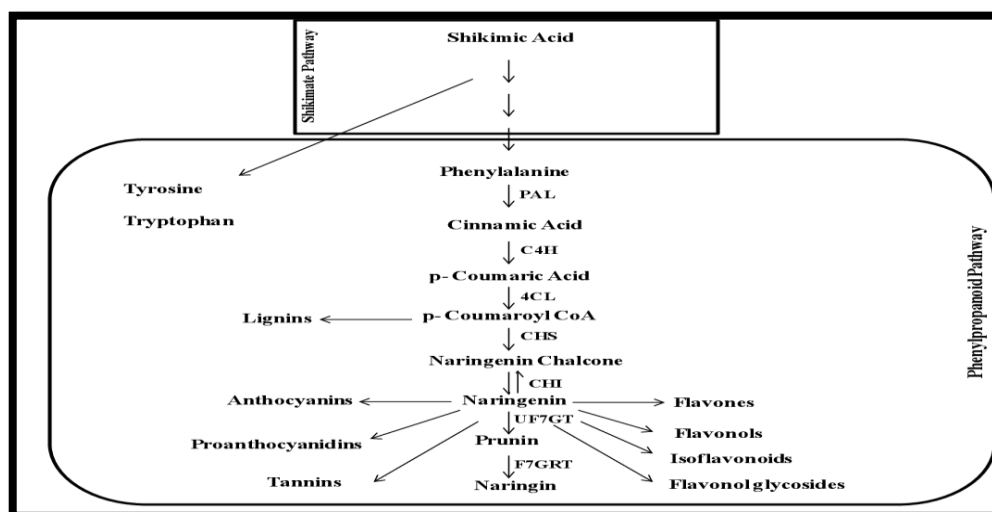


Figure 10: Biosynthèse de naringine

II.6. Pharmacocinétique et toxicité de naringine :

II.6.1. Pharmacocinétique :

➤ Absorption :

La naringine produit plusieurs métabolites dans le sang et l'urine des rats, notamment la naringénine, le glucuronide de naringénine et le sulfate de naringénine. Des enzymes telles que les -rhamnosidases et les -glucosidases catalysent l'hydrolyse de la naringine en naringénine. En outre, par fission du cycle, la naringine est transformée par la microflore intestinale en une variété d'acides phénoliques. Les principaux métabolites de la naringine ont été identifiés comme étant l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide 2,4,6-trihydroxybenzoïque, le phloroglucinol, l'acide 4-hydroxyphénylpropionique et l'acide 4-hydroxyphénylacétique. En outre, lorsque la naringénine est incubée avec des microsomes de foie de rat, trois métabolites sont produits (deux hydroxylates de naringénine et le 5,7-dihydroxychromone). Tsai et Tsai ont démontré que l'absorption de la naringine par le système porte et le système lymphatique était respectivement d'environ 95 et 5 %. La naringine et la naringénine sont détectables dans le plasma environ cinq heures après l'administration orale.

➤ Distribution :

La naringine et ses métabolites étant très lipophiles, ils sont distribués dans presque tous les organes du corps, les concentrations les plus élevées étant observées dans l'estomac et les plus

faibles dans le cerveau en raison de la perméabilité réduite de la barrière hémato-encéphalique. La naringine est concentrée dans le foie et la bile par des processus de transport actif.

➤ **Métabolisme :**

La naringine subit un important métabolisme de phase I et de phase II dans le foie, comme le montre la figure 1. Liu et ses collègues ont identifié un total de 23 métabolites de la naringine après administration orale à des rats (42 mg/kg) et à des chiens (12,4 mg/kg). Ils ont identifié l'acide 4-hydroxyphénylpropionique (37% chez les chiens et 16% chez les rats) comme un métabolite majeur de la naringine.

➤ **Élimination :**

La naringine est éliminée par les reins dans l'urine et par le foie dans la bile en subissant partiellement le clivage bactérien du cycle (de l'anneau C) et ensuite les trois ponts de carbone vers la partie dihydrochalcone. Selon Fuhr et Kummert, l'excrétion urinaire varie entre 5 et 57 % de la consommation totale. Dans les 36 heures suivant l'administration, Liu et ses collègues ont récupéré 60 % de la dose administrée sous forme de métabolites dans l'urine et les fèces des chiens et 21 % chez les rats. Cependant, 48 heures après l'administration, 1 % de la naringine administrée a été récupérée dans l'urine des rats et 8 % chez les chiens sous forme de naringine libre et de naringénine, ce qui est comparable à ce que l'on trouve chez l'homme (environ 5 %). Ishii et ses collègues ont étudié l'élimination de la naringine chez un seul volontaire sain ayant reçu 500 mg de naringine. Ils ont découvert que le pic urinaire de naringine (64 g) était atteint vers 4 heures, celui de naringénine (850 g) vers 24 heures et celui de glucuronides de naringénine (4 mg) vers 10 heure ([Bharti et al., 2014](#)).

II.6.2. Toxicité :

On sait que la naringine n'a pas d'effet toxique significatif lorsqu'elle est administrée à des doses normales, et qu'une dose orale unique de 2 g n'a pas d'effets significatifs chez l'homme.

La toxicité chronique de la naringine a été étudiée chez des rats Sprague-Dawley pendant 6 mois. La naringine a été administrée à des rats à des doses de 50, 250 et 1250 mg/kg par voie orale ; aucun décès ni effet toxique n'a été observé chez les deux sexes. Le traitement à la naringine à des doses de 250 et 1250mg/kg a entraîné une diminution du poids corporel mais aucun changement pathologique. Il a été proposé que la naringine contribue à la régulation du métabolisme des acides gras, du cholestérol et du glucose. La dose sans effet nocif observé (NOAEL) de naringine chez les rats serait supérieure à 1250mg/kg, ce qui équivaut à environ 200mg/kg chez l'homme. Dans l'étude du même groupe sur la toxicité de la naringine, il a été

déterminé qu'une dose orale unique de 16mg/kg de naringine n'avait aucun effet toxique. Chez les porcs et les rats, les doses létales médianes (DL50) ont été estimées à 2000mg/kg ([Bacanli et al., 2018](#)).

II.7. Effets thérapeutiques de naringine :

➤ Actions analgésiques et anti-inflammatoires :

Après l'administration intragastrique de naringine à différentes doses, il a été démontré que les temps de torsion des rats étaient considérablement réduits. L'administration intragastrique de naringine, en commençant par une dose de 120 mg, a permis d'inhiber le degré de gonflement de l'oreille. Après administration intragastrique de naringine, les sécrétions péritonéales ont sensiblement diminué. Après l'administration intragastrique de naringine à des doses croissantes à partir de 60 mg pendant trois jours consécutifs, le gonflement inflammatoire provoqué par l'injection de protéines de griffes de rat a été stoppé, et le mécanisme anti-inflammatoire peut être lié aux effets inhibiteurs. Affecte la façon dont les médiateurs inflammatoires PGE2 sont produits ou libérés ([Wang et al., n.d.](#)).

➤ Anti-apoptose, anti-radiations et prévention du cancer :

On a découvert que la naringine protège contre les lésions hépatiques provoquées par la production de facteur de nécrose tumorale induite par le lipopolysaccharide, ce qui peut être utilisé pour réduire les lésions hépatiques et le risque de carcinogenèse hépatocellulaire [10]. L'effet anticancéreux de la naringine est le résultat global de nombreux processus physiologiques, tels que l'effet des antioxydants et le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et l'induction de l'apoptose. Naringine a notamment permis de prévenir le cancer en induisant l'apoptose dans les cellules tumorales ([Wang et al., n.d.](#)).

➤ Protection précoce du diabète contre les complications :

En empêchant l'apoptose oxydative des cellules B du pancréas et en contrôlant l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des acides gras, du cholestérol et du glucose, naringine accélère la décomposition du sucre dans le foie et abaisse les niveaux de glycogène.

Le rhizome de *Drynaria*, un ingrédient clé de la médecine traditionnelle chinoise, contient de naringine. Des expériences ont démontré que naringine peut supprimer les effets de plusieurs types d'inflammation, y compris l'arthrose. En outre, il a été démontré que naringine favorisait le développement et la prolifération des ostéoblastes tout en inhibant l'activité des ostéoclastes ([Wang et al., n.d.](#)).

➤ **Une activité synergique avec une variété de suppléments :**

Naringine est de plus en plus connue en raison de ses interactions bénéfiques avec de nombreux suppléments et médicaments potentiels. Après supplémentation, elle améliore l'absorption des nutriments ([Shakyawal et al., 2022](#)).

➤ **Régénération osseuse efficace :**

Les effets des formulations de naringine à libération contrôlée sur la régénération osseuse et la cicatrisation osseuse potentielle ont été démontrés ([Chen et al., 2013](#)).

II.8. Bio applications de naringine :

- Naringine de pépins de pamplemousse : l'extrait de pépins de pamplemousse est antibactérien, antiviral et antifongique. Il est utilisé comme traitement de premier secours, nettoyant pour le visage, douche vaginale, remède contre les irritations de la peau, gargarisme contre les maux de gorge, rinçage des oreilles ou du nez pour traiter les infections, rinçage dentaire et rafraîchisseur d'haleine. Sa vapeur peut être inhalée pour traiter les infections pulmonaires. En agriculture, il est utilisé pour tuer les champignons, les bactéries et les parasites dans les aliments pour animaux, pour lutter contre la formation de moisissures, pour désinfecter l'eau et pour conserver les aliments ([Shakyawal et al., 2022](#)).

- La naringine est un médicament antidiabétique qui est également utilisé pour traiter l'herpès, l'insuffisance cardiaque, l'alcoolisme et l'insuffisance veineuse chronique.

- La naringine est largement utilisée dans l'industrie de la nutrition pour augmenter l'absorption de suppléments tels que la caféine. Elle améliore le métabolisme de l'éthanol et réduit les effets négatifs de la consommation d'éthanol ; c'est un antioxydant et un piègeur de radicaux libres ; et elle réduit de manière significative l'oxydation des LDL. Elle possède des propriétés antifongiques, réduit la cytotoxicité et agit comme un agent anti-apoptotique.

- La naringine inhibe la dégradation endogène des protéines autophagiques-lysosomales induite par l'acide okadaïque, ainsi que l'absorption et la dégradation des glycoprotéines médiées par les récepteurs.

- La naringine peut être utilisée pour prévenir l'hyperphosphorylation pathologique, les effets secondaires des médicaments chimiothérapeutiques et les toxines environnementales.

- La naringine (25 mg) améliore la biodisponibilité des nutriments et des médicaments ([Shakyawal et al., 2022](#)).

Chapitre III :

***Contexte théorique des
différentes techniques
expérimentales utilisée***

Notre étude vise à évaluer l'activité biologiques (antidiabétique, antiinflammatoire, anticancer et antibactérien) de la naringine *in vitro*. Cette activité peut être étudiée à l'aide de différentes techniques analytiques, dont la plus courante est la spectroscopie UV-Visible. Ainsi, l'étude *in silico* des différents paramètres physicochimiques, par exemple : Drug-likeness et de pharmacocinétique par l'outil bio-informatique SwissADME et aussi de l'interaction entre le naringine via Docking (L'amarrage moléculaire) qui permet de confirmer théoriquement nos résultats expérimentaux.

I. Spectroscopie d'absorption dans le domaine UV-Visible :

Les domaines de longueurs d'onde considérés ici sont, pour la radiation ultraviolette (UV), Compris entre 190 et 400 nm et entre 400 et 900 nm pour la radiation du domaine visible. (Biemont, É., 2008 et Gratien, E., 2008).

I.1. Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible :

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm⁻¹ soit 160 à 665 KJ.mol⁻¹). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules (Baudouin, A., 2012).

I.2. Loi de Beer-Lambert :

L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est proportionnelle à la longueur du trajet d'absorption (ℓ) et à la concentration de l'espèce dans le milieu (C). On exprime généralement, la concentration en mol L⁻¹ et la longueur en cm on a donc la relation :

$$A_{\lambda} = \epsilon \cdot \ell \cdot C$$

Avec ϵ : coefficient d'absorption (ou d'extinction) molaire du composé à une longueur d'onde définie. L'unité du coefficient d'adsorption molaire est : Lmol⁻¹ cm⁻¹, C'est une grandeur qui dépend de l'espèce chimique considérée, de la longueur d'onde d'analyse, du solvant et de la température (Mesplede, J., Randon J. 2004 et Boutiti A., 2010).

II. L'amarrage moléculaire :

La première problématique de la biologie structurale est le repliement des macromolécules dans une structure tridimensionnelle biologiquement active. La compréhension de la communication moléculaire pour échanger des informations, s'activer ou s'inhiber est la seconde problématique, enjeu majeur de la biologie intégrée (Brut, 2009). L'amarrage moléculaire (ou le docking moléculaire) est l'un des outils qui confère à résolu ces problèmes.

II.1. Principe :

Le Docking est utilisé pour prédire la structure du complexe intermoléculaire résultant de L'association entre au moins deux molécules. Il permet aussi de connaître la façon dont un ligand (petite molécule) interagisse avec un récepteur (macromolécule) et de calculer l'énergie de liaison entre eux. Il permet aussi de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec un récepteur cible (Asses, 2011 ; Lanez, 2016).

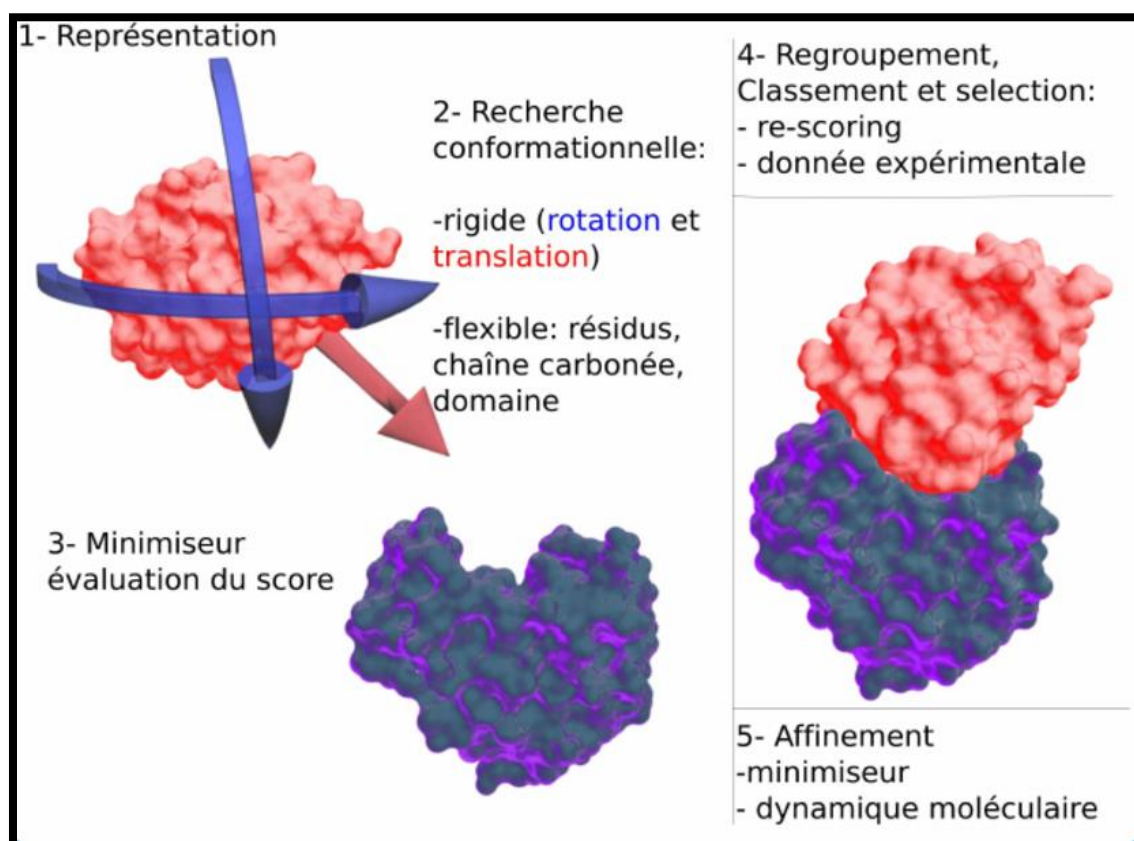


Figure 11: Schéma du protocole générale de docking

II.2. Les étapes de Docking :

Le processus du Docking est itératif et chaque passe de calcul s'articule en deux étapes :

II.2.1. Amarrage moléculaire avec l'AutoDock Tools :

Est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la molécule et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. Les logiciels de Docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique (EL Hadj, 2016 ; Lanez, 2016).

II.2.2. Modélisation du potentiel énergétique :

Pour calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, Autodock Tools utilise les termes d'un champ de force traditionnel auxquels sont ajoutés deux termes liés à l'entropie. L'énergie est donnée par l'Équation suivante :

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol} \text{ (Garrett, M. M et al., 1998)}$$

ΔG_{vdw} : énergie de dispersion / répulsion des atomes,

ΔG_{hbond} : énergie des liaisons d'hydrogène,

ΔG_{elec} : énergie des interactions électrostatiques,

$\Delta G_{conform}$: énergie de déviations à partir de géométrie covalente

ΔG_{tor} : est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction des rotors libres du ligand et à la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation au récepteur,

ΔG_{sol} : est un autre terme lié à l'entropie qui décrit les variations d'énergie du système lors de la désolvatation du ligand au moment de la complexation au récepteur (Lanez E., 2016).

Le passage par une relation empirique de type QSAR est nécessaire pour relier la structure des complexes et l'énergie libre de liaison. Le modèle empirique utilisé dans AUTODOCK est une régression linéaire multiple des différents termes de l'équation d'énergie libre. Chaque terme est ainsi pondéré par un coefficient dérivé d'un jeu étendu de complexes récepteur-inhibiteur pour lesquels la constante d'inhibition K_i est connue. La relation entre la constante d'inhibition et l'énergie libre de liaison est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G = RT \ln K_i$$

Où **R** : constante des gaz parfaits (1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹) ; **T** : température absolue (298.15 K) (Garrett, M. Met al., 1998).

III. SwissADME:

Les modèles bio informatiques constituent des alternatives valables aux expériences. Ici, nous présentons le nouvel outil web SwissADME qui donne un accès gratuit à un pool de modèles prédictifs rapides mais robustes pour les propriétés physico-chimiques, la pharmacocinétique (ADME), la ressemblance avec les médicaments et la convivialité de la chimie médicinale. Une saisie et une interprétation simple et efficace sont assurées grâce à une interface conviviale via le site Web (<http://www.swissadme.ch>). Spécialistes, mais aussi un non-expert en chiminformatique ou en chimie computationnelle peut prédire rapidement des paramètres clés pour une collection de molécules pour soutenir leurs efforts de découverte de médicaments (Daina et al., 2017).

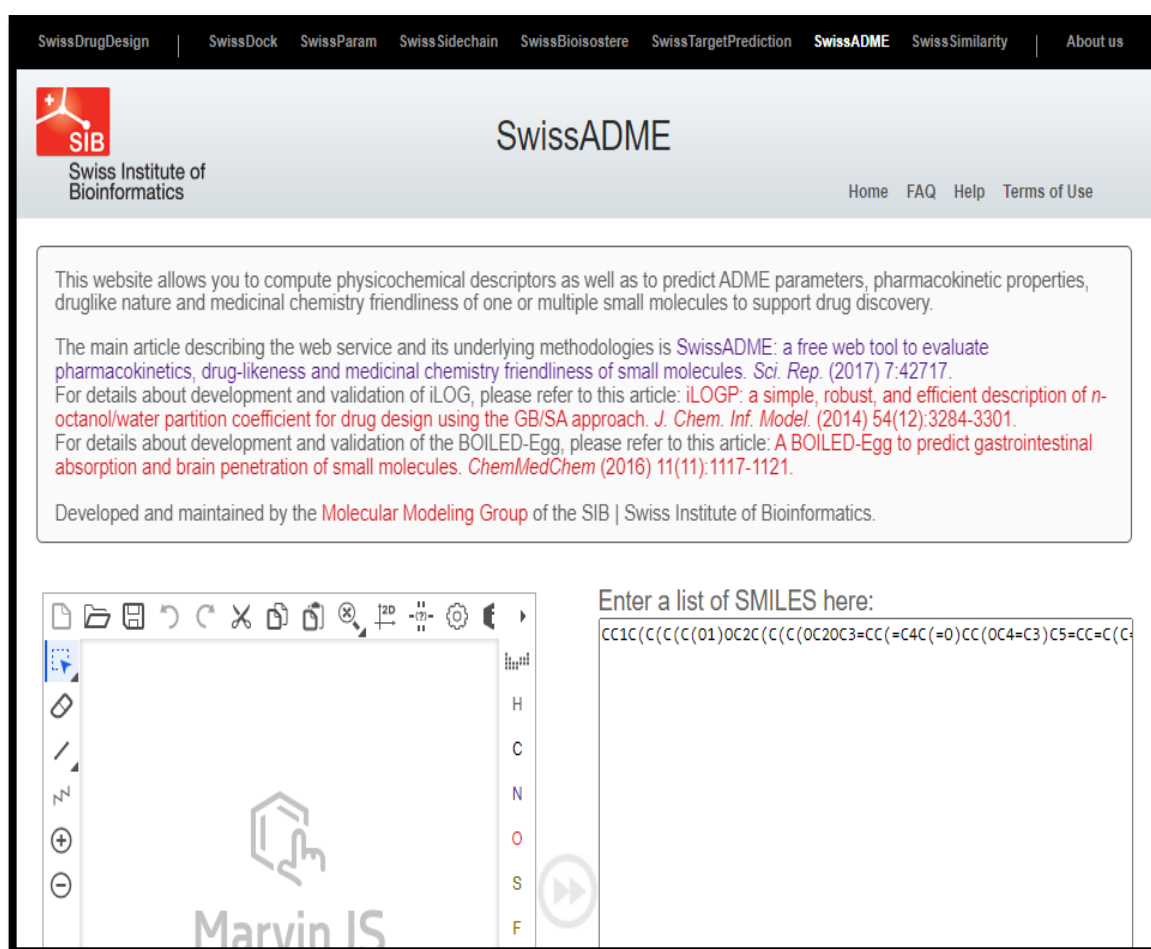


Figure 12: Page d'accueil du serveur SwissADME

IV. Prottox :

ProTox-II fournit un serveur Web gratuit pour la prévision de la toxicité in silico pour les toxicologues, les organismes de réglementation, les chimistes computationnels et médicaux, et tous les utilisateurs sans connexion à (http://tox.charite.de/prottox_II). Le serveur Web prend structure chimique deux-dimensionnelle en tant qu'intrant et indique le profil de toxicité possible du produit chimique pour 33 modèles avec des scores de confiance, et un tableau radar de toxicité globale avec trois composés les plus semblables ayant une toxicité aiguë connue (P.Banerjee et al.,2018).

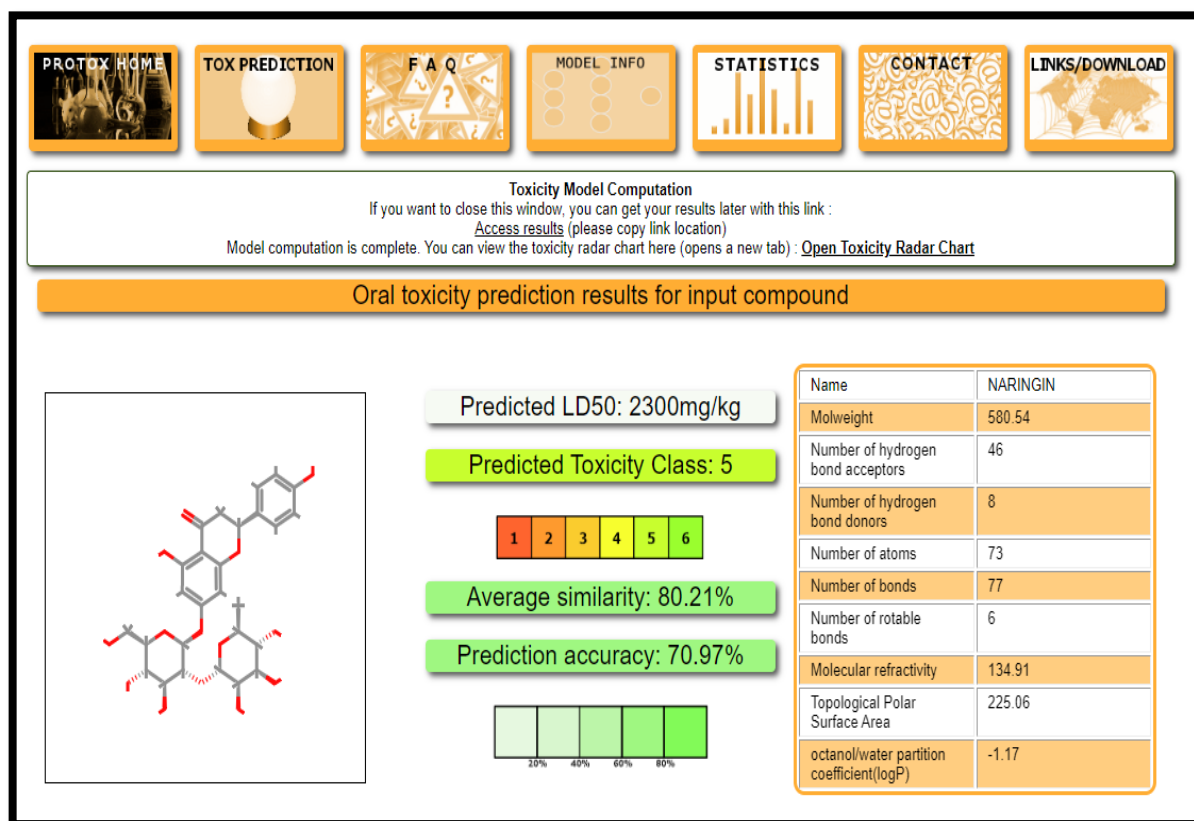


Figure 13: Page d'accueil du serveur Prottox

Références bibliographiques :

- Alioua, R., & Bouamoucha, I. (n.d.).** Thème Etude de l ' activité antibactérienne de l ' extrait méthanolique du fruit de Zaarour rouge (*Crataegus monogyna*) vis-à-vis des bactéries résistantes aux antibiotiques Membres.
- Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., & Sarker, S. D. (2014).** Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their. 404–417. <https://doi.org/10.3945/an.113.005603.404>.
- Aslam, M. S., Naveed, S., Ahmed, A., Abbas, Z., Gull, I., & Athar, M. A. (2014).** Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 05(08), 817–822. <https://doi.org/10.4236/jct.2014.58089>.
- Asses, Y. (2011).** Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c-Met. Thèse de doctorat. - Université Henri Poincaré – Nancy I.
- Aswini K, Mangesh K, Kailash V, Pratibha C. & Mahavir G. (2012).** Pharmacognostic investigation on leaves of *Citrus maxima* (Burm). Merr. (Rutaceae) *CIB Tech Journal of Pharmaceutical sciences*.
- ASSILA, I., CHOUGUI, L., & ROUAA, M. A. (2022).** Évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des plantes *Paronychia argentea* et *Urtica dioica* L.10,11,12–45.
- Barnes. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Journal of Biogeography*,17(3), 315.<https://www.jstor.org/stable/2845127?origin=crossref>.
- Baudouin, A. (2012).** La spectroscopie., l'université Lyon1., rapport de Formation pour Professeurs du 2nd degré, CEPEC, Craonne.
- Bacanli, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2018).** The major flavonoid of grapefruit: Naringin. Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease, 37–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813008-7.00004-7>.
- BaronJ, Gomez G, (2016).** Heterosides, <http://sciences physiques. Acmontpellier. Fr/ ABCDORGA/Famille4/HETEROSIDES.htm#DeuxDeux> ; consulte le 6 mai 2016.
- Benavente G. O. & Castillo J. (2008).** Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric Food Chem*.56 :185-205p.
- Bharti, S., Rani, N., Krishnamurthy, B., & Arya, D. S. (2014).** Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: A review. *Planta Medica*, 80(6), 437–451. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368351>.
- Biemont, É. (2008).** Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale,

- Edition De Boeck Supérieur, Paris, 428p.
- Blough, B., Moreland, A., & Mora, A. (2015).** Metformin-Induced Lactic Acidosis with Emphasis on the Anion Gap. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 28(1), 31–33. <https://doi.org/10.1080/08998280.2015.11929178>.
- Blaisot Cécile (2016).** Le marché des extraits de pépins de pamplemousse. Comparatif des produits existants et conseil à l'officine., Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Rouen, 176pp.
- Boutiti, A. (2010).** Étude phytochimique de l'espèce globularia alypum L., grade de magister., Université Mentouri Constantine., p41.
- Bochaton C, Rochegude S, R. R. (2004).** Gentamicine. 2004.
- Bousquet, J., Holgate, S. T., & Zuberbier, T. (2010).** Risk of first-generation H1-antihistamines: A GA2LEN position paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65(4), 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02325.x>.
- Bouanini, M. (2019).** Synthèse, séparation chirale et évaluation biologique des dérivés iminonaringine et iminonaringénine. Université Kasdi Merbah-OUARGLA-, 12–13.
- Brut, M. (2009).** Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier. P90.
- Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. 4^{ème} ed, Paris. France. 1288 p.
- Bruneton J. (2016).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales - 5^{ème} Ed. Tec & Doc / Lavoisier.
- Church, M. K., Maurer, M., Simons, F. E. R., Bindslev-Jensen, C., Van Cauwenberge, P., Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Cheick, T.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako (2006) : 72p.
- Chabosseau, S et Derbré, S. (2015).** Cancer du sein : recommandations sur l'usage de la phytothérapie. Elsevier Masson SAS. 45-49 p.
- Chen, K. Y., Lin, K. C., Chen, Y. S., & Yao, C. H. (2013).** A novel porous gelatin composite containing naringin for bone repair. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(January). <https://doi.org/10.1155/2013/283941>.
- Cordonnier, C. (2015).** Extrait de pépins de pamplemousse : on l'utilise comment ? Top Santé.

