



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 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 en Sciences biologiques

Spécialité : TOXICOLOGIE

THEME

**Études in vitro et in silico des effets
biologiques de naringine extraite des
fruits d'orange**

Présentés Par :

BOUSSEKRA Kinana & DEBBAB Chaima & TEREHA Hafsa Chiraz & TRIKI Zahra

Devant le jury composé de :

➤ **Président : M^{me} Adaika Aicha**

M.A.A, Université d'El Oued

➤ **Examineur : M^r Bouali Nourredine**

M.A.A, Université d'El Oued

➤ **Promoteur : M^r Lanez Elhafnaoui**

M.C.B, Université d'El Oued

Année universitaire 2022/2023

إهداء

بعد اللهم العني ولحمد لله الذي أثار طريقي وكان لي خير عون أهدي هذا العمل
المتواضع لي:

لي اليد الطاهرة التي أزلت من أمامنا أشواك الطريق ورسمت المستقبل بخطوط"
من الأمل والثقة، لي الذي لا تغيه كلمات الشكر والعرفان لي مثالي الأعلى وقدمتي لي الحياة
أبي الحبيب: "تريكي أحمد".

لي ملاكي في الحياة لي معنى الحب والحنان لي بسملة الحياة وسر الوجود إليك"
أمي الغالية: "الاحق جميلة".

لي تلك التي تشبهني صديقتي ورفيقتي ونصفي الآخر أختي التوأم: "ليلي".

لي أختي الذين لا تحلو الحياة إلا بهم: "عروسي. ياسين. طارق".

لي صديقتي الغاليات البعيدات عن العين القريبات من القلب "أية بركان". "وفاء بجوح".

لي صديقات المشوار الدراسي اللاتي قاسمنني لحضاته "دباب شيماء" و"زهرة الاحق".

لي كل الأرواح التي غادرتنا "رحمهم الله".

لي أستاذتي الأعزاء

لي كل من وسعهم قلبي ولم يسعهم قلمي

"زهرة"



إهداء

وَأَخِرُّ وَخَوَّاهُمْ أَنَّ الْحَمْدَ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

الحمد لله الذي ما تم جهده ولا ختم سعيه إلا بفضل الله وما تخطى العبد من عقبات وصعوبات إلا بتوفيقه ومعونته

أهدي فرحة تخرجني

إلى الأبداء الطاهرة التي لطالما أزلت من طريقي أشواك الفشل... إلى من ساندني بكل حب عند ضعفي

إلى من رسم لي المستقبل بخطوط من الثقة والحب إليكم عائلتي

أهدي فرحة تخرجني إلى تلك الأنسنة العظيمة التي لطالما تمننت أن تقر عينها برؤيتي في يوم كهذا.. إلى أمي

إلى من كلد العرق جبينه وعلمني أن النجاح لا يأتي إلا بالصبر والاصرار.... أبي

إلى نعيم قلبي وحظي في الدنيا إلى مصدر قوتي وسندي إلى المؤسسات الغالية أختوتي.. إلى وحيدتي وعضيدي أخي

إلى أول من انتظر هذه اللحظات ليفتخر بي إلى سندي إلى رفيقي في الخطوة الأولى والخطوة ما قبل الأخيرة.

"كسنة"



إهداء

مرت قاطرة البحث بكثير من العوائق، ومع ذلك حاولت أن أخطاها بثبات بفضل من الله ومنه
أهدي هذا العمل المتواضع

" إلى من أفضلها على نفسي ولم لا فلقد ضحت من أجله، ولم تدخر جهداً في سبيل إسعادي على الدوام أسي اللبينة "بني فلاتينة"

نسير في دروب الحياة، ويتقى من يسيطر على أذهاننا في كل مسلك نسلكه

إلى صاحب الوجه الطيب والأفعال الحسنة، فلم يتجمل على طيلة حياته والذي العزير "صلاح الدين"

إلى أخي الوحيد الذي كان بمثابة العضد والسند "شهاب الدين" أول من يفرح لي وأول من يفتقدني

" إلى اخواني الغاليات اللاتي لا تحلو الحياة إلا معهم ولا تطيب إلا بهم "فاطمة ناصيف، سلسبيل، سندس، مريم اينان، هنية" وباللاخص اختي الصغيرة "هزيمة ملكية" التي

ساعدتني في مذكرتي عند الحاجة

إلى روح البنيت ونجته أبناء اختي "هديل و معاذ" وإلى الملاك القادم إلينا في قادم الأيام إن شاء الله

إلى التي أنجبت رب بيتنا والذي العزير جنتي الغالية "ملكة" اطل الله في عمرك

إلى تلك الأرواح التي تفتح المنية "هنية، الطيب، محمد علي" رحمهم الله برحمته الواسعة

" إلى رموز الشهامة "الأب الثاني" أخوة أسي "نور الدين، السعيد، عبد الله، صالح، محمد البني، مصدق، نبيل، خالد، شبيب

إلى أجباء أبي وأخوته "فارس، غازي، طالب، حياة، سلمية، ياسمين، وداد، زينب"

إلى عزير القلب الذي كان لي سند وداعم لي خلال أسوء أوقاتي

إلى رفيقات القلب نعم الصديقات "عزوز مروة، بيكة، نرجس"

إلى الصديق العفي "عبد الرحمن الوثري" الذي كان مخلصاً وداعماً لي وسأهم في إنجاز هذه المذكرة

" إلى الصديقات اللاتي قضيت معهن أفضل أيامي خلال مسيرتي الجامعية "يوسكرة كنانة، غراب مسعودة، محمودي الكوثر،

برحومة مدرجة، عريفة مبروكة، نصبة صفاء

إلى كل من يعرفني من قريب أو من بعيد اطل الله في أعمالكم ورتبكم من خيراته

" شيراز "



إهداء

وصلت رحلتى لجامعية لى نحاتتها بعد تعب ومشقة

وها أنا إذ أختتم بحث تحريي بكل هممة ونشاط

وأمتن لكل من كان له فضل في مسيرتي، وساعدني ولو باليسير

لى بطلي الاوحد واستقامة ظهري ... ذلك الذي اطلب منه نجمتين.. فيعود حاملها السماء"

والدي الحبيب "وباب العيد"

لى تلك المرأة الصبورة.. التي علمتني أن لا حاجة لي عند مخلوق وأن الله معي دائما"

أحد أقداري السعيدة أُمي الغالية "وأم فضيلة"

لى تلك التي تشبعتني صديقتي ورفيقتي ونصفي الآخر. "تركي زهرة"

وأستاذتي .. واحب الناس لي قلبي"

والسلام على الذين كلما ذللت ملامحنا ، أعادوها ب كلمة لطيفة

شكرا

"شيماء"



Remerciements

Premièrement et dernièrement, tout le remercie à Dieu Qui nous a donné la patience, le courage Et la force pour réaliser ce travail.

Nous remercions M. LANEZ Elhafnaoui notre encadreur de mémoire qui nous a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions ...Merci aussi pour nous avoir fait partager votre expérience et votre culture scientifique et pour votre confiance. Travailler sous votre direction a été un plaisir et un honneur.

Nous remercions aussi monsieur LANEZ Touhami le directeur de laboratoire de valorisation et technologie des ressources saharienne pour nous avoir accueillir et nous a fourni tous les produits nécessaires dans son laboratoire pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes du laboratoire VTRS et surtout à M Tliba Ali et Mme, ADAIKA Aicha. Pour tous les conseils et informations fournis par eux et Pour son aide précieux pour la réalisation de ce travail

Nous remercions le Directeur du Centre de Recherche d'Analyses Physiques et Chimiques (CRAPC), Ouargla. Pour avoir facilité le processus d'analyses chimiques RMN.

Nous adressons également nos remerciements au personnel administratif du collège, dirigé par le doyen du faculté, ainsi qu'au chef du département, Tlili Mohammed el-Eid.

Un grand merci à l'équipe pédagogique du collège. À tous les professeurs qui nous ont enseignées et qui par leurs compétences et leurs efforts, nous ont soutenu dans la fin de nos études.

Finalement, nos vifs remerciements vont aux membres du jury pour leurs intérêts et qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Un grand merci aux doctorants pour leur aide dans la réalisation de cette étude, en particulier Zahra Saada, Marwa Djarallah, Aida Benine, Yahia Bekkar, Yousuf Ben Aissa

À tous ceux qui ont contribué, d'une façon ou d'une autre à l'achèvement de ce modeste travail Nous vous remercions très profondément.

Résumé :

En raison de l'importance des plantes dans la fabrication de médicaments et de remèdes naturels, car elles contiennent des composés actifs efficaces pour éliminer les maladies. Cette étude visait à isoler et à extraire le composé actif naringine des agrumes, plus précisément des écorces d'orange, et à évaluer ses activités biologiques *in vitro* et *in silico*. La naringine a été extraite des pelures par trempage dans du méthanol (solvant organique) avec un rendement de 3,5 % (poids sec). Un test a été mené pour mesurer l'efficacité de la naringine dans chacune des activités suivantes (anticancéreux, antidiabétique, antibactérien), où les résultats ont montré une forte affinité entre la naringine et les molécules biologiques, avec un rapport de liaison de $1,84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour l'ADN et $1,09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour l'ADN. Quant à la BSA, l'effet antibactérien du composé a ensuite été évalué sur deux souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), et d'après les résultats, il a montré une activité inhibitrice de la naringine sur les souches testées. Les résultats ont également montré l'efficacité du composé pour inhiber l'enzyme alpha-amylase responsable de la démolition de l'amidon et de sa conversion en sucre, avec un taux d'inhibition de $\text{IC}_{50} = 3,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Afin de vérifier les résultats de laboratoire avec une image informatique, nous avons effectué le processus d'amarrage moléculaire afin d'évaluer la formation et la force de la liaison entre la naringine et les différents composés biologiques à travers le programme de simulation de modélisation moléculaire Auto Dock, dans lequel les résultats ont montré la formation de liaisons hydrogène entre chacun des acides aminés du composé et les acides aminés des molécules Participent à l'interaction.

Des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées sur les résultats de la fusion moléculaire du complexe (naringine - alpha-amylase) afin de mesurer la stabilité thermodynamique à la fois du composé et de l'enzyme, les trois analyses ayant montré la formation de liaisons hydrogène, ainsi que la stabilité du composé et de l'enzyme et la flexibilité de son site actif.

Mots-clés : naringine / composés actifs / molécules biologiques / *Staphylococcus aureus* / *Escherichia coli* / enzyme alpha-amylase / docking moléculaire / simulation modélisation moléculaire autodoc / simulation dynamique moléculaire

Abstract

Abstract:

Due to the importance of plants in the manufacture of medicines and natural remedies, because they contain active compounds that are effective in eliminating diseases. This study aimed to isolate and extract the active compound naringin from citrus fruits, specifically from orange peels, and to evaluate its biological activities by computer and in the laboratory. Naringin was extracted from the peels by soaking using methanol (an organic solvent) with a yield of 3.5% (dry weight). A test was conducted to measure the effectiveness of naringin in each of the following activities (anti-cancer, anti-diabetic, anti-bacterial), where the results showed a strong affinity between both naringin and biological molecules, with a binding ratio of $1.84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for DNA and $1.09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for DNA. As for BSA, then the antibacterial effect of the compound was evaluated on two strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), and according to the results, it showed an inhibitory activity of naringenin on the tested strains. The results also showed the effectiveness of the compound in inhibiting the alpha-amylase enzyme responsible for the demolition of starch and converting it into sugar, with an inhibition rate of $\text{IC}_{50} = 3.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$. In order to verify the laboratory results with a computer image, we performed the molecular docking process in order to evaluate formation and the strength of the bond between naringin and the different biological compounds through the molecular modeling simulation program AutoDock, in which the results showed the formation of hydrogen bonds between each of the amino acids of the compound and the amino acids of the molecules Participate in the interaction.

Molecular dynamics simulations were performed on the results of the molecular fusion of the complex (naringenin - alpha-amylase) in order to measure the thermodynamic stability of both the compound and the enzyme, as the three analyzes showed the formation of hydrogen bonds, as well as the stability of the compound and the enzyme and the flexibility of its active site.