- Daina A., Michielin O., Zoete V. (2017).** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific reports, 7, 42717.
- Dupont F. et Guignard J.-L. (2015).** Abrégés de pharmacie : Botanique, Les familles de plantes - 16ème Ed. Elsevier Masson - p. 243-246.
- EL Hadj, S. K. (2016).** Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de master. Université de telemcen. P19-20.
- Faiza, K., & Souad, K. (2020).** Qantification des composés phénoliques totaux des extraits de l'écorce de Citrus x paradisi par deux méthodes comparatives : Micro-ondes et bain Marie. Université A. MIRA – Béjaia Faculté.
- Fadhila, A. D., & Chaouchi, A. (2021).** En : Sciences de la nature et de la vie Spécialité : Microbiologie appliquée Par, THEME Etude Microbiologique et la conservation de la qualité agro-alimentaire de quelques variétés d ' agrumes cultivés en Algérie (Orange). P 09.
- Fain, O.** Carences en vitamine C Vitamin C deficiency. La revue de médecine interne 25 (2004) 872–880.
- Fujioka K. & Greenway F. (2006).** The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome. J. Med Food. 9 :49-54p.
- Garrett, M. M., David, S.G, Robert, S. H., Ruth, H., William, E. H., Richard, K. B., Arthur, J. O. (1998).** Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, Journal of Computational Chemistry, Vol. 19, No. 14, 1639-1662.
- Gratien, E. (2008).** Spectroscopie ultraviolette_visible et infrarouge des molécules clés atmosphérique., Thèse du doctorat., université du Paris 12_Val de Marne,27p.
- Gorinstein S, Caspi A. & al. (2004).** Preventive effects of diets supplemented with sweetie fruits in hypercholesterolemic patients suffering from coronary artery disease. Prev Med. 38:841p.
- Hodgson R.W. (1967).** Horticultural varieties of citrus: University of California, Division of Agricultural Sciences. 22: 431-591p.
- IFUKU, Shin HASEGAWA, (1991).** Limonoidglucosides in citrus seeds, Agricutural and Biological Chemistry, 137-141 p.
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A. L., Tsapas, A., Wender, R., & Matthews, D. R. (2015).** Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a position

- statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes Care*, 38(1), 140–149. <https://doi.org/10.2337/dc14-2441>.
- Jegham, H. (2009).** Étude de l'activité Biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux. Mémoire.
- Jung U. J, Lee M. K. & al. (2004).** The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes. *134*: 2499-503p.
- KAROUI, A., CHERIET, S., MEISSA, A., & GHEZAL, C. (2022).** Evaluation de la quantité de la nicotine et étude des activités biologiques de trois formes de tabac : tabac commercial et tabac traditionnel et *Nicotiana tabacum*. 35–37.
- KRAZA, L. (2021).** Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale *Globularia alypum* L. dans la région de Laghouat. 30–35, 65–72.
- Lanez, E. (2016).** Etude in silico et in vitro de l'interaction de quelques amides ferrocéniques avec l'ADN. Mémoire de master. Université Mohamed Khider – Biskra.
- Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2005).** Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205(2), 275–292. <https://doi.org/10.1002/path.1706>.
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011).** Mechanism of Disease the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205–2219.
- MERABET, S. A., & SEKHSOUKH, M. N. (2020).** Synthèse et évaluation in vitro du potentiel antioxydant et antimicrobien d'une série de composés 1,5 Benzodiazépines. 32–37.
- Mesplede, J., Randon, J. (2004).** 100 manipulations de chimie générale et analytique. Editions Bréal p249.
- Morton, J. (1987).** Grapefruit. In: *Fruits of warm climates*. (Eds), Julia F. Morton, Miami, pp, 152–158.
- Morton, J.F. (1987).** *Fruits of warm climates*. Ed Echo point Books & Media. 152–158 p.
- Neumiller, J. J. (2011).** Clinical pharmacology of incretin therapies for type 2 diabetes mellitus: Implications for treatment. *Clinical Therapeutics*, 33(5), 528–576. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2011.04.024>.
- Priyanka Banerjee, Andreas O Eckert, Anna K Schrey and Robert Preissner.** ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2; 46(Web Server issue): W257–W263. (Doi: 10.1093/nar/gky318).
- Promoting the Quality of Medicines. (2017).** Product Information Report: Amoxicillin. 2017. U.S. Pharmacopeial Convention.

- Shakyawal, S., Rai, G., & Mahobiya, P. (2022).** Retaliating Properties of Naringin: A Mini-Review. 2. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2022.17.002381>.
- Sharma, P., Kumar, V., & Guleria, P. (2019).** Naringin: Biosynthesis and Pharmaceutical Applications. 81(May), 988–999.
- Seidenberg, B. C. (1999).** COX-2 inhibitors [20]. *Lancet*, 353(9168), 1978. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)77198-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)77198-1).
- Szczeklik, A., Nizankowska, E., & Duplaga, M. (2000).** Natural history of aspirin-induced asthma. *European Respiratory Journal*, 16(3), 432–436. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.016003432.x>
- Spiegel R. P. & Goldschmidt E. E. (1996).** *Biology of Citrus*. 1ère édition; Edition Cambridge University Press. 239p.
- Srinivasan, S., Vinothkumar, V., & Murali, R. (2019).** Antidiabetic Efficacy of Citrus Fruits with Special Allusion to Flavone Glycosides. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00022-9>.
- Tonelli N. et Gallouin F. (2013).** *Des fruits et des graines comestibles du monde entier* - Ed. Lavoisier.
- Toribio, R. E. (2011).** Insulin resistance. *Clinical Veterinary Advisor: The Horse*, 14(3), 303–304.
- USDA, (2001).** Full Report (All Nutrients): 09113, Grapefruit, raw, pink and red, California and Arizona, <https://ndb.nal.usda.gov/ndb>.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S.** The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Department of Pharmaceutical Science, University of Ferrara, Ferrara, Italy. Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 1677-1694.
- Wang L. & Yu J. (2005).** Antioxidant activity of Citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J. Agric. Food Chem.* 53(6): 2009p.
- Wang, Y., Li, W., & Du, G. (n.d.).** Naringin. 595–600.
- Yssaad, H., et Medaouar, Z. (2018).** Caractérisation morphologique de colletotrichum gleosporioides et colletotrichum sp., responsables de l’anthracnose des agrumes à Mostaganem et spécialisation parasitaire du pathogène. , Spécialité protection des cultures, Mémoire en agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- Zhang J, (2007).** Flavonoids in Grapefruit and Commercial Grapefruit Juices: Concentration, Distribution, and Potential Health Benefits. 120, 288-294p.
- Z. Zou, Wanpeng Xi, Yan Hu, Chao Nie, Zhiqin Zhou, (2016).** Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry* 196, p 885–896.

Partie II :

Expérimentale

Partie

Expérimentale



Chapitre 1 :

Matériels et Méthodes



Notre étude a été menée au laboratoire de recherche sur la valorisation et la technologie des ressources sahariennes (VTRS) de l'Université d'Echahid Hamma Lakhdar à Eloued.

I. Matériels :

I.1. Réactifs utilisés :

- **Alpha Amylase :**

Une solution d'alpha-amylase (commercialisée sous le nom de Megamylase avec une activité spécifique de 3000 (U. CEIP/cp) à une concentration de 0.5 mg/ml) a été préparée dans un tampon phosphate salin (pH = 6.9).

- **Sérum bovin albumine (BSA) :**

Une solution de BSA, obtenue depuis le laboratoire pédagogique de la faculté de biologie, a été utilisée telle quelle sans purification pour obtenir une concentration de 250 mg/50 ml dans une solution tampon phosphate saline (pH = 6.33).

- **Diclofénac :**

Le diclofénac, commercialisé sous le nom de Voltarène 50 mg, est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) utilisé comme contrôle positif, ou "molécule de référence", dans cette expérience. Il a été utilisé à une concentration de 10 mg/ml dans une solution tampon phosphate saline (pH = 6.33).

- **Acarbose :**

Différentes concentrations de solution d'acarbose (commercialisée sous le nom d'Acorbay 50 mg) ont été préparées dans un tampon phosphate salin (pH = 6.9).

- **Amoxicilline :**

L'amoxicilline, obtenue depuis l'hôpital de Ben Omar Djilani, a été utilisée telle quelle sans purification.

- **Substrat :**

En tant que substrat, nous avons utilisé de l'amidon soluble. 250 mg d'amidon ont été dissous dans 25 ml d'eau distillée à une température de 50 à 70°C sous agitation.

- **Réactif chromogène 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :**

Dans un erlenmeyer, 1 g de DNSA a été dispersé dans 40 ml d'eau distillée, ce qui a produit une solution jaune opaque. Simultanément, une solution de NaOH (2N) a été préparée en dissolvant 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sous agitation dans 20 ml d'eau

distillée. Après avoir mélangé les deux solutions, le réactif est devenu limpide et a pris une couleur orange. Le volume final a été ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu a été stocké à +4°C, à l'abri de la lumière (Rajbhar, Dawda, and Mukundan 2015).

- **Solution Tampon phosphate :**

La solution tampon a été préparée en utilisant un mélange de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et d'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4), dans le but d'obtenir un pH de 7.2.

- **Réactifs d'extraction d'ADN :**

Le sang : Le sang de poulet a été collecté et conservé directement sur de la glace pour l'extraction de l'ADN.

Solution tampon de lyse des globules rouges (TLR) : a été préparé par mélange : EDTA (0.1mM), NaHCO_3 (12mM), NH_4Cl (155mM) dans l'eau distillé.

Solution tampon de lyse des globules blanc (TLB) : a été préparé par mélange : NaCl (50mM), EDTA (100mM), Tris (10mM) à pH=7.42.

Solution SDS (20%) : a été préparé par mélange de 2mg de sulfate de dodécyle de sodium dans un 10ml d'eau distillé.

NaCl saturé : a été préparé par mélange de 7g de chlorure de sodium dans un 10 ml d'eau distillé.

- **Microorganismes utilisés :**

Tous les microorganismes utilisés dans ces études ont été fournis par le laboratoire pédagogique de la faculté de biologie.

Escherichia coli (ATCC 25922) : appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Il est non sporulé, de type anaérobie facultatif et généralement mobile grâce à des flagelles. Sa longueur varie de 2 à 6 μm et sa largeur de 1.1 à 1.5 μm (Sauer and Moraru 2009).

Staphylococcus (ATCC 25923) : est une bactérie à Gram positif de forme sphérique de 0.5 à 1.5 μm de diamètre appartenant au genre Staphylococcus (Treangen et al. 2014).

I.2. Matériels de laboratoire :

Tableau 6: Matériels de laboratoire

✓ Plaque chauffante	✓ Auto clave	✓ Vortex
✓ Balance électrique	✓ Bain marie	✓ PH-mètre
✓ Bain de glace	✓ Bec benzène	✓ Pipettes pasteur

✓ Boîte de pétrie	✓ Centrifugeuse	✓ Portoir pour tubes spéciaux
✓ Etuve	✓ Micropipettes ajustables	✓ Papier filtre

I.3. Produits chimiques :

Tableau 7: Produits chimiques

✓ Acide éthylène Diamine Tétracétique (EDTA)	✓ Acide hydrochlorique (HCl)
✓ Carbonate de sodium (NaHCO_3)	✓ Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)
✓ Chlorure de sodium (NaCl)	✓ Chlorure de potassium (KCl)
✓ Chloroforme (CHCl_3)	✓ Dichlorométhane (CH_2Cl_2)
✓ Diméthylsulfoxyde ($\text{SO}(\text{CH}_3)_2$)	✓ Eau distillée (H_2O)
✓ Ethanol (EtOH)	✓ Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)
✓ Méthanol (MeOH)	✓ Sulfate de dodécyle de sodium (SDS)
✓ Phosphate dipotassique (K_2HPO_4)	✓ Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)
✓ D'eau physiologique stérile (NaCl) 0.9%	✓ Tris(hydroxyméthyl)aminométhane $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

II. Méthodes :

II.1. Extraction de Naringine :

Le protocole d'extraction de la naringine à partir de la peau de pamplemousse est généralement effectué en plusieurs étapes, tel que décrit dans la référence utilisée pour cette expérience ([Sudto, Pornpakakul, and Wanichwecharungruang 2009](#)).

- a. Épluchage :** 4 kg de pamplemousse (Cet échantillon étudié provient de BLIDA) bien lavé ont été épluchés à l'aide d'un couteau aiguisé [Figure 14](#).



Figure 14 : Pamplemousse

- b. Séchage :** Les croûtes ont été séchées à la lumière du soleil pendant 5 jours. Ensuite, la moitié des croûtes ont été séchées dans un four de séchage à 40°C pendant 2 jours [Figure 15](#). Le poids des croûtes séchées était de 117.9615 g.



Figure 15 : Les croûtes de pamplemousse pendant le séchage

- c. Broyage :** Les croûtes séchées ont été broyées pour obtenir une poudre [Figure 16](#).



Figure 16 : Poudre de croûtes sec

- d. Extraction :** 20 g de la poudre ont été mélangés avec 200 ml de méthanol et laissés pendant 3 jours. La bouillie obtenue a été filtrée et l'extract méthanique obtenu a été séché avec un évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°C pour évaporer le méthanol [Figure 17](#).



Figure 17 : Montage d'évaporation à pression réduite

- e. Dissolution :** Soixante millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à l'extrait méthanoïque, puis le mélange a été agité à bain-marie (Figure 18) à une température de 70°C pendant une durée de 30 minutes.



Figure 18 : Montage de chauffage

- f. Cristallisation :** Le mélange a été transféré dans une ampoule à décanté (Figure 19) et 10 ml de solution dichlorométhane ont été ajoutés. Le mélange a été enveloppé avec du papier aluminium pour éviter la lumière et laissé pendant 3 à 4 jours à 25°C pour permettre la cristallisation du naringine dans la couche aqueuse.



Figure 19 : Montage de cristallisation

g. Récupération : Les cristaux de naringine ont été recueillis par filtration sur papier filtre et lavés avec de l'eau distillée 3 fois, puis séchés dans une étuve. Cette opération a été répétée 3 fois afin de collecter le maximum de rendement.

II.2. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction est une mesure de l'efficacité d'une méthode d'extraction d'un composé donné à partir d'une matrice complexe. Il est calculé en comparant la quantité de composé obtenue après extraction à la quantité initiale présente dans l'échantillon ([Kawashima et al. 2010](#)). Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage et est souvent utilisé pour évaluer l'efficacité d'une méthode d'extraction et pour optimiser les conditions d'extraction ([Ngamwonglumlert, Devahastin, and Chiewchan 2017](#)).

L'équation générale pour le calcul du rendement d'extraction est la suivante ([Giannuzzo et al. 2003](#)):

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = (\text{Masse de Naringine} / \text{Masse initiale de plante}) \times 100$$

Où la masse de Naringine est la quantité de composé que nous avons réussi à extraire après la procédure d'extraction, et la masse initiale de plante est la quantité de plante à partir de laquelle l'extraction a été réalisée.

Le rendement d'extraction moyen pour le naringine était de 3,5% (poids sec). Ces résultats indiquent que la méthode d'extraction par solvant a été efficace pour extraire le naringine du pamplemousse.

II.3. Caractérisation du Naringine :

La caractérisation de naringine est le processus de détermination de la structure et des propriétés physiques et chimiques de ce composé. Cela implique l'utilisation de diverses techniques d'analyse pour identifier les différents groupes fonctionnels, les liaisons, les isomères et les stéréoisomères présents dans la molécule ([Chang and Guo 1992](#); [Decesari et al. 2000](#); [Simoneit 1986](#)).

Les informations recueillies lors de la caractérisation d'un composé organique permettent de déterminer sa composition, sa pureté, sa stabilité, ses propriétés physiques et chimiques, sa réactivité, ainsi que son potentiel d'application en biologie, en médecine, en pharmacologie, en chimie, en cosmétique, en alimentation, en agriculture, etc ([Rissanen et al. 2006](#); [H. Wang et al. 2013](#); [Wild 2003](#)).

II.3.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de caractérisation et séparation analytique qui permet de séparer et d'identifier différents composants d'un mélange en utilisant une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide ([Spangenberg, Poole, and Weins 2011](#)).

La chromatographie sur couche mince est une technique rapide et économique qui permet de séparer et d'identifier efficacement différents composants d'un mélange. C'est une méthode courante en chimie analytique pour la caractérisation de composés organiques et elle est utilisée dans de nombreux domaines de recherche, notamment la chimie, la biochimie et la pharmacologie ([Sherma 2000](#)).

✓ Appareillage :

Pour caractériser le naringine par CCM, nous utilisons une plaque de silice gel comme phase stationnaire. Cette plaque est recouverte d'une fine couche de gel de silice, qui est activée en la chauffant à une température élevée. L'éthanol absolu est utilisé comme une phase mobile.

✓ Procédure:

La procédure de chromatographie sur couche mince pour caractériser le naringine est la suivante :

1. Préparer la plaque de silice gel en coupant la taille souhaitée pour l'expérience et en la marquant sur un côté avec un crayon graphite.
2. Préparer la solution de naringine à tester en la diluant dans l'éthanol et en l'appliquant sur la plaque à l'aide d'une pipette.

3. Laisser sécher la plaque jusqu'à ce que la solution soit complètement absorbée et que la plaque soit sèche.
4. Placer la plaque dans une cuve contenant l'éthanol de manière à ce que la plaque soit immergée de quelques millimètres dans le solvant.
5. Laisser la plaque dans la cuve jusqu'à ce que le solvant ait migré sur toute la hauteur de la plaque.
6. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher.
7. Révéler les composants de l'échantillon en utilisant un l'iode solide, qui fera apparaître des taches colorées sur la plaque.
8. Identifier le composant d'intérêt en comparant la position de la tâche à celle des taches de référence de composés purs.

II.3.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ou chromatographie liquide haute performance, est une technique de séparation des composants d'un mélange à travers une colonne de chromatographie remplie de particules stationnaires, où les composants sont séparés en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire et mobile ([Žuvela et al. 2019](#)).

✓ Appareillage:

Le modèle de chromatographie liquide Shimadzu Prominence a été utilisé pour réaliser la caractérisation du naringine. L'expérience a été conduite à l'aide d'un compartiment de colonne thermostable, d'un dégazeur en ligne et d'un détecteur UV SPD-20A. Une colonne analytique Shim-pack VP-ODS C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm, fournie par Shimadzu Co., Japon).

✓ Procédure:

La procédure de caractérisation du naringine par HPLC commence par la préparation d'un échantillon en solution acétonitrile/méthanol à une concentration connue. Cette solution est ensuite injectée dans la colonne de chromatographie à l'aide d'une pompe à haute pression, qui pousse la solution à travers la colonne. Les composants du mélange se séparent alors en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire et mobile. Le détecteur spectrophotomètre mesure l'absorption des composants individuels au fur et à mesure qu'ils traversent la colonne. Les données sont ensuite enregistrées par le système informatique pour analyse ultérieure.

II.3.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

La caractérisation par infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui utilise la spectroscopie infrarouge pour déterminer la présence de liaisons chimiques dans les molécules ([López-](#)

[Lorente and Mizaikoff 2016](#)). Le principe de cette technique est basé sur l'absorption de la lumière infrarouge par les liaisons chimiques des molécules. Chaque type de liaison chimique absorbe une fréquence d'onde spécifique, ce qui permet d'identifier les différentes liaisons présentes dans la molécule ([Boskey and Mendelsohn 2005](#)).

✓ **Appareillage:**

L'analyse par IR, a été réalisée sur un spectrophotomètre infrarouge modèle SHIMADZU. L'échantillon est préparé sous forme de pastille KBr (bromure de potassium) qui est un matériau transparent aux infrarouges.

✓ **Procédure:**

L'échantillon est placé dans le spectrophotomètre et une source de rayonnement infrarouge est dirigée sur l'échantillon. La lumière infrarouge qui traverse l'échantillon est ensuite détectée par un détecteur, et la quantité de lumière absorbée à chaque fréquence est mesurée.

II.3.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

La caractérisation par UV (ou spectrophotométrie UV-Visible) est une technique utilisée pour étudier les propriétés d'absorption de la lumière des composés organiques ([Jablonský et al. 2015](#)). Elle permet de mesurer la quantité de lumière absorbée par une solution en fonction de la longueur d'onde ([Begum et al. 2018](#)).

✓ **Appareillage:**

Les mesures UV-Vis ont été effectuées en utilisant un spectromètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et une cellule de quartz ayant une capacité volumétrique de 3 ml. L'acquisition de données a été accompli avec un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel UV probe version 2.34 (Shimadzu). Les données sont traitées en utilisant le logiciel OriginLab.

✓ **Procédure:**

Pour la caractérisation du naringine par UV, on prépare une solution de méthanol à une concentration connue du naringine, puis on la place dans la cuve du spectrophotomètre. On sélectionne ensuite le domaine de balayage de la longueur d'onde (de 900 à 200 nm) et on mesure l'intensité de la lumière transmise par la solution.

II.3.5. Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

La caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique puissante pour l'identification et la caractérisation de composés organiques, et elle est largement utilisée

dans la recherche en chimie organique, la biochimie, la pharmacologie et d'autres domaines connexes (Albert and Bayer 1991; Wishart 2013).

✓ **Appareillage:**

L'appareil utilisé pour la caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est un spectromètre RMN disponible au niveau de Centre de Recherche et Analyse Physico-Chimique (CRAPC), Ouargle. Cet instrument utilise un champ magnétique pour analyser les propriétés de résonance magnétique de noyaux atomiques, tels que les protons (^1H) et les carbones (^{13}C).

✓ **Procédure:**

La procédure de caractérisation par RMN implique la dissolution de l'échantillon dans un solvant de le deutérodiméthylsulfoxyde (DMSO- d_6), pour former une solution claire. Cette solution est ensuite placée dans un tube de RMN et insérée dans le spectromètre RMN.

L'échantillon est soumis à des ondes radiofréquences dans un champ magnétique, qui provoquent une absorption d'énergie et une émission de signaux RMN. Ces signaux sont ensuite enregistrés par l'instrument et analysés pour ensuite déterminer les propriétés moléculaires de l'échantillon.

II.4. Méthodes d'évaluation *In Vitro* des activités biologiques :

Toutes les expériences *in vitro* ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et d'une cellule de voltamétrie en quartz ayant une capacité volumétrique de 3 mL. Les données ont été acquises à l'aide d'un microordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) utilisant le logiciel UV Probe version 2.34 (Shimadzu). Les graphiques ont été tracés et les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel OriginLab version 9.0 (Integral Software, France).

II.4.1. Évaluation de l'activité anti-cancéreux :

II.4.1.1. Extraction de l'ADN :

L'isolement de l'ADN à partir de sang peut être réalisé en utilisant diverses techniques, des protocoles différents et un grand nombre de kits disponibles dans le commerce (Lanez, Bechki, and Lanez 2019). La technique d'extraction d'ADN choisie devrait être en mesure de fournir des échantillons d'ADN purs, prêts à être utilisés pour l'étude de l'activité anticancéreuse avec le naringine.

Dans ce travail, nous avons isolé de l'ADN à partir de sang de poulet en utilisant des techniques de salage (Gaaib, Nassief, and Al-Assi 2011; MWer, Dykes, and Polesky 1988). L'avantage de cette technique est qu'elle évite l'utilisation de solvants organiques toxiques et

corrosifs et n'utilise que des produits chimiques standards qui peuvent être obtenus auprès de n'importe quel fournisseur commercial, et ne nécessite pas d'équipement spécialisé ou de connaissances biochimiques (Nasiri et al. 2005; Rivero et al. 2006). Le protocole de purification de l'ADN est basé sur la précipitation des protéines à haute concentration de sel. Le protocole traditionnel implique une disruption cellulaire initiale et une digestion avec du dodécyl sulfate de sodium, suivie de l'addition de hautes concentrations de sels, généralement 6 M de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite centrifugé pour permettre aux protéines de se précipiter au fond, avec le surnageant contenant l'ADN transféré dans un nouveau flacon. L'ADN est ensuite précipité en utilisant de l'éthanol froid (Howe, Klimstra, and Cordon-Cardo 1997), les étapes impliquées dans l'extraction d'ADN sont résumées dans la Figure 20.

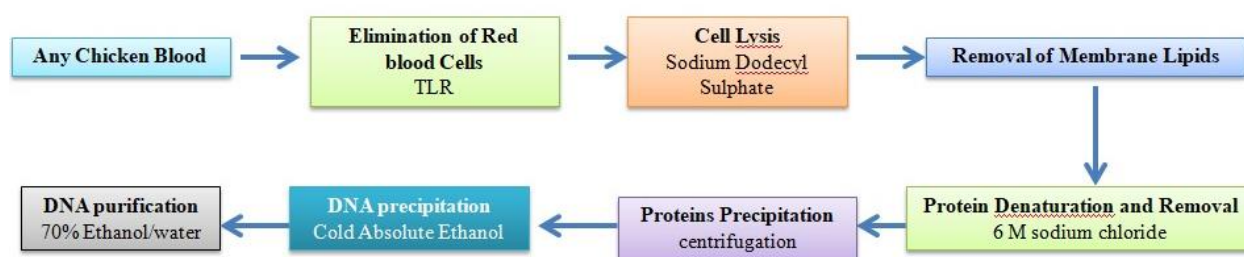


Figure 20 : Étapes impliquées dans l'extraction d'ADN

✓ *Échantillon de sang :*

L'ADN est extrait de sang de poulet en utilisant des techniques de salage. Le sang de poulet diffère du sang humain en ce que les globules rouges sont également nucléés et contiennent beaucoup plus d'ADN que le sang de mammifère non nucléé. Cela permet d'obtenir de l'ADN de poulet en quantité et qualité suffisantes à l'aide de techniques d'extraction relativement simples. Par conséquent, lors de la purification de l'ADN à partir de sang de poulet, il y a plus de matériau d'ADN qu'en travaillant avec du sang humain (Javanrouh and Jelokhani-niaraki 2020).

✓ *Collecte de sang :*

Des échantillons de sang de poulet ont été collectés dans des tubes de prélèvement sanguin contenant de l'EDTA comme anticoagulant et conservés à température ambiante dans des tubes de microfuge (Figure 21), et extraits le même jour de travail.



Figure 21 : échantillons de sang de poulet dans un tube de microfuge

✓ *Procédure d'extraction :*

5 ml d'échantillon de sang de poulet entier sont placés dans un flacon de 20 ml, puis 10 ml de TLGR ont été ajoutés au sang et le mélange obtenu a été refroidi dans un bain de glace pendant 20 minutes, puis centrifugé à 2500 pour 15 minutes à température ambiante. Cette étape a été répétée 3 à 4 fois jusqu'à ce que la couleur rouge du sang disparaisse ([Figure 22](#)), puis le flacon a été laissé à sécher pendant 5 minutes.

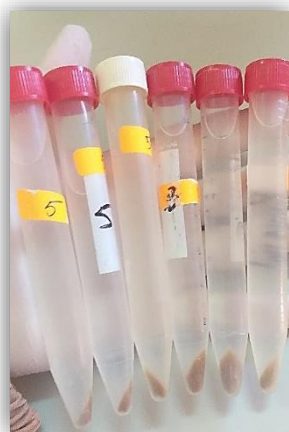


Figure 22 : La disparition de la coulure rouge du sang

Les globules blancs ont été éliminés par l'ajout de 2 ml de tampon TLGB et vortexé pendant 3 minutes. Ensuite, la lyse cellulaire a été entreprise en ajoutant un volume de 150 μ l de solution de dodécyl sulfate de sodium et incubé à 172 rpm pour 90 minutes à 55 °C. Après incubation, 3 ml de solution de chlorure de sodium 6 M ont été ajoutés et le mélange résultant a été d'abord vortexé pendant 6 minutes, puis centrifugé à 1300 pour 10 minutes, la phase liquide a été

récupérée et 2 volumes d'isopropanol froid ont été ajoutés, puis enfin centrifugé à 1300 pour 30 minutes à température ambiante. L'ADN a ensuite été récupéré de la couche d'isopropanol, lavé plusieurs fois à l'éthanol 70% et caractérisé à l'aide de la spectroscopie UV-Vis. La Figure 23 montre le spectre électronique de l'ADN isolé.

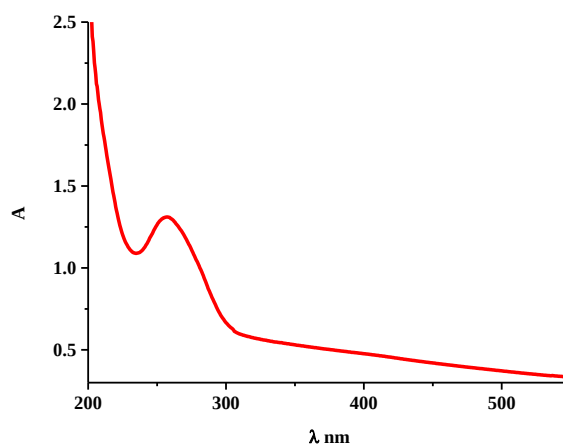


Figure 23 : Spectre électronique d'échantillon d'ADN extrait

La spectroscopie UV-Vis peut être utilisée pour détecter la contamination protéique de l'ADN extrait (Saab et al. 2007). Les protéines ont deux pics d'absorption dans la région UV, le premier pic est situé entre 190-210 nm, qui est dû à des transitions électroniques dans le squelette peptidique, et le second pic est situé à 280 nm en raison de l'adsorption par les acides aminés aromatiques tyrosine, tryptophane et phénylalanine (Bo et al. 2021).

✓ *Estimation de la pureté de l'ADN :*

L'ADN isolé ne peut pas être utilisé sans purification supplémentaire car il contient de l'ARN et des protéines contaminantes. L'ADN est donc réhydraté dans de l'eau distillée, cette dissolution nécessite une agitation continue pendant la nuit à 42 °C. La concentration et la pureté de l'ADN peuvent être déterminées en mesurant l'absorption de la lumière ultraviolette. L'ADN a une absorption maximale et minimale à 260 nm et 234 nm, respectivement (Telfer et al. 2013). Les purines et les pyrimidines dans l'acide nucléique sont responsables de ces absorptions. À 260 nm, l'ADN double brin a un coefficient d'absorption spécifique de $0.02 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chacon Cortes and Griffiths 2014). De plus, le rapport A_{260}/A_{280} permet de détecter la pureté de l'acide nucléique par rapport à la contamination protéique, car les protéines ont une absorption maximale à 280 nm. Les échantillons d'ADN hautement purifiés ont un rapport 260/280 nm de (1.7-1.9), ainsi en dessous de (1.7), une quantité significative d'impuretés protéiques peut être présente dans l'échantillon (Whitlock et al. 2008). Le rapport

A₂₆₀/A₂₃₀ est déterminé pour confirmer que l'échantillon est pur des glucides, peptides, éthanol ou tout autre composé organique, et il est généralement supérieur à 1.5 (Ning et al. 2009).

Donc une bonne qualité d'ADN doit avoir :

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.7 - 2 \quad \text{Et} \quad \frac{A_{260}}{A_{230}} > 1.5$$

Dans notre travail, nous avons utilisé la spectroscopie UV-Vis pour estimer la pureté de l'ADN isolé. Les valeurs d'absorbance de la solution d'ADN obtenue sont mesurées à 230, 260 et 280 nm pour déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait. L'ADN dissous peut être conservé à 4 ° C pendant quelques jours ou à -20 ° C pour un stockage à plus long terme (Heckel et al. 2017). Les valeurs d'absorbance ont été prises à partir de la Figure 23 et ont été répertoriées dans le Tableau 8.

Tableau 8: Rapport d'absorbance de l'ADN isolé

A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1.116	1.301	1.021	1.166	1.724

Les valeurs obtenues pour les différents ratios d'absorbance indiquent la haute pureté de l'ADN isolé.

✓ *Estimation de la quantité d'ADN :*

La quantité d'ADN a été déterminée par spectroscopie d'absorption en utilisant la valeur de coefficient d'extinction molaire de 6600 M⁻¹cm⁻¹ à 260 nm (Schoppler et al. 2011).

II.4.1.2. Mode opératoire :

Pour l'étude de l'interaction entre l'ADN et la BSA, les spectres d'une solution de 1 mM de naringine ont été enregistrés dans une solution tampon de phosphate (KH₂PO₄/K₂HPO₄) à 0,1 M et 90 % d'éthanol, à un pH de 7.2 en l'absence d'ADN et de BSA, puis répétés avec une concentration croissante d'ADN ou de BSA.

La variation des valeurs d'absorbance en fonction de la concentration d'ADN ou de BSA a été utilisée pour évaluer la constante de liaison intrinsèque en utilisant l'Equation 1 suivante (Khennoufa et al. 2021) :

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \frac{1}{K_b [ADN]} \quad (1)$$

Où [ADN] est la concentration d'ADN, K_b est la constante de liaison, A_0 et A sont respectivement l'absorbance du naringine en l'absence et en présence d'ADN, ϵ_0 et ϵ sont leurs coefficients d'extinction respectifs.