Keywords: naringin / active compound / biological molecules / *Staphylococcus aureus* / *Escherichia coli* / alpha-amylase enzyme / molecular docking / molecular modeling simulation autodoc / molecular dynamics simulation

ملخص:

نظرا لأهمية النباتات في صناعة الأدوية و العلاجات الطبيعية و ذلك لإحتوائها على مركبات نشطة فعالة في القضاء على الأمراض. هدفت هذه الدراسة الى فصل وإستخلاص المركب الفعال النارينجين من الحمضيات بالتحديد من قشور ثمرة البرتقال و تقييم النشاطات البيولوجية له حاسوبيا و في المختبر. حيث تم استخلاص النارينجين من القشور عن طريق النقع بإستعمال الميثانول (مذيب عضوي) بعائد قدره 3.5% (الوزن الجاف). تم إجراء إختبار لقياس فعالية النارينجين في كل من النشاطات التالية (مضاد للسرطان مضاد للسكري مضاد للبكتيريا) حيث أظهرت النتائج وجود تقارب قوي بين كل من النارينجين و الجزيئات البيولوجية بنسبة ربط بلغت $1.84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ بالنسبة لل ADN و $1.09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ بالنسبة لل BSA ومن ثم تم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للمركب على سلالتين (المكورات العنقودية الذهبية, الإشريكية القولونية) وفقا للنتائج فقد ظهر نشاطا مثبطا للنارينجين على السلالات المختبرة. كما بنسبة تثبيط بلغت $\text{IC}_{50}=3.5 \mu\text{g/ml}$

بهدف التأكد من النتائج المخبرية بصورة حاسوبية قمنا بإجراء عملية الالتحام الجزيئي من أجل تقييم كيفية و قوة الارتباط بين كل من النارينجين و المركبات البيولوجية المختلفة عن طريق برنامج محاكاة النمذجة الجزيئية أوتودوك حيث أظهرت النتائج تشكيل روابط هيدروجينية بين كل من الأحماض الأمينية للمركب و الأحماض الأمينية للجزيئات المشاركة في التفاعل. تم إجراء محاكاة الديناميكات الجزيئية على نتائج الالتحام الجزيئي للمعقد (نارينجين – ألفا أميلاز) و ذلك من أجل قياس الاستقرار الديناميكي الحراري لكل من المركب و الانزيم حيث أظهرت التحاليل الثلاثة تشكل روابط هيدروجينية وكذا ثبات المركب والانزيم ومرونة موقعه الفعال.

كلمات مفتاحية : النارينجين / مركب نشط / الجزيئات البيولوجية / المكورات العنقودية الذهبية / الإشريكية

القولونية / إنزيم ألفا أميلاز / الالتحام الجزيئي / محاكاة النمذجة الجزيئية أوتودوك / محاكاة الديناميكات الجزيئية

Tableau de matière

Liste d'abréviation :

Å	Ångström
ADN	Acide desoxyribonucleique
ADT	AutoDockTools
BSA	Sérum bovin albumin
°C	Degres celsius
CCM	Chromatographie sur couche mince
IC50	Concentration inhibitrice mediane
Cm	Centimeter
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DO	Densite optique
DNS	Dinitrosalicylique acide
DL50	Dose letale mediane
EDTA	Acide ethylene diamine tetraacetique
E. coli	Escherichia coli
G	Gramme
HPLC	La chromatographie liquide a haute performance
IR	Infrarouge
KH₂PO₄	Dihydrogenophosphate de potassium
K	Constant de liaison
KBr	Bromure de potassium
Kg	Kilogramme
L	Litre
M	Molaire
Mg	Milligramme
Min	Minute
ml	Millilitre
Mmol	Millimole
Nm	Nanometre
PH	Potentiel hydrogene
RMN	Resonance magnetique nucleaire
RMSD	Root mean square deviation

Tableau de matière

RMSF	Root mean square fluctuation
R	Coefficient de determination
S. aureus	Staphylococcus aureus
UV	Ultraviolet
Vis	Visible
MI	Microlitre
ΔG	Energie libre de liaison

Tableau de matière

Tableau de matière :

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Partie I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : activités biologiques.....	03
1. L'activité anti-cancéreux	03
1.ADN	03
1.1.Définition	03
1.2.Structure de l'ADN	03
1.3.Dommages de l'ADN et l'oncogenèse	04
1.4.Étapes de l'oncogenèse	04
1.4.1.L'étape d'initiation	04
1.4.2.L'étape de promotion	04
1.4.3.L'étape de progression	04
1.5.Traitement du cancer	04
II .L'activité antidiabétique	05
1.diabète	05
1.1.Définition	05
1.2.Classification:	06
1.2.1.Le diabète de type I	06
1.2.2.Le diabète de type II	06
1.2.3. Le diabète gestationnel	06
1.2.4 Le diabète secondaire	06
2. La régulation enzymatique de la glycémie	06
2.1.L'alpha amylase	06
2.1.1.Définition	06

Tableau de matière

2.1.2.Structure.....	07
2.1.3. Le rôle d'alpha-amylase	07
2.1.4.Mécanisme d'action	08
2.2.Alpha-glucosidase	09
III .L'activité antibactérienne.....	09
1.Les bactéries	09
1.1.Définition:	09
1.2.Structure bactérienne	10
1.3.Les Morphologies bactériennes	10
2. Les antibiotiques	11
2.1.Définition	11
2.2.Mode d'action des antibiotiques	11
2.2.1.Antibiotiques agissant sur la paroi	11
2.2.2.Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique:	12
2.2.3.Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques	12
2.2.4.Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique	13
2.2.5.Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique	13
Chapitre 2 : Naringine	14
I.Agrumes.....	14
1.Introduction	14
2.Historique	14
3.Types	15
II.l'orange	15
1.Définition	15
2.Types	16
3.composants	16
4.Compositions biochimiques	17
III.Flavonoïdes	17
1.Définition	17
2.flavonoïdes présents dans les oranges	18
IV.Naringine	18
1.Définition	18
2.Structur	18
3.propriétés physiques et chimiques	19

Tableau de matière

4.application	19
Chapitre 3 : Contexte théoriques de techniques Expérimentales utilisées	20
I.Les techniques d'analyses spectroscopiques	20
1.Spectroscopie d'absorption dans UV-Visible	20
1.1.Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible	20
1.2.Loi de Beer-Lambert	20
1.3.Appareillage	20
2.Spectrométrie Infrarouge	21
2.1.Principe de la spectroscopie infrarouge	22
3.La Résonance magnétique nucléaire (RMN)	22
4.La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	22
5.Chromatographie sur couche mince	23
II.L'amarrage moléculaire	23
1.Principe	24
2.Les étapes de Docking	24
2.1.Amarrage moléculaire avec l'Auto Dock Tools	24
2.2.Modélisation du potentiel énergétique	24
III.SwissADME	25
IV.admetSAR	26
V.Protox	27

Partie II : EXP2RIMENTALE

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes	29
I.Matériels	29
1.Réactifs utilisés	29
2.Matériels de laboratoire	30
3.Produits chimiques	30
II.Méthodes	31
1.Extraction de Naringine	31
2.Rendement d'extraction	34
3.Caractérisation du Naringine	34
3.1.Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	35
3.2.Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance(HPLC).....	36
3.3.Caractérisation par Infrarouge (IR)	36
3.4.Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	37

Tableau de matière

3.5.Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	37
4.Méthodes d'évaluation In Vitro des activités biologiques	38
4.1.Évaluation de l'activité anti-cancéreux	38
4.1.1.Extraction de l'ADN	38
4.1.2.Mode opératoire	42
4.2.Evaluation in vitro de l'activité antidiabétique	42
4.2.1.Mode opératoire	42
4.3.Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne	43
4.3.1.Mode opératoire	43
5.Méthodes d'évaluation In Silico des activités biologiques	44
5.1.Évaluation ADMET et de la similitude médicamenteuse	44
5.1.1.Généralité sur la similitude médicamenteuse	45
5.1.2.Introduction aux propriétés physicochimiques	45
5.1.3.Généralité sur le profil pharmacocinétique	46
5.1.4.L'intérêt de la prédiction de la toxicité	47
5.2.Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	48
5.2.1.Préparation des ligands	48
5.2.2.Préparation des récepteurs	49
5.2.3.Expériences d'amarrage Moléculaire	51
5.3.Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire	52
Chapitre 2 : Résultats et Discussion	54
I.1Caractérisation	54
1.1Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	54
1.2.Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	54
1.3.Caractérisation par Infrarouge (IR)	55
1.4.Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	56
1.5.Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	57
2.Évaluation In Vitro des activités biologiques	59
2.1.Évaluation de l'activité anti-cancéreux	59
2.1.1.Constantes de liaison	60
2.1.2.Énergie libre de liaison	61
2.2. Évaluation de l'activité antidiabétique	61
2.2.1.Activités inhibitrices de l'alpha-amylase (IC ₅₀)	62
2.2.2.Constantes de liaison	64

Tableau de matière

2.2.3.Énergie libre de liaison	64
2.3.Évaluation de l'activité antibactérien	65
2.3.1.Détermination du diamètre de la zone d'inhibition	65
2.3.2.Activités inhibitrice des bactéries (IC ₅₀).....	67
2.3.3.Constantes de liaison	69
2.3.4.Énergie libre de liaison	70
3.Évaluation In Silico des activités biologiques	71
3.1.Prédiction des propriétés ADMET et la similitude médicamenteuse	71
3.2.Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	78
3.2.1.Évaluation de l'activité anti-cancéreux	78
3.2.2.Évaluation de l'activité antidiabétique	80
3.2.3.Évaluation de l'activité antibactérien	83
3.3.Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire	88
3.3.1.Root Mean Square Deviation (RMSD)	89
3.3.2.Root Mean Square Fluctuation (RMSF)	90
3.3.3.Liaisons hydrogène	91
Conclusion générale et perspective	93
I.Conclusion	93
II.Perspective	93
Références bibliographiques.....	95

Liste des figures

Liste des figures :

Numéro	Titre	Page
Figure 01	ADN dans le noyau cellulaire	03
Figure 02	Étapes de l'oncogenèse	04
Figure 03	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase	07
Figure 04	La digestion enzymatique de l'amidon	08
Figure 05	Structure générale d'une cellule bactérienne	10
Figure 06	Différents formes de bactéries	11
Figure 07	Coupe équatoriale d'une orange	17
Figure 08	Structure de naringine	18
Figure 09	Quatre partie essentielles de spectrophotomètre	21
Figure 10	le spectre électromagnétique	21
Figure 11	La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	23
Figure 12	Les étapes de docking moléculaire	25
Figure 13	Page d'accueil du serveur SwissADME.	26
Figure 14	Page d'accueil du serveur admetSAR	27
Figure 15	Page d'accueil du serveur Protox	28
Figure 16	Orange	31
Figure 17	Les croûtes d'Orange pendant le séchage	32
Figure 18	Poudre de croûtes sec	32
Figure 19	Montage d'évaporation a pression réduit	33
Figure 20	Montage de chauffage	33
Figure 21	Montage de cristallisation	34
Figure 22	Étapes impliquées dans l'extraction d'ADN	39

Liste des figures

Figure 23	échantillons de sang de poulet dans un tube de microfuge	39
Figure 24	La disparition de la coulure rouge du sang	40
Figure 25	Spectre électronique d'échantillon d'ADN extrait	40
Figure 26	Structure de naringine optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)	49
Figure 27	Structure de : Amoxicilline (a) et Acarbose (b) extraites de la base de données DrugBank	49
Figure 28	Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine	54
Figure 29	Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine	55
Figure 30	Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)	56
Figure 31	Spectre UV du naringine extrait (Linge noire) et de naringine référence (Linge rouge)	57
Figure 32	Spectre RMN du ^1H de naringine	58
Figure 33	Spectre RMN du ^{13}C de naringine	59
Figure 34	Spectres d'absorption UV-visible de 1 mM de naringine en absence et en présence	59
Figure 35	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	60
Figure 36	Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Acarbose (b)	62
Figure 37	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	64
Figure 38	Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne	66
Figure 39	Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline	68
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	70
Figure 41	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe ADN	80
Figure 42	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe BSA	80
Figure 43	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l' α -amylase	82
Figure 44	Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase	83

Liste des figures

Figure 45	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli	85
Figure 46	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli	86
Figure 47	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le S. aureus	86
Figure 48	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le S. aureus	86
Figure 49	Visualisation du complexe naringine_ α -amylase dans une boîte d'eau après la simulation de dynamique moléculaire	89
Figure 50	RMSD du complexe naringine_ α -amylase et du α -amylase	90
Figure 51	RMSF du complexe naringine_ α -amylase	91
Figure 52	Nombre moyen de liaisons hydrogène entre le naringine et l' α -amylase	92

Liste des tableaux

Liste des tableaux:

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Compositions biochimiques de l'orange	17
Tableau 02	Rapport d'absorbance de l'ADN isolé	41
Tableau 03	Structure SMILES des ligands étudiées	44
Tableau 04	Classification des produits chimiques selon leurs toxicités	47
Tableau 05	Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire.	50
Tableau 06	Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible	52
Tableau 07	Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre électroniques UV-VIS	60
Tableau 08	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	61
Tableau 09	Valeurs des absorbances tirées à partir du test d'alpha-amylase	62
Tableau 10	Activité antidiabétique de naringine et acarbose par le test d'inhibition de l'α-amylase.	63
Tableau 11	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l'alpha-amylase calculées à partir des données UV-Vis	64
Tableau 12	Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre E. coli et S. aureus	66
Tableau 13	Valeurs des absorbances tirées à partir du test antibactérien	67
Tableau 14	Activité antibactérien de naringine et amoxicilline par le test d'inhibition de E. coli et S. aureus	68
Tableau 15	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.	70
Tableau 16	Caractéristiques générales des composés étudiées	73
Tableau 17	Propriétés physico-chimiques des composés étudiées	73
Tableau 18	Caractéristiques de lipophilicité des composés étudiés	73
Tableau 19	Caractéristiques de solubilité dans l'eau des composés étudiés	74
Tableau 20	Paramètres pharmacocinétiques des composés étudiés	74
Tableau 21	Règle de druglikeness et score de biodisponibilité des composés étudiés	75