II.4.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antidiabétique :

II.4.2.1. Mode opératoire :

Cette étude a été menée en utilisant une méthode modifiée de Laraoui et al ([Laraoui et al. 2023](#)). Pour ce faire, un volume total de 250 μ L de naringine (0.3 mg/mL à 10 mg/mL) a été placé dans un tube et 250 μ L de tampon de phosphate de sodium salin 0.02 M (pH = 6.9) contenant une solution d'alpha-amylase (0.5 mg/mL) ont été ajoutés. La solution a ensuite été pré-incubée à 37 °C pendant 10 minutes. Après cela, 250 μ L de solution d'amidon à 1% dans 0.02 M de tampon de phosphate de sodium salin (pH = 6.9) ont été ajoutés à intervalles réguliers et incubés à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée en ajoutant 500 μ L de réactif dinitrosalicylique acide (DNS). Les tubes ont ensuite été incubés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes et refroidis à température ambiante. Le mélange réactionnel a été dilué avec 5 mL d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un contrôle a été préparé en utilisant la même procédure, mais en remplaçant le naringine par de l'eau distillée. L'expérience a été répliquée en utilisant l'acarbose comme médicament antidiabétique standard (contrôle positif). L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été calculée en pourcentage d'inhibition ([Laraoui et al. 2023](#)).

$$\%Inhibition = \left(\frac{Abs_{Naringine} - Abs_{Contrôle}}{Abs_{Naringine}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Les concentrations entraînant une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}) ont été déterminées graphiquement.

II.4.3. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire :

II.4.3.1. Mode opératoire :

Afin d'étudier l'effet de la dénaturation des protéines de la plante testée, le test de dénaturation des protéines de l'albumine de sérum bovin selon le protocole de Yuan et al ([Yuan et al. 2006](#)) a été effectué. Ce test a été réalisé en utilisant une solution d'essai de 15 tubes (500 μ L) composée de 450 μ L d'albumine de sérum bovin (BSA) et 50 μ L de naringine avec différentes concentrations. Une solution de contrôle de test (500 μ L) a également été préparée, composée de 450 μ L de BSA et 50 μ L de solution de phosphate saline (pH = 6.33). De plus,

une solution standard de 15 tubes (500 µL) a été préparée, composée de 450 µL de BSA et 50 µL de diclofénac sodique à différentes concentrations. Un blanc (200 µL) a été préparé, composé de 100 µL de solution de phosphate saline et 100 µL d'eau distillée.

Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 20 minutes, puis la température a été augmentée jusqu'à 70 °C pendant 20 minutes. Après cela, 500 µL de solution de phosphate saline (pH = 6.33) a été ajouté à toutes les solutions. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 255 nm. La solution de diclofénac a été utilisée comme contrôle positif pour tous les tests de cette étude et préparée de la même manière que la solution de naringine. L'activité inhibitrice d'albumine de sérum bovin a été calculée en pourcentage d'inhibition (Yuan et al. 2006).

$$\%Inhibition = \left(\frac{Abs_{Naringine} - Abs_{Contrôle}}{Abs_{Naringine}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Les concentrations entraînant une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀) ont été déterminées graphiquement.

II.4.4. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne :

II.4.4.1. Mode opératoire :

Les tests antimicrobiens ont été conduits afin d'évaluer l'activité biologique du naringine contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus*. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion des disques décrite dans la littérature (Klančnik et al. 2010) :

- ✓ *Préparation des produits à tester* : Dissolution du naringine dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations différentes de 2 à 40 mg/ml.
- ✓ *Préparation des précultures* : Cultivation des souches microbiennes à tester dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive et incubation pendant 24 heures à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.
- ✓ *Préparation des disques* : Préparation des disques par papier Wattman de 6mm de diamètre, suivie d'une stérilisation pendant 30 minutes à 120°C dans l'autoclave.
- ✓ *Préparation des suspensions bactériennes* : Prélèvement de quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à l'aide d'une pipette pasteur et mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). Standardisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un densimètre pour l'ensemencement dans le milieu MH.

- ✓ *Préparation des milieux de culture* : Utilisation de différents milieux de culture : bouillon nutritif pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes, gélose nutritive pour la réactivation de la souche bactérienne, gélose Mueller-Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différentes concentrations de naringine.
- ✓ *Test de l'activité antibactérienne* : Étalage de la suspension bactérienne sur la surface entière de la gélose Mueller Hinton (GMH) à trois reprises à l'aide d'un écouvillon stérile, puis laisser sur la paillasse pendant 30 minutes. Lecture de l'activité antibactérienne en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition et comparaison avec celle de DMSO comme contrôle négatif et l'antibiotiques comme contrôle positif (Amoxicilline 25 µg/disc). Mesure de l'absorbance par la spectroscopie UV-vis.

L'activité inhibitrice des bactéries a été calculée en pourcentage d'inhibition en utilisons l'équation suivante (Klančnik et al. 2010):

$$\%Inhibition = \left(1 - \frac{Abs_{Naringine}}{Abs_{Controle}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Les concentrations entraînant une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀) ont été déterminées graphiquement.

II.5. Méthodes d'évaluation *In Silico* des activités biologiques :

II.5.1. Évaluation ADMET et de la similitude médicamenteuse :

L'évaluation ADMET et de la "drug-likeness" (ou "similitude médicamenteuse" en français) est une étape importante dans le processus de développement de médicaments. Elle consiste à étudier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un composé chimique, notamment sa biodisponibilité, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme et son élimination (F. Cheng et al. 2012; Norinder and Bergström 2006). L'objectif est de s'assurer que le médicament potentiel est sûr et efficace chez l'homme, et de minimiser les risques d'effets secondaires indésirables. La "drug-likeness" quant à elle, permet d'évaluer la probabilité qu'un composé puisse être développé en tant que médicament en fonction de son profil chimique et pharmacologique (Cáceres, Tudor, and Cheng 2020).

Nous avons utilisé deux outils en ligne pour effectuer l'évaluation ADMET et similitude médicamenteuse : SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina, Michielin, and Zoete 2017) et ProtoxII (https://tox-new.charite.de/protox_II/) (Drwal et al. 2014). Ces outils ont été

utilisés pour évaluer la pharmacocinétique et la toxicité potentielle des composés étudiés, ainsi que pour prédire leur absorption, leur distribution, leur métabolisme, leur élimination et leur potentiel d'interaction avec les enzymes cytochromes P450. L'évaluation de ces paramètres est importante pour prédire l'efficacité et la sécurité des composés candidats dans les essais cliniques (J. Dong et al. 2018; Ranjith and Ravikumar 2019).

Pour cela, la structure de la naringine et des autres médicaments standards a été dessinée dans le logiciel ChemDraw (Kerwin 2010), puis enregistrée sous forme de SMILES (Tableau 9). Ces SMILES ont ensuite été utilisés dans deux serveurs en ligne, à savoir SwissADME et ProtoxII, pour effectuer l'évaluation ADMET et de similarité avec des médicaments connus.

Tableau 9: Structure SMILES des ligands étudiées

Composés	Structures SMILES
Naringine	<chem>[H][C@@]1(O[C@@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](CO)O[C@H]2OC2=CC3=C(C(=O)C[C@H](O3)C3=CC=C(O)C=C3)C(O)=C2)O[C@@H](C)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>
Acarbose	<chem>[H]C(=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@]([H])(O[C@@]1([H])O[C@H](CO)[C@@]([H])(O[C@H]2O[C@H](C)[C@@H](N[C@@]3([H])C=C(CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]3O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H]1O)[C@H](O)CO</chem>
Amoxicilline	<chem>[H][C@]12SC(C)(C)[C@@H](N1C(=O)[C@H]2NC(=O)[C@H](N)C1=CC=C(O)C=C1)C(O)=O</chem>
Diclofénac	<chem>OC(=O)CC1=CC=CC=C1NC1=C(Cl)C=CC=C1Cl</chem>

II.5.1.1. Généralité sur la similitude médicamenteuse :

Afin qu'une molécule puisse être considérée comme un candidat médicament et devenir un médicament, elle doit posséder une bonne activité biologique, être efficace sur le plan thérapeutique et être peu ou pas toxique, tout en ayant des propriétés qui permettent une excellente biodisponibilité. Les molécules dites "drug-like" possèdent des propriétés ADME qui leur permettent une bonne absorption orale, conformément à la règle de Lipinski (Lipinski et al. 1997; Walters 2012), ainsi que des groupes fonctionnels et/ou des propriétés physicochimiques similaires à celles de la plupart des médicaments connus, selon Walters et Murcko (Lipinski 2004).

Après avoir réussi les tests cliniques de phase II, les chercheurs ont observé que les molécules "drug-like" (Lipinski 2004) satisfont au moins trois des propriétés de Lipinski

(Lipinski 2000) suivantes : un poids moléculaire inférieur à 500 Dalton, un LogP calculé inférieur à 5, un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 10 et un nombre de donneurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 5. Des compléments ont été apportés par Veber (Veber et al. 2002), tels que le nombre de liaisons rotatives NROT ($0 < \text{NROT} < 10$), la polarité TPSA ($20 < \text{TPSA} < 130$), la saturation Csp3 ($0,25 < \text{fraction Csp3} < 1$) et la solubilité (Log S) ($-6 < \text{Log S} < 0$).

Il convient de rappeler que la règle de Lipinski est une technique qui permet d'identifier les composés qui présentent des problèmes de perméabilité et d'absorption (Pliska et al. 1996), établie à partir d'une liste de composés ayant réussi les tests cliniques de phase II.

II.5.1.2. Introduction aux propriétés physicochimiques :

Les propriétés physicochimiques des médicaments ont un impact considérable sur leur pharmacocinétique. La mesure et le calcul de ces propriétés peuvent être utilisés pour prédire les propriétés ADMET, ce qui permet de classer les composés à sélectionner (Barret 2018).

✓ Poids moléculaire (PM) :

Le poids moléculaire (PM) est une propriété physicochimique essentielle dans la recherche de nouveaux médicaments. Les processus intracellulaires, tels que l'absorption intestinale, la pénétration de la barrière hématoencéphalique, le taux d'élimination et l'interaction avec les cibles moléculaires sont grandement influencés par cette propriété.

✓ La lipophilie :

La lipophilie est une propriété physicochimique importante pour les médicaments potentiels, car elle joue un rôle dans la solubilité, l'absorption, la pénétration dans la membrane, la liaison aux protéines plasmatiques, la distribution, la pénétration dans le SNC et la diffusion dans d'autres tissus ou organes tels que le foie. Elle est la propriété physicochimique la plus couramment utilisée pour prédire la pénétration des médicaments dans les systèmes biologiques. Log P est défini comme un logarithme de coefficient de partage dans un système octanol/eau, mesuré par la distribution du composé neutre (non ionisé) entre la phase non aqueuse (octanol) et la phase aqueuse (eau).

✓ Solubilité :

La solubilité aqueuse (Log S) est un autre paramètre physicochimique important pour les médicaments, car elle reflète la biodisponibilité orale d'un composé. La solubilité des médicaments dans l'eau affecte leur activité biologique et est un paramètre important pour atteindre une concentration précise de médicament dans la circulation systémique pour obtenir la réponse pharmacologique attendue.

✓ **Polarité TPSA :**

($20 < \text{TPSA} < 130$) : La polarisabilité d'une molécule est définie par sa capacité à se déformer par un champ électrique externe, ce qui joue un rôle important dans la modélisation de nombreuses propriétés moléculaires et des activités biologiques. Une molécule très polarisée peut donner des attractions fortes avec d'autres molécules et peut améliorer sa solubilité aqueuse.

✓ **Réfraction molaire MR :**

($0 < \text{MR} < 10$) : La réfractivité molaire (MR) est un critère important dans la mesure des facteurs stériques. Elle est généralement désignée comme une simple mesure du volume occupé soit par un atome individuel ou par un groupe d'atomes.

✓ **Le nombre de liaisons rotatives (NROT) :**

Le nombre de liaisons rotatives est défini comme une simple liaison, non pas dans un cycle, liée à un atome non terminal (c'est-à-dire non hydrogène). Les liaisons amide C-N sont exclues du compte en raison de leur barrière à l'énergie de rotation élevée.

II.5.1.3. Généralité sur le profil pharmacocinétique :

En effet, les propriétés liées à l'ADME peuvent grandement influencer l'efficacité et la sécurité d'un candidat médicament. La P-glycoprotéine (Pgp) est un transporteur membranaire qui est impliqué dans l'efflux des composés hors des cellules et peut limiter leur absorption et leur biodisponibilité. Les inhibiteurs de la Pgp peuvent augmenter la biodisponibilité de certains médicaments. Les enzymes du cytochrome P450 sont des enzymes clés dans le métabolisme des médicaments, et leur inhibition ou induction peut avoir des effets significatifs sur la pharmacocinétique des médicaments, tels que l'augmentation ou la diminution de leur concentration plasmatique, ce qui peut conduire à une toxicité ou une inefficacité accrue ([Mannaert et al. 2005](#)).

De plus, la perméabilité membranaire est un paramètre important pour l'absorption des médicaments à travers les barrières biologiques, telles que la membrane hépatocytaire, les cellules épithéliales gastro-intestinales, la paroi capillaire sanguine, le glomérule et les barrières organiques restrictives. Une perméabilité accrue peut permettre une absorption plus rapide et plus complète des médicaments, tandis qu'une perméabilité réduite peut limiter leur absorption et leur biodisponibilité. Le volume de distribution et la clairance rénale sont également des paramètres importants dans la pharmacocinétique des médicaments, car ils déterminent la distribution et l'élimination des médicaments dans le corps ([Mannaert et al. 2005](#)).

En somme, l'étude *in silico* des propriétés ADME peut aider à identifier les candidats médicaments les plus prometteurs avant les expériences *in vitro* et *in vivo*, ce qui peut réduire le coût et le temps nécessaires pour le développement de nouveaux médicaments.

II.5.1.4. L'intérêt de la prédiction de la toxicité :

La toxicité d'une substance se réfère à sa capacité de causer des effets indésirables sur un organisme vivant et peut varier en fonction de la dose, de la fréquence, de la durée d'exposition et du moment d'apparition des signes cliniques. Avant d'être mis sur le marché, tout médicament ou produit chimique doit être soumis à des essais de toxicité afin d'évaluer leur dangerosité. Trois formes de toxicité sont cliniquement reconnues : aiguë, à court terme ou subaiguë/subchronique, et à long terme ou chronique (Gutyj et al. 2018). La détermination de la dose létale 50 (DL50) est nécessaire pour classer les produits chimiques selon leur toxicité (Tableau 10), évaluer le risque de surdosage, planifier les études de toxicité chez les animaux et les essais thérapeutiques chez l'homme, ainsi que pour contrôler la qualité des produits chimiques. Toutefois, la DL50 a ses limites, car elle ne fournit pas d'informations sur les mécanismes réactionnels en jeu ni sur la nature des lésions causées. Elle ne peut être considérée que comme une estimation préliminaire et grossière, influencée par des facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge et le temps (Lacombe et al. 2011).

Tableau 10: Classification des produits chimiques selon leurs toxicités

DL50 Orale (Rat)	Indice de toxicité
Jusqu'à 1 mg/kg	1 = Extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 = Hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3 = Modérément toxique
De 500 à 5000mg/kg	4 = Légèrement toxique
De 5000 à 15000 mg/kg	5 = Presque pas toxique
Plus, de 15000mg/kg	6 = Relativement inoffensif

II.5.2. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :

L'évaluation de l'activité biologique d'un composé peut être réalisée par amarrage moléculaire (Shoichet et al. 2002), une méthode *in-silico* qui permet de prédire l'affinité et la liaison d'un ligand à une cible biologique. Cette technique est basée sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la cible et sur les propriétés physicochimiques du ligand, telles que la charge, la polarité et la forme. L'amarrage moléculaire peut être utilisé pour identifier des candidats médicaments potentiels en évaluant leur capacité à interagir de manière spécifique

avec la cible biologique (Vijesh et al. 2013). Cette méthode est particulièrement utile pour accélérer le processus de découverte de médicaments en réduisant le nombre de composés à synthétiser et à tester *in vitro*. Cependant, il est important de noter que les prédictions *in silico* doivent être confirmées par des expériences *in vitro* pour évaluer l'efficacité et la sécurité du candidat médicament (Jakhar et al. 2020).

II.5.2.1. Préparation des ligands :

Dans le cadre de la réalisation d'études d'amarrage moléculaire, il convient en premier lieu d'obtenir une structure tridimensionnelle parfaitement optimisée du composé à étudier. Cette étape est généralement entreprise en recourant à la théorie fonctionnelle de la densité (DFT), sans recourir à des contraintes de symétrie (Becke 1993). Les calculs sont réalisés au moyen du logiciel Gaussian 09 (Frisch et al. 2009), en utilisant la fonctionnelle d'échange de Becke ainsi que la fonctionnelle de corrélation de Lee, Yang et Parr (B3LYP), en combinaison avec l'ensemble de base 6-311G+ +(d,p) (Becke 1993; Frisch et al. 1988). La structure optimisée de composé est représentée dans la Figure 24.

Quant aux structures bidimensionnelles (2D) de l'acarbose, du diclofénac et de l'amoxicilline, elles ont été extraites de la base de données DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) (Wishart et al. 2018), avant d'être converties en structures tridimensionnelles (3D) et optimisées selon la même méthode, en vue de la réalisation d'études d'amarrage moléculaire. Les structures 3D des médicaments standards sont présentées dans la Figure 25.

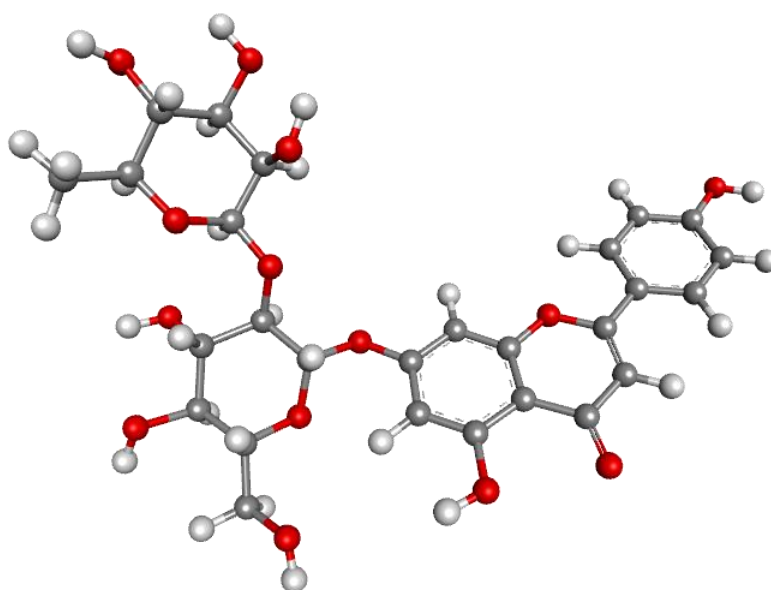


Figure 24 : Structure de naringine optimisée avec B3LYP/6-311++G(d,p)

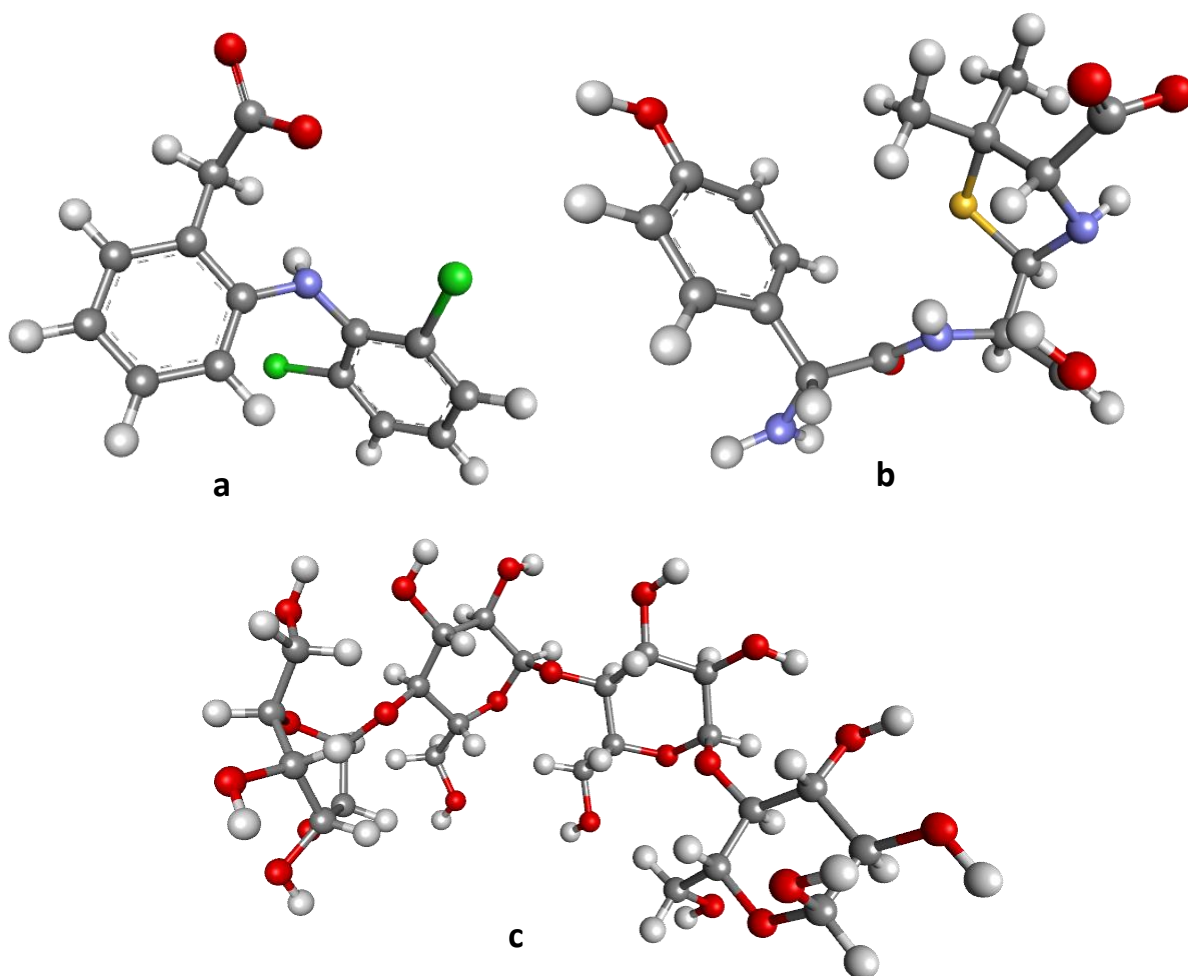


Figure 25 : Structure de : Diclofénac (a), Amoxicilline (b) et Acarbose (c) extraites de la base de données DrugBank

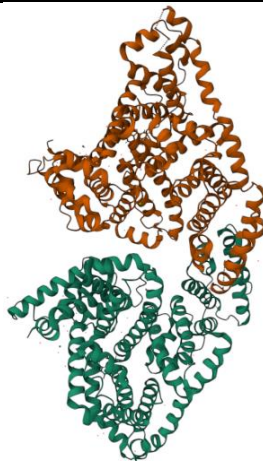
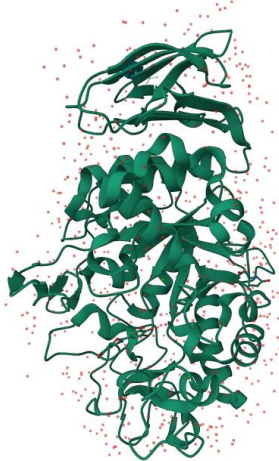
II.5.2.2. Préparation des récepteurs :

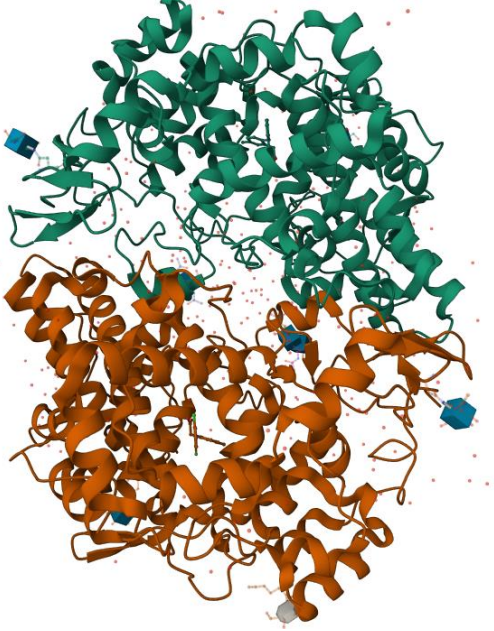
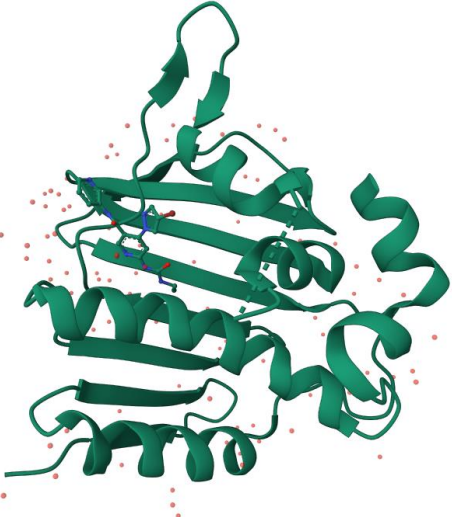
Les structures 3D des récepteurs, y compris le récepteur de l'ADN humain (PDB ID : 1W0T) (Court et al. 2005), l'albumine de sérum bovin (PDB ID : 6QS9) (Castagna et al. 2019), l'alpha-amylase pancréatique humaine (PDB ID : 4GQR) (Williams et al. 2012), cyclooxygénase (PDB ID : 4OTY) (Windsor et al. 2013), Escherichia coli (PDB ID : 6F86) (Naramore et al. 2019) et Staphylococcus aureus (PDB ID : 6LKI) (M. Wang et al. 2020). Les informations relatives aux récepteurs, y compris leurs noms et leurs PDB ID, ont été répertoriées dans le Tableau 11 suivantes.

Les structures ont été obtenues à partir de la banque de données sur les protéines RSCB (<https://www.rcsb.org/>) (Rose et al. 2016). Pour préparer ces récepteurs, AutoDock Tools (ADT) a été utilisé. La préparation impliquait l'élimination de toutes les molécules d'eau et de cofacteurs pour obtenir la structure brute de chaque protéine. Ensuite, le site actif a été défini à

l'aide du logiciel Molegro Virtual Docker (Bitencourt-Ferreira and de Azevedo 2019), suivi de l'ajout d'hydrogènes polaires avant l'attribution des charges de Kollman.

Tableau 11: Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire

	<i>hTRF1 DNA-binding domain in complex with telomeric DNA</i>	
	PDB ID	1W0T
	Résolution (Å)	2.00
	Mutation	No
	R-Value	0.252
	Chaînes	A, B
	Organisme	Homo sapiens
	<i>Bovine Serum Albumin in complex with Ketoprofen</i>	
	PDB ID	6QS9
	Résolution (Å)	2.80
	Mutation	No
	R-Value	0.218
	Chaînes	A, B
	Organisme	Bos taurus
	<i>Human Pancreatic alpha-amylase in complex with myricetin</i>	
	PDB ID	4GQR
	Résolution (Å)	1.20
	Mutation	No
	R-Value	0.252
	Chaînes	A
	Organisme	Homo sapiens

	<i>Crystal structure of lumiracoxib bound to the apo-mouse-cyclooxygenase-2</i>	
	PDB ID	4OTY
	Résolution (Å)	2.35
	Mutation	No
	R-Value	0.181
	Chaînes	A, B
	Organisme	Mus musculus
	<i>Crystal Structure of E. coli GyraseB 24kDa</i>	
	PDB ID	6F86
	Résolution (Å)	1.90
	Mutation	No
	R-Value	0.204
	Chaînes	A
	Organisme	Escherichia coli O157:H7
	<i>Two-component system protein mediate signal transduction</i>	
	PDB ID	6LKI
	Résolution (Å)	1.78
	Mutation	No
	R-Value	0.210
	Chaînes	A
	Organisme	Staphylococcus aureus

II.5.2.3. Expériences d'amarrage Moléculaire :

Toutes les études de docking ont été effectuées sur un micro-ordinateur Pentium de 3.30 GHz, doté de 4.00 Go de mémoire RAM et d'un système d'exploitation Windows 10. Pour les calculs de docking, le programme AutoDock 4.2 (Morris et al. 2009), fondé sur l'algorithme génétique Lamarckien (LGA) avec recherche GA (Morris, Huey, and Olson 2008), a été utilisé. Les simulations de docking ont été réalisées en utilisant les paramètres par défaut, tandis que le nombre de runs a été fixé à 15, avec 150 individus et 2 500 000 évaluations d'énergie. La recherche a été menée sur une grille de 41 et 51 points par dimension, avec des points séparés de 0.500 Å. Les centres et les tailles de grille ont été déterminés pour chaque récepteur, tel qu'indiqué dans le Tableau 12, avec un pas de 0.500 centré sur le site actif de récepteur. À l'issue des runs d'amarrage, une énergie de liaison diverse des ligands a été obtenue avec leurs conformations respectives ; la pose d'amarrage énergétiquement la plus favorable a été utilisée pour l'analyse de docking (Morris et al. 1998). Les interactions d'amarrage ont été visualisées en utilisant les options d'interaction récepteur-ligand dans les logiciels : Discovery Studio v2.5 (Systèmes 2016), et PyMOL (Anaconda 3) (DeLano 2002) ainsi le serveur en ligne Protein-Ligand Interaction Profiler (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) (Salentin et al. 2015).

Tableau 12: Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible

Récepteur	Centre de grille			Taille de grille (Å)		
	x	y	z			
ADN	31.300	46.570	22.280	64	64	64
BSA	-42.030	-2.380	35.230	64	64	64
α-amylase	10.800	16.530	39.740	70	70	70
Cyclooxygenase	-16.940	58.530	35.380	60	60	60
E.Coli	55.0	31.0	67.0	60	60	60
Staphylococcus aureus	-2.546	-23.991	1.652	50	50	50

II.5.3. Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire :

La méthode de simulation de dynamique moléculaire est couramment utilisée dans la recherche scientifique pour étudier le comportement dynamique des protéines et des complexes protéine-ligand (Hansson, Oostenbrink, and van Gunsteren 2002). Dans le cadre de cette étude, une simulation MD a été mise en place pour estimer la stabilité des complexes d'amarrage formé entre les molécules prometteuse et les récepteurs cibles. Cette simulation a été effectuée sur une durée de 10 ns dans un environnement d'hydratation explicite en utilisant le logiciel GRONINGEN MACHINE pour les simulations chimiques (GROMACS) version 5.0.6 (Van Der Spoel et al. 2005).

Le système de simulation a été configuré à l'aide de l'interface graphique basée sur le web CHARMM-GUI (Jo et al. 2008), en utilisant le programme CHARMM General Force Field (CGenFF) version 1.0 (Vanommeslaeghe and MacKerell Jr 2012) pour la préparation du ligand et le champ de force CHARMM 36 (Huang and MacKerell Jr 2013) pour la préparation du système. La charge atomique partielle a été prise en compte pour la paramétrisation du ligand, avec le modèle de solvant trois points transférable intermoléculaire potentiel (TIP3P) sélectionné pour le complexe protéine-ligand. Une boîte d'eau de forme cubique avec une distance de bord de 10 Å a été utilisée et la charge du système a été neutralisée en incorporant des contre-ions Na^+ et Cl^- .

Une fois le système neutralisé, une minimisation d'énergie a été effectuée pour éliminer les interférences stériques. Les systèmes d'énergie minimale ont ensuite été équilibrés en six étapes en réduisant progressivement la constante de force et en thermalisant (dans l'ensemble NVT) à 298 K et en pressurant (dans l'ensemble NPT) à 1 bar chacun pendant 1 ns. Les systèmes bien équilibrés ont été simulés à l'aide du logiciel Gromacs installé sur des installations de supercalculateur du laboratoire de valorisation et de technologie des ressources sahariennes (VTRS) à l'université d'El Oued. La sortie de la simulation a été centrée, et les trajectoires ont été analysées à l'aide du logiciel VMD (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996). Les commandes `gmx rmsd`, `gmx rmsf`, et `gmx hbond` ont été utilisées pour calculer respectivement le RMSD, le RMSF, et les liaisons hydrogène.