Liste des tableaux

Tableau 22	Propriétés de chimie médicinale des composés étudiés	75
Tableau 23	Les profils de toxicité in silico des composés étudiés	77
Tableau 24	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine avec l'ADN et le BSA	78
Tableau 25	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et acarbose avec l' α -amylase	81
Tableau 26	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et amoxicilline avec l'E. coli et le S. aureus cyclooxygénase-2	83
Tableau 27	Comparaison des paramètres de liaison et d'IC50 pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire	87

Introduction générale

Introduction

Introduction:

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles comme remèdes pour traiter divers maux chez les humains. Des études ont révélé que 70 à 80 % de la population mondiale utilise des plantes médicinales à des fins thérapeutiques (**Boubekour, 2019**). Dans les pays en développement, la majorité des personnes ont recours aux plantes médicinales pour les soins de base en raison du manque d'accès aux médicaments sur ordonnance, mais aussi parce que les plantes peuvent s'avérer efficaces. On estime qu'au moins 25 % des médicaments modernes sont directement ou indirectement dérivés de plantes médicinales, principalement grâce à l'application des connaissances traditionnelles aux technologies modernes (**IGCRT, 2007**). Selon l'Organisation mondiale de la santé, environ 80 % de la population mondiale utilise des préparations traditionnelles à base de plantes pour les soins de base (**OMS, 2003**). L'Algérie, en raison de sa situation géographique, possède une flore variée. Les plantes médicinales renferment une multitude de composés différents, y compris des métabolites secondaires, qui jouent un rôle crucial dans la survie et la reproduction des plantes qui les produisent. Ces composés sont également largement utilisés par l'homme dans des domaines tels que la pharmacologie, la cosmétique et l'agroalimentaire (**Reguleg, 2011**). Parmi ces plantes se trouvent les oranges, dont les pelures contiennent de la naringine (NAR), un flavonoïde présent dans de nombreuses plantes médicinales et fruits. La naringine a suscité un intérêt croissant en raison de son potentiel à contribuer à l'amélioration de nombreux problèmes de santé. Des études expérimentales ont démontré qu'elle possède de nombreuses propriétés biologiques, notamment des activités anti oxydantes, anti-inflammatoires et antidiabétiques. Des études in vitro et in silico ont également démontré les bienfaits de la naringine dans différents modèles précliniques, tels que l'athérosclérose, les troubles cardiovasculaires, le diabète sucré, les troubles neurodégénératifs, l'ostéoporose et les troubles rhumatismaux. De plus, la naringine a également montré des propriétés chimio préventives et anti-cancéreuses dans divers modèles de cancer de la bouche, du sein, du côlon, du foie, du poumon et de l'ovaire. Le but de notre étude est d'évaluer l'effet de la naringine (un flavonoïde) sur les activités biologiques suivantes : antidiabétique, anti-cancéreuse et antibactérienne. Cette étude peut être réalisée de deux manières, in silico par docking moléculaire, in vitro en utilisant du méthanol, de l'éthanol, de la lumière UV et plusieurs autres produits chimiques. Notre travail est divisé en deux parties, une partie théorique qui comprend 3 chapitres, le premier chapitre contient un aperçu bibliographique de la naringine, le deuxième chapitre contient la technique d'utilisation, et le troisième chapitre contient les

Introduction

activités biologiques. La deuxième partie appliquée contient deux chapitres. Le premier chapitre est Matériels et Méthodes et le deuxième chapitre est Résultats et discussion.

Partie I :
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :
Activités biologiques

I. L'activité anti-cancéreuse:**I.1. ADN****I. 1.1. Définition**

L'ADN est un polymère biologique omniprésent. Il est présent dans toutes les cellules, se trouvant dans le cytoplasme des cellules procaryotes, tandis qu'il est localisé dans le noyau, les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. L'ADN joue un rôle fondamental dans l'hérédité, car il constitue le génome des organismes vivants et se transmet intégralement ou partiellement lors des processus de reproduction. (Quinkal, I., 2003).

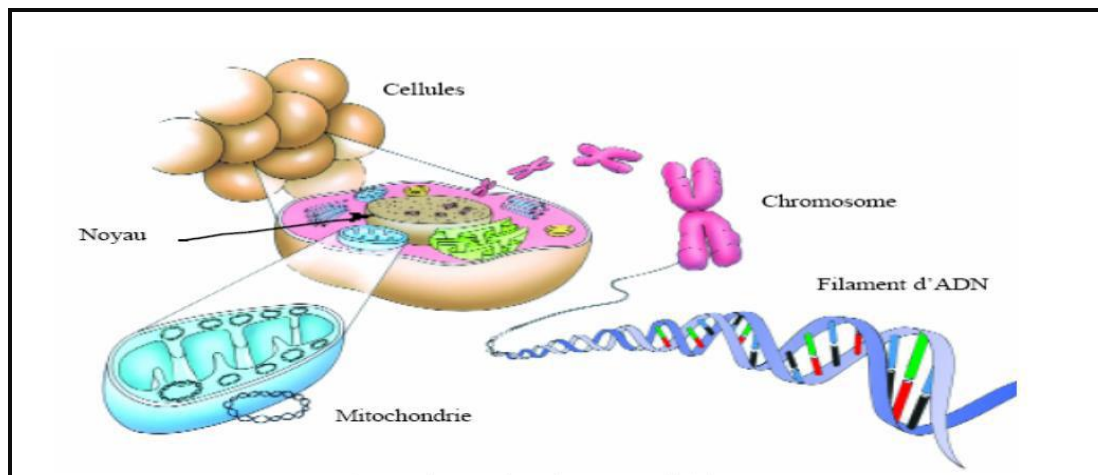


Figure 01 : ADN dans le noyau cellulaire (Chennouf, F., 2011).

I. 1.2. Structure de l'ADN

La molécule d'ADN est la plus volumineuse dans l'organisme. Elle adopte une structure en double hélice formée de deux brins enroulés autour l'un de l'autre. Cette molécule est composée d'une succession répétitive de nucléotides qui comprennent une base purique ou pyrimidique, un sucre appelé désoxyribose et un groupe phosphorique. La séquence sucre-acide phosphorique est constante dans l'ADN, tandis que les nucléotides se distinguent uniquement par leur base. Il existe quatre types de bases dans l'ADN : l'adénine (A) et la guanine (G), qui sont des purines, ainsi que la cytosine (C) et la thymine (T), qui sont des pyrimidines. La thymine est une base spécifique de l'ADN et ne se retrouve pas dans l'ARN (acide ribonucléique), où elle est remplacée par l'uridine (U). (Swynghedauw, B., Silvestre J-S., 2008).

1

I. 1.3.Dommages de l'ADN et l'oncogenèse

La préservation précise du matériel génétique (y compris l'épigénétique) est essentielle pour le développement normal d'un organisme. Cependant, l'ADN est constamment exposé à des facteurs enzymatiques, chimiques et physiques qui peuvent altérer son intégrité. À l'intérieur de la cellule, un réseau complexe de voies de signalisation, connu sous le nom de réponse aux dommages de l'ADN (DDR), joue un rôle crucial dans la maintenance et la transmission du génome. Cette réponse coordonne des processus tels que la réplication de l'ADN, la recombinaison, la réparation de l'ADN et la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Tout dysfonctionnement de ces processus peut entraîner une prédisposition au cancer (Lacave, R et al., 2005).

I. 1.4.Étapes de l'oncogenèse

I.1.4.1.L'étape d'initiation : elle se produit lorsque l'ADN subit une lésion rapide et irréversible suite à une exposition à un agent cancérigène, qu'il s'agisse d'une cause physique, chimique, virale, etc.

I.1.4.2.L'étape de promotion : elle survient lors d'une exposition prolongée, répétée ou continue à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiale.

I.1.4.3.L'étape de progression : elle se caractérise par l'acquisition de propriétés de multiplication non contrôlée, l'indépendance vis-à-vis des signaux de régulation, la perte de différenciation cellulaire, ainsi que l'invasion locale et la formation de métastases. (Teste, K., 2008 cité par Adaika A., 2016).

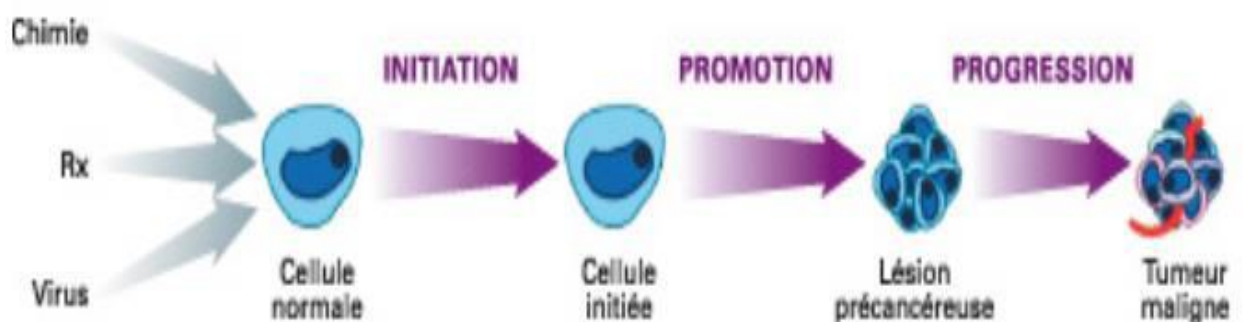


Figure 02: Étapes de l'oncogenèse (Jacqueline L.Ch., 2000).

I. 1.5.Traitement du cancer

Le traitement du cancer vise principalement à atteindre la guérison idéale ou, à défaut, à stopper la progression de la maladie pendant une période prolongée tout en atténuant les

symptômes. Deux principales modalités de traitement sont utilisées : les traitements locorégionaux (chirurgie, radiothérapie) et les traitements médicaux systémiques tels que l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie (**Jegham, H., 2009**).

- La chirurgie consiste à enlever la tumeur ou les tissus affectés et est le principal traitement des tumeurs solides localisées.
- La radiothérapie consiste à irradier la tumeur avec des rayons X ou γ pour détruire les cellules cancéreuses. Elle est souvent utilisée en combinaison avec d'autres thérapies.
- Les traitements biologiques utilisent des substances naturelles produites par l'organisme. Par exemple, l'immunothérapie renforce les défenses immunitaires contre les cellules cancéreuses.
- Les traitements hormonaux agissent sur la croissance, la multiplication ou la mort des cellules cancéreuses. Ils sont utilisés spécifiquement pour les cancers dépendants des hormones.
- Les greffes de moelle osseuse renforcent le système de production des cellules sanguines, bien qu'elles ne constituent pas un traitement direct du cancer.
- La chimiothérapie utilise des médicaments pour tuer les cellules cancéreuses. Différents agents chimio thérapeutiques aux mécanismes d'action variés sont généralement combinés pour augmenter l'efficacité et prévenir la résistance (**Teniou, S., 2011**).

Un domaine en pleine expansion dans le traitement du cancer est l'utilisation de composés organométalliques en chimie bio-organométallique. Les dérivés ferrocéniques sont particulièrement intéressants et font l'objet de nombreuses études (**Görmen, M., 2010**).

II .L'activité antidiabétique:

II.1. diabète

II.1.1. Définition:

Le diabète se réfère à un ensemble de maladies métaboliques ayant diverses causes, se manifestant par une élévation chronique du taux de glucose sanguin. Il est caractérisé par des perturbations dans les métabolismes des glucides, des lipides et des protéines, résultant d'une sécrétion et/ou d'une action insuffisante de l'insuline (**DeFronzo et al., 2015**). Cette augmentation chronique du taux de glucose est associée, à différents degrés, à des complications à long terme qui affectent principalement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (**ADA, 2008 ; Rodier, 2008**).

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique, ce qui signifie que la glycémie à jeun est supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L), ou que la glycémie dépasse 2 g/L (11,1 mmol/L) à n'importe quel moment, ou encore lors d'un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à deux reprises (deux heures après le début d'un repas ou après ingestion de 75 g de glucose par voie orale). Cette définition repose sur le seuil glycémique associé à un risque de micro angiopathie, en particulier de rétinopathie (**Sachon et al., 2004 ; ADA, 2007**).

II.1.2. Classification:

Le diabète sucré est divisé en quatre catégories, à savoir le diabète de type I, le diabète de type II, le diabète gestationnel et d'autres types spécifiques connus sous le nom de diabètes secondaires (**Luka et al., 2013**).

II.1.1.1. Le diabète de type I, également appelé diabète insulino-dépendant (DID), se caractérise par une administration régulière d'insuline, une production insuffisante d'insuline et une cause inconnue qui le rend non préventif (**Chaouki, 2012**).

II.1.1.2. Le diabète de type II, également appelé diabète non insulino-dépendant (DNID), est causé par une mauvaise régulation de l'insuline par l'organisme. Il est le type de diabète le plus répandu dans le monde, représentant environ 90 % des cas. Les symptômes sont souvent moins graves que ceux du diabète de type I, et il peut être diagnostiqué plusieurs années après son apparition (**Chaouki, 2012**).

II.1.1.3. Le diabète gestationnel est généralement transitoire et disparaît quelques semaines après l'accouchement. Les femmes atteintes de diabète gestationnel ont un risque accru de développer un diabète de type II ultérieurement (**Schaefer-Graf et al., 2002**).

II.1.1.4. Le diabète secondaire peut être lié à diverses causes selon l'American Diabètes Association (**ADA, 1997**) et l'Organisation mondiale de la santé (**OMS, 1999**). Il peut résulter d'une maladie du pancréas, d'une maladie endocrinienne, de l'utilisation de certains médicaments ou substances toxiques, d'anomalies génétiques de l'action de l'insuline, ainsi que d'autres maladies génétiques parfois associées au diabète (**Chaouki, 2012**).

II.2. La régulation enzymatique de la glycémie:

II.2.1. L'alpha amylase:

II.2.1.1 Définition:

L' α -amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, tout comme les autres enzymes (**Nouadri, 2011**). C'est une enzyme présente universellement, synthétisée par tous les organismes vivants (**Merabti, 2006**). Elle agit comme une endo-

enzyme, avec une masse moléculaire comprise entre 40 et 70 kDa (**Panchal, 1990**), et elle hydrolyse de manière aléatoire les liaisons osidiques (1,4) de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène, à l'exception des liaisons terminales de ces chaînes. Cela entraîne la libération du glucose, du maltose et principalement des α -dextrines (**Kelly et al., 1997**).

II.2.1.2. Structure :

Les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 3 domaines globulaires (**Nouadri, 2011**). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (**Figure 3**). La partie glucidique est formée essentiellement de maltose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (**Chiba,1988; Nouadri, 2011**).

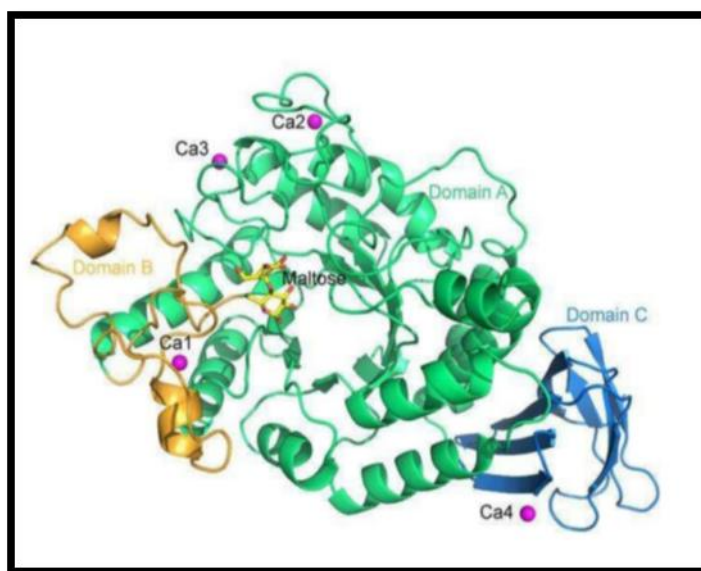


Figure03: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase (**Kraulis, 1991**).

L' α -amylase fongique, comportant trois domaines globulaires (A, B, et C). Le domaine A (couleur verte), forme un tonneau (β / α) 8 feuillets et porte le site actif à la partie C- terminale des feuillets β . Le domaine B (couleur jaune), forme une boucle à partir du milieu du domaine A et constitue une sorte de «couvercle ». Quant au domaine C (couleur bleue), il constitue un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles et l'ion de calcium (sphère violet) (**Benaouida, 2008**).

II.2.1.3. Le rôle d' α -amylase :

A digestion de l'amidon, qui est la principale source de glucides pour l'homme, commence dans la bouche. La salive contient de l' α -amylase, une enzyme qui hydrolyse toutes les liaisons glycosidiques α (1-4) de l'amidon, à l'exception des plus extrêmes et de celles proches des points de branchement. Lorsque les aliments mâchés parviennent à l'estomac, l'acidité inactive l' α -amylase et réduit la longueur moyenne des chaînes d'amidon de plusieurs milliers à moins de huit unités de glucose. La digestion de l'amidon se poursuit dans l'intestin grêle grâce à l'action de la β -amylase, qui agit à partir de l'extrémité non réductrice, ainsi que de l' α -amylase pancréatique, similaire à l' α -amylase salivaire. Ces enzymes dégradent l'amidon en un mélange de maltose, un disaccharide, de maltotriose, un tri saccharide composé de trois résidus de glucose liés par des liaisons α (1-4), et de dextrines, des oligosaccharides présentant des ramifications α (1-6). Ces oligosaccharides sont ensuite hydrolysés en monosaccharides par des enzymes spécifiques situées dans les membranes de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale, notamment une α (1-6) glucosidase qui libère un à un les résidus de glucose des oligosaccharides (**Figure 04**) (Voet, D. et Voet, J., 2005).

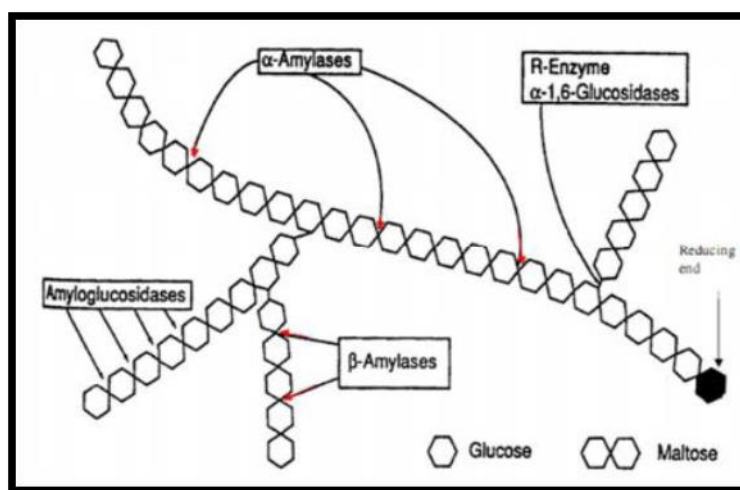


Figure 04 : La digestion enzymatique de l'amidon (Tormo et al., 2004).

II.2.1.4.Mécanisme d'action:

Le mécanisme d'action de l' α -amylase implique la participation de trois fonctions du site actif qui comprennent un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé. Cela signifie que la rupture de la liaison osidique implique des échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides Carboxyliques et un noyau imidazole (Park et al., 1997). Ce mécanisme est une

caractéristique de l'enzyme, et selon les conditions expérimentales telles que la température, le pH, la taille et la structure du substrat, l'enzyme peut utiliser différents mécanismes, voire une combinaison de plusieurs mécanismes (**Mazur et Nakatani, 1993 ; Nielson et al., 2001**).

Parmi les mécanismes observés :

- L'attaque aléatoire : l' α -amylase hydrolyse de manière aléatoire les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments qui seront attaqués séparément.
- L'attaque préférentielle : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- L'attaque répétitive ou multiple : cela implique que l'enzyme se déplace le long de la chaîne du substrat pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (**Berry et Paterson, 1990 ; Scriban, 1999**).

Fogarty et Kelly (1980) ont signalé que les α -amylases sont des métallo-enzymes nécessitant la présence d'ions calcium pour leur activité enzymatique et le maintien de la stabilité de leur structure en acides aminés.

II.2.2. Alpha-glucosidase

Selon la nomenclature IUPAC-IUBMB, les α -glucosidases (EC 3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase) sont des enzymes exo-glycosidases qui catalysent principalement l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glucosidiques d'un substrat, tels que les malto-oligosaccharides ou le glycogène, afin de libérer un α -D-glucose. En plus de cela, elles peuvent également catalyser des réactions de trans-glycosylation pour synthétiser des composés α -D-glucosylés (**Kato et al., 2002 ; Ferrer et al., 2005 ; Seo et al., 2011**).

III.L'activité antibactérienne

III.1. Les bactéries

III.1.1. Définition:

Les bactéries sont des micro-organismes responsables de maladies graves ou qui peuvent simplement coloniser la peau de manière mineure. La plupart des bactéries se reproduisent rapidement en quelques heures ou jours, tandis que d'autres se développent plus lentement, ce qui peut entraîner des infections chroniques difficiles à traiter. Les bactéries possèdent une grande capacité d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique qui peut transférer du matériel génétique au sein de la même espèce ou entre différentes espèces.

Cette adaptation génétique peut augmenter leur pathogénicité et leur résistance aux antibiotiques (Hart et Shears, 1997).

III.1.2. Structure bactérienne

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « constants » ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « inconstants » ou « facultatifs. » (Fasquelle, 1971) et (Javillier et al., 1972).

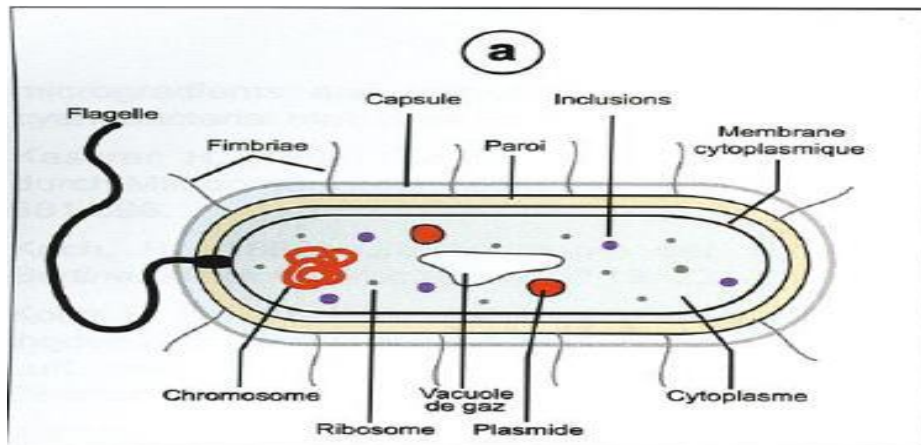


Figure 05: Structure générale d'une cellule bactérienne (Bertrand et al., 2011).

III.1.3. Les Morphologies bactériennes:

Les bactéries présentent diverses formes, telles que sphériques (coques ou cocci), en forme de bâtonnet (bacilles) ou intermédiaires (coccobacilles). La plupart des bactéries sont colorées selon la méthode de Gram, où les bactéries à Gram positif (comme *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) apparaissent en bleu-violet, tandis que les bactéries à Gram négatif (comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*) présentent une coloration rose.. (Hart et Shears, 1997).

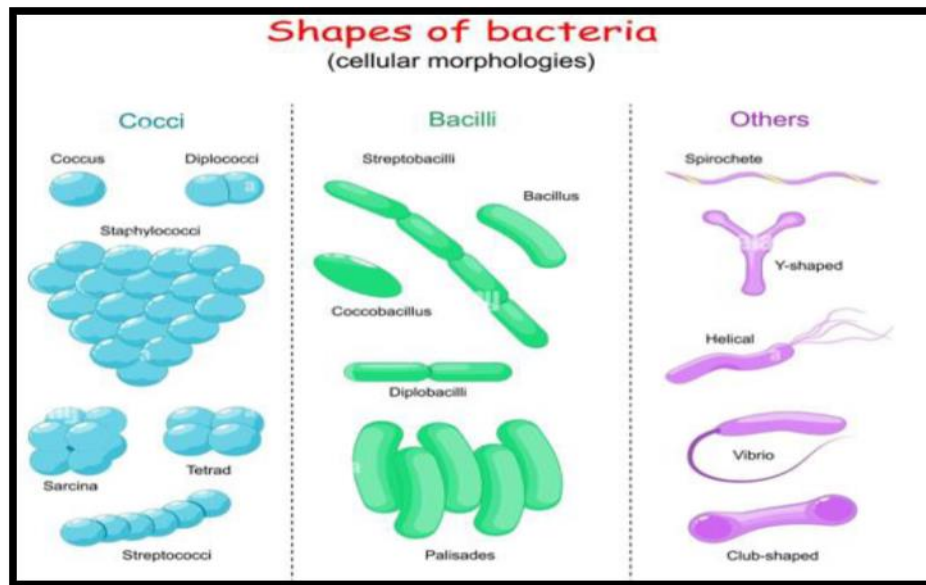


Figure06: Différents formes de bactéries (Yamaguchi et al., 2014).

III.2. Les antibiotiques

III.2.1. Définition:

Les antibiotiques, dérivés du grec "anti" (contre) et "bios" (vie), sont des substances d'origine microbienne ou leurs dérivés qui ont la capacité de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance. Bien que les sulfamides soient parfois inclus dans cette catégorie, ce sont en réalité des produits chimio thérapeutiques synthétiques d'origine non microbienne. Les antibiotiques présentent les caractéristiques suivantes :

- Ils ont une activité antibactérienne.
- Leur action in vivo diffère de celle des désinfectants.
- Ils sont bien absorbés et se diffusent efficacement dans l'organisme (Prescott, 2003).