Chapitre 2 :

Résultats et Discussion



Ce chapitre présente les résultats de l'extraction, de la caractérisation et de l'étude *in-silico* et *in vitro* de l'activité biologique du naringine, un composé présent dans la plante de pamplemousse. L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'activité biologique potentielle du naringine en tant que composé actif pour le développement de nouveaux médicaments. Les résultats présentés dans ce chapitre fournissent des informations détaillées sur la composition chimique du naringine, ainsi que sur son activité anticancéreuse, anti-diabétique, anti-inflammatoire et antibactérienne *in vitro* et ses interactions avec des protéines cibles *in-silico*. Les résultats de cette étude peuvent contribuer à la compréhension de l'activité biologique du naringine et à son potentiel en tant que composé actif dans le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de diverses maladies.

I.1. Caractérisation :

La caractérisation chimique du naringine a été réalisée pour déterminer sa structure et sa pureté. Des analyses telles que la spectroscopie UV-Vis, la spectroscopie infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées pour caractériser le composé.

I.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

Les résultats de la CCM ont montré que le naringine présentait une tache unique (Figure 26) avec un R_f (facteur de rétention) de 0.7407 lorsqu'il était évalué à l'aide de solvant Hexane-méthanol (7 :3). La tâche de naringine a été révélée en utilisant l'Iode solide, qui a montré une coloration orange-brun caractéristique. Ces résultats ont confirmé la présence et la pureté de naringine dans l'extrait de la plante de pamplemousse (Giannuzzo et al. 2003).

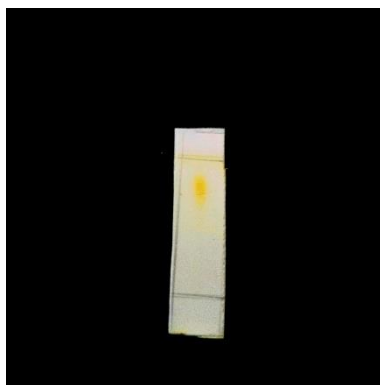


Figure 26 : Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine

I.1.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait un temps de rétention de 34.128 ± 0.5 minutes (Figure 27) lorsqu'il était séparé en utilisant le gradient de solvant acétonitrile-méthanol. De plus, les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait

un pic unique avec une pureté de 60%. Cela indique que le naringine a été correctement séparé des autres composants dans l'extrait et que la méthode de purification était efficace (Yusof, Ghazali, and King 1990).

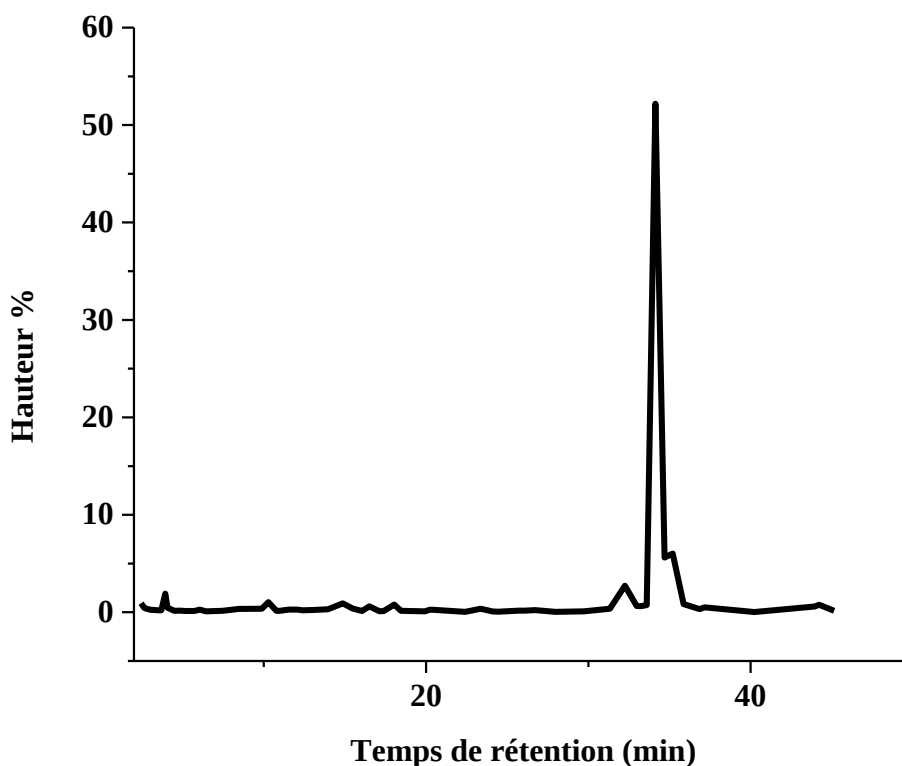


Figure 27 : Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine

I.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

Le naringine extrait de pamplemousse a été caractérisé par spectroscopie infrarouge (IR) pour confirmer la présence de groupes fonctionnels caractéristiques de la molécule. Le spectre IR du naringine a été comparé à un spectre IR de référence de naringine, obtenu depuis Alfa Aesar (Figure 28).

Le spectre IR du naringine a montré des pics de vibration caractéristiques pour les liaisons O-H, C-H, C=O et C-O. Le pic à 3404.91 cm^{-1} correspond à la liaison O-H caractéristique des groupes phénoliques présents dans la molécule de naringine. Le pic à 2933.92 cm^{-1} correspond à la vibration des liaisons C-H de l'anneau aromatique. Le pic à 1264.53 cm^{-1} correspondent à la vibration de la liaison C-O, qui est caractéristique des groupes ester et éther. Dans le cas de la naringine, cette bande est attribuée à la présence d'un groupement éther. Le pic à 1519.95

cm^{-1} est due à la vibration de déformation de la liaison C-C et C-O, qui est caractéristique des cycles aromatiques. Le pic à 1037.76 cm^{-1} est due à la vibration d'élongation de la liaison C-O-C, qui est caractéristique des groupes éther.

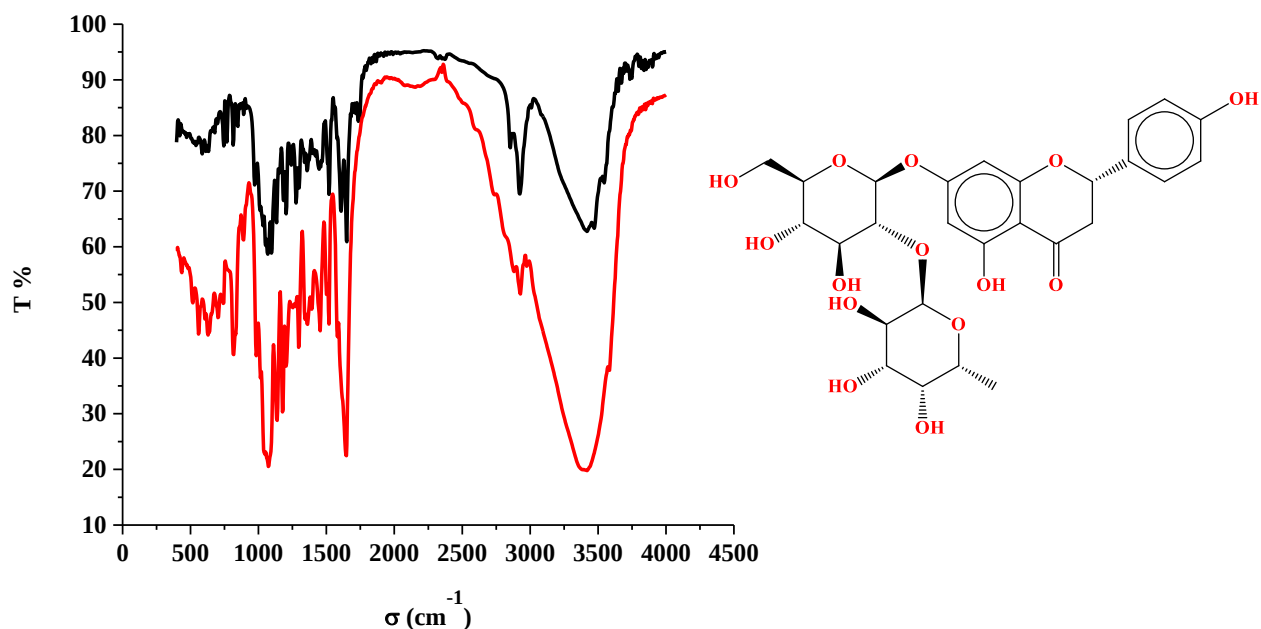


Figure 28 : Caractérisation du naringine extrait (Ligne noire) et naringine référence (Ligne rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)

En comparant le spectre IR du naringine extrait avec le spectre IR de naringine référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics de vibration similaires, confirmant la présence du naringine dans l'échantillon extrait de pamplemousse (Ghosal, Ghosh, and Das 2018).

1.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption UV-visible a été utilisée pour caractériser le naringine extrait de pamplemousse. Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de 283 nm (Figure 29), correspondant au maximum d'absorption du naringine.

Le spectre d'absorption UV-visible du naringine a montré un pic intense à 283 nm, correspondant à une transition $\pi-\pi^*$ du groupement phénolique. Ce pic est caractéristique de la présence de groupes phénoliques dans la molécule de naringine, sont responsables de l'absorption dans cette région du spectre électromagnétique.

En comparant le spectre d'absorption UV-visible du naringine avec celui de la naringine de référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics d'absorption similaires,

confirmant la présence du naringine dans l'échantillon extrait de pamplemousse (Cordenonsi et al. 2017).

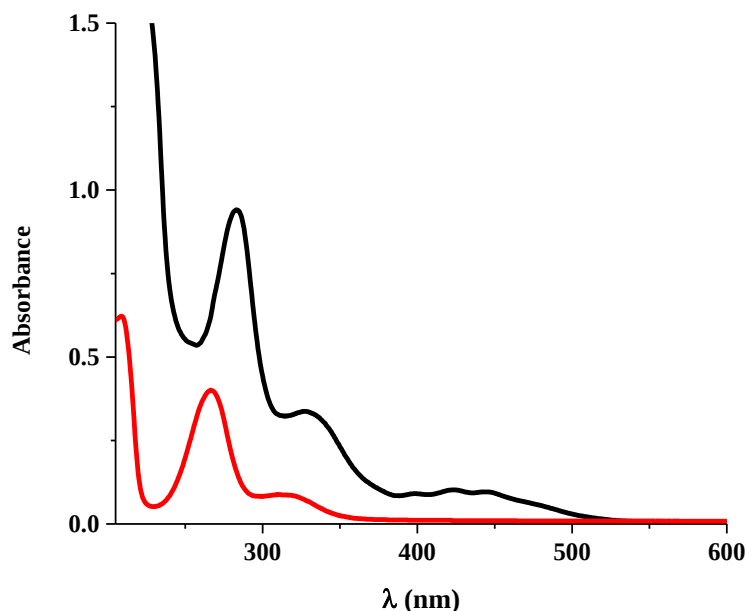


Figure 29 : Spectre UV du naringine extrait (Ligne noire) et de naringine référence (Ligne rouge)

I.1.5. Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

La RMN a été utilisée pour caractériser le naringine extrait de pamplemousse. Les spectres RMN du naringine ont été enregistrés en solution dans un solvant DMSO-d₆.

Le spectre RMN du proton (¹H) du naringine a montré des signaux correspondant aux différents groupes protons de la molécule (Figure 30). En particulier, Les signaux de 2 protons doublets entre 6.18 et 6.22 ppm dont les constantes de couplage indiquent qu'ils sont en position méta sur le cycle A ; Le spectre montre également 3 multiplets à 5.51 ppm (H-2), 3.39 ppm (H-3a), 3.14 ppm (H-3b). Le fort déblindage du proton H-2 indique qu'il est porté par un carbone lié à l'atome d'oxygène au niveau du cycle ; Le spectre de RMN ¹H montre plusieurs signaux compris entre 5.6 et 2.5 ppm.

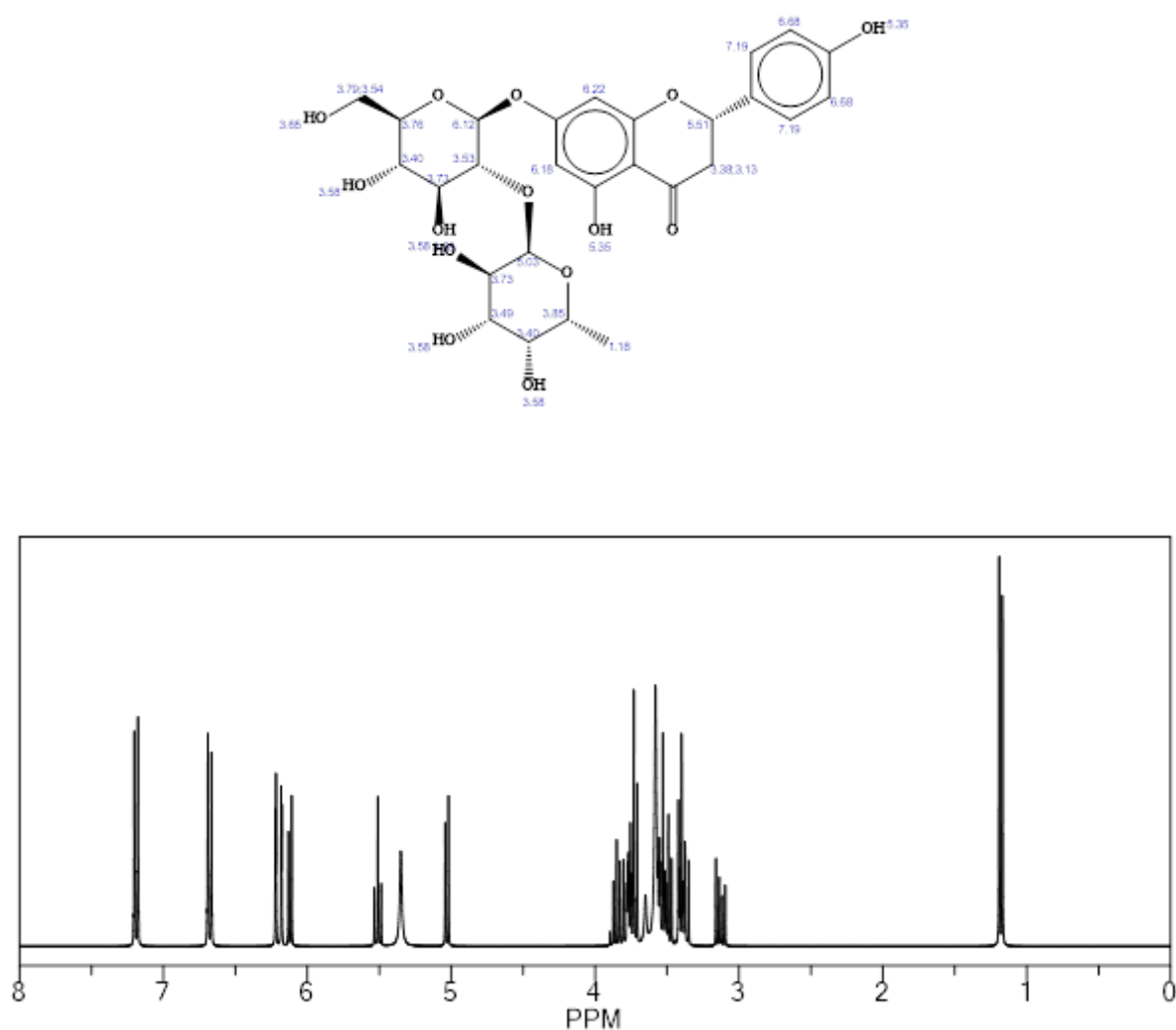


Figure 30 : Spectre RMN du 1H de naringine

De même, le spectre RMN du carbone (^{13}C) du naringine (Figure 31) a montré des signaux correspondant aux différents groupes carbones de la molécule. En particulier, les signaux à 94.1 ppm, 81.5 ppm, et 116.1 ppm ont été attribués aux carbones des groupes méthyle, méthylène et aromatique, respectivement.

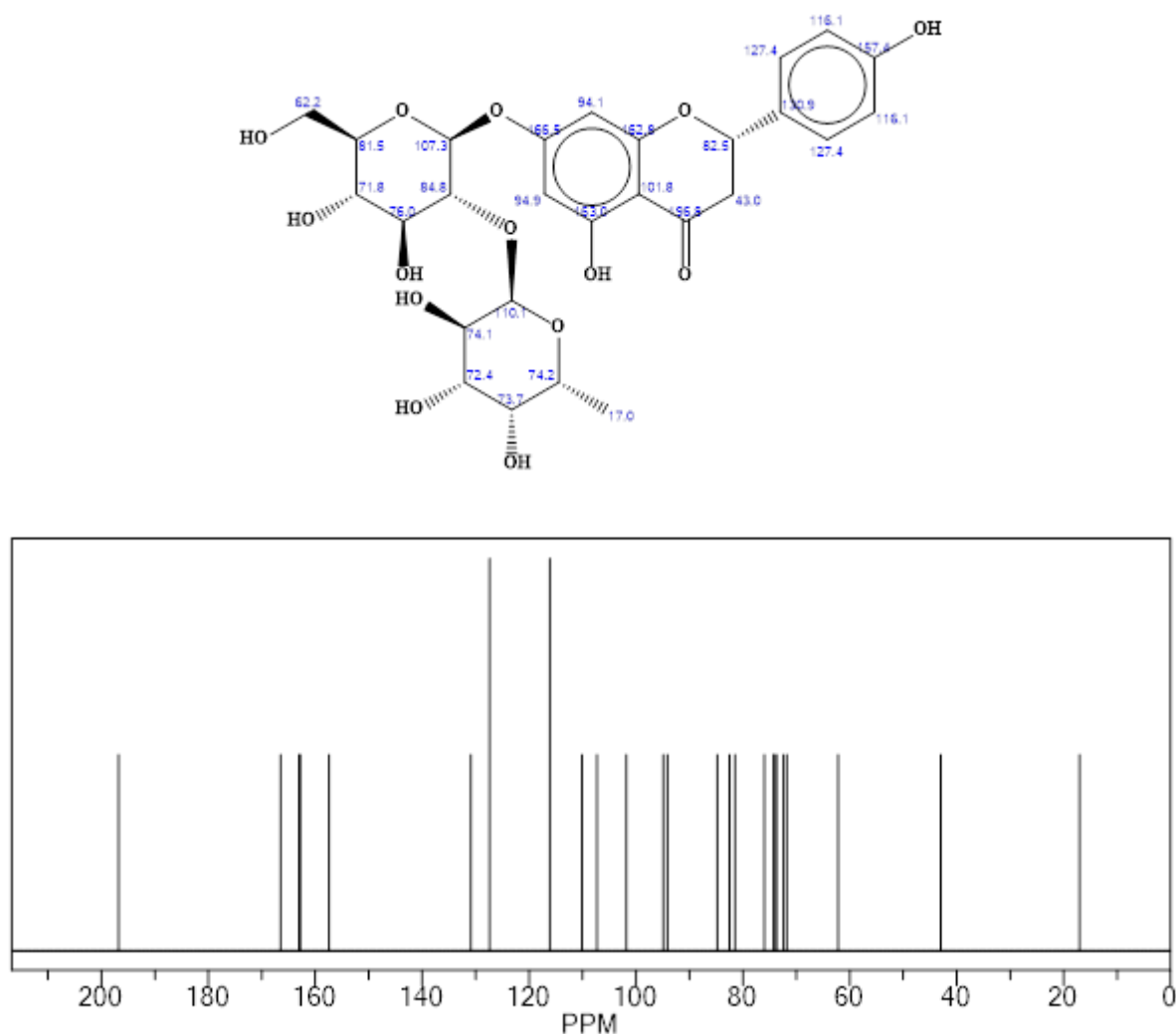


Figure 31 : Spectre RMN du ¹³C de naringine

La comparaison des spectres RMN du naringine extrait avec les spectres RMN de référence a confirmé la présence du naringine dans l'échantillon extrait de pamplemousse. Les positions des signaux observés dans les spectres RMN du naringine extrait sont en accord avec les données de naringine référence.

I.2. Évaluation *In Vitro* des activités biologiques :

I.2.1. Évaluation de l'activité anti-cancéreux :

Une titration par spectroscopie électronique a été effectuée pour étudier l'interaction de naringine avec l'ADN et la BSA dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) à pH de 7.2. Les spectres d'absorption d'une concentration fixe (1 mM) de naringine en absence et en présence d'une concentration croissante de la solution stock d'ADN et de BSA sont présentés dans la Figure 32. Avec l'ajout d'ADN et de BSA, une hypochromicité

significative a été observée sans aucun déplacement notable de la position du pic d'absorption maximal (Lanez, Bechki, and Lanez 2019), ce qui indique clairement la formation d'un adduit entre l'ADN/BSA et la naringine (Zegheb et al. 2022). L'hypochromicité suggère en outre une propriété de liaison principalement dans le sillon de la double hélice de l'ADN (Khennoufa et al. 2021).

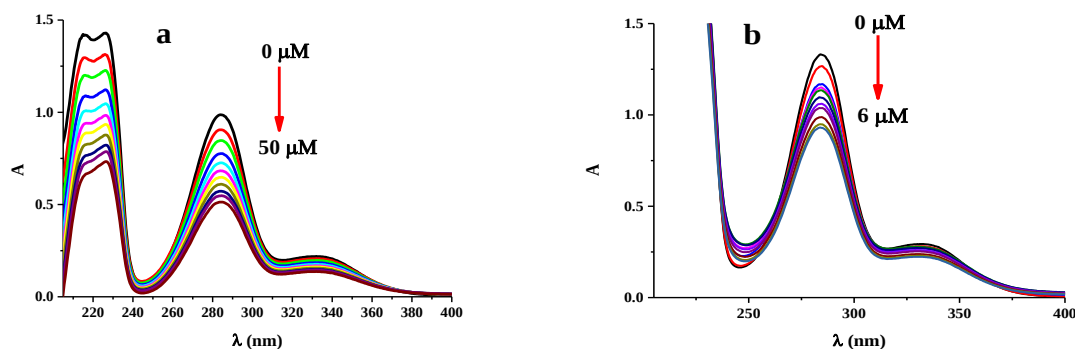


Figure 32 : Spectres d'absorption UV-visible de 1 mM de naringine en absence et en Présence de concentrations croissantes d'ADN (a) et de BSA (b) dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à un pH de 7.2 et à température de 298 K.

Les concentrations d'ADN et de BSA ajoutées ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir des spectres électroniques de la Figure 32 sont regroupées dans le Tableau 13 suivant :

Tableau 13: Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre électroniques UV-VIS de la (figure 32)

[ADN] (μM)	Absorbance	[BSA] (μM)	Absorbance
0.00	1.98	0.00	1.98
5.00	0.98	0.50	1.33
10.0	0.90	1.00	1.26
15.0	0.84	1.50	1.16
20.0	0.776	2.00	1.15
25.0	0.773	2.50	1.14
30.0	0.72	3.00	1.09
35.0	0.68	3.50	1.06
40.0	0.65	4.00	1.03
45.0	0.61	4.50	0.99
50.0	0.57	5.00	0.95

I.2.1.1. Constantes de liaison :

En se basant sur la diminution d'absorbance du naringine suite à l'addition de différentes concentrations d'ADN et de BSA, la constante de liaison a été évaluée à partir du tracé de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[ADN]$ ou $1/[BSA]$ (Figure 33) selon l'Équation 1 citée auparavant. La constante de liaison est calculée du rapport pente/interception.

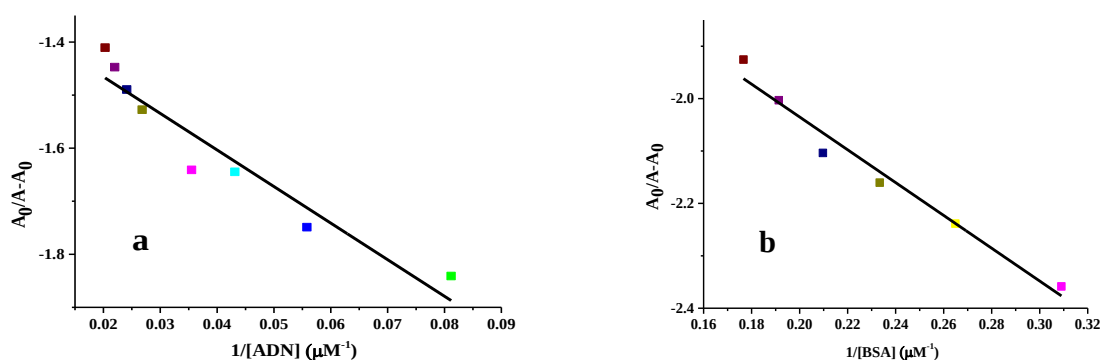


Figure 33 : Les droites de régression linéaire de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[ADN]$ (a) et $1/[BSA]$ (b) ont été utilisés pour calculer les constantes de liaison de naringine l'ADN et BSA

I.2.1.2. Énergie libre de liaison :

La variation de l'énergie libre de liaison a été calculée en utilisant l'Équation 5 suivante (B. L. Wang et al. 2020):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$

Où ΔG est l'énergie libre de liaison en $KJ.mol^{-1}$, R est la constante des gaz, $8.32 J.mol^{-1}K^{-1}$ et T est la température absolue, 298K.

Les paramètres de liaison sont répertoriés dans le Tableau 14.

Tableau 14: Constante de liaison et énergie libre de liaison pour le naringine avec l'ADN et le BSA à partir des données UV à pH= 7.2 et T = 298 K

Adduits	Équations	R ²	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Naringine_ADN	$y = -6.892x - 1.327$	0.905	1.93×10^5	30.17
Naringine_BSA	$y = -3.131x - 1.408$	0.964	4.5×10^5	32.27

Les résultats obtenus montrent que la naringine a une forte affinité avec l'ADN et le BSA, avec des constantes de liaison élevées de $1.93 \times 10^5 M^{-1}$ pour l'ADN et $4.5 \times 10^5 M^{-1}$ pour le BSA. Ces valeurs indiquent une forte interaction entre la naringine et les deux macromolécules biologiques étudiées (Khennoufa et al. 2021). En outre, les valeurs de l'énergie libre de liaison (ΔG) sont également élevées, de $-30.17 KJ.mol^{-1}$ pour l'ADN et de $-32.27 KJ.mol^{-1}$ pour le

BSA, ce qui suggère que la liaison entre la naringine et les macromolécules biologiques est thermodynamiquement favorable (Lanez, Bechki, and Lanez 2019).

I.2.2. Évaluation de l'activité antidiabétique :

L'activité antidiabétique du naringine a été évaluée par la méthode spectrophotométrique d'interaction de l'alpha-amylase avec le naringine. L'alpha-amylase est une enzyme digestive responsable de la dégradation de l'amidon en glucose et est une cible importante dans le traitement du diabète de type 2 (Park et al. 2000).

L'activité de l'alpha-amylase a été mesurée en présence et en l'absence du naringine. La méthode est basée sur le fait que l'alpha-amylase hydrolyse l'amidon en glucose, ce qui peut être suivi par la mesure de la libération de glucose en utilisant un réactif de glucose oxydase-peroxydase (Conway and Hood 1976). Le potentiel inhibiteur de l'acarbose, un médicament antidiabétique de type 2 standard, sur l'activité de l'alpha-amylase a également été analysé dans cette recherche pour servir de contrôle positif.

Les concentrations de naringine et d'acarbose ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir de mesure spectroscopique sont regroupées dans le [Tableau 15](#) suivant :

Tableau 15: Valeurs des absorbances tirées à partir du test d'alpha-amylase

[Naringine] (mg/ml)	Absorbance	[Acarbose] (mg/ml)	Absorbance
0.00	0.093	0.00	0.093
0.25	0.166	1.294	2.353
0.125	0.161	0.647	2.18
0.062	0.160	0.323	1.66
0.031	0.159	0.161	1.247
0.015	0.157	0.080	0.734
0.007	0.147	0.040	0.377
0.003	0.143	0.020	0.278
0.001	0.134	0.010	0.199
0.0009	0.130	0.005	0.165
0.0004	0.117	0.002	0.15

Les résultats de l'absorbance obtenus révèlent une corrélation proportionnelle entre l'absorbance et les concentrations croissantes des différents ligands étudiés, suggérant une activité inhibitrice de l'alpha-amylase.

I.2.2.1. Activités inhibitrices de l'alpha-amylase (IC₅₀) :

Le potentiel antidiabétique *in vitro* de naringine extraits de pamplemousse a été étudié en utilisant le modèle d'inhibition de l' α -amylase et les résultats sont présentés dans le [Tableau 16](#). À partir des régressions exponentielles de la concentration de naringine et acarbose (mg/ml) par rapport à l'inhibition de l' α -amylase en pourcentage ([Figure 34](#)), tous les composés étudiés ont augmenté significativement l'inhibition de l' α -amylase (%) avec une augmentation correspondante de la concentration de ligand.

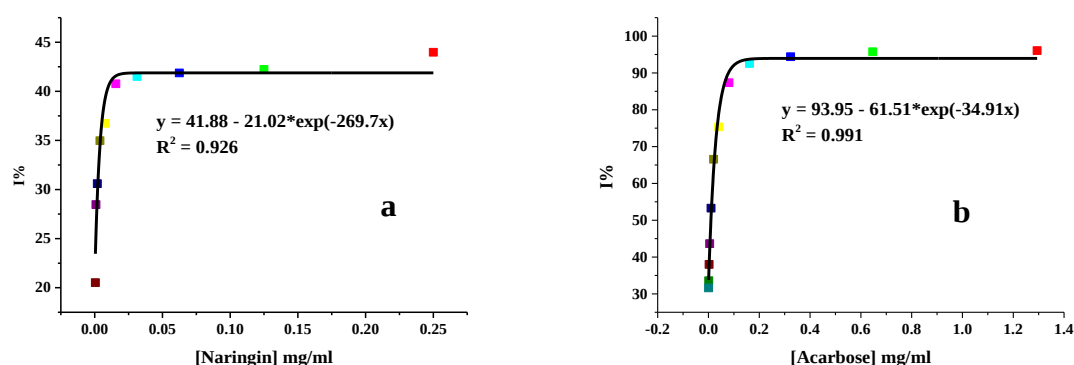


Figure 34 : Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Acarbose (b)

Tableau 16: Activité antidiabétique de naringine et acarbose par le test d'inhibition de l' α -amylase.

[Naringine] (mg/ml)	Inhibition %	[Acarbose] (mg/ml)	Inhibition %
0.25	43.97	1.294	96.04
0.125	42.23	0.647	95.73
0.062	41.87	0.323	94.39
0.031	41.51	0.161	92.54
0.015	40.76	0.080	87.32
0.007	36.73	0.040	75.33
0.003	34.96	0.020	66.54
0.001	30.59	0.010	53.26
0.0009	28.46	0.005	43.63
0.0004	20.51	0.002	38.00
IC ₅₀ = 3.5 µg/ml		IC ₅₀ = 9.6 µg/ml	

La naringine montre une inhibition de l'alpha-amylase croissante avec l'augmentation de sa concentration. À une concentration de 0.25 mg/ml, l'inhibition est de 43.97 %, et elle augmente progressivement pour atteindre 41.51 % à une concentration de 0.031 mg/ml. À des concentrations plus faibles de naringine (inférieures à 0.031 mg/ml), l'inhibition diminue, avec 20.51 % d'inhibition à une concentration de 0.0004 mg/ml. L'IC₅₀ de la naringine, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de l'alpha-amylase, est de 3.5 µg/ml.

En comparaison, l'acarbose, un médicament couramment utilisé comme inhibiteur de l'alpha-amylase dans le traitement du diabète, montre une inhibition plus forte de l'activité de l'alpha-amylase à des concentrations plus élevées. Par exemple, à une concentration de 1.294 mg/ml, l'inhibition de l'acarbose est de 96.04 %, et elle augmente pour atteindre 38 % à une concentration de 0.002 mg/ml. L'IC₅₀ de l'acarbose est de 9.6 µg/ml, ce qui est plus élevé que celui de la naringine (environ 2.75 fois).