III.2.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être catégorisés en fonction de différents critères tels que leur origine, leur composition chimique, leur spectre d'activité et leur mécanisme d'action (Yala et al., 2001). En ce qui concerne leur mode d'action, les antibiotiques sont regroupés en cinq catégories distinctes.

III.2.2.1. Antibiotiques agissant sur la paroi:

- Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition des protéines liant la pénicilline (PLP) qui sont responsables de la synthèse du peptidoglycane. Les PLP jouent un rôle dans les activités

transpeptidasiques, carboxypeptidasiques et transglycolasiques. En bloquant l'action des PLP, on entrave la formation des ponts pentacycliques essentiels à la structure réticulée de la paroi bactérienne. Cela conduit à la formation de cellules bactériennes de forme ronde ou filamenteuse qui finissent par se lyser (**Sedrati, 2014**).

- Certains antibiotiques agissent en bloquant la polymérisation du peptidoglycane en se liant à la partie terminale D-Ala-D-Ala des peptides impliqués dans cette étape de polymérisation du peptidoglycane (**Perronne, 1999**).

- Un autre antibiotique se fixe sur une enzyme essentielle à la formation de l'acide N-acétylmuramique, l'un des précurseurs du peptidoglycane (**Agregé et al., 2015**).

III.2.2.2. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique:

Leur mécanisme d'action implique la fixation sur la sous-unité 30S du ribosome, où ils interfèrent avec la synthèse des protéines(**Singleton, 2005**).

- Ils agissent au niveau de la sous-unité 50S du ribosome en inhibant la croissance de la chaîne polypeptidique en formation (**Yala et al., 2001**).

- Leur action se situe au niveau de la sous-unité 30S du ribosome, où ils entravent la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique en empêchant la fixation de l'aminocyl-ARNt (**Bryskier, 1999**).

- Ils inhibent la peptidyl-transférase en se liant à la sous-unité 50S du ribosome bactérien (**Wareham et Wilson, 2002**).

- Leur fixation se fait sur la sous-unité ribosomale 50S, empêchant ainsi sa liaison avec la sous-unité 30S (**Nauciel et Vildé, 2005**).

III.2.2.3. Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques:

- Leur action se dirige vers deux enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN : l'ADN gyrase (principale cible des BGN). Elles forment un complexe ADN-gyrase-quinolone qui bloque la progression de l'ADN polymérase bactérienne lors de la réplication. De plus, l'ADN topoisomérase IV est également affectée. L'interaction entre l'ADN, la quinolone et la topoisomérase favorise la coupure de l'ADN et inhibe la relégation (**Hooper, 2002**).

- Elles inhibent la transcription de l'ADN en ARNm en ciblant l'ARN polymérase (**Nauciel et Vildé, 2005**).

- Leur action se manifeste directement sur l'ADN, provoquant diverses lésions telles que des coupures et des substitutions de bases (**Nauciel et Vildé, 2005**).

III.2.2.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique:

- Elles se lient aux phospholipides, ce qui perturbe les transferts transmembranaires de nutriments et inhibe les processus de phosphorylation oxydative du métabolisme énergétique **(Fauchère et al., 2002)**.

III.2.2.5. Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique:

- Ils bloquent la synthèse des folates en se liant à la dihydroptéroate synthétase (DHPS), qui est le site actif impliqué dans une réaction cruciale pour la production de l'acide tétrahydrofolique (DHF). L'acide tétrahydrofolique est essentiel pour la synthèse des purines et des pyrimidines nécessaires à la formation de l'acide nucléique **(Lambert, 1995)**.

- Ils inhibent la synthèse des folates en se liant à la dihydrofolate réductase **(Veyssier, 1999)**.

- Ils agissent sur les deux enzymes mentionnées précédemment **(Veyssier, 1999)**.

Chapitre 2 :
Naringine

I. Agrumes:**I.1. Introduction:**

Les agrumes sont des fruits populaires et très appréciés dans le monde entier pour leur goût acidulé, leur teneur élevée en vitamines et leurs propriétés médicinales. Le genre *Citrus* comprend des variétés d'arbres fruitiers tels que les oranges, les citrons, les pamplemousses, les limes et les mandarines. Les agrumes sont originaires d'Asie du Sud-Est, mais sont aujourd'hui cultivés dans de nombreux pays, notamment les États-Unis, le Brésil, l'Espagne, l'Italie, l'Afrique du Sud et l'Australie. **(Davies., 2019).**

Les agrumes ont une longue histoire, remontant à plus de 4 000 ans en Chine, où ils étaient considérés comme des fruits sacrés. Depuis lors, les agrumes ont été introduits et cultivés dans de nombreuses parties du monde, devenant une composante importante de l'alimentation et de la culture de nombreuses sociétés **(Hyman., 2013).**

Les agrumes ont également des utilisations pratiques dans l'industrie, en particulier dans la production d'huiles essentielles pour les parfums, les produits de nettoyage et les produits de soins personnels. Les agrumes sont également utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter une variété de troubles, tels que les infections respiratoires, la digestion et la prévention du cancer **(Laszlo .,2007).**

I.2. Historique:

Les agrumes sont des fruits issus de diverses variétés d'arbres appartenant au genre *Citrus*, tels que les oranges, les citrons, les pamplemousses, les limes et les mandarines. Ces fruits sont originaires d'Asie du Sud-Est, mais ont depuis été cultivés dans le monde entier **(Hyman., 2013).**

Les agrumes ont une longue histoire, remontant à plus de 4 000 ans en Chine, où ils étaient considérés comme des fruits sacrés. Les Romains et les Grecs de l'Antiquité connaissaient également les agrumes et les utilisaient pour leurs propriétés médicinales **(Hyman., 2013).**

Au cours du Moyen Âge, les agrumes étaient encore considérés comme des produits de luxe en Europe, car leur culture était limitée à des régions chaudes comme le sud de l'Italie et de l'Espagne. Ce n'est que pendant la Renaissance que les agrumes ont commencé à être cultivés en Europe centrale et en Amérique du Sud, grâce aux explorateurs portugais et espagnols **(Davies., 2019).**

Au fil des siècles, les agrumes sont devenus de plus en plus populaires dans le monde entier, et aujourd'hui, ils sont cultivés dans de nombreux pays, y compris les États-Unis, le Brésil, l'Espagne, l'Italie, l'Afrique du Sud et l'Australie. Ils sont appréciés pour leur goût

acidulé, leur teneur élevée en vitamines et leur utilisation dans la cuisine, les boissons et les parfums (**Laszlo, 2007**).

I.3. Types:

Il existe plusieurs types d'agrumes, chacun avec ses propres caractéristiques de goût et de texture. Voici une liste de certains des types d'agrumes les plus courants :

- . **Orange:** Il existe plusieurs variétés d'oranges, dont la Navel, la Valencia et la Blood orange. Les oranges ont une pulpe juteuse et sucrée avec une acidité agréable.
- . **Pamplemousse:** Il existe deux variétés principales de pamplemousses : le pamplemousse rose et le pamplemousse blanc. Les deux ont une saveur acidulée et légèrement amère.
- . **Citron:** Les citrons sont connus pour leur acidité forte et leur utilisation fréquente dans la cuisine. Les citrons sont également utilisés dans la production de boissons gazeuses et de limonade.
- . **Lime:** Les limes sont des agrumes verts souvent utilisés dans les plats mexicains et asiatiques. Les limes ont une saveur acide et légèrement amère.
- . **Mandarine:** Il existe plusieurs variétés de mandarines, dont la Satsuma, la Clementine et la Tangerine. Les mandarines ont une pulpe sucrée et juteuse, avec une acidité modérée.
- . **Clémentine:** La clémentine est une variété de mandarine sans pépins, avec une pulpe sucrée et une acidité faible.
- . **Bergamote:** La bergamote est un agrume souvent utilisé pour son huile essentielle dans les parfums. Elle a un goût amer et est souvent utilisée pour aromatiser les thés et les boissons alcoolisées (**Schaffer et al, 2019**).

II. L'orange

II.1. Définition:

Les oranges sont des agrumes appartenant à la famille des Rutacées et sont l'un des fruits les plus couramment consommés dans le monde. Elles sont originaires d'Asie et ont été cultivées pendant des milliers d'années.

Les oranges ont une pulpe juteuse et sucrée avec une acidité agréable. Elles sont riches en vitamine C, en fibres alimentaires et en divers antioxydants. Les oranges peuvent être consommées fraîches, en jus ou utilisées dans diverses préparations culinaires.

Les oranges sont également utilisées dans l'industrie alimentaire pour produire des arômes, des colorants et des huiles essentielles. L'huile d'orange est souvent utilisée dans les produits de nettoyage ménagers pour son parfum frais et son action nettoyante (**Schaffer et al, 2019**).

II.2.Types

Il existe de nombreux types d'oranges cultivées dans le monde entier. Voici une liste de quelques-unes des variétés les plus courantes :

. **Orange Navel** : Cette variété est la plus courante en Amérique du Nord. Elle est douce et juteuse avec une texture ferme et légèrement granuleuse. Elle doit son nom à la petite « navelle » ou deuxième fruit qui se forme à l'extrémité de la fleur.

. **Orange Valencia** : Cette variété est souvent cultivée en Floride et en Californie. Elle est très juteuse et a une saveur douce et acidulée. Elle est souvent utilisée pour faire du jus d'orange frais.

. **Orange sanguine** : Cette variété est également appelée "orange sanguine de Sicile" et est cultivée en Italie. Elle doit son nom à sa chair rouge foncé qui est riche en anthocyanes, des pigments qui lui donnent sa couleur caractéristique.

. **Orange amère** : Cette variété est également appelée « orange de Séville » et est souvent utilisée pour faire de la marmelade. Elle a une saveur amère et une texture épaisse.

. **Orange de mandarine** : Cette variété est plus petite que les oranges traditionnelles et a une saveur plus douce. Elle est facile à peler et est souvent utilisée comme collation pour les enfants (Schaffer et al,2019).

II.3. Composants:

Les oranges sont riches en nutriments et en composants bénéfiques pour la santé. Voici quelques-uns des composants clés que l'on trouve dans les oranges :

Vitamine C : Les oranges sont une excellente source de vitamine C, qui est un antioxydant puissant et qui aide à renforcer le système immunitaire.

Fibres : Les oranges contiennent des fibres solubles, telles que la pectine, qui peuvent aider à réguler la digestion et à réduire le cholestérol sanguin.

Caroténoïdes : Les oranges contiennent des caroténoïdes, tels que la lutéine et la zéaxanthine, qui sont bénéfiques pour la santé oculaire.

Flavonoïdes : Les oranges contiennent des flavonoïdes, tels que la naringénine et l'héspéridine, qui ont des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes.

Acides organiques : Les oranges contiennent des acides organiques, tels que l'acide citrique et l'acide malique, qui peuvent aider à réguler l'équilibre acido-basique de l'organisme.

Les oranges contiennent également des minéraux tels que le potassium, le calcium et le magnésium, ainsi que des vitamines du groupe B (Hyman., 2013).

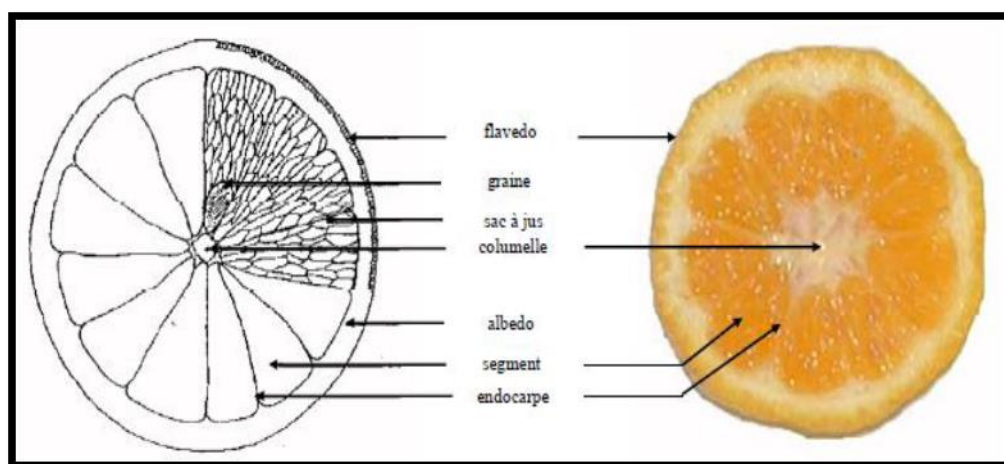


Figure 07: Coupe équatoriale d'une orange (Huet, 1991).

II.4. Compositions biochimiques:

Avec plus de 85% d'eau l'orange est un fruit désaltérant. C'est dans cette eau de Constitution que se trouvent sous forme dissoute les principaux éléments nutritifs (**Tableau. 01**) (Albrigo, 1970).

Tableau 01: Compositions biochimiques de l'orange (Albrigo, 1970).

Composants	Contenance
Glucides	8.5 à 12%
Acides organiques	1.2 % (acide citrique et un peu d'acide malique).
Vitamines	dominé par une teneur en vitamine C
Minéraux	40mg/ 100g
Pigments	Anthocyanes

III. Flavonoïdes

III.1. Définition:

Les flavonoïdes sont une classe de composés phytochimiques présents dans les plantes, y compris les agrumes tels que les oranges, les citrons et les pamplemousses. Les flavonoïdes sont des antioxydants puissants qui aident à protéger les cellules du corps contre les dommages causés par les radicaux libres. Ils sont également responsables de la couleur vive de nombreux fruits et légumes. (Overgaard et al. 2017).

Il existe plusieurs types de flavonoïdes, chacun ayant des propriétés uniques et bénéfiques pour la santé. Les flavonoïdes dans les agrumes, tels que la naringine et l'hespéridine, ont été étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti oxydantes et cardio-protectrices (Crozier et al. 2009).

III.2. Flavonoïdes présents dans les oranges:

Les oranges contiennent plusieurs types de flavonoïdes, notamment :

- . **Hespéridine** : c'est le flavonoïde le plus abondant dans les oranges, principalement dans la partie blanche de l'écorce et la pulpe. L'hespéridine est considérée comme un antioxydant puissant et a des propriétés anti-inflammatoires.
- . **Naringine** : c'est un autre flavonoïde courant dans les oranges, principalement dans la pulpe. La naringine est également un antioxydant et a des propriétés anti-inflammatoires.
- . **Narirutine** : c'est un flavonoïde moins courant dans les oranges, mais il est également présent dans la pulpe. La narirutine a des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Clemente et al. 2018).

IV. Naringine

IV.1. Définition:

La naringine est un flavonoïde de la famille des flavanones, qui est largement présente dans les agrumes, en particulier dans les oranges amères. Elle est considérée comme un antioxydant puissant et a des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et anticancéreuses potentielles. La naringine est également connue pour améliorer l'absorption d'autres nutriments et médicaments dans l'organisme (Li Li et al. 2018).

La naringine a également des propriétés hypoglycémiantes et hypocholestérolémiantes. Elle a été étudiée pour son potentiel dans la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la stéatose hépatique, de l'obésité, du diabète et de l'inflammation chronique (Sánchez et al. 2013).

De plus, la naringine peut améliorer l'absorption d'autres nutriments et médicaments dans l'organisme en inhibant l'enzyme CYP3A4, qui est responsable de la dégradation de nombreux médicaments dans le foie (Patel et al. 2020).

IV.2. Structur:

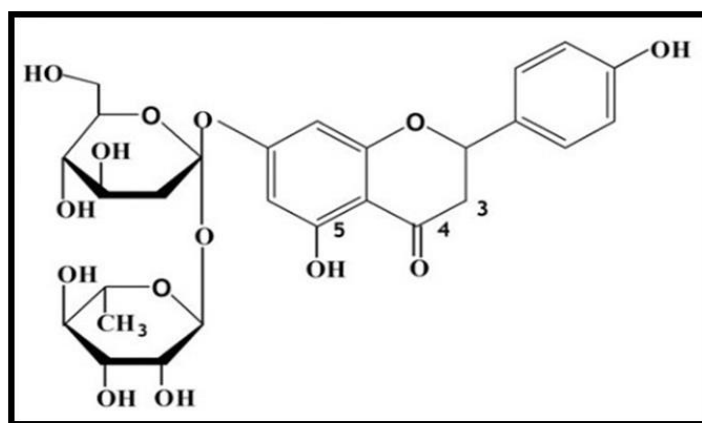


Figure 08: Structure de naringine

IV.3 propriétés physiques et chimiques:

La naringine est un flavonoïde de la famille des flavanones, et elle possède plusieurs propriétés physiques et chimiques. Voici quelques informations sur ces propriétés :

- . Masse moléculaire : 582,52 g/mol

- . Point de fusion : 181-183°C

- . Solubilité : insoluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'éthanol et le méthanol, soluble dans les solvants organiques tels que l'acétone et l'éther

- . Couleur : blanc à jaune clair

- . Odeur : inodore

En termes de propriétés chimiques, la naringine est un composé flavonoïde contenant plusieurs groupes fonctionnels, tels que des groupes hydroxyle, des groupes méthoxyle et un groupe cétone. Elle possède également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, qui sont liées à sa capacité à piéger les radicaux libres et à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (**Sánchez et al. 2013**).

IV.4. Application

La naringine présente plusieurs applications dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire en raison de ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses. Voici quelques exemples d'applications de la naringine :

Dans l'industrie pharmaceutique, la naringine est utilisée comme ingrédient actif dans des médicaments pour traiter l'inflammation, la douleur et les maladies cardiovasculaires (**Parekar et al. 2014**).

Dans l'industrie cosmétique, la naringine est utilisée comme ingrédient actif dans des produits de soins de la peau pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, qui aident à prévenir les dommages causés par les radicaux libres et à réduire l'inflammation (**Dandekar et al. 2019**).

Dans l'industrie alimentaire, la naringine est utilisée comme additif alimentaire pour améliorer la saveur et la couleur des aliments. Elle est également utilisée comme conservateur naturel et pour prévenir l'oxydation des graisses dans les aliments (**Rastogi et al. (2019)**).

Chapitre 3 :
Contexte théoriques des
techniques
Expérimentales utilisés

I. Les techniques d'analyses spectroscopiques

I.1. Spectroscopie d'absorption dans UV-Visible

Dans cette étude, nous nous intéressons aux plages de longueurs d'onde spécifiques. Pour la radiation ultraviolette (UV), nous considérons les longueurs d'onde allant de 190 à 400 nm. Quant à la radiation du domaine visible, nous nous concentrons sur les longueurs d'onde allant de 400 à 800 nm.. **(Biemont, É., 2008 et Gratien, E., 2008)** .

I.1.1. Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible

Les transitions électroniques UV-visibles dans une molécule correspondent aux énergies les plus significatives en chimie, avec des valeurs d'environ 13000 à 50000 cm^{-1} , équivalant à 160 à 665 KJ.mol^{-1} . Ces énergies sont de l'ordre de grandeur des énergies de liaison moléculaire et peuvent parfois entraîner la rupture de liaisons. De manière générale, ces rayonnements induisent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules **(Baudouin, A., 2012)**.

I.1.2. Loi de Beer-Lambert

L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est déterminée par deux facteurs : la longueur du trajet d'absorption (ℓ) et la concentration de l'espèce dans le milieu (C). La concentration est généralement exprimée en mol L^{-1} et la longueur en cm. La relation qui lie ces variables est donnée par $A_\lambda = \epsilon \lambda . \ell . C$, où $\epsilon \lambda$ représente le coefficient d'absorption molaire (ou d'extinction) du composé à la longueur d'onde λ . Ce coefficient est exprimé en $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et dépend de l'espèce chimique, de la longueur d'onde, du solvant et de la température **(Mesplede, J., Randon J. 2004 et Boutiti A., 2010)**.

I.1.3. Appareillage

Un spectrophotomètre est composé de quatre éléments essentiels :

. Source lumineuse:

- Une lampe au deutérium utilisée pour le domaine de 190 à 400 nm.
- Une lampe à filament de tungstène utilisée pour le domaine de 350 à 800 nm.

. Monochromateur: constitué principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie, il permet de sélectionner la longueur d'onde souhaitée.

. Cuve: contenant la solution de référence et la solution à analyser. Ces cuves doivent être parallélépipédiques et transparentes aux radiations. Pour travailler dans les domaines UV et visible, les cuves sont fabriquées en quartz. Leur épaisseur détermine la longueur du trajet optique (ℓ).

. **Détecteur:** composé de deux éléments, les photodiodes (semi-conducteurs) et le photomultiplicateur qui amplifie l'intensité du faisceau émergent (**Degallaix, S., Ilschner B.,2007**).

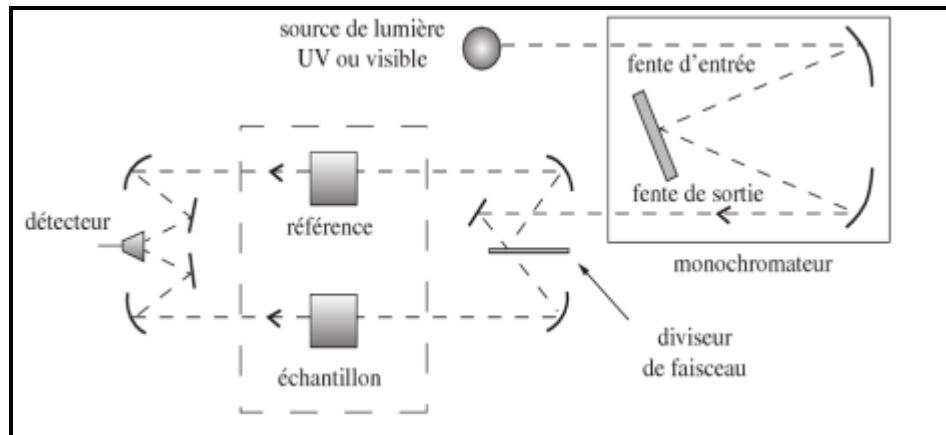


Figure09 : quatre partie essentielles de spectrophotomètre (Burgot, G., Burgot, J-L., 2011).

I .2. Spectrométrie Infrarouge.

A découverte du rayonnement infrarouge (IR) remonte à 1800, grâce à Frédéric Wilhelm Herschel. Ces radiations se situent au-delà des longueurs d'onde de couleur rouge et se trouvent entre la région du spectre visible et les ondes hertziennes. Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il est communément divisé en trois catégories : le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm ou 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm ou 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm ou 400-10 cm^{-1}) (**Benbayer, C. 2021**).

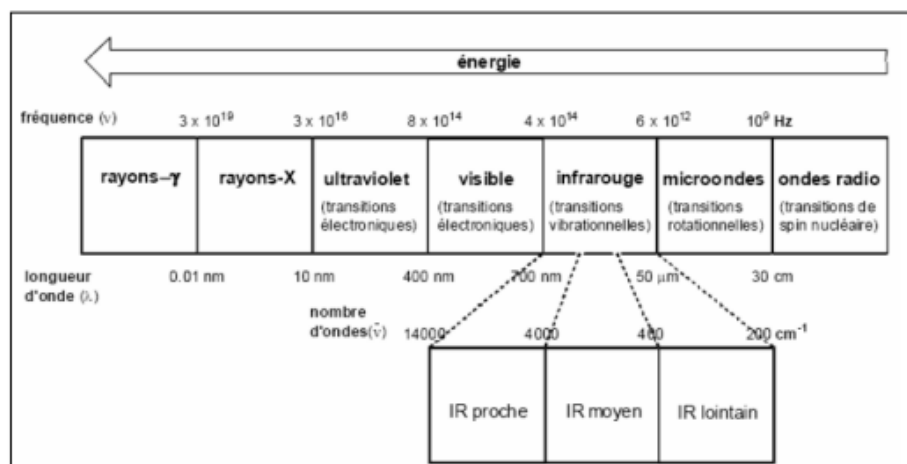


Figure 10: le spectre électromagnétique Benbayer, C. (2021).

I.2.1. Principe de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'interaction entre la lumière infrarouge et le nuage électronique des liaisons chimiques. Contrairement à la plupart des spectroscopies optiques telles que la spectroscopie de fluorescence, où l'absorption d'énergie permet à un électron de passer d'un état fondamental à un état excité, la spectroscopie d'absorption IR ne provoque généralement pas de transitions électroniques car le rayonnement émis par la source polychromatique n'est pas suffisamment énergétique. Cependant, il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle des molécules **(Benbayer, C. 2021)**.

I.3. La Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse utilisée pour déterminer la structure des molécules organiques. Il existe plusieurs types de RMN, tels que la RMN-1H, la RMN-13C et la RMN-19F. Dans cette étude, nous nous concentrerons sur la RMN du proton, qui implique les atomes d'hydrogène composés d'un proton et d'un électron.

Le principe de la RMN consiste à exposer la molécule à un champ magnétique, ce qui entraîne la résonance des atomes d'hydrogène. Les différentes fréquences de résonance des atomes d'hydrogène sont enregistrées dans un spectre qui permet de déterminer la structure de la molécule **(Benbayer, C. 2021)**.

I.4. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode analytique très répandue qui permet de séparer, identifier et quantifier des composés chimiques dans des mélanges complexes. Son fonctionnement repose sur le principe de la répartition d'un échantillon entre une phase stationnaire (généralement un solide ou un liquide contenu dans une colonne) et une phase mobile (un solvant liquide), afin d'analyser le déplacement distinct des différents composants à travers la colonne **(Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W. 2010)**.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) présente de nombreux atouts par rapport aux autres méthodes chromatographiques. Elle se distingue notamment par sa haute résolution, sa sensibilité accrue et sa capacité à traiter divers types d'échantillons. La HPLC trouve ainsi des applications dans de nombreux domaines, tels que l'analyse pharmaceutique, la surveillance environnementale, l'analyse alimentaire, la médecine légale, et bien d'autres encore **(Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch, S.R. 2017)**.