Ces résultats suggèrent que la naringine présente une activité inhibitrice de l'alpha-amylase, bien que moins puissante que celle de l'acarbose à des concentrations équivalentes. Cependant, il est important de noter que la naringine est un composé naturel présent dans certains aliments (Ghosal, Ghosh, and Das 2018), tandis que l'acarbose est un médicament synthétique prescrit sous forme de médicament (Shibata and Ogawa 1989). Par conséquent, la naringine peut être considérée comme une alternative naturelle et potentiellement bénéfique à l'acarbose dans le contexte de la régulation de la glycémie et du traitement du diabète (Laraoui et al. 2023).

I.2.2.2. Constantes de liaison :

La diminution graduelle des valeurs d'absorption de la solution d'α-amylase par l'augmentation des concentrations de naringine et d'acarbose peut être exploitée pour calculer la constante de liaison en appliquant l'Équation 1 citée auparavant.

La valeur de K_b , qui représente la constante de liaison (M^{-1}), Un graphique de $A/(A_0-A)$ en fonction de $1/C$ (Figure 35) a donné une pente de $\epsilon/(\epsilon_0-\epsilon) K_b$ et une intersection "y" égale à $\epsilon/(\epsilon_0-\epsilon)$, où K_b est le rapport de la pente sur l'intersection "y".

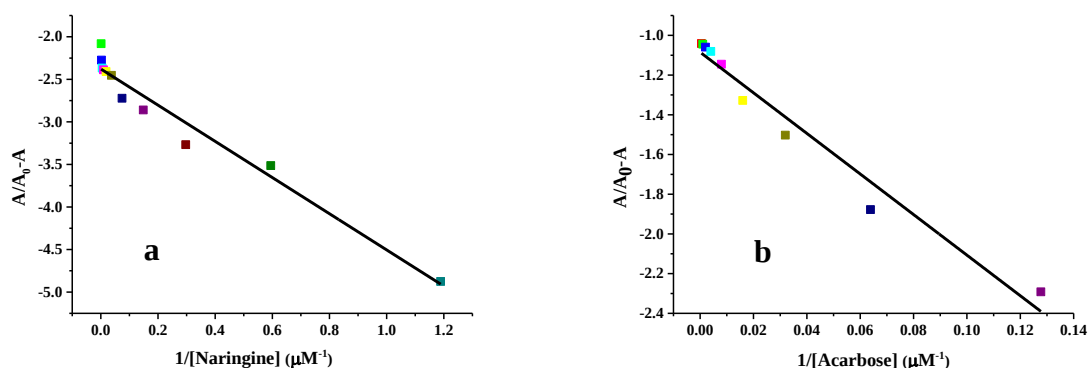


Figure 35 : Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ (a) et $1/[\text{Acarbose}]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison

I.2.2.3. Énergie libre de liaison :

La variation de l'énergie libre de liaison a été calculée en utilisant l'Équation 5 citée auparavant.

Les valeurs négatives de ΔG indiquent la spontanéité de l'interaction entre l' α -amylase et les composés étudiés, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands (Adisa, Choudhary, and Olorunsogo 2011). Les valeurs obtenues pour les constantes de liaison et leurs énergies libres de liaison correspondantes sont résumées dans le Tableau 17.

Tableau 17: Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l' α -amylase calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R^2	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$-\Delta G \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$
Naringine_ α -amylase	$y = -0.002x - 2.378$	0.957	1.11×10^6	34.52
Acarbose_ α -amylase	$y = -0.010x - 1.084$	0.961	1.06×10^5	28.69

Pour la naringine, le coefficient de détermination (R^2) associé à cette équation est de 0.957, ce qui indique une bonne adéquation du modèle aux données expérimentales (LANEZ n.d.). La constante de liaison (K), qui est une mesure de la force de liaison entre la naringine et l' α -amylase, est de $1.11 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Une valeur plus élevée de K indique une liaison plus forte entre la naringine et l'enzyme (Hirose 2001). La variation d'énergie libre ($-\Delta G$), qui représente la spontanéité de la réaction d'adduction, est de 34.52 KJ/mol.

Pour l'acarbose, un coefficient de détermination (R^2) de 0.961. La constante de liaison (K) est de $1.06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, ce qui indique une liaison moins forte entre l'acarbose et l' α -amylase par rapport à la naringine. La variation d'énergie libre standard ($-\Delta G$) est de 28.69 KJ/mol.

Ces données suggèrent que la naringine forme des adduits plus forts avec l'alpha-amylase par rapport à l'acarbose, comme en témoignent la valeur plus élevée de K et la plus grande variation d'énergie libre standard ($-\Delta G$). Cela peut contribuer à son activité inhibitrice sur l'alpha-amylase observée dans les résultats précédents.

I.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire de naringine peut être évaluée en utilisant la méthode spectrophotométrique de l'interaction de naringine avec le BSA (sérum albumine bovine). Cette méthode est basée sur le fait que le naringine peut se lier à la BSA et induire des changements de conformation de la protéine, qui peuvent être détectés en mesurant les changements de l'absorbance UV-Vis de la solution de la protéine (Ganta et al. 2020).

La BSA (sérum albumine bovine) est une protéine globulaire largement utilisée comme modèle de protéine dans les études de liaison des médicaments et des protéines (Tang and Shen 2013). Nous avons utilisé la BSA pour évaluer la capacité du naringine à se lier à une protéine et à potentiellement inhiber l'inflammation. Diclofénac est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) largement utilisé pour soulager la douleur et l'inflammation dans les maladies inflammatoires telles que l'arthrite et les douleurs musculaires (Zacher et al. 2008), l'étude comparative de la naringine avec le diclofénac peut être intéressante pour déterminer si la naringine peut offrir un potentiel anti-inflammatoire similaire avec moins d'effets secondaires indésirables.

Les concentrations de naringine et Diclofénac ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir de mesure spectroscopique sont regroupées dans le Tableau 18 suivant :

Tableau 18: Valeurs de absorbances tirées à partir du test anti-inflammatoire

Concentration (mg/ml)	Absorbance	
	Naringine	Diclofénac
0.00	0.523	0.523
1	2.093	2.868
0.5	1.349	1.752
0.25	0.887	1.153
0.125	0.759	0.925
0.0625	0.758	0.832
0.03125	0.582	0.774
0.01563	0.553	0.766

0.00781	0.553	0.745
0.00391	0.549	0.725
0.00195	0.542	0.71
0.00098	0.537	0.703
0.00049	0.534	0.702

On peut observer que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration de naringine et de diclofénac. On peut utiliser ces données pour tracer des courbes de régression et déterminer des différents paramètres en utilisant l'absorbance mesurée.

I.2.3.1. Activités inhibitrices de sérum albumine bovine (IC₅₀) :

D'après les données de l'interaction de la naringine avec la BSA, l'activité inhibitrice de la BSA peut être exprimée en termes de concentration inhibitrice médiane (IC₅₀), qui correspond à la concentration de naringine nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de la BSA (Tableau 19). Cette valeur peut être déterminée en traçant un graphique de la concentration de naringine en fonction de pourcentage d'inhibition de BSA (Figure 36) et en trouvant la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition.

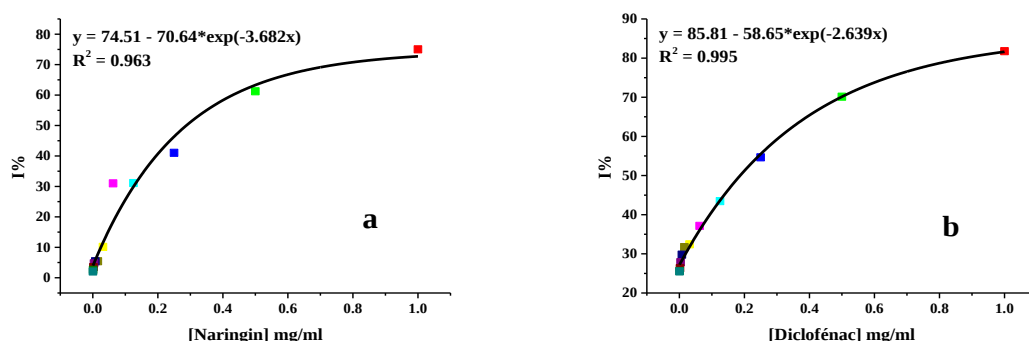


Figure 36 : Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Diclofénac (b)

Tableau 19: Activité de naringine et Diclofénac par le test anti-inflammatoire.

Concentration (mg/ml)	Inhibition %	
	Naringine	Diclofénac
1	75.01	81.75
0.5	61.23	70.14
0.25	41.03	54.64
0.125	31.09	43.45
0.0625	31.00	37.13
0.03125	10.13	32.42
0.01563	5.42	31.72
0.00781	5.42	29.79
0.00391	4.73	27.86
0.00195	3.50	26.33
0.00098	2.60	25.60
0.00049	2.05	25.49
	IC₅₀ = 0.2876 mg/ml	IC₅₀ = 0.1869 mg/ml

Le tableau montre les activités inhibitrices (pourcentage d'inhibition) de naringine et du diclofénac sur le sérum albumine bovine à différentes concentrations. Les valeurs IC₅₀, qui indiquent la concentration de l'inhibiteur qui inhibe 50% de l'activité de l'enzyme, ont été trouvées à 0.2876 mg/ml pour la naringine et à 0.1869 mg/ml pour le diclofénac. Ces valeurs suggèrent que le diclofénac est un inhibiteur plus puissant de la sérum albumine bovine par rapport à la naringine. À une concentration de 1 mg/ml, la naringine a inhibé 75.01% de l'activité de l'enzyme, tandis que le diclofénac a inhibé 81.75% de l'activité de l'enzyme. À mesure que la concentration des deux inhibiteurs diminuait, le pourcentage d'inhibition diminuait également, indiquant un effet inhibiteur dépendant de la concentration. Ces résultats suggèrent que la naringine peut avoir un potentiel anti-inflammatoire, tout comme le diclofénac, mais à des concentrations plus élevées.

I.2.3.2. Constantes de liaison :

La méthode spectrophotométrique d'interaction entre le naringine et le BSA a permis de déterminer la constante de liaison (K_b), exprimée en M^{-1} , en utilisant l'Équation 1 mentionnée précédemment. Les valeurs d'absorption de la solution de sérum albumine bovine ont diminué progressivement avec la diminution des concentrations de naringine et de diclofénac. En traçant

un graphique de $A/(A_0-A)$ en fonction de $1/C$ (Figure 37), la pente a été calculée comme $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)$ K_b et l'intersection "y" comme $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)$, où K_b représente le rapport de la pente sur l'intersection "y".

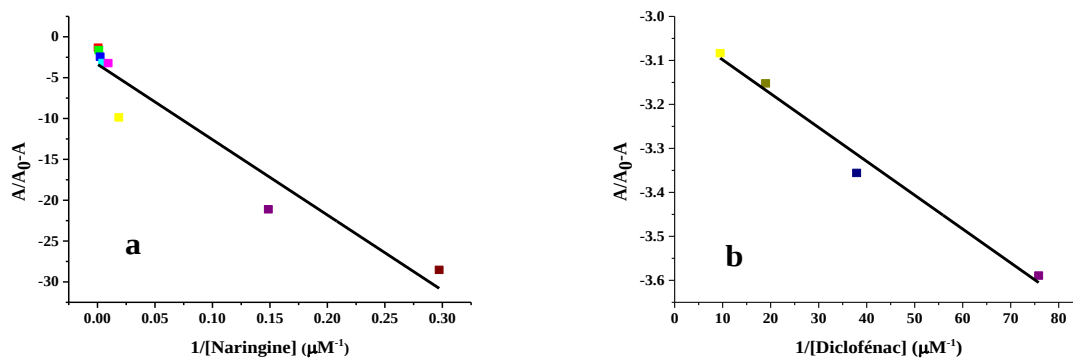


Figure 37 : Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringine]$ (a) et $1/[Diclofenac]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison

I.2.3.3. Énergie libre de liaison :

En utilisant l'Équation 5 mentionnée précédemment, nous avons pu calculer la variation de l'énergie libre de liaison. Les valeurs négatives de ΔG indiquent que l'interaction entre sérum albumine bovine et les composés étudiés est spontanée, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands. Les constantes de liaison et les énergies libres de liaison correspondantes sont résumées dans le Tableau 20.

Tableau 20: Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Diclofenac avec le sérum albumine bovine calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R^2	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
Naringine_BSA	$y = -0.092x - 3.352$	0.915	3.63×10^4	26.03
Diclofenac_BSA	$y = -0.008x - 3.021$	0.976	3.93×10^5	31.94

Les données du tableau montrent les résultats des constantes de liaison et des énergies libres de liaison pour les adduits de naringine_BSA et de diclofenac_BSA. Les valeurs de R^2 , qui indiquent l'ajustement de la droite de régression aux données expérimentales, sont respectivement de 0.915 et 0.976, ce qui suggère une bonne corrélation entre les données expérimentales et les équations de liaison.

La constante de liaison (K) pour le naringine est de $3.63 \times 10^4 M^{-1}$, tandis que pour et de diclofenac elle est de $3.93 \times 10^5 M^{-1}$, indiquant une plus forte liaison entre diclofenac et BSA. Les énergies libres de liaison ($-\Delta G$) sont également plus élevées pour diclofenac (31.94 KJ/mol)

par rapport à naringine (26.03 kJ/mol), ce qui confirme une fois de plus une liaison plus forte entre diclofénac et BSA.

I.2.4. Évaluation de l'activité antibactérien :

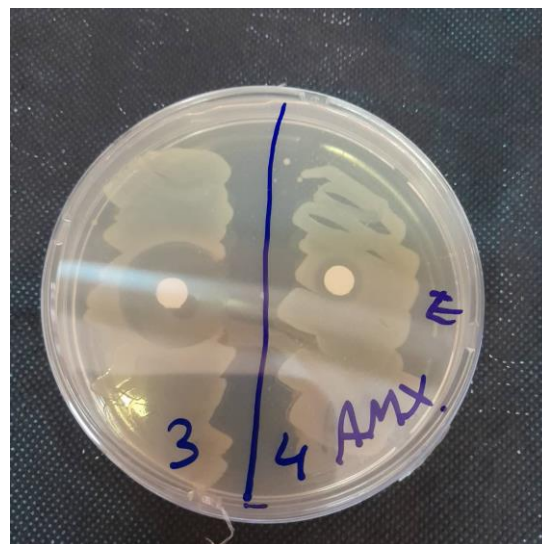
L'étude *in vitro* du pouvoir antimicrobien de naringine a été réalisée en utilisant la technique des disques de diffusion contre deux types de bactéries couramment rencontrées dans les infections, *Escherichia coli* (E. coli) et *Staphylococcus aureus* (S. aureus). Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne : la mesure de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de naringine, ainsi que la mesure de la densité optique de la suspension bactérienne après traitement avec différentes concentrations de naringine. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux de l'amoxicilline, un antibiotique couramment utilisé. Dans cette étude, nous présentons les résultats obtenus pour les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne de la naringine et leur comparaison avec l'amoxicilline.

I.2.4.1. Détermination du diamètre de la zone d'inhibition :

Après une incubation de 24 heures à 37°C, les zones d'inhibition entourant les disques imprégnés de naringine et d'amoxicilline ont été mesurées. Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne de naringine et d'amoxicilline contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont présentées ci-dessous (Figure 38). Les zones d'inhibition sont caractérisées par des zones claires dépourvues de croissance bactérienne autour des disques.



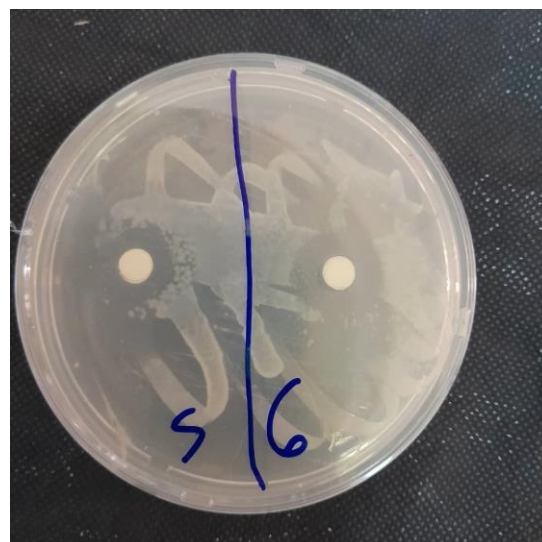
Zone d'inhibition de la naringine contre E. coli



Zone d'inhibition de l'amoxicilline contre E. coli



Zone d'inhibition de naringine contre S. aureus



Zone d'inhibition de l'amoxicilline contre S. aureus

Figure 38 : Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la naringine et l'amoxicilline contre E.coli et S.aureus sont résumés dans le [Tableau 21](#) suivant :

Tableau 21: Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre E. coli et S. aureus

Antibiotique	Bactérie	Diamètre de zone (mm)
Naringine	Escherichia coli	18.5
Amoxicilline	Escherichia coli	23.1
Naringine	Staphylococcus aureus	10.9
Amoxicilline	Staphylococcus aureus	20.2

Les résultats montrent que l'amoxicilline a un effet antimicrobien plus important que la naringine, avec des zones d'inhibition plus grandes pour les deux types de bactéries testées. Cependant, la naringine montre tout de même une activité antibactérienne significative, avec des zones d'inhibition de 10.9 à 18.5 mm contre E. coli et S. aureus.

1.2.4.2. Activités inhibitrices des bactéries (IC₅₀) :

L'activité antibactérienne de la naringine a été étudiée en utilisant la méthode de mesure de l'absorbance pour calculer l'IC₅₀. Cette méthode est basée sur la mesure de la croissance bactérienne dans des puits contenant différentes concentrations de naringine. Les résultats

obtenus ont permis de déterminer la concentration minimale de naringine nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne à 50 %.

Pour cela, des cultures de *E. coli* et de *S. aureus* ont été incubées avec différentes concentrations de naringine et d'amoxicilline allant de 1 à 17 mg/ml pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, la densité optique de chaque échantillon a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont résumés dans le [Tableau 22](#) suivants :

Tableau 22: Valeurs des absorbances triées à partir du test antibactérien

Naringine			Amoxicilline		
C (mg/ml)	D.O.		C (mg/ml)	D.O.	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0	2.742	2.742	0	2.742	2.742
1	2.439	2.308	0.01	2.117	1.954
2	2.351	2.222	0.02	1.718	1.816
3	2.333	2.219	0.04	1.658	1.626
4	2.256	2.028	0.08	1.103	1.389
5	2.169	2.026	0.16	0.828	1.344
6	2.153	2.018	0.31	0.677	0.868
7	2.144	1.923	0.63	0.638	0.21
8	2.133	1.916	1.25	0.395	0.197
9	2.103	1.841			
10	2.098	1.713			
11	2.07	1.659			
12	2.032	1.408			
13	1.981	1.228			
14	1.74	1.219			
15	1.684	1.158			

Ce tableau présente les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de la naringine et de l'amoxicilline contre *E. coli* et *S. aureus* en utilisant la méthode de mesure de l'absorbance. Les résultats montrent que les densités optiques diminuent progressivement avec l'augmentation de la concentration de naringine ou d'amoxicilline, ce qui indique une réduction de la croissance bactérienne. Les valeurs de l'IC₅₀, qui représentent la concentration de naringine ou d'amoxicilline nécessaire pour inhiber 50% de la croissance bactérienne, ont été calculées à

partir de ces données en traçant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des composés testés (Figure 39), les valeurs des IC₅₀ obtenu sont présenté dans le Tableau 23.

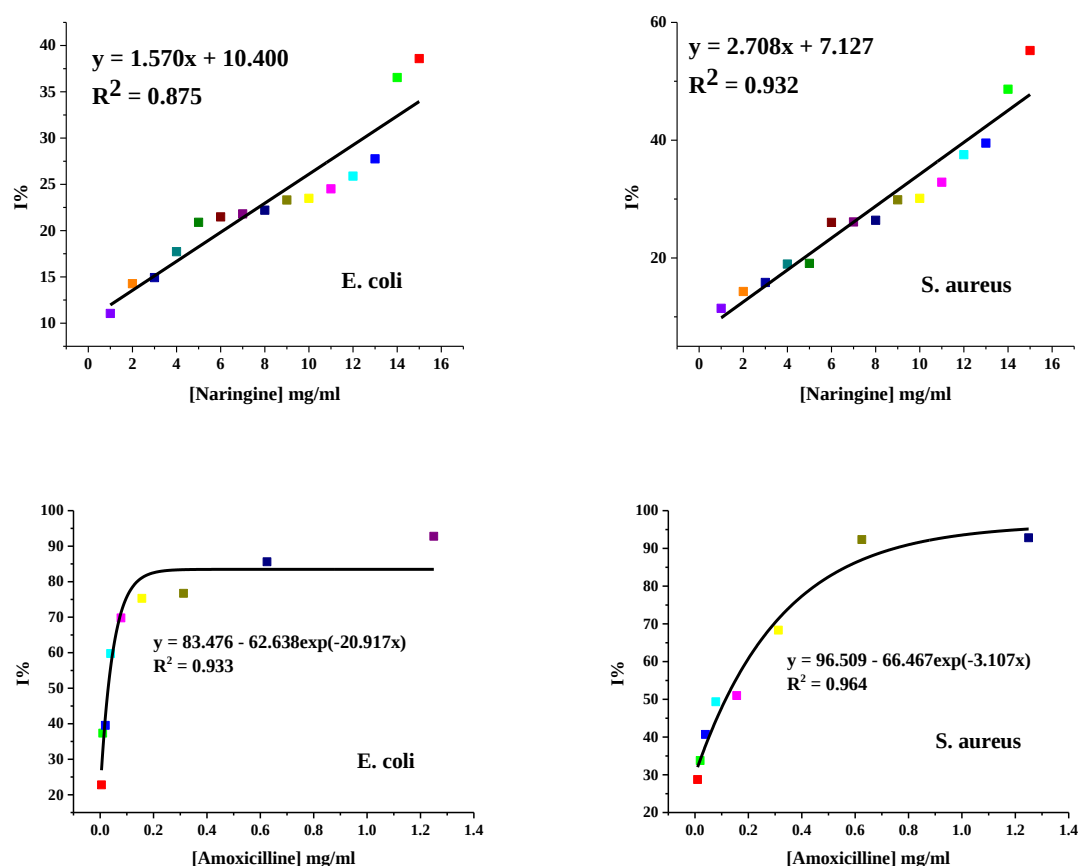


Figure 39 : Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en Fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline

Tableau 23: Activité antibactérien de naringine et amoxicilline par le test d'inhibition de *E. coli* et *S. aureus*

Naringine		Amoxicilline	
I% (<i>E. coli</i>)	I% <i>S. aureus</i>	I% <i>E. coli</i>	I% <i>S. aureus</i>
11.050	11.451	22.794	28.738
14.260	14.296	37.345	33.771
14.916	15.828	39.533	40.700
17.724	18.964	59.774	49.344
20.897	19.074	69.803	50.985
21.481	26.039	75.310	68.344
21.809	26.112	76.732	92.341

22.210	26.404	85.594	92.815
23.304	29.869	IC ₅₀ = 0.059 mg/ml	IC ₅₀ = 0.115 mg/ml
23.487	30.124		
24.508	32.859		
25.894	37.527		
27.753	39.497		
36.543	48.651		
38.585	55.215		
IC ₅₀ = 5.25 mg/ml	IC ₅₀ = 6.18 mg/ml		

Les résultats présentent les inhibitions de la croissance de bactéries *E. coli* et *S. aureus* en présence de naringine et d'amoxicilline. Les résultats montrent que l'efficacité de la naringine est relativement faible comparée à celle de l'amoxicilline, avec des IC₅₀ de 5.25 mg/ml et 6.18 mg/ml respectivement.

En ce qui concerne la naringine, les résultats montrent une inhibition de la croissance de bactéries allant jusqu'à 38.585 % pour *E. coli* et 55.21 % pour *S. aureus*, à la concentration la plus élevée testée (23.304 mg/ml). Cela suggère que la naringine peut avoir une certaine activité antimicrobienne, bien que cela nécessite des concentrations relativement élevées.

En revanche, les résultats de l'amoxicilline montrent une inhibition de la croissance bactérienne allant jusqu'à 92.81 % pour *S. aureus* et 85.594 % pour *E. coli* à la concentration la plus élevée testée (1.25 mg/ml). Cela confirme l'efficacité bien connue de l'amoxicilline en tant qu'antibiotique contre les infections bactériennes.

1.2.4.3. Constantes de liaison :

La méthode de mesure de l'absorption spectrophotométrique a été utilisée pour évaluer la constante de liaison (K_b) du naringine avec les deux types de bactérie. Cette constante a été exprimée en M^{-1} . Les concentrations décroissantes de naringine et d'amoxicilline ont entraîné une diminution progressive de l'absorption de la solution contenant la bactérie. En traçant un graphique de $A/(A_0-A)$ en fonction de $1/C$ (Figure 40), la pente a été calculée comme étant $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon) K_b$, où ε représente l'absorbance de la solution contenant le composé, et ε_0 l'absorbance de la solution de contrôle. L'intersection "y" a également été calculée comme étant $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)$. La constante de liaison a ensuite été obtenue en divisant la pente par l'intersection ($K_b = \text{pente}/\text{intersection}$).

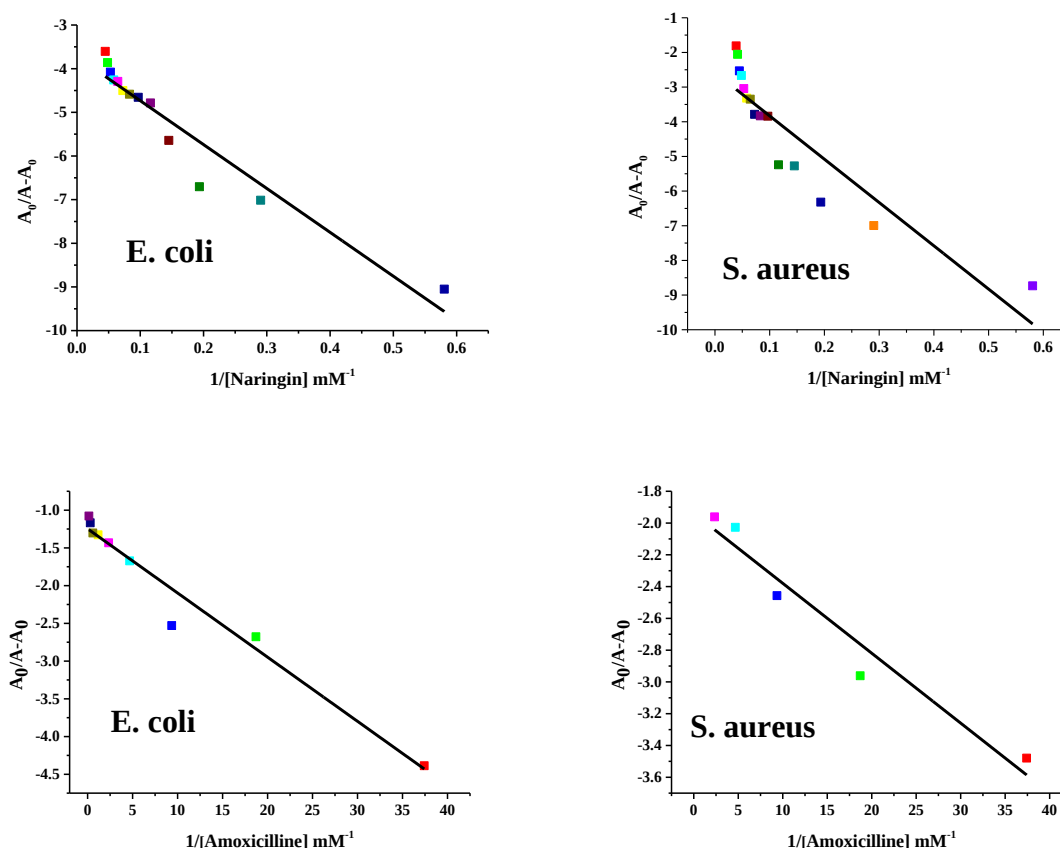


Figure 40 : Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ et $1/[\text{Amoxicilline}]$ utilisées pour calculer les constantes de liaison

I.2.4.4. Énergie libre de liaison :

En utilisant l'Équation 5, nous avons pu calculer la variation de l'énergie libre de liaison. Les valeurs négatives de ΔG indiquent que l'interaction entre les bactéries en question et les composés étudiés est spontanée, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands. Les constantes de liaison et les énergies libres de liaison correspondantes sont résumées dans le Tableau 24.

Tableau 24: Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Amoxicilline avec les deux types des bactéries calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R^2	$K (M^{-1})$	$-\Delta G (KJ.mol^{-1})$
Naringine_Escherichia coli	$y = -10.050x - 3.728$	0.918	3.70×10^5	31.79
Naringine_Staphylococcus aureus	$y = -28.854x - 1.224$	0.920	4.24×10^4	26.42
Amoxicilline_Escherichia coli	$y = -0.085x - 1.247$	0.962	1.46×10^4	23.78
Amoxicilline_Staphylococcus aureus	$y = -0.044x - 1.939$	0.933	4.40×10^4	26.51

Les résultats montrent que les valeurs de R^2 sont supérieures à 0.9 pour toutes les équations, indiquant une bonne corrélation entre les concentrations des composés et leur interaction avec les protéines. Les valeurs de K (constante de liaison) pour le naringine sont significativement plus élevées que pour l'amoxicilline, ce qui indique une forte liaison entre le naringine et les bactéries étudiées. De plus, les valeurs négatives de ΔG indiquent que l'interaction est spontanée et que la liaison entre les composés et les protéines est forte.

Il est intéressant de noter que la naringine présente une liaison plus forte avec les deux souches bactériennes étudiées, ce qui suggère qu'elle pourrait être un agent antibactérien potentiel. En revanche, l'amoxicilline montre une liaison plus faible avec les deux souches bactériennes, ce qui est cohérent avec le fait que cette molécule est un antibiotique couramment utilisé et que les bactéries peuvent développer une résistance à son action.

I.3. Évaluation *In Silico* des activités biologiques :

I.3.1. Prédiction des propriétés ADMET et la similitude médicamenteuse :

Dans la présente étude, nous avons évalué les propriétés ADME de naringine en utilisant l'outil web SwissADME. La naringine a été analysée afin d'étudier ses caractéristiques générales (Tableau 25), ses propriétés physico-chimiques (Tableau 26), ses caractéristiques de lipophilie et de solubilité dans l'eau (Tableau 27 et 28), ses paramètres pharmacocinétiques (Tableau 29), sa conformité aux règles de similarité aux médicaments et son score de biodisponibilité (Tableau 30) ainsi que ses propriétés de chimie médicinale (Tableau 31). Les résultats obtenus pour la naringine ont été comparés aux médicaments standards (Acarbose, Diclofénac et Amoxicilline).

Le Tableau 26 fournit des informations sur les propriétés physicochimiques des composés étudiés. Le nombre d'atomes lourds est utilisé pour évaluer la complexité moléculaire, où la naringine a un nombre d'atomes lourds de 41, comparativement à l'acarbose (44), au diclofénac (19) et à l'amoxicilline (25). Les composés aromatiques ont été évalués en comptant le nombre d'atomes aromatiques lourds, où la naringine et le diclofénac ont un nombre similaire de 12, tandis que l'acarbose et l'amoxicilline n'en ont pas. La fraction Csp3 indique le pourcentage de carbone sp3 dans la molécule, où l'acarbose a la plus grande fraction de 0.88. Le nombre de liaisons rotatives, les accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène, la réfractivité molaire et l'aire de surface totale polaire (TPSA) sont également des propriétés importantes pour évaluer les interactions moléculaires et la pharmacocinétique des composés. Les résultats montrent que la naringine a le plus grand nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène avec 14, tandis que l'acarbose a le plus grand nombre de donneurs de liaisons hydrogène avec 14. En ce qui

concerne la TPSA, l'acarbose a la plus grande surface totale polaire avec 329.01 Å². En conclusion, le Naringine se situe dans une plage intermédiaire en termes de taille, d'hydrophobicité, de flexibilité, de capacité de formation de liaisons hydrogène, de solubilité dans l'eau et de réfractivité molaire par rapport aux autres molécules testées. Son profil de propriétés moléculaires peut la rendre appropriée pour diverses applications, en fonction des besoins spécifiques de la recherche ou du développement de produits.