Un système HPLC de base est composé de plusieurs éléments essentiels. Il comprend un système d'injection de l'échantillon, un système de distribution de la phase mobile, une colonne de séparation, un détecteur et un système d'acquisition de données. La phase mobile est généralement constituée d'un mélange de solvants, tels que l'eau et un solvant organique comme l'acétonitrile ou le méthanol, qui est pompé à travers la colonne sous haute pression. L'échantillon est injecté sur la colonne, où les différents composants sont séparés en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire et la phase mobile (**Mobile. Lämmerhofer, M., & Weckwerth, W. (Eds.). (2017).**

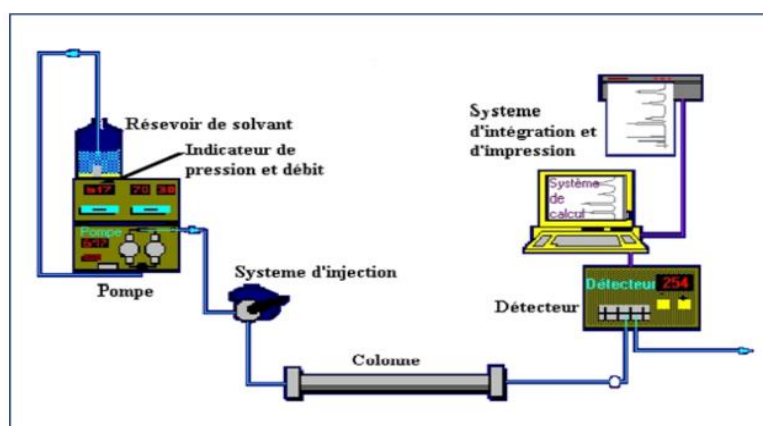


Figure 11: La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

I.5. Chromatographie sur couche mince:

A chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation et d'analyse des composants d'un mélange qui repose sur les variations d'affinité entre une phase stationnaire solide (la couche mince) et une phase mobile liquide. Cette technique est fréquemment employée en chimie analytique afin de séparer, identifier et quantifier les constituants d'un échantillon (**Sherma, J., & Fried, B. 2003**).

Dans la chromatographie sur couche mince (CCM), une fine couche de matériau adsorbant, généralement de la silice gel ou de la cellulose, est déposée sur une plaque de support pour former la phase stationnaire. L'échantillon est appliqué sur cette plaque, puis celle-ci est immergée dans un solvant (phase mobile) qui se déplace par capillarité sur la surface de la couche mince. En raison des interactions distinctes avec la phase stationnaire et la phase mobile, les différents composants de l'échantillon se séparent progressivement le long de la plaque (**Stahl, E. 1969**).

II. L'amarrage moléculaire:

La biologie structurale aborde en premier lieu le défi du repliement des macromolécules pour atteindre une structure tridimensionnelle fonctionnellement active. La seconde problématique essentielle concerne la compréhension de la communication moléculaire, qui

permet l'échange d'informations, l'activation ou l'inhibition des processus biologiques. Cette dernière problématique représente un enjeu majeur dans le domaine 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 une méthode utilisée pour prédire la structure du complexe intermoléculaire formé lors de l'association d'au moins deux molécules. Il permet également de comprendre comment un ligand (une petite molécule) interagit avec un récepteur (une macromolécule) et de calculer l'énergie de liaison entre eux. En outre, le docking permet de déterminer quel ligand candidat interagira de manière optimale avec un récepteur cible. (Asses, Y., 2011; Lanez, E., 2016).

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

L'étape de sélection est cruciale et implique le positionnement du ligand dans le site actif de la molécule, ainsi que l'échantillonnage des conformations, des positions et des orientations possibles (poses). Seules les poses représentant les interactions les plus favorables sont conservées. Les logiciels de docking sont donc des outils extrêmement précieux en biologie, en pharmacie et en médecine, car la plupart des principes actifs sont des petites molécules (ligands) qui interagissent avec des cibles biologiques d'intérêt thérapeutique (EL Hadj., 2016; Lanez., 2016).

II.2.2. Modélisation du potentiel énergétique

Afin de calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, Autodock Tools intègre les termes d'un champ de force classique, auxquels s'ajoutent deux termes relatifs à l'entropie. L'énergie est exprimée par l'équation suivante:

$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$ (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).

Pour établir une relation entre la structure des complexes et l'énergie libre de liaison, il est nécessaire d'utiliser une approche empirique de type QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Dans le cas d'Autodock, le modèle empirique repose sur une régression linéaire multiple des différents termes de l'équation d'énergie libre. Chaque terme est pondéré par un coefficient dérivé à partir d'un ensemble 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 exprimée par l'équation suivante:

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

Où **R**: constante des gaz parfaits ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) ;

T : température absolue (298.15 K)

(Garrett, M. Met al., 1998).

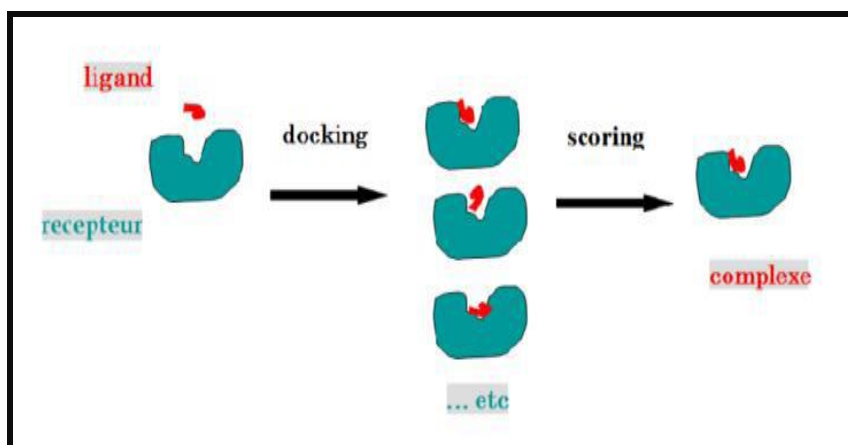


Figure 12 : Les étapes de docking moléculaire (EL Hadj, S. K., 2016).

III. SwissADME:

Les modèles bioinformatiques offrent des alternatives viables aux expérimentations. Nous vous présentons ici SwissADME, un nouvel outil web qui offre un accès gratuit à une gamme de modèles prédictifs rapides et fiables pour les propriétés physico-chimiques, la pharmacocinétique (ADME), la similarité avec les médicaments et la facilité d'utilisation en chimie médicinale. Une interface conviviale via le site web (<http://www.swissadme.ch>) assure une saisie et une interprétation simples et efficaces. Cet outil permet à la fois aux experts en chimie informatique et aux non-spécialistes d'effectuer rapidement des prédictions clés pour une collection de molécules afin de soutenir leurs efforts de découverte de médicaments (Daina et al., 2017).

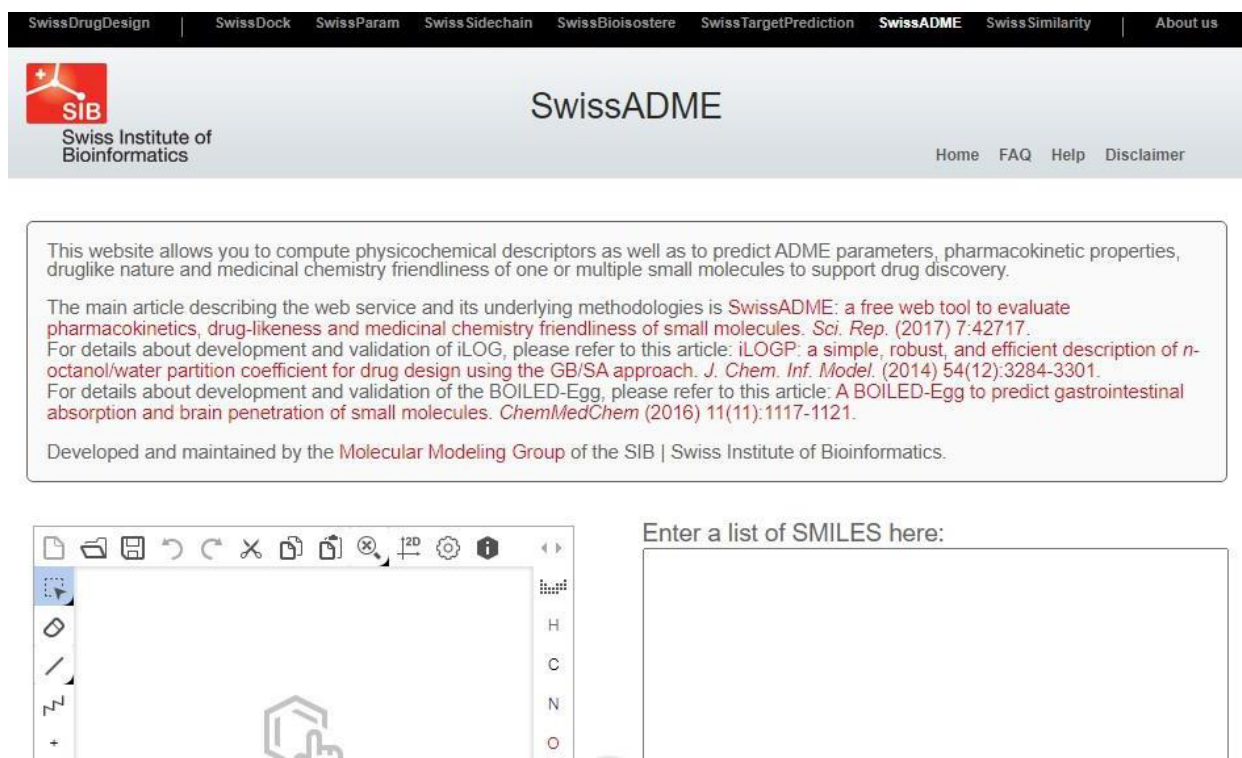


Figure13: Page d'accueil du serveur SwissADME.

IV. admetSAR

Le serveur admetSAR, un outil de relations structure-activité ADMET, est une ressource complète permettant de prédire les propriétés ADMET des médicaments candidats et des produits chimiques environnementaux. Plus de 200 000 données annotées ADMET pour environ 96 000 composés uniques ont été soigneusement sélectionnées à partir de nombreuses sources bibliographiques. Le serveur admetSAR offre une interface conviviale permettant de rechercher facilement des profils chimiques en utilisant le CASRN, le nom commun ou des critères de similarité. La nouvelle version d'admetSAR (version 2.0) se concentre principalement sur la prédiction in silico des propriétés chimiques ADMET. Elle propose plus de 40 modèles prédictifs pour de nouvelles propriétés chimiques ADMET dans le cadre du filtrage in silico (Cheng et al., 2012).

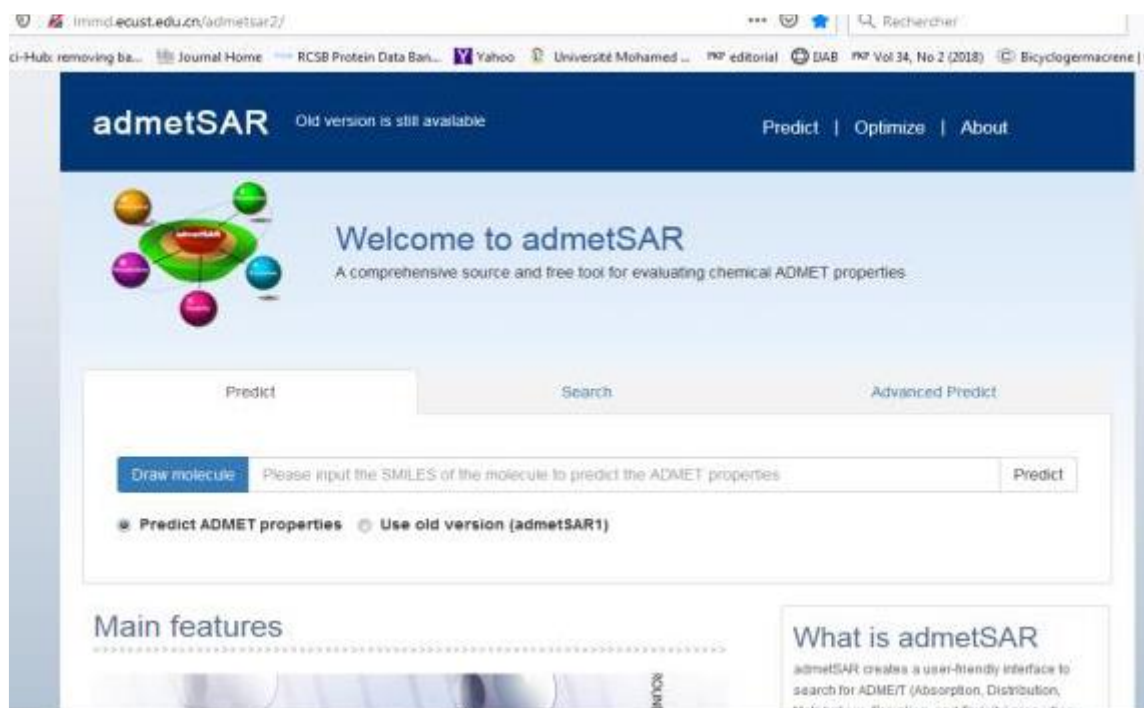


Figure14: Page d'accueil du serveur admetSAR .

V. Protox :

Un serveur Web gratuit est mis à disposition pour la prédiction de la toxicité in silico, destiné aux toxicologues, aux organismes de réglementation, aux chimistes computationnels et médicaux, ainsi qu'à tous les utilisateurs sans accès à http://tox.charite.de/protox_II . Ce serveur Web utilise une structure chimique bidimensionnelle en tant qu'entrée et fournit un profil potentiel de toxicité du produit chimique à l'aide de 33 modèles avec des scores de confiance. Il propose également un tableau radar de toxicité globale comprenant les trois composés les plus similaires ayant une toxicité aiguë connue (P.Banerjee et al.,2018).

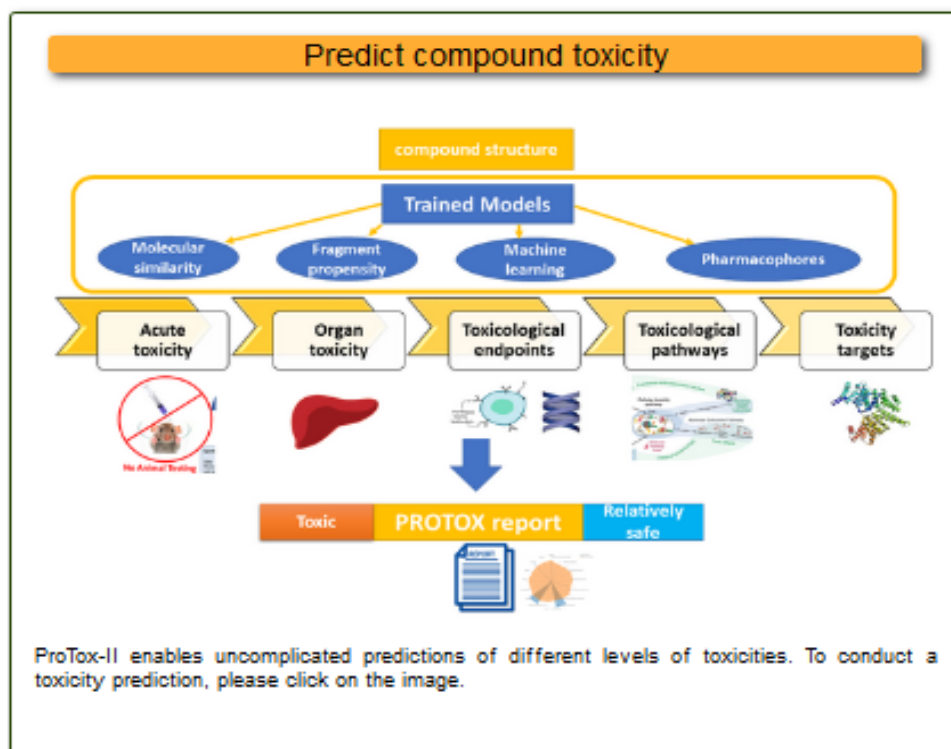


Figure15: Page d'accueil du serveur Protox (P.Banerjee et al.,2018).

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 1 mg/ml) a été préparée dans un tampon phosphate salin (pH = 6.4).

- **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).

- **Acarbose :**

Différentes concentrations de solution d'acarbose (commercialisée sous le nom d'Acorbay 50 mg) ont été préparées dans un tampon phosphate salin (pH = 6.4).

- **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. 500 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 :

✓ Plaque chauffante	✓ Auto clave	✓ Vortex
✓ Balance électrique	✓ Bain marie	✓ PH-mètre
✓ Bain de glace	✓ Bec benzène	✓ Pipettes pasteur
✓ Boite de pétrie	✓ Centrifugeuse	✓ Portoir pour tubes spéciaux
✓ Etuve	✓ Micropipettes ajustables	✓ Papier filtre

I.3. 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 (C ₃ H ₈ O)
✓ Méthanol (MeOH)	✓ Sulfate de dodécyle de sodium (SDS)
✓ Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	✓ Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄)
✓ D'eau physiologique stérile (NaCl) 0.9%	✓ Tris(hydroxyméthyl) aminométhane C ₄ H ₁₁ NO ₃

II. Méthodes :

II.1. Extraction de Naringine :

Le protocole d'extraction de la naringine à partir de la peau de Orange 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 Orange bien lavé ont été épluchés à l'aide d'un couteau aiguisé
Figure 16.



Figure 16 : Orange

- 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 17**. Le poids des croûtes séchées était de 117.9615 g.



Figure 17 : Les croûtes de Orange pendant le séchage

c. **Broyage :** Les croûtes séchées ont été broyées pour obtenir une poudre **Figure 18**.



Figure 18 : 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'extrait méthanique obtenu a été séché avec un évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°C pour évaporer le méthanol **Figure 19**.

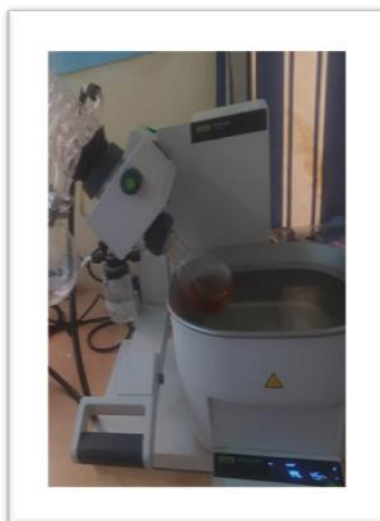


Figure 19 : Montage d'évaporation à pression réduite

- e. Dissolution :** Soixante millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à l'extrait méthanoïque, puis le mélange a été agité à bain-marie (**Figure 20**) à une température de 70°C pendant une durée de 30 minutes.



Figure 20 : Montage de chauffage

- f. Cristallisation :** Le mélange a été transféré dans un ampoule à décanté (**Figure 21**) 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 21 : 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 de l'Orange.

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 réaliser 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 a une concentration connue du naringine, puis on la place dans la cuve du spectrophotomètre. On sélectionne ensuite une 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 22**.

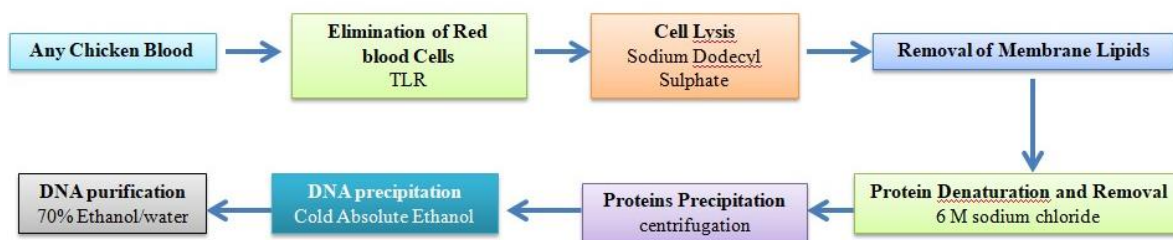


Figure 22 : Étapes impliquées dans l'extraction d'ADN.

✓ *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 23**), et extraits le même jour de travail.



Figure 23 : 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 24**), puis le flacon a été laissé à sécher pendant 5 minutes.

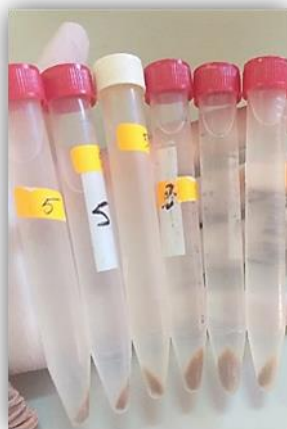


Figure 24 : La disparition de la couleur rouge du sang.

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 centrifugé à 172 rpm pour 90 minutes à 55 °C. Après centrifugation, 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 25** montre le spectre électronique de l'ADN isolé.

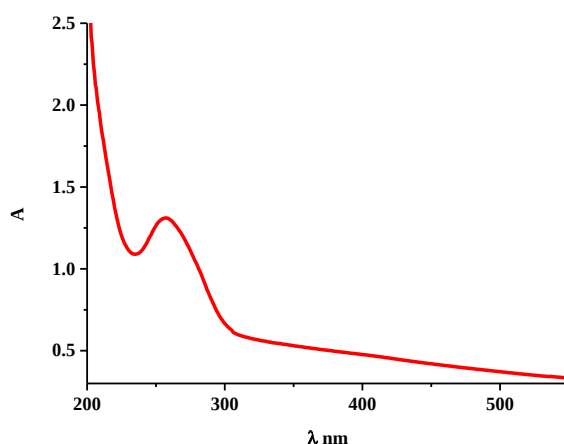


Figure 25 : Spectre électronique d'échantillon d'ADN extrait.

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 A_{260}/A_{230} 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 25** et ont été répertoriées dans le **Tableau 02**

Tableau 02 : 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, A₀ et A sont respectivement l'absorbance du naringine en l'absence et en présence d'ADN, ε₀ 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 µL de naringine (0.3 mg/mL à 10 mg/mL) a été placé dans un tube et 250 µL de tampon de phosphate de sodium salin 0.02 M (pH = 6.4) 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 µL de solution d'amidon à 1% dans 0.02 M de tampon de phosphate de sodium salin (pH = 6.4) ont été ajoutés à intervalles réguliers et incubés à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée en ajoutant 500 µL 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 (IC₅₀) ont été déterminées graphiquement.

II.4.3. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne :

II.4.3.1. 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**):

$$\%Inhibition = \left(1 - \frac{Abs_{Naringine}}{Abs_{Contrôle}} \right) \times 100 \quad (3)$$

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 03). 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 03 : 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>

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 04**), 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 04 : 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 26**.

Quant aux structures bidimensionnelles (2D) de l'acarbose, 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 27**.

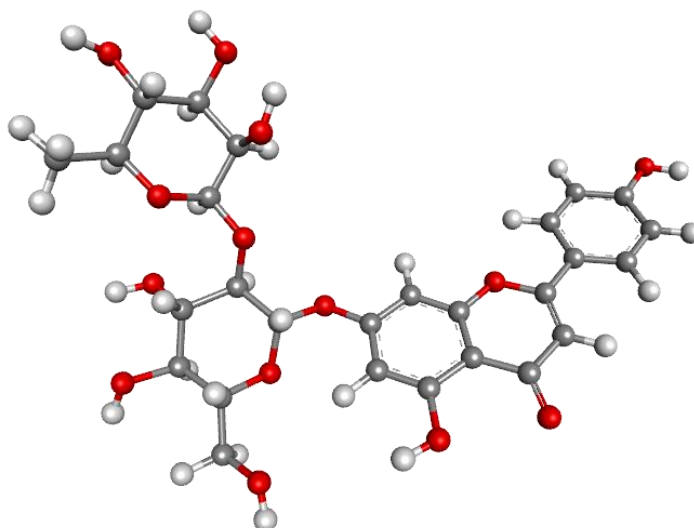


Figure 26 : Structure de naringine optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)

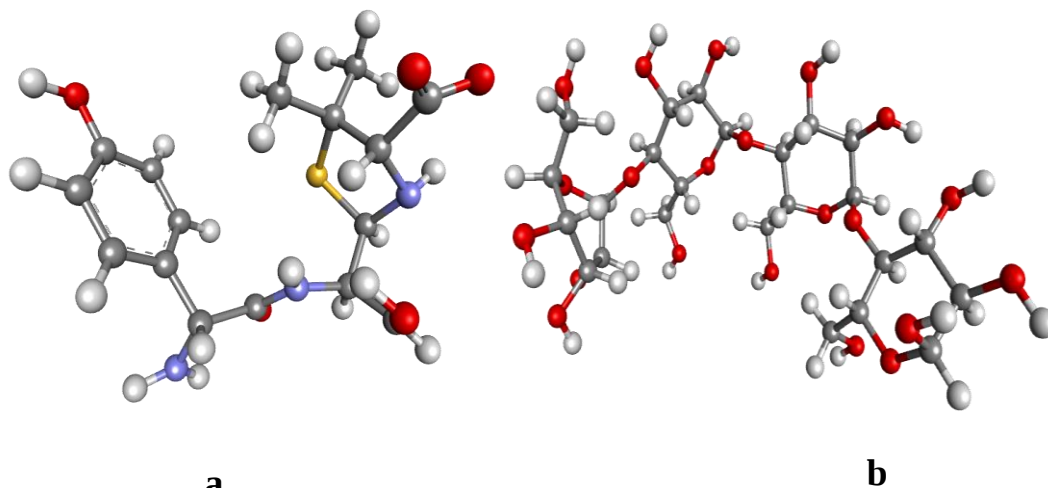