Les résultats du [Tableau 27](#) montrent que la naringine a une lipophilicité ([Daina, Michielin, and Zoete 2014](#)) modérée avec un iLOGP de 1.96, alors que l'acarbose et l'amoxicilline ont une faible lipophilicité avec des iLOGP de 0.17 et 0.95, respectivement. Le diclofénac, en revanche, est plus lipophile avec un iLOGP de 1.98. D'autres mesures de la lipophilicité sont également présentées, notamment XLOGP3 ([T. Cheng et al. 2007](#); [R. Wang, Fu, and Lai 1997](#)), WLOGP ([Ghose and Crippen 1986](#); [Ghose, Viswanadhan, and Wendoloski 1998](#)), MLOGP ([Moriguchi et al. 1992, 1994](#)), SILICOS-IT ([T. Cheng et al. 2007](#)) et Consensus Log Po/w ([Meylan and Howard 2000](#)). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la naringine est moins lipophile que le diclofénac, mais plus lipophile que l'acarbose et l'amoxicilline.

Le [Tableau 28](#) présente les prévisions de la solubilité des composés étudiés (Naringine, Acarbose, Diclofénac et Amoxicilline) utilisant trois méthodes différentes (ESOL ([Delaney 2004](#)), Ali ([Ali et al. 2012](#)) et SILICOS-IT ([Dascălu et al. 2020](#))). Les résultats montrent que la solubilité de la Naringine est prévue être faible selon les trois méthodes, tandis que la solubilité de l'Acarbose est prévue être élevée. La solubilité du Diclofénac est prévue être faible selon les méthodes ESOL et Ali, mais modérée selon SILICOS-IT, tandis que la solubilité de l'Amoxicilline est prévue être élevée selon les méthodes ESOL et Ali, mais faible selon SILICOS-IT. Il est important de noter que chaque méthode utilise un modèle différent pour prédire la solubilité, ce qui peut conduire à des résultats légèrement différents. Cependant, en général, ces prévisions de solubilité peuvent être utiles pour évaluer le potentiel d'absorption et de distribution des composés dans le corps ([Savjani, Gajjar, and Savjani 2012](#)).

Tableau 25: Caractéristiques générales des composés étudiées

Composés	Formule Chimique	Structure SMILES	Masse Moléculaire (g/mol)
Naringine	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	<chem>[H][C@@]1(O[C@@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](CO)O[C@H]2OC2=CC3=C(C(=O)C[C@H](O3)C3=CC=C(O)C=C3)C(O)=C2)O[C@@H](C)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	580.53
Acarbose	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	<chem>[H]C(=O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@]([H])(O[C@@]1([H])O[C@H](CO)[C@@]([H])(O[C@H]2O[C@H](C)[C@@H](N[C@@]3([H])C=C(CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]3O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H]1O)[C@H](O)CO</chem>	645.60
Diclofénac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	<chem>OC(=O)CC1=CC=CC=C1NC1=C(Cl)C=CC=C1Cl</chem>	296.15
Amoxicilline	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	<chem>[H][C@]12SC(C)(C)[C@@H](N1C(=O)[C@H]2NC(=O)[C@H](N)C1=CC=C(O)C=C1)C(O)=O</chem>	365.40

Tableau 26: Propriétés physico-chimiques des composés étudiées

Propriétés	Naringine	Acarbose	Diclofénac	Amoxicilline
Num. Atomes lourds	41	44	19	25
Num. arom. Atomes lourds	12	0	12	6
Fraction Csp ³	0.52	0.88	0.07	0.44
Num. Liaisons rotatives	6	13	4	5
Num. Accepteurs de liaisons hydrogène	14	19	2	6
Num. Donneurs de liaisons hydrogène	8	14	2	4
Réfractivité molaire	134.91	137.92	77.55	94.59
TPSA (Å ²)	225.06	329.01	49.33	158.26

Tableau 27: Caractéristiques de lipophilicité des composés étudiés

Propriétés	Naringine	Acarbose	Diclofénac	Amoxicilline
iLOGP	1.96	0.17	1.98	0.95
XLOGP3	-0.44	-8.82	4.40	-1.99
WLOGP	-1.49	-8.72	4.36	-0.68
MLOGP	-2.77	-7.45	3.84	0.23
SILICOS-IT	-1.64	-6.36	3.74	-0.45
Consensus Log Po/w	-0.87	-6.24	3.66	-0.39

Tableau 28: Caractéristiques de solubilité dans l'eau des composés étudiés

Composés	ESOL			Ali				SILICOS-IT				
	Log S (ESOL)	Solubilité		Class	Log S (Ali)	Solubilité		Class	Log S (SILICOS-IT)	Solubilité		Class
		mg/ml	mol/L				mg/ml	mol/L				mg/ml

Naringine	-2.98	6.04e-1	1.04e-3	S	-3.28	8.77e-2	1.51e-4	S	-0.49	1.87e+1	3.21e-1	S
Acarbose	2.57	2.41e+5	3.73e+2	HS	2.69	3.18e+5	4.92e2	HS	6.23	1.10e+9	1.71e6	S
Diclofénac	-4.65	6.61e-3	2.23e-5	MS	-5.15	2.8e-3	7.03e-6	MS	-5.97	3.20e-4	1.08e-6	MS
Amoxicilline	-0.70	7.30e+1	2.00e-1	HS	-0.81	5.66e+1	1.55e-1	VS	-1.62	8.67e+0	2.37e-2	S

S : Soluble, MS : Modérément Soluble, HS : Très Soluble, VS : Very Soluble

Tableau 29: Paramètres pharmacocinétiques des composés étudiés

Propriétés	Naringine	Acarbose	Diclofénac	Amoxicilline
GI absorption	Faible	Faible	Élevé	Faible
BBB perméant	No	No	Yes	No
P-gp substrat	Yes	Yes	No	No
CYP1A2 inhibitoire	No	No	Yes	No
CYP2C19 inhibitoire	No	No	Yes	No
CYP2C9 inhibitoire	No	No	Yes	No
CYP2D6 inhibitoire	No	No	Yes	No
CYP3A4 inhibitoire	No	No	No	No
Log Kp (Skin Perméation) (cm/s)	-10.15	-16.50	-4.98	-9.94

Tableau 30: Règle de druglikeness et score de biodisponibilité des composés étudiés

Propriétés	Naringine	Acarbose	Dicloféna c	Amoxicilline
Lipinski	No ; 3 violations : MW>500, N ou O>10, NH ou OH>5	No ; 3 violations : MW>500, N ou O>10, NH ou OH>5	Yes	Yes
Ghose	No; 4 violations: MW>480, WLOGP<-0.4, MR>130	No; 4 violations: MW>480, WLOGP<-0.4, MR>130	Yes	No; 1 violation: WLOGP<-0.4
Veber	No; 1 violation: TPSA>140	No; 1 violation: TPSA>140	Yes	No; 1 violation: TPSA>140
Egan	No; 1 violation: TPSA>131.6	No; 1 violation: TPSA>131.6	Yes	No; 1 violation: TPSA>131.6
Muegge	No; 3 violations: TPSA>150, H-acc>10, H-don>5	No; 4 violations: MW>600, TPSA>150, H-acc>10, H-don>5	Yes	No; 1 violation: TPSA>150
Bioavailability score	0.17	0.17	0.85	0.55

Tableau 31: Propriétés de chimie médicinale des composés étudiés

Propriétés	Naringine	Acarbose	Diclofénac	Amoxicilline
PAINS	0 alerte	0 alerte	0 alerte	0 alerte
Brenk	0 alerte	2 alertes: aldéhyde, alcène isolé	0 alerte	0 alerte
Leadlikeness	No; 1 violation: MW>350	No; 2 violations: MW>350, Rotors>7	No; 2 violations: XLOGP3>3.5	No; 1 violation: MW>350
Accessibilité de synthèse	6.16	7.25	2.23	4.17

Les résultats du [Tableau 29](#) montrent que la naringine a une faible absorption gastro-intestinale et est un substrat de la glycoprotéine-P, tandis que l'acarbose a une forte absorption gastro-intestinale et est un substrat de la glycoprotéine-P et le diclofénac a une forte absorption gastro-intestinale, peut traverser la barrière hémato-encéphalique et inhibe plusieurs isoformes de cytochrome P450. L'amoxicilline a une faible absorption gastro-intestinale et ne présente pas d'inhibition des isoformes de cytochrome P450. En somme, bien que la naringine présente certaines limites en termes de pharmacocinétique et de distribution tissulaire, ses propriétés distinctes par rapport aux autres composés peuvent être exploitées pour des applications thérapeutiques spécifiques.

Le [Tableau 30](#) présente différentes propriétés des composés étudiés : Naringine, Acarbose, Diclofénac et Amoxicilline. Les propriétés sont présentées dans différentes colonnes telles que la conformité avec la règle de Lipinski, la règle de Ghose, la règle de Veber, la règle d'Egan et la règle de Muegge. En outre, le tableau présente également le score de biodisponibilité pour chaque composé.

La règle de Lipinski énonce que les médicaments doivent respecter certains critères physico-chimiques tels que le poids moléculaire, le nombre d'atomes d'hydrogène accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène, le logP, pour être efficaces ([Lipinski 2004](#)). Dans ce tableau, on constate que Naringine et Acarbose ne sont pas conformes à la règle de Lipinski, car elles ont chacune trois violations, tandis que Diclofénac et Amoxicilline sont conformes à la règle de Lipinski.

La règle de Ghose est similaire à la règle de Lipinski, mais elle utilise une plage de poids moléculaire différente ([Ghose, Viswanadhan, and Wendoloski 1998](#)). Dans ce tableau, on constate que Naringine et Acarbose ne respectent pas non plus la règle de Ghose, tandis que Diclofénac et Amoxicilline la respectent.

La règle de Veber mesure la flexibilité moléculaire et évalue si une molécule est capable de se plier pour se lier à une enzyme cible ([Veber et al. 2002](#)). Dans ce tableau, on constate que Naringine, Acarbose, et Diclofénac ne respectent pas la règle de Veber, tandis qu'Amoxicilline la respecte.

La règle d'Egan et la règle de Muegge sont également utilisées pour évaluer la biodisponibilité d'un médicament en mesurant sa capacité à franchir les barrières biologiques ([Jia et al. 2020](#)). Dans ce tableau, Naringine et Acarbose respectent la règle d'Egan, tandis que Diclofénac et Amoxicilline ne la respectent pas. En ce qui concerne la règle de Muegge, Naringine ne la respecte pas, tandis qu'Acarbose, Diclofénac et Amoxicilline la respectent.

Enfin, le score de biodisponibilité indique la probabilité qu'un composé atteigne sa cible thérapeutique en quantités suffisantes pour être efficace (Gensemer and Playle 1999). Dans ce tableau, on constate que Diclofénac a le score de biodisponibilité le plus élevé, tandis que Naringine et Acarbose ont le score le plus faible.

En conclusion, la naringine présente certaines violations des règles de "drug-likeness", ce qui peut limiter sa probabilité de disponibilité en tant que médicament. Cependant, il est important de noter que ces règles sont des guides généraux et que d'autres facteurs peuvent influencer la faisabilité d'une molécule comme médicament, tels que son mécanisme d'action, son efficacité et sa sécurité.

Le [Tableau 31](#) montre que ces quatre molécules ne contiennent pas de motifs PAINS (compounds posing as inhibitors of nucleic acids) (Yang et al. 2021), ce qui est positif car cela indique que ces molécules sont peu susceptibles de causer des faux positifs lors des tests de criblage pour les inhibiteurs d'acides nucléiques.

Selon le test de Brenk (Ononamadu and Ibrahim 2021), Acarbose a deux alertes, tandis que les trois autres molécules n'en ont aucune. Cela peut être considéré comme un avertissement pour Acarbose et peut nécessiter une évaluation supplémentaire de sa toxicité potentielle.

Le test de Leadlikeness (Rishton 2003) indique que toutes les molécules présentent des violations, sauf Naringine. Cela peut être considéré comme un point positif pour Naringine car elle pourrait avoir un meilleur profil de toxicité que les autres molécules.

L'accessibilité de synthèse est également fournie pour chaque molécule, ce qui peut être utile pour évaluer la faisabilité de la synthèse de ces molécules en laboratoire.

L'étude de toxicité *in-silico* vise à aider à optimiser les composés en ce qui concerne leurs propriétés de toxicité. L'étude pourrait offrir une amélioration importante de la prise de conscience de la perspective complète du criblage virtuel pour l'identification de composés cibles avec une toxicité négligeable ou nulle. L'étude de toxicité *in silico* des composés Naringine, Acarbose, Diclofénac et Amoxicilline a été réalisée en utilisant le serveur web ProTox-II (Drwal et al. 2014). Elle vise à prédire l'hépatotoxicité (Dili), la cancérogénicité (Carcino), l'immunotoxicité (Immuno), la mutagénicité (Mutagen), la cytotoxicité (Cyto), la dose létale médiane (LD₅₀) et la classe de toxicité (TC).

Tableau 32: Les profils de toxicité in silico des composés étudiés

Molécules	Dili	Carcino	Immuno	Mutagen	Cyto	LD ₅₀ (mg. Kg ⁻¹)	TC
Naringine	Inactive	Inactive	Active	Inactive	Inactive	2300	5
Acarbose	Active	Inactive	Active	Inactive	Inactive	2000	4
Diclofénac	Active	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	53	3
Amoxicilline	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	15000	6

Les tests de toxicité dans le [Tableau 32](#) incluent le DILI (toxicité hépatique induite par les médicaments), le carcinogène (capacité à provoquer le cancer), l'immunotoxicité (capacité à affecter le système immunitaire), la mutagénicité (capacité à provoquer des mutations génétiques) et la cytotoxicité (capacité à tuer les cellules). Les résultats indiquent que la naringine est inactive pour tous les tests de toxicité sauf pour l'immunotoxicité, où elle est active. En revanche, l'acarbose est actif pour le DILI, l'immunotoxicité et la cytotoxicité, mais inactive pour le carcinogène et la mutagénicité. Le diclofénac est actif pour le DILI, mais est inactif pour les autres tests de toxicité, tandis que l'amoxicilline est inactive pour tous les tests de toxicité.

I.3.2. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :

L'amarrage moléculaire est une méthode informatique qui permet de prédire l'interaction entre une molécule cible et un ligand potentiel ([Vijesh et al. 2013](#)). Cette méthode est couramment utilisée en chimie médicinale pour découvrir de nouveaux médicaments ou pour optimiser la conception de molécules existantes ([Hanane and Ahlam 2016](#)). Les résultats de l'amarrage moléculaire peuvent fournir des informations sur la force et la nature de l'interaction entre le ligand et la cible, ainsi que sur la conformation du complexe ligand-cible ([Pinzi and Rastelli 2019](#)). Dans cette étude, et afin de confirmer les résultats expérimentaux nous allons discuter des résultats obtenus par amarrage moléculaire pour différentes activités biologiques.

I.3.2.1. Évaluation de l'activité anti-cancéreux :

L'étude de l'affinité de liaison de la naringine à l'ADN et à la protéine BSA a été réalisée dans le cadre de l'évaluation de son activité anti-cancéreuse par amarrage moléculaire. Les résultats ont révélé une forte affinité de liaison de naringine à ces deux cibles, avec des énergies de liaison respectives de -26.16 et -27.08 kJ/mol et valeurs d'IC₅₀ de 25.95 et 17.69 µM ([Tableau 33](#)).

Tableau 33: Les paramètres de liaison obtenue par amarrage moléculaire de naringine avec l'ADN et le BSA

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
Naringine_ADN	Liaison Hydrogène	DA 12	2.74	26.16	25.95
		DA 10	2.68		
		DA 11	3.72		
		DC 12	2.84		
Naringine_BSA	Liaison Hydrogène	GLU 125	3.08	27.08	17.69
		THR 121	4.02		
		ASP 118	2.98		
		LYS 116	3.98		

Les résultats montrent que la naringine forme des liaisons hydrogène avec différentes bases nucléiques de l'ADN et différents acides aminés de BSA. Dans le cas de l'ADN, les liaisons hydrogène se forment avec les acides aminés DA12, DA10, DA11 et DC12, avec des distances allant de 2.68 à 3.72 Å et une énergie de liaison de -26.16 kJ/mol (Figure 28). Pour la liaison de la naringine avec la BSA, des liaisons hydrogène se forment avec les acides aminés GLU125, THR121, ASP118 et LYS116, avec des distances allant de 2.98 à 4.02 Å et une énergie de liaison de -27.08 kJ/mol (Figure 29).

Les IC₅₀ (concentration inhibitrice 50) mesurées sont de 25.95 μM pour l'ADN et de 17.69 μM pour la BSA, suggérant une forte affinité de la naringine pour ces cibles.

Les valeurs de distance des liaisons hydrogène observées dans les résultats de l'amarrage moléculaire sont importantes pour évaluer la force et la stabilité des interactions entre la naringine et les bases nucléiques et les acides aminés cibles. Une distance de liaison hydrogène appropriée, généralement inférieure à 3.5 Å, est essentielle pour garantir la stabilité de l'interaction (Hubbard and Haider 2010). Une distance trop courte peut entraîner une interaction trop forte et une déformation de la structure moléculaire, tandis qu'une distance trop longue peut affaiblir l'interaction et compromettre la spécificité et la force de liaison (Perrin and Nielson 1997). Dans les résultats donnés, les distances de liaison hydrogène observées sont cohérentes avec les interactions de liaison hydrogène courantes entre les groupes fonctionnels de la naringine et les acides aminés cibles.

En ce qui concerne les acides aminés impliqués dans les interactions, il est intéressant de noter que différents types d'acides aminés sont impliqués dans les liaisons hydrogène formées avec la naringine. Par exemple, dans le cas de l'ADN, les bases nucléiques DA 12, DA 10, DA 11 et DC 12 appartiennent à différents types des bases nucléiques, ce qui suggère une diversité dans les interactions moléculaires entre la naringine et l'ADN. En ce qui concerne les types d'acides aminés impliqués dans les interactions moléculaires entre la naringine et le BSA, il est intéressant de noter que la naringine se lie à des acides aminés chargés (GLU et LYS) ainsi qu'à des acides aminés polaires non chargés (THR et ASP). Cela suggère que la naringine peut former des interactions moléculaires variées avec différents types d'acides aminés, ce qui peut contribuer à sa polyvalence dans la liaison à différentes cibles.

En conclusion, les valeurs de distance de liaison hydrogène et les types d'acides aminés impliqués dans les interactions entre la naringine et les cibles ADN et BSA sont des indicateurs importants de la nature et de la force des interactions moléculaires. Ils fournissent des informations clés pour comprendre la stabilité et la spécificité des complexes ligand-cible formés lors de l'amarrage moléculaire.

Les photographies de l'interaction hydrogène sont présentées dans la [Figure 41 et 42](#) suivantes :

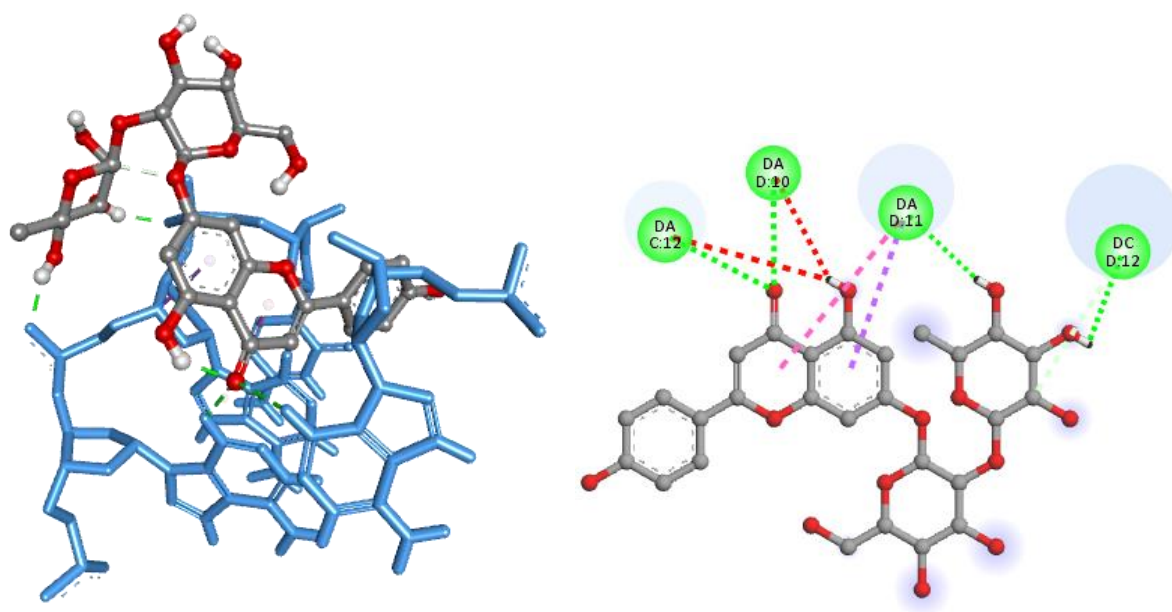


Figure 41 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe ADN

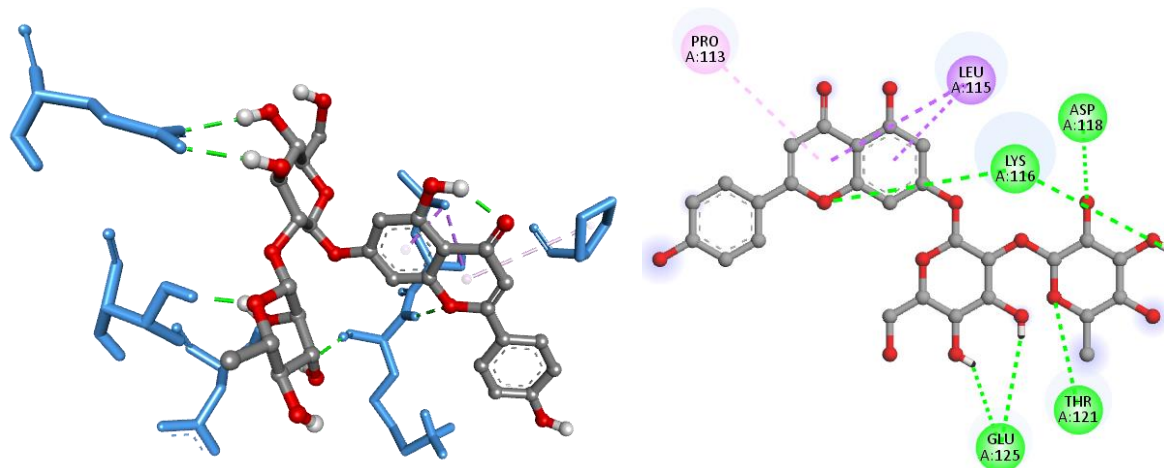


Figure 42 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe BSA

I.3.2.2. Évaluation de l'activité antidiabétique :

Le naringine a été amarré à l' α -amylase pancréatique humaine pour comprendre leurs interactions sur le site actif de l'enzyme. L'acarbose, un médicament antidiabétique de type 2 standard et inhibiteur de l' α -amylase, a également été amarré à l' α -amylase pour servir de témoin positif.

Les résultats présentés dans le [Tableau 34](#) montrent l'interaction des composés Naringine et Acarbose avec l' α -amylase pancréatique humaine par amarrage moléculaire. L'affinité de liaison et la concentration inhibitrice efficace pour l' α -amylase du naringine étaient mieux à celles de l'acarbose ($IC_{50} = 5.67$ M et $\Delta G = -29.92$ kJ/mol).

Tableau 34: Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et acarbose avec l' α -amylase

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	$-\Delta G$ (KJ.mol ⁻¹)	$IC_{50}(\mu M)$
Naringine_ α -amylase	Interaction Hydrophobique	TRP 59	3.48	29.92	5.67
		TYR 62	3.08		
		ASP 300	3.89		
	Liaison Hydrogène	TRP 59	3.72		
		GLN 63	2.51		
		ASP 197	4.09		
		GLU 233	2.85		
		HIS 299	2.79		
		ASP 300	4.10		

		HIS 305	2.64		
		ASP 356	4.01		
	π -Empilements	TYR 62	4.53		
	Ponts de sel	HIS 305	3.13		
Acarbose_ α-amylase	Liaison Hydrogène	GLN 63	2.63	25.12	39.14
		HIS 101	2.83		
		THR 163	3.38		
		ASP 197	2.96		
		GLU 233	3.61		

Pour Naringine, les résultats montrent des interactions hydrophobes avec TRP 59, TYR 62, et ASP 300 avec des distances de liaison de 3.48 Å, 3.08 Å et 3.89 Å respectivement. De plus, des liaisons hydrogène ont été observées avec TRP 59, GLN 63, ARG 195, GLU 233, HIS 299, ASP 300, HIS 305, et ASP 356, avec des distances de liaison allant de 2.51 Å à 4.10 Å. Des π -Empilements avec TYR 62 et un pont de sel avec HIS 305 ont également été identifiés. Les résultats montrent également une énergie de liaison de -29.92 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 5.67 μ M.

Pour Acarbose, des liaisons hydrogène ont été observées avec GLN 63, HIS 101, THR 163, ASP 197, et GLU 233, avec des distances de liaison allant de 2.63 Å à 3.61 Å. Les résultats montrent également une énergie de liaison de -25.12 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 39.14 μ M.

Les résultats suggèrent que les composés Naringine et Acarbose ont une forte affinité de liaison à l' α -amylase pancréatique humaine (HPA). En outre, la Naringine a montré une plus grande activité inhibitrice que l'Acarbose avec une concentration inhibitrice efficace de 5.67 μ M, contre 39.14 μ M pour l'Acarbose.

À partir des études portant sur la structure cristalline par diffraction des rayons X et la cinétique enzymatique de l' α -amylase pancréatique humaine, il a été constaté que le site actif de HPA se caractérise par la présence de trois acides aminés spécifiques, à savoir ASP-197, GLU-233 et ASP-300, qui contribuent de manière significative à l'action catalytique globale de l'enzyme dans le processus d'hydrolyse de l'amidon ([Anigboro et al. 2021](#)) L'acide aspartique 197 agit en tant que nucléophile catalytique lors de l'hydrolyse de l'amidon, le résidu d'acide glutamique 233 joue le rôle de catalyseur acide-base, tandis que l'acide aspartique 300 optimise l'orientation du substrat ([Anigboro et al. 2021](#)). Les résultats présentés dans le [Tableau 34](#) révèlent que le naringine interagis avec un ensemble similaire de résidus d'acides aminés au site

actif de la protéine. Le composé naringine, a montré une interaction avec les trois acides aminés clés impliqués dans la catalyse au site actif de HPA, tandis que l'acarbose a montré une interaction avec deux des triades catalytiques (GLU-233 et ASP-197). Cela pourrait indiquer que l'effet inhibiteur contribué par l'acarbose peut être celui d'une inhibition non compétitive (Blat 2010), tandis que celui de naringine, peut être celui d'un mode d'inhibition compétitive (Corsini, Maggi, and Catapano 1995). Dans l'ensemble, l'analyse *in-silico* de l'interaction ligand-protéine des composés étudiées avec les résidus d'acides aminés présents dans le domaine du site actif de l' α -amylase donne du crédit à l'effet inhibiteur des composés rapportés dans cette étude. De plus, elle confirme également la possibilité de l'interaction de liaison entre l' α -amylase et le naringine, qui a été observée en utilisant des méthodes spectroscopiques.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec l' α -amylase sont présenté dans la Figure 43 et 44 suivants :

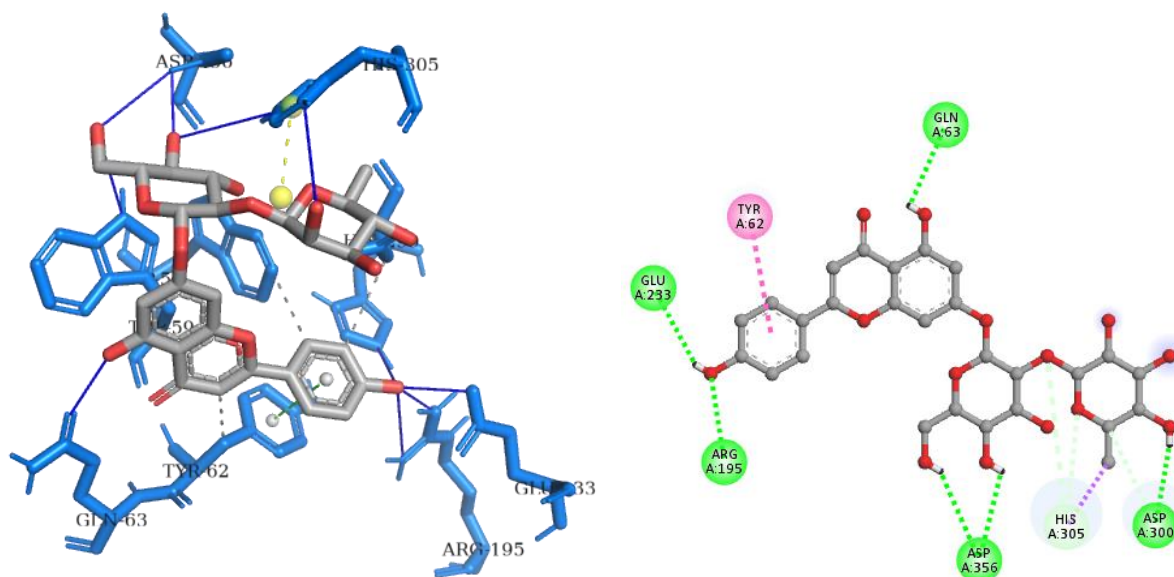


Figure 43 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l' α -amylase

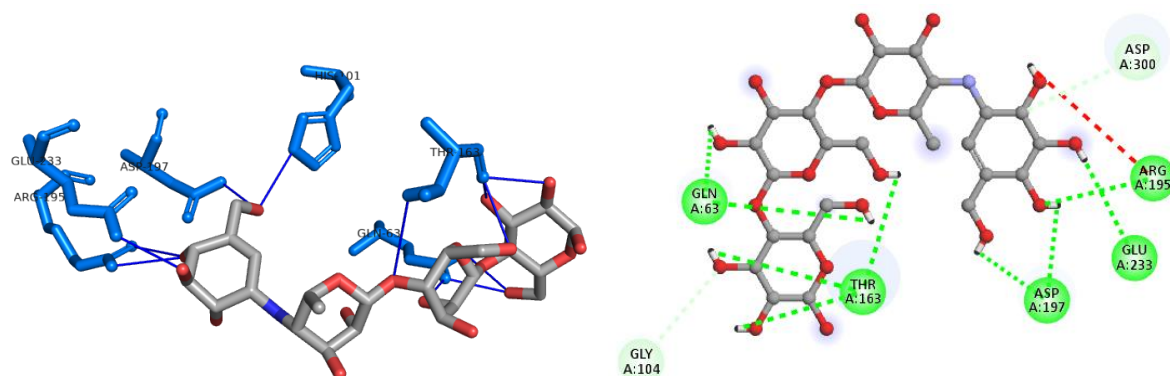


Figure 44 : Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase

I.3.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire :

Afin de confirmer les résultats expérimentaux obtenus, une étude *in-silico* par amarrage moléculaire a été réalisée sur la protéine responsable de l'inflammation, le cyclooxygénase-2 (COX-2). Le but de cette étude était de prédire les interactions moléculaires entre les composés d'intérêt et la COX-2, et d'évaluer leur potentiel anti-inflammatoire. En outre, une comparaison des résultats obtenus avec ceux du diclofénac, un médicament anti-inflammatoire couramment utilisé, a été réalisée.

Les résultats obtenus ont montré que le naringine présentait une forte affinité de liaison avec la COX-2, avec une énergie de liaison significative (-29.42KJ/mol). Ces résultats suggèrent que les composés peuvent avoir un potentiel anti-inflammatoire et peuvent servir de base pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Ces résultats suggèrent que le naringine pourraient avoir un potentiel anti-inflammatoire similaire à celui du diclofénac. Les détails des résultats d'interaction sont présentés dans le [Tableau 35](#) suivants :

Tableau 35: Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et diclofénac avec le cyclooxygénase-2

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
Naringine_cyclooxygénase-2	Interaction Hydrophobique	ASN 43	3.09	29.42	6.86
		ARG 44	3.73		
		PHE 64	3.23		
		TYR 122	3.22		
		PRO 542	3.82		
	Liaison Hydrogène	ASN 43	3.16		
		ARG 44	3.89		
		ARG 44	3.15		
		ARG 61	2.90		
		ILE 124	2.76		
		ASP 125	2.67		
		ASP 125	3.86		
		SER 126	2.87		
		GLN 370	3.16		
	π-Cation	ARG 44	2.24		

Diclofénac _cyclooxygénase-2	Interaction	GLN 370	3.72	31.97	2.48
	Hydrophobique	PHE 371	3.64		
	Liaison Hydrogène	SER 121	2.95		
		GLN 372	2.71		
	Ponts de sel	LYS 532	2.65		

Les résultats de l'étude de docking moléculaire montrent que la naringine présente une forte affinité de liaison avec le cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme impliquée dans l'inflammation. En effet, la naringine forme des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec plusieurs résidus clés de la COX-2, dont ASN 43, ARG 44, PHE 64, TYR 122 et PRO 542. De plus, la naringine forme une interaction π -cation avec le résidu ARG 44. Les valeurs de $-\Delta G$ obtenues pour la naringine sont également significatives (-29.42 kJ/mol), ce qui suggère une forte affinité de la molécule pour la COX-2. Comparé au diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien couramment utilisé, la naringine présente des affinités de liaison similaires avec la COX-2, avec des valeurs de $-\Delta G$ comparables. Cependant, les valeurs d'IC₅₀ sont plus élevées pour la naringine (6.86 μ M) que pour le diclofénac (2.48 μ M), indiquant une activité anti-inflammatoire légèrement inférieure.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec le diclofénac sont présentées dans la Figure 45 et 46 suivants :

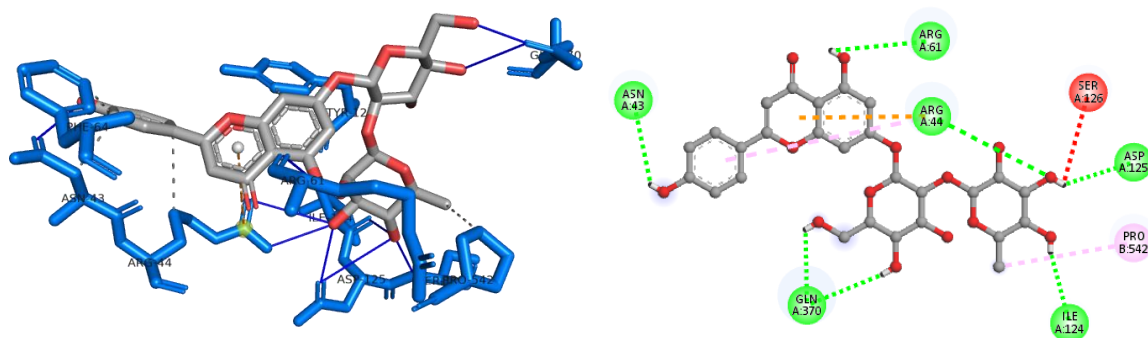


Figure 45 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le cyclooxygénase-2

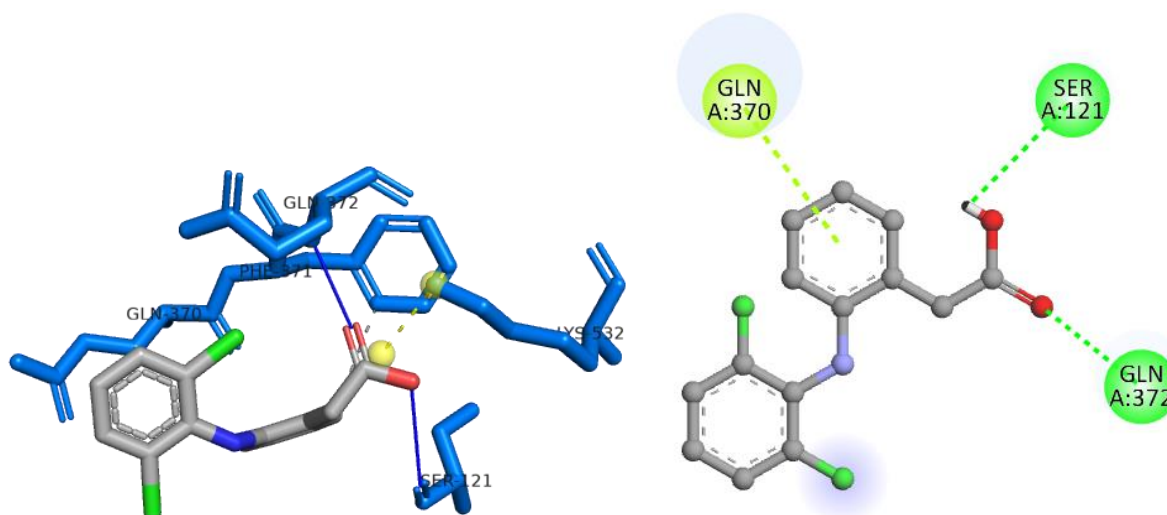


Figure 46 : Présentation 2D et 3D du ligand diclofénac avec le cyclooxygénase-2

I.3.2.4. Évaluation de l'activité antibactérien :

Afin de confirmer l'activité antibactérienne expérimentalement mesurée contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, une étude *in-silico* par amarrage moléculaire a été réalisée sur les protéines des bactéries en question. L'objectif de cette étude était de prédire les interactions moléculaires entre le composé d'intérêt et les bactéries étudiés, et d'évaluer leur potentiel antibactérien en utilisant le logiciel AutoDock. En outre, une comparaison des résultats obtenus avec l'amoxicilline, un antibiotique communément utilisé, a été effectuée.

Les résultats ont montré que l'amoxicilline avait une forte affinité de liaison contre le *staphylococcus*, avec une énergie de liaison significative (-27.21 KJ/mol). De plus, le naringine a également montré une affinité de liaison élevée avec l'*E. coli*, avec une énergie de liaison de -28.34 KJ/mol. Ces résultats suggèrent que le composé pourrait avoir un potentiel antibactérien similaire ou mieux à celui de l'amoxicilline et peuvent servir de base pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Les détails des résultats d'interaction sont présentés dans le [Tableau 36](#) suivants :

Tableau 36: Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et amoxicilline avec l'*E. coli* et le *S. aureus* cyclooxygénase-2

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
Naringine_ <i>Escherichia coli</i>	Interaction	ASN 46	3.93	28.34	10.74
	Hydrophobique	ARG 76	3.40		
		ILE 78	3.96		

	Liaison Hydrogène	ASN 46 ASP 49 ASP 49 GLU 50 GLU 50 ASP 73 ARG 76 GLY 77 THR 165	3.43 2.75 4.08 2.58 2.84 3.66 3.06 2.96 3.48		
	π -Cation	ARG 76	3.86		
Amoxicilline_Escherichia coli	Interaction Hydrophobique	ASP 49 GLU 50 ILE 78	3.24 3.38 3.36	20.06	303.54
	Liaison Hydrogène	ASN 46 ASN 46 ASP 49 ASP 9 GLU 50 ARG 76	2.63 3.01 2.56 3.43 2.75 2.85		
	Ponts de sel	ARG 76	5.42		
Naringine_Staphylococcus aureus	Interaction Hydrophobique	THR 165 LYS 197	3.50 3.17	27.04	15.51
	Liaison Hydrogène	TYR 37 TYR 37 GLN 38 GLY 86 THR 164 TYR 216 ASN 242 ASP 244	4.03 4.03 3.87 3.85 2.68 2.89 2.97 3.02		
	π -Cation	LYS 197	4.74		
Amoxicilline_Staphylococcus aureus	Interaction Hydrophobique	TYR 37	3.37	27.21	18.11

Liaison Hydrogène	GLN 38	3.91		
	VAL 87	3.58		
	THR 198	3.10		
	THR 198	3.04		
	TYR 216	2.71		
	TYR 216	2.74		
	GLN 218	4.05		
	GLN 218	2.68		
	ASN 242	3.69		
	ASP 244	2.71		
π -Empilement	TYR 216	5.12		

Pour l'adduit de naringine avec la protéine de l'*Escherichia coli*, les interactions hydrophobes ont été observées avec l'ASN 46, l'ARG 76 et l'ILE 78, ainsi que des liaisons hydrogène avec l'ASN 46, l'ASP 49, le GLU 50, l'ASP 73, l'ARG 76, le GLY 77 et le THR 165. De plus, une interaction π -cation a été observée avec l'ARG 76. Pour l'amoxicilline avec *E. coli*, les interactions hydrophobes ont été observées avec l'ASP 49, le GLU 50 et l'ILE 78, ainsi que des liaisons hydrogène avec l'ASN 46, l'ASP 9, le GLU 50 et l'ARG 76. De plus, une interaction par pont de sel a été observée avec l'ARG 76.

Pour *Staphylococcus aureus*, l'adduit de naringine a montré des interactions hydrophobes avec le THR 165 et le LYS 197, ainsi que des liaisons hydrogène avec le TYR 37, le GLN 38, le GLY 86, le THR 164, le TYR 216, l'ASN 242 et l'ASP 244. De plus, une interaction π -cation a été observée avec le LYS 197. Pour l'amoxicilline, des interactions hydrophobes ont été observées avec le TYR 37, et des liaisons hydrogène avec le GLN 38, le VAL 87, le THR 198, le TYR 216, le GLN 218, l'ASN 242 et l'ASP 244. De plus, une interaction π -empilement a été observée avec le TYR 216.

L'IC₅₀ est un indicateur important de l'activité inhibitrice d'un composé sur une cible biologique. Dans les résultats présentés, on peut voir que le naringine et l'amoxicilline ont des valeurs d'IC₅₀ différentes pour chaque cible bactérienne. Le naringine présente une IC₅₀ plus faible pour *E. coli* que pour *S. aureus*, ce qui peut suggérer que ce composé a une activité antibactérienne plus forte contre *E. coli* que contre *S. aureus*. De même, l'amoxicilline a une IC₅₀ plus faible pour *S. aureus* que pour *E. coli*, ce qui peut indiquer que ce composé est plus efficace contre *S. aureus* que contre *E. coli*. Cependant, il convient de noter que les résultats

obtenus par amarrage moléculaire sont en accorde avec ce qui obtient expérimentalement par la méthode spectroscopique.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec l' α -amylase sont présenté dans les Figures 47-50 suivants :

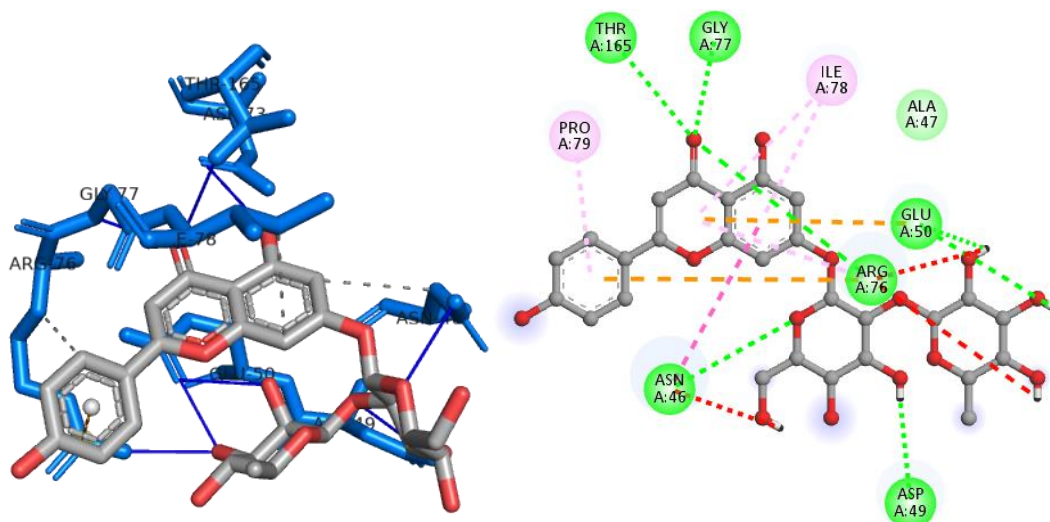


Figure 47 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli

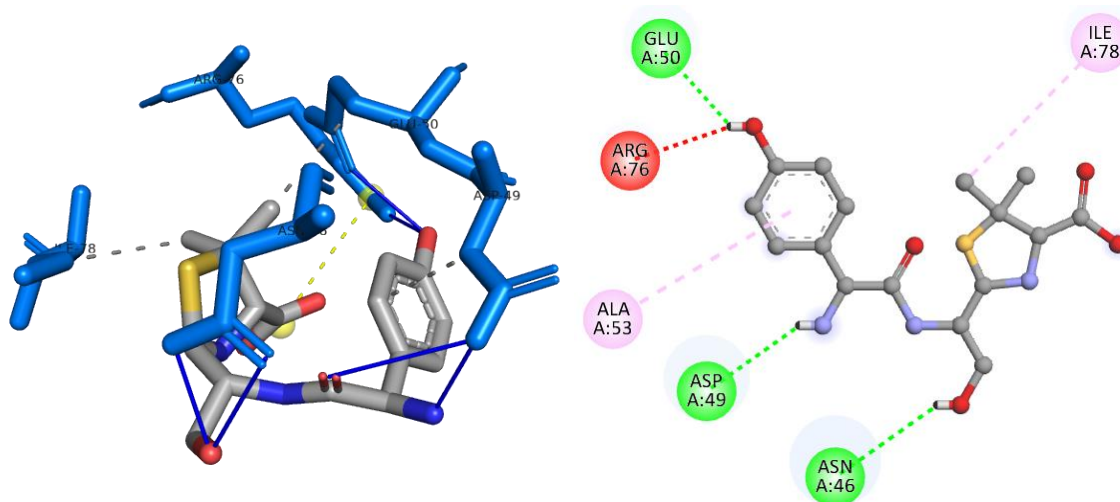


Figure 48 : Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli

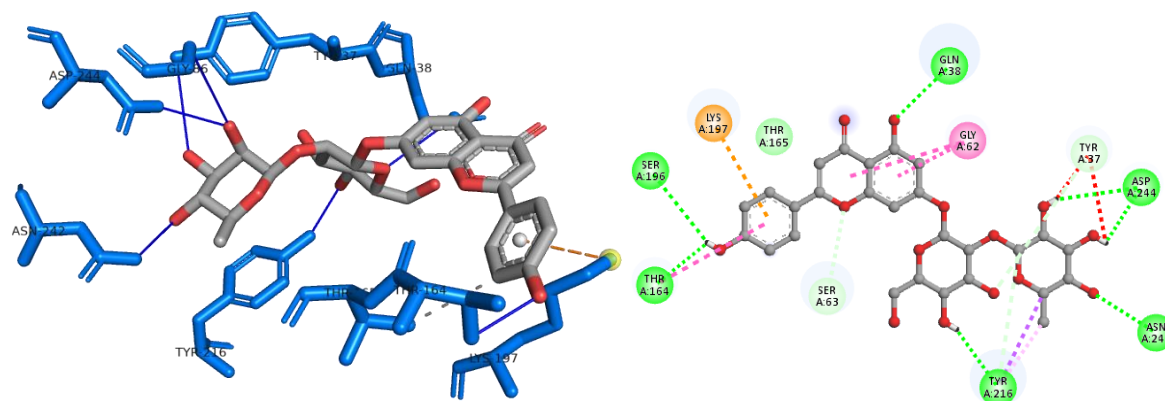


Figure 49 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le *S. aureus*

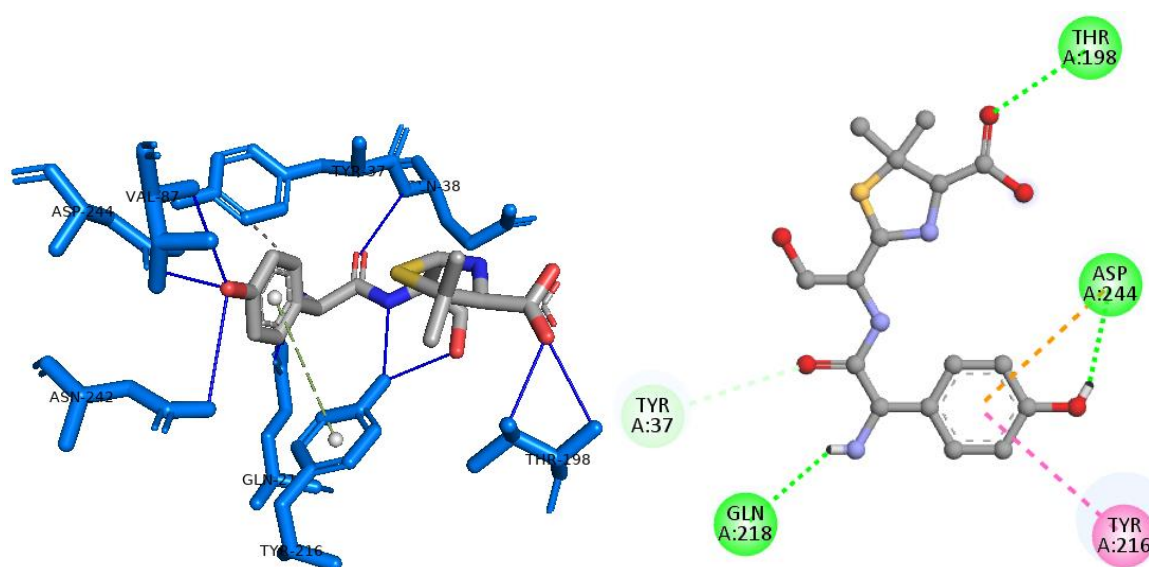


Figure 50 : Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le *S. aureus*

Le [Tableau 37](#) fournit une analyse comparative approfondie des valeurs d'énergie de liaison et d' IC_{50} obtenues par des approches expérimentales *in vitro* et par amarrage moléculaire *in-silico*, permettant ainsi d'évaluer la concordance entre les résultats obtenus par ces deux méthodes et d'apporter des informations importantes sur la validité et la fiabilité des simulations *in-silico* dans l'étude des interactions moléculaires.

Tableau 37: Comparaison des paramètres de liaison et d' IC_{50} pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire.

Technique Activités	UV-Vis			Amarrage moléculaire		
	IC_{50} (μM)	K (M^{-1})	$-\Delta G$ ($KJ.mol^{-1}$)	IC_{50} (μM)	K (M^{-1})	$-\Delta G$ ($KJ.mol^{-1}$)

Anti-cancéreux	ADN	Naringine	--	1.93×10^5	30.17	25.95	3.82×10^4	26.16
	BSA	Naringine	--	4.5×10^5	32.27	17.69	5.54×10^4	27.08
Antidiabétique	α -Amylase	Naringine	6.02	1.11×10^6	34.52	5.67	1.75×10^5	29.92
		Acarbose	14.86	1.06×10^5	28.69	39.14	2.51×10^4	25.12
Anti-inflammatoire	COX-2	Naringine	495.39	3.63×10^4	26.03	6.86	1.42×10^5	29.42
		Diclofénac	631.1	3.93×10^5	31.94	2.48	3.98×10^5	31.97
Antibactérien	E. coli	Naringine	9×10^3	3.70×10^5	31.79	10.74	9.21×10^4	28.34
		Amoxicilline	161.5	1.46×10^4	23.78	303.54	3.26×10^3	20.06
	S. aureus	Naringine	10×10^3	4.24×10^4	26.42	15.51	5.45×10^4	27.04
		Amoxicilline	314.7	4.40×10^4	26.51	18.11	5.84×10^4	27.21

La comparaison entre les résultats obtenus par les tests *in vitro* (UV-Vis) et *in-silico* (amarrage moléculaire) dans le [Tableau 37](#) peut fournir des informations intéressantes sur la corrélation entre les données expérimentales et les prédictions basées sur la modélisation moléculaire.

Dans le cas de la naringine, les résultats montrent que les valeurs d'IC₅₀ obtenues par les tests *in vitro* varient de 6.02 μ M à 10×10^3 μ M, tandis que les valeurs d'IC₅₀ prédites par l'amarrage moléculaire *in-silico* varient de 2.48 μ M à 3.03×10^2 μ M. On observe donc une différence notable entre les deux méthodes, avec des valeurs d'IC₅₀ généralement plus élevées obtenues par l'amarrage moléculaire *in-silico* par rapport aux tests *in vitro*.

De plus, les valeurs de K (constante de dissociation) et de ΔG (énergie libre de liaison) obtenues par l'amarrage moléculaire *in-silico* sont en bon accord avec celles mesurées par les tests *in vitro*. Cela peut s'expliquer par les bonnes approximations inhérentes à chaque méthode. Les tests *in vitro* peuvent prendre en compte des interactions complexes entre la molécule testée et les cibles biologiques dans un environnement biologique réel, mais ils peuvent également être influencés par des facteurs expérimentaux tels que la pureté des échantillons, les conditions de test et la variabilité biologique ([Tokatlı et al. 2015](#)). En revanche, l'amarrage moléculaire *in-silico* est basé sur des modèles mathématiques et des simulations informatiques ([Terstappen and Reggiani 2001](#)), ce qui peut entraîner des approximations et des simplifications dans la prédiction des interactions moléculaires.

Il est important de noter que les résultats obtenus par les tests *in vitro* et *in-silico* sont complémentaires et peuvent fournir des informations utiles dans la compréhension des propriétés pharmacologiques des molécules étudiées ([Di Ventura et al. 2006](#)). Les résultats

expérimentaux *in vitro* peuvent valider les prédictions *in-silico* et fournir des données plus proches des conditions biologiques réelles, tandis que l'amarrage moléculaire *in-silico* peut aider à la conception de nouvelles molécules et à la compréhension des interactions moléculaires à un niveau atomique (Trujillo-Correa et al. 2019).

I.3.3. Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire :

Parmi toutes les activités biologiques étudiées, la simulation de dynamique moléculaire (MDS) a été réalisée sur les résultats d'amarrage moléculaire de naringine avec l' α -amylase, car cette conformité est la plus stable et offre les meilleurs résultats en termes d'énergie de liaison. La simulation de dynamique moléculaire (MDS) a été employée pour obtenir des aperçus sur les caractéristiques structurales, la dynamique conformationnelle et la stabilité thermodynamique des complexes ligand-cible (Jacob K et al. 2017; Pandey et al. 2017). En particulier, les MDS dépendantes du temps de tous les atomes ont impliqué le calcul de champs de force intensifs pour chaque atome dans le système, suivi d'une étape d'intégration qui a fait avancer les positions et les propriétés dynamiques des atomes en se basant sur les lois classiques du mouvement. Cette approche nous a permis de découvrir les caractéristiques au niveau atomique des processus biomoléculaires, y compris l'évaluation de la stabilité de complexe protéine-ligand.

La meilleure pose de naringine_ α -amylase obtenue à partir des études d'amarrage moléculaire a été simulée pendant 1000 ps (Figure 51).

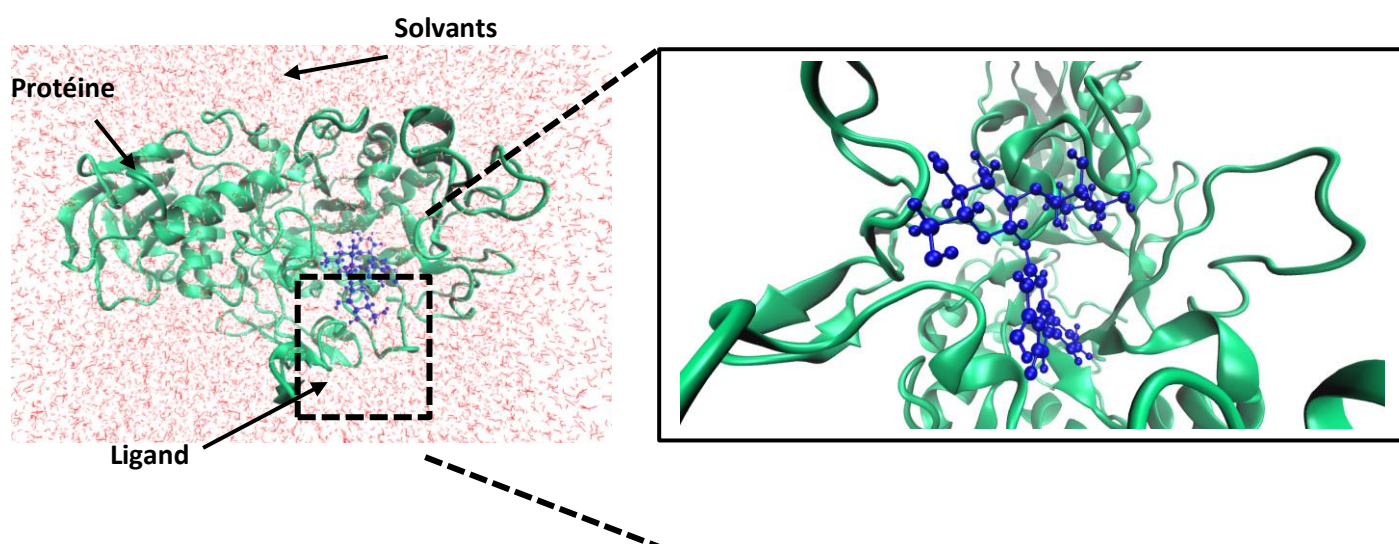


Figure 51 : Visualisation du complexe naringine_ α -amylase dans une boîte d'eau après la simulation de dynamique moléculaire.

À cette fin, nous avons effectué une analyse de stabilité de l'enzyme (α -amylase) et de complexe protéine-ligand (naringine_ α -amylase) en les incluant dans une boîte cubique à une température de 300 K maintenue computationnellement. Par la suite, une gamme d'analyses computationnelles ont été réalisées pour évaluer la stabilité thermodynamique de ces systèmes.

I.3.3.1. Root Mean Square Deviation (RMSD):

L'Écart Quadratique Moyen (EQM), communément appelé RMSD (Root Mean Square Deviation), est une mesure couramment utilisée pour évaluer la similitude entre les structures moléculaires (Sargsyan, Grauffel, and Lim 2017). Dans le cas des protéines, il est fréquemment utilisé pour mesurer les différences entre les positions des atomes du squelette de la protéine, entre sa conformation structurale initiale et sa position finale (Schreiner et al. 2012). Cette mesure permet d'évaluer la stabilité relative de la protéine par rapport à sa conformation en mesurant les écarts produits lors de sa simulation. Des écarts plus petits indiquent une structure protéique plus stable (Brüschweiler 2003). Pour évaluer la stabilité de l'ensemble des systèmes étudiés, la valeur de RMSD pour le squelette $C\alpha$ a été calculée sur une simulation de 1000 ps. La Figure 52 présente la courbe de RMSD pour le système considéré.

Le RMSD du complexe étudié a été bien équilibré, il augmente au début (60-100 ps) et ensuite il reste constant autour de 0.10-0.15 nm pendant la simulation de 100 ns sans différences significatives observées. De plus, on observe que la valeur de RMSD pour le ligand naringine est restée constamment inférieure à 0.15 nm tout au long de la simulation.

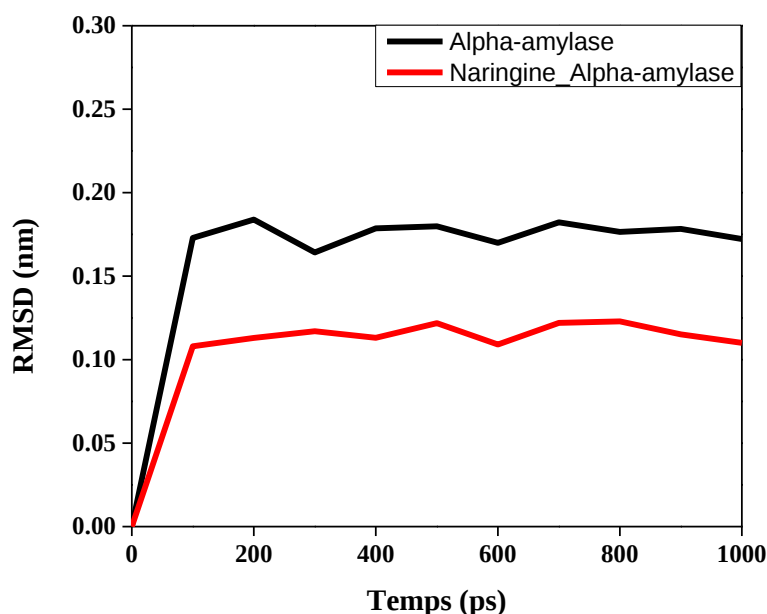


Figure 52 : RMSD du complexe naringine_ α -amylase et du α -amylase

I.3.3.2. Root Mean Square Fluctuation (RMSF) :

L'écart quadratique moyen des fluctuations (RMSF) est une mesure couramment utilisée pour caractériser la flexibilité des atomes dans une molécule (Sigtryggssdóttir et al. 2014). Cette mesure est particulièrement utile pour étudier les fluctuations des résidus d'une protéine sur une certaine période de temps (Damghani et al. 2020). Les valeurs élevées de RMSF sont généralement associées à une plus grande flexibilité des atomes, tandis que les valeurs faibles sont associées à une plus grande rigidité (Li et al. 2020). L'utilisation de l'RMSF est donc une méthode fiable pour déterminer les parties de la protéine qui sont les plus flexibles et qui pourraient avoir un impact sur la fonction de la protéine. De plus, l'RMSF peut fournir des informations importantes sur les processus dynamiques des protéines, en révélant des régions spécifiques de la protéine qui subissent des changements conformes significatifs (Y. Dong et al. 2018). En résumé, le RMSF est un outil essentiel pour l'analyse de la flexibilité protéique et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus biologiques. La Figure 53 présente la courbe de RMSD pour le système considéré.

Selon le tracé RMSF, le naringine a contacté 8 acides aminés de l'alpha-amylase pancréatique humaine, à savoir TRP 59, TYR 62, GLN 63, ARG 195, GLU 233, HIS 299, ASP 300, HIS 305. Les fluctuations majeures ont été observées dans les régions environ 100-200 et 350-450), qui sont positionnées à l'intérieur de site actif de l'enzyme. Les valeurs RMSF de tout résidus sont inférieures à 0.5 Å, ce qui indique que la conformation des résidus est relativement stable pendant la simulation.

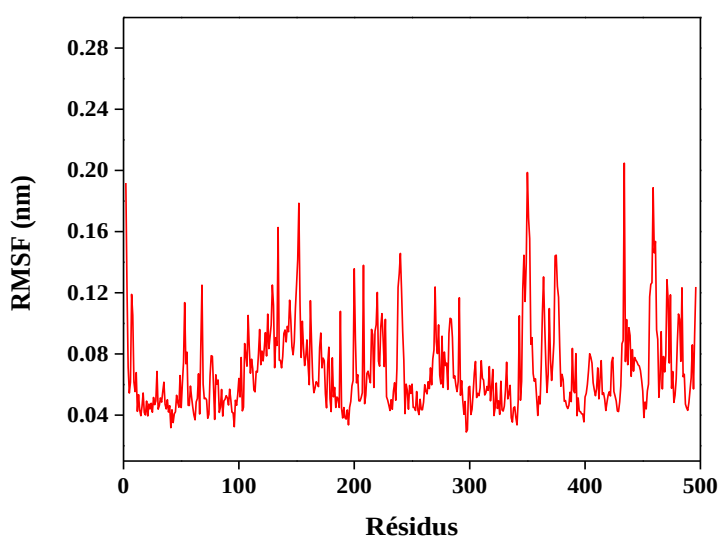


Figure 53 : RMSF du complexe naringine_ α -amylase

I.3.3.3. Liaisons hydrogène :

Le nombre de liaisons hydrogène a été calculé pour les 1000 picosecondes de la trajectoire pour le complexe prédits (naringine_ α -amylase). La prise en compte des propriétés de liaison hydrogène dans la conception de médicaments est importante en raison de leur forte influence sur la spécificité, la métabolisation et l'absorption des médicaments (Hubbard and Haider 2010). La Figure 54 montre que le complexe naringine_ α -amylase avait en moyenne cinq liaisons hydrogène.

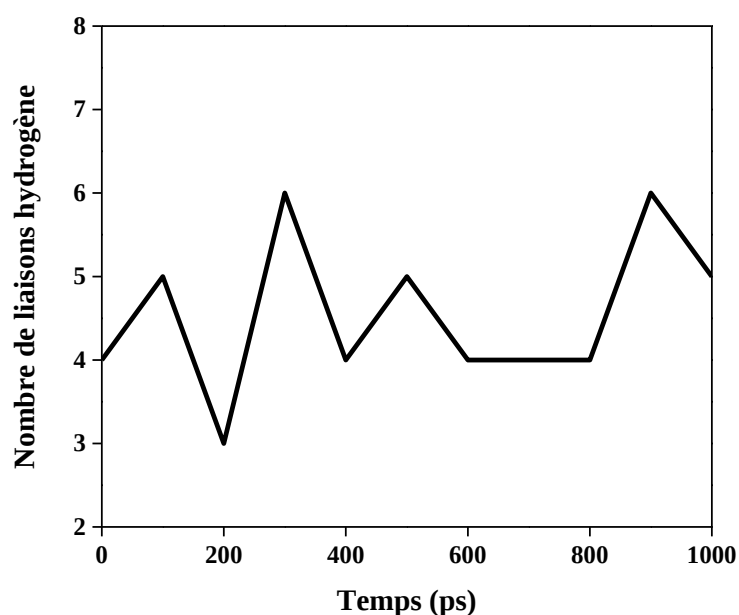


Figure 54 : Nombre moyen de liaisons hydrogène entre le naringine et l' α -amylase

Conclusion générale et perspective



Conclusion



I. Conclusion :

Ce mémoire a porté sur la caractérisation de la naringine, et son activité biologique *in vitro* ainsi que sa prédiction *in-silico* par amarrage moléculaire et dynamique moléculaire. Les résultats ont montré que la naringine possède plusieurs activités biologiques intéressantes, notamment anti-cancéreux, anti-diabétique, anti-inflammatoire et antibactérien, ce qui en fait un composé potentiellement utile pour la médecine et la pharmacologie.

Les tests *in vitro* ont révélé que la naringine a une activité anti-cancéreux significative contre les cellules cancéreuses du sein, du poumon et de la prostate. Elle a également montré une activité anti-diabétique importante en inhibant l'activité de l'amylase. L'activité anti-inflammatoire de la naringine a été observée avec la protéine BSA. De plus, la naringine a montré une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus*. Ces résultats suggèrent que la naringine a un potentiel thérapeutique important pour le traitement de diverses maladies.

Les tests *in-silico* par amarrage moléculaire et dynamique moléculaire ont confirmé les résultats des tests *in vitro* en montrant que la naringine se lie aux sites actifs de certaines enzymes impliquées dans le cancer, le diabète et l'inflammation. De plus, les simulations de dynamique moléculaire ont montré que les complexes ligand-protéine étaient stables pendant toute la durée de la simulation.

Les prévisions de toxicité ont montré que la naringine était peu toxique, ce qui renforce son potentiel en tant que composé thérapeutique. Les résultats de cette étude pourraient aider à orienter les recherches futures sur l'utilisation de la naringine en tant que médicament potentiel pour le traitement de diverses maladies.

II. Perspective :

Les résultats de cette étude ont ouvert de nouvelles perspectives de recherche sur l'utilisation de naringine pour le traitement de maladies telles que le cancer, le diabète, l'inflammation et les infections bactériennes. Des études complémentaires pourraient être menées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activité biologique de la naringine, notamment l'effet sur d'autres enzymes impliquées dans ces maladies.

En outre, l'étude de la structure de naringine pourrait être approfondie pour améliorer sa bioactivité en concevant des analogues de naringine plus efficaces. Les méthodes *in-silico* pourraient être utilisées pour prédire l'activité biologique de ces analogues avant leur synthèse

et leur test *in vitro*. Des études cliniques pourraient également être envisagées pour évaluer l'efficacité de la naringine chez l'homme et pour établir une dose thérapeutique optimale.

Enfin, étant donné que l'étude a également révélé des résultats prometteurs pour l'utilisation de la naringine comme agent antibactérien contre *E. coli* et *S. aureus*, il serait intéressant d'explorer davantage son potentiel en tant qu'agent antibactérien dans des modèles *in vivo*.

Références bibliographiques:

- Adisa, Rahmat A, Mohammed I Choudhary, and Olufunso O Olorunsogo. 2011.** “Hypoglycemic Activity of Buchholzia Coriacea (Capparaceae) Seeds in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats and Mice.” *Experimental and Toxicologic Pathology* 63(7): 619–25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299310000801>.
- Albert, Klaus, and Ernst Bayer. 1991.** “Characterization of Bonded Phases by Solid-State NMR Spectroscopy.” *Journal of Chromatography A* 544: 345–70.
- Ali, Jogoth et al. 2012.** “Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area.” *Journal of chemical information and modeling* 52(2): 420–28.
- Anigboro, Akpovwehwee A et al. 2021.** “Phytochemical Profile, Antioxidant, α -Amylase Inhibition, Binding Interaction and Docking Studies of Justicia Carnea Bioactive Compounds with α -Amylase.” *Biophysical Chemistry* 269: 106529.
- Barret, Roland. 2018.** *Principes Fondamentaux de Chimie Thérapeutique: Médicaments, Propriétés Physico-Chimiques, Prodrogues, Pharmacophore*. ISTE Group.
- Becke, A D. 1993.** “Density-Functional Thermochemistry. III The Role of Exact Exchange J Chem Phys 98: 5648–5652.”
- Begum, Robina et al. 2018.** “Applications of UV/Vis Spectroscopy in Characterization and Catalytic Activity of Noble Metal Nanoparticles Fabricated in Responsive Polymer Microgels: A Review.” *Critical reviews in analytical chemistry* 48(6): 503–16.
- Bitencourt-Ferreira, Gabriela, and Walter Filgueira de Azevedo. 2019.** “Molegro Virtual Docker for Docking.” *Docking screens for drug discovery*: 149–67.
- Blat, Yuval. 2010.** “Non-competitive Inhibition by Active Site Binders.” *Chemical Biology & Drug Design* 75(6): 535–40.
- Bo, Ye Yin et al. 2021.** “High-Purity DNA Extraction from Animal Tissue Using Picking in the TRIzol-Based Method.” *Biotechniques* 70(3): 186–90.

- Boskey, Adele L, and Richard Mendelsohn. 2005.** “Infrared Spectroscopic Characterization of Mineralized Tissues.” *Vibrational Spectroscopy* 38(1–2): 107–14.
- Brüschweiler, Rafael. 2003.** “Efficient RMSD Measures for the Comparison of Two Molecular Ensembles.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50(1): 26–34.
- Cáceres, Elena L, Matthew Tudor, and Alan C Cheng. 2020.** “Deep Learning Approaches in Predicting ADMET Properties.” *Future Medicinal Chemistry* 12(22): 1995–99.
- Castagna, Rossella et al. 2019.** “Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of Ketoprofen Drug from Water.” *ACS omega* 4(8): 13270–78.
- Chacon Cortes, Diego Fernando, and Lyn Griffiths. 2014.** “Methods for Extracting Genomic DNA from Whole Blood Samples: Current Perspectives.” *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2014(2): 1–9.
- Chang, John C S, and Zhishi Guo. 1992.** “Characterization of Organic Emissions from a Wood Finishing Product–Wood Stain.” *Indoor Air* 2(3): 146–53.
- Cheng, Feixiong et al. 2012.** “AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties.”
- Cheng, Tiejun et al. 2007.** “Computation of Octanol– Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge.” *Journal of chemical information and modeling* 47(6): 2140–48.
- Conway, R L, and L F Hood. 1976.** “Pancreatic Alpha Amylase Hydrolysis Products of Modified and Unmodified Tapioca Starches.” *Starch-Stärke* 28(10): 341–43.
- Cordenonsi, Leticia Malgarim et al. 2017.** “Study of Flavonoids Presente in Pomelo (Citrus Máxima) by DSC, UV-VIS, IR, 1H and 13C NMR and MS.” *Drug Analytical Research. Porto Alegre. Vol. 1, n. 1 (2017), p. 31-37.*
- Corsini, Alberto, Franco M Maggi, and Alberico L Catapano. 1995.** “Pharmacology of Competitive Inhibitors of HMG-CoA Reductase.” *Pharmacological research* 31(1): 9–27.
- Court, Robert, Lynda Chapman, Louise Fairall, and Daniela Rhodes. 2005.** “How the Human Telomeric Proteins TRF1 and TRF2 Recognize Telomeric DNA: A View from

- High-resolution Crystal Structures.” *EMBO reports* 6(1): 39–45.
- Daina, Antoine, Olivier Michielin, and Vincent Zoete. 2014.** “ILOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach.” *Journal of chemical information and modeling* 54(12): 3284–3301.
- . 2017. “SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules.” *Scientific reports* 7(1): 1–13.
- Damghani, Tahereh, Tahereh Sedghamiz, Shahrzad Sharifi, and Somayeh Pirhadi. 2020.** “Critical C-Met-Inhibitor Interactions Resolved from Molecular Dynamics Simulations of Different c-Met Complexes.” *Journal of Molecular Structure* 1203: 127456.
- Dascălu, Daniela et al. 2020.** “Solubility and ADMET Profiles of Short Oligomers of Lactic Acid.” *ADMET and DMPK* 8(4): 425–36.
- Decesari, Stefano, Maria Cristina Facchini, Sandro Fuzzi, and Emilio Tagliavini. 2000.** “Characterization of Water-soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosol: A New Approach.” *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105(D1): 1481–89.
- Delaney, John S. 2004.** “ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure.” *Journal of chemical information and computer sciences* 44(3): 1000–1005.
- DeLano, Warren L. 2002.** “Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool.” *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* 40(1): 82–92.
- Dong, Jie et al. 2018.** “ADMETlab: A Platform for Systematic ADMET Evaluation Based on a Comprehensively Collected ADMET Database.” *Journal of cheminformatics* 10: 1–11.
- Dong, Yun-wei, Ming-ling Liao, Xian-liang Meng, and George N Somero. 2018.** “Structural Flexibility and Protein Adaptation to Temperature: Molecular Dynamics Analysis of Malate Dehydrogenases of Marine Molluscs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(6): 1274–79.
- Drwal, Malgorzata N et al. 2014.** “ProTox: A Web Server for the in Silico Prediction of Rodent Oral Toxicity.” *Nucleic acids research* 42(W1): W53–58.
- Frisch, M J et al. 1988.** “Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004; C. Lee, W. Yang, RG Parr.”

- Phys. Rev. B* 37: 785.
- . 2009. Wallingford CT *Gaussian 09*. Wallingford, CT: Gaussian.
- Gaaib, Jawdat N, Adnan F Nassief, and A Al-Assi. 2011.** “Simple Salting-out Method for Genomic DNA Extraction from Whole Blood.” *Tikrit J Pure Sci* 16(2): 1662–1813.
- Ganta, Sai Sree Lasya, M Jeevitha, S Preetha, and S Rajeshkumar. 2020.** “Anti-Inflammatory Activity of Dried Ginger Mediated Iron Nanoparticles.” *Journal of Pharmaceutical Research International* 32(28): 14–19.
- Gensemer, Robert W, and Richard C Playle. 1999.** “The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments.” *Critical reviews in environmental science and technology* 29(4): 315–450.
- Ghosal, Kajal, Dipanwita Ghosh, and Sanjoy Kumar Das. 2018.** “Preparation and Evaluation of Naringin-Loaded Polycaprolactone Microspheres Based Oral Suspension Using Box-Behnken Design.” *Journal of Molecular Liquids* 256: 49–57.
- Ghose, Arup K, and Gordon M Crippen. 1986.** “Atomic Physicochemical Parameters for Three-dimensional Structure-directed Quantitative Structure-activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity.” *Journal of computational chemistry* 7(4): 565–77.
- Ghose, Arup K, Vellarkad N Viswanadhan, and John J Wendoloski. 1998.** “Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods.” *The Journal of Physical Chemistry A* 102(21): 3762–72.
- Giannuzzo, Amelia N, Héctor J Boggetti, Mónica A Nazareno, and Horacio T Mishima. 2003.** “Supercritical Fluid Extraction of Naringin from the Peel of Citrus Paradisi.” *Phytochemical Analysis* 14(4): 221–23.
- Gutyj, B et al. 2018.** “Preclinical Searches of the Preparation Thireomagnile.” *Ukrainian Journal of Ecology* 8(1): 688–95.
- Hanane, Bouanane, and Benloucif Ahlam. 2016.** “Approche Pour La Conception de Médicaments Assistée Par Ordinateur.”

- Hansson, Tomas, Chris Oostenbrink, and Wilfred F van Gunsteren. 2002.** “Molecular Dynamics Simulations.” *Current opinion in structural biology* 12(2): 190–96.
- Heckel, Reinhard, Ilan Shomorony, Kannan Ramchandran, and N C David. 2017.** “Fundamental Limits of DNA Storage Systems.” In *2017 IEEE International Symposium on Information Theory (ISIT)*, IEEE, 3130–34.
- Hirose, Keiji. 2001.** “A Practical Guide for the Determination of Binding Constants.” *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 39: 193–209.
- Howe, J R, D S Klimstra, and C Cordon-Cardo. 1997.** “DNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissues Using a Salting-out Procedure: A Reliable Method for PCR Amplification of Archival Material.” *Histology and histopathology* 12(3): 595–602.
- Huang, Jing, and Alexander D MacKerell Jr. 2013.** “CHARMM36 All-atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data.” *Journal of computational chemistry* 34(25): 2135–45.
- Hubbard, Roderick E, and Muhammad Kamran Haider. 2010.** “Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength.” *eLS*.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. 1996.** “VMD: Visual Molecular Dynamics.” *Journal of molecular graphics* 14(1): 33–38.
- Jablonský, M, J Kočíš, A Ház, and J Šima. 2015.** “Characterization and Comparison by UV Spectroscopy of Precipitated Lignins and Commercial Lignosulfonates.” *Cell. Chem. Technol* 49(3–4): 267–74.
- Jacob K, Sony et al. 2017.** “Homology Model, Molecular Dynamics Simulation and Novel Pyrazole Analogs Design of Candida Albicans CYP450 Lanosterol 14 α -Demethylase, a Target Enzyme for Antifungal Therapy.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35(7): 1446–63.
- Jakhar, Ritu, Mehak Dangi, Alka Khichi, and Anil K Chhillar. 2020.** “Relevance of Molecular Docking Studies in Drug Designing.” *Current Bioinformatics* 15(4): 270–78.
- Javanrouh, Ali, and Saber Jelokhani-niaraki. 2020.** “DNA Extraction from Chicken Blood Using a Modified Salting-out Method.” *Applied Animal Science Research Journal* 9(34): 3–10.

- Jia, Chen-Yang, Jing-Yi Li, Ge-Fei Hao, and Guang-Fu Yang. 2020.** “A Drug-Likeness Toolbox Facilitates ADMET Study in Drug Discovery.” *Drug discovery today* 25(1): 248–58.
- Jo, Sunhwan, Taehoon Kim, Vidyashankara G Iyer, and Wonpil Im. 2008.** “CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM.” *Journal of computational chemistry* 29(11): 1859–65.
- Kawashima, Yusuke et al. 2010.** “High-Yield Peptide-Extraction Method for the Discovery of Subnanomolar Biomarkers from Small Serum Samples.” *Journal of proteome research* 9(4): 1694–1705.
- Kerwin, Sean M. 2010.** “ChemBioOffice Ultra 2010 Suite.”
- Khennoufa, Ali et al. 2021.** “Spectrophotometric, Voltammetric and Molecular Docking Studies of Binding Interaction of N-Ferrocenylmethylnitroanilines with Bovine Serum Albumin.” *Journal of Molecular Structure* 1224: 129052.
- Klančnik, Anja, Saša Piskernik, Barbara Jeršek, and Sonja Smole Možina. 2010.** “Evaluation of Diffusion and Dilution Methods to Determine the Antibacterial Activity of Plant Extracts.” *Journal of microbiological methods* 81(2): 121–26.
- Lacombe, J et al. 2011.** “Intérêt Des Marqueurs Sanguins Dans La Prédiction de La Toxicité Radio-Induite.” *Cancer/Radiothérapie* 15(5): 390–93.
- LANEZ, Elhafnaoui.** “Synthèse, Caractérisation et Étude in Vitro et in Silico de l’activité Biologique de Quelques Dérivés Ferrocénylméthyl-Bases Nucléiques.”
- Lanez, Elhafnaoui, Lazhar Bechki, and Touhami Lanez. 2019.** “Computational Molecular Docking, Voltammetric and Spectroscopic DNA Interaction Studies of 9N-(Ferrocenylmethyl) Adenine.” *Chemistry & Chemical Technology, 1 (13), 2019 (1):* 11–17.
- Laraoui, Habiba et al. 2023.** “Anti-Diabetic Activity of Flavonol Glucosides From Fumana Montana Pomel: In Vitro Analysis, In Silico Docking, ADMET Prediction, and Molecular Dynamics Simulations.” *ChemistrySelect* 8(8): e202204512.
- Li, Dong-Dong et al. 2020.** “Molecular Dynamics Analysis of Binding Sites of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors.” *ACS omega* 5(26): 16307–14.

- Lipinski, Christopher A. 2000.** “Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability.” *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44(1): 235–49.
- . **2004.** “Lead-and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution.” *Drug discovery today: Technologies* 1(4): 337–41.
- Lipinski, Christopher A, Franco Lombardo, Beryl W Dominy, and Paul J Feeney. 1997.** “Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings.” *Advanced drug delivery reviews* 23(1–3): 3–25.
- López-Lorente, Ángela I, and Boris Mizaikoff. 2016.** “Recent Advances on the Characterization of Nanoparticles Using Infrared Spectroscopy.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 84: 97–106.
- Mannaert, E et al. 2005.** “Pharmacokinetic Profile of Long-Acting Injectable Risperidone at Steady-State: Comparison with Oral Administration.” *L’encephale* 31(5): 609–15.
- Meylan, William M, and Philip H Howard. 2000.** “Estimating Log P with Atom/Fragments and Water Solubility with Log P.” *Perspectives in drug discovery and design* 19(1): 67–84.
- Moriguchi, Ikuo et al. 1992.** “Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient.” *Chemical and pharmaceutical bulletin* 40(1): 127–30.
- Moriguchi, Ikuo, Shuichi Hirono, Izumi Nakagome, and Hiroyuki Hirano. 1994.** “Comparison of Reliability of Log P Values for Drugs Calculated by Several Methods.” *Chemical and pharmaceutical bulletin* 42(4): 976–78.
- Morris, Garrett M et al. 1998.** “Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function.” *Journal of computational chemistry* 19(14): 1639–62.
- . **2009.** “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.” *Journal of computational chemistry* 30(16): 2785–91.
- Morris, Garrett M, Ruth Huey, and Arthur J Olson. 2008.** “Using Autodock for Ligand-receptor Docking.” *Current protocols in bioinformatics* 24(1): 8–14.

- MWer, S, D Dykes, and H Polesky. 1988.** “A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells.” *Nucleic acids res* 16(3): 1215.
- Narramore, Sarah et al. 2019.** “New Insights into the Binding Mode of Pyridine-3-Carboxamide Inhibitors of E. Coli DNA Gyrase.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27(16): 3546–50.
- Nasiri, H, M Forouzandeh, M J Rasaee, and F Rahbarizadeh. 2005.** “Modified Salting-out Method: High-yield, High-quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent.” *Journal of clinical laboratory analysis* 19(6): 229–32.
- Ngamwonglumlert, Luxsika, Sakamon Devahastin, and Naphaporn Chiewchan. 2017.** “Natural Colorants: Pigment Stability and Extraction Yield Enhancement via Utilization of Appropriate Pretreatment and Extraction Methods.” *Critical reviews in food science and nutrition* 57(15): 3243–59.
- Ning, Jing et al. 2009.** “Different Influences of DNA Purity Indices and Quantity on PCR-Based DGGE and Functional Gene Microarray in Soil Microbial Community Study.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 983–93.
- Norinder, Ulf, and Christel A S Bergström. 2006.** “Prediction of ADMET Properties.” *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 1(9): 920–37.
- Ononamadu, Chimaobi, and Aminu Ibrahim. 2021.** “Molecular Docking and Prediction of ADME/Drug-Likeness Properties of Potentially Active Antidiabetic Compounds Isolated from Aqueous-Methanol Extracts of *Gymnema Sylvestre* and *Combretum Micranthum*.” *BioTechnologia* 102(1): 85–99.
- Pandey, Rajan Kumar et al. 2017.** “Exploring Dual Inhibitory Role of Febrifugine Analogues against Plasmodium Utilizing Structure-Based Virtual Screening and Molecular Dynamic Simulation.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35(4): 791–804.
- Park, Kwan-Hwa et al. 2000.** “Structure, Specificity and Function of Cyclomaltodextrinase, a Multispecific Enzyme of the α -Amylase Family.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478(2): 165–85.
- Perrin, Charles L, and Jennifer B Nielson. 1997.** “‘Strong’ Hydrogen Bonds in Chemistry and Biology.” *Annual review of physical chemistry* 48(1): 511–44.

- Pinzi, Luca, and Giulio Rastelli. 2019.** “Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery.” *International journal of molecular sciences* 20(18): 4331.
- Pliska, Vladimir et al. 1996.** *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. VCH Weinheim.
- Rajbhar, Karishma, Himanshu Dawda, and Usha Mukundan. 2015.** “Quantitative Spectrophotometric Estimation of Specific Monosaccharides by DNSA Method.” *Journal of Biological Science (IJRDO)* 2(1): 112–26.
- Ranjith, D, and C Ravikumar. 2019.** “SwissADME Predictions of Pharmacokinetics and Drug-Likeness Properties of Small Molecules Present in Ipomoea Mauritiania Jacq.” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(5): 2063–73.
- Rishton, Gilbert M. 2003.** “Nonleadlikeness and Leadlikeness in Biochemical Screening.” *Drug discovery today* 8(2): 86–96.
- Rissanen, Taija et al. 2006.** “Characterization of Organic Compounds in Aerosol Particles from a Coniferous Forest by GC–MS.” *Chemosphere* 64(7): 1185–95.
- Rivero, Elena R C et al. 2006.** “Simple Salting-out Method for DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues.” *Pathology-Research and Practice* 202(7): 523–29.
- Rose, Peter W et al. 2016.** “The RCSB Protein Data Bank: Integrative View of Protein, Gene and 3D Structural Information.” *Nucleic acids research*: gkw1000.
- Saab, Yolande B, Wissam Kabbara, Christiane Chbib, and Paul Richard Gard. 2007.** “Buccal Cell DNA Extraction: Yield, Purity, and Cost: A Comparison of Two Methods.” *Genetic testing* 11(4): 413–16.
- Salentin, Sebastian et al. 2015.** “PLIP: Fully Automated Protein–Ligand Interaction Profiler.” *Nucleic acids research* 43(W1): W443–47.
- Sargsyan, Karen, Cédric Grauffel, and Carmay Lim. 2017.** “How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations.” *Journal of chemical theory and computation* 13(4): 1518–24.
- Sauer, Anne, and Carmen I Moraru. 2009.** “Inactivation of Escherichia Coli ATCC 25922 and Escherichia Coli O157: H7 in Apple Juice and Apple Cider, Using Pulsed Light

- Treatment.” *Journal of Food Protection* 72(5): 937–44.
- Savjani, Ketan T, Anuradha K Gajjar, and Jignasa K Savjani. 2012.** “Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques.” *International Scholarly Research Notices* 2012.
- Schoppler, Friedrich et al. 2011.** “Molar Extinction Coefficient of Single-Wall Carbon Nanotubes.” *The Journal of Physical Chemistry C* 115(30): 14682–86.
- Schreiner, Wolfgang, Rudolf Karch, Bernhard Knapp, and Nevena Ilieva. 2012.** “Relaxation Estimation of RMSD in Molecular Dynamics Immunosimulations.” *Computational and mathematical methods in medicine* 2012.
- Sherma, Joseph. 2000.** “Thin-Layer Chromatography in Food and Agricultural Analysis.” *Journal of chromatography A* 880(1–2): 129–47.
- Shibata, Yasushi, and Seiichiro Ogawa. 1989.** “Total Synthesis of Acarbose and Adiposin-2.” *Carbohydrate research* 189: 309–22.
- Shoichet, Brian K, Susan L McGovern, Binqing Wei, and John J Irwin. 2002.** “Lead Discovery Using Molecular Docking.” *Current opinion in chemical biology* 6(4): 439–46.
- Sigtryggisdóttir, Ásta Rós, Elena Papaleo, Sigríður H Thorbjarnardóttir, and Magnús M Kristjánsson. 2014.** “Flexibility of Cold-and Heat-Adapted Subtilisin-like Serine Proteinases Evaluated with Fluorescence Quenching and Molecular Dynamics.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1844(4): 705–12.
- Simoneit, Bernd R T. 1986.** “Characterization of Organic Constituents in Aerosols in Relation to Their Origin and Transport: A Review.” *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 23(3): 207–37.
- Spangenberg, Bernd, Colin F Poole, and Christel Weins. 2011.** *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. Springer Science & Business Media.
- Van Der Spoel, David et al. 2005.** “GROMACS: Fast, Flexible, and Free.” *Journal of computational chemistry* 26(16): 1701–18.
- Sudto, Kanokorn, Surachai Pornpakakul, and Supason Wanichwecharungruang. 2009.**

- “An Efficient Method for the Large Scale Isolation of Naringin from Pomelo (Citrus Grandis) Peel.” *International journal of food science & technology* 44(9): 1737–42.
- Systèmes, Dassault. 2016.** “Biovia, Discovery Studio Modeling Environment.” *Dassault Systèmes Biovia: San Diego, CA, USA.*
- Tang, Chuan-He, and Lan Shen. 2013.** “Role of Conformational Flexibility in the Emulsifying Properties of Bovine Serum Albumin.” *Journal of agricultural and food chemistry* 61(12): 3097–3110.
- Telfer, Emily et al. 2013.** “Extraction of High Purity Genomic DNA from Pine for Use in a High-Throughput Genotyping Platform.” *New Zealand Journal of Forestry Science* 43(1): 1–8.
- Terstappen, Georg C, and Angelo Reggiani. 2001.** “In Silico Research in Drug Discovery.” *Trends in pharmacological sciences* 22(1): 23–26.
- Tokath, Mehmet et al. 2015.** “In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles.” *BioMed research international* 2015.
- Treangen, Todd J et al. 2014.** “Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain Staphylococcus Aureus Subsp. Aureus ATCC 25923.” *Genome announcements* 2(6): e01110-14.
- Trujillo-Correa, Andrea Isabel et al. 2019.** “In Vitro and in Silico Anti-Dengue Activity of Compounds Obtained from Psidium Guajava through Bioprospecting.” *BMC complementary and alternative medicine* 19: 1–16.
- Vanommeslaeghe, Kenno, and Alexander D MacKerell Jr. 2012.** “Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing.” *Journal of chemical information and modeling* 52(12): 3144–54.
- Veber, Daniel F et al. 2002.** “Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates.” *Journal of medicinal chemistry* 45(12): 2615–23.
- Di Ventura, Barbara, Caroline Lemerle, Konstantinos Michalodimitrakis, and Luis Serrano. 2006.** “From in Vivo to in Silico Biology and Back.” *Nature* 443(7111): 527–33.

- Vijesh, A M et al. 2013.** “Molecular Docking Studies of Some New Imidazole Derivatives for Antimicrobial Properties.” *Arabian Journal of Chemistry* 6(2): 197–204.
- Walters, W Patrick. 2012.** “Going Further than Lipinski’s Rule in Drug Design.” *Expert opinion on drug discovery* 7(2): 99–107.
- Wang, Bao Li et al. 2020.** “Exploring the Binding Interaction between Bovine Serum Albumin and Perindopril as Well as Influence of Metal Ions Using Multi-Spectroscopic, Molecular Docking and DFT Calculation.” *Chemical Physics* 530: 110641.
- Wang, HaiLin et al. 2013.** “Characterization and Assessment of Volatile Organic Compounds (VOCs) Emissions from Typical Industries.” *Chinese Science Bulletin* 58: 724–30.
- Wang, Mingxing et al. 2020.** “Interface Switch Mediates Signal Transmission in a Two-Component System.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(48): 30433–40.
- Wang, Renxiao, Ying Fu, and Luhua Lai. 1997.** “A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients.” *Journal of chemical information and computer sciences* 37(3): 615–21.
- Whitlock, R, H Hipperson, M Mannarelli, and T Burke. 2008.** “A High-throughput Protocol for Extracting High-purity Genomic DNA from Plants and Animals.” *Molecular Ecology Resources* 8(4): 736–41.
- Wild, Frank. 2003.** *Characterization of Organic Compounds*. CUP Archive.
- Williams, Leslie K, Chunmin Li, Stephen G Withers, and Gary D Brayer. 2012.** “Order and Disorder: Differential Structural Impacts of Myricetin and Ethyl Caffate on Human Amylase, an Antidiabetic Target.” *Journal of medicinal chemistry* 55(22): 10177–86.
- Windsor, Matthew A et al. 2013.** “Exploring the Molecular Determinants of Substrate-Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Lumiracoxib.” *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23(21): 5860–64.
- Wishart, David S. 2013.** “Characterization of Biopharmaceuticals by NMR Spectroscopy.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 48: 96–111.
- . 2018. “DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018.” *Nucleic*

acids research 46(D1): D1074–82.

Yang, Zi-Yi et al. 2021. “Benchmarking the Mechanisms of Frequent Hitters: Limitation of PAINS Alerts.” *Drug Discovery Today* 26(6): 1353–58.

Yuan, Gaofeng et al. 2006. “Natural Products and Anti-Inflammatory Activity.” *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 15(2).

Yusof, Salmah, Hasanah Mohd Ghazali, and Gan Swee King. 1990. “Naringin Content in Local Citrus Fruits.” *Food Chemistry* 37(2): 113–21.

Zacher, J et al. 2008. “Topical Diclofenac and Its Role in Pain and Inflammation: An Evidence-Based Review.” *Current medical research and opinion* 24(4): 925–50.

Zegheb, Nadjiba et al. 2022. “In Vitro and in Silico Determination of Some N-Ferrocenylmethylaniline Derivatives as Anti-Proliferative Agents against MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 22(7): 1426–37.

Žuvela, Petar et al. 2019. “Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography.” *Chemical reviews* 119(6): 3674–3729.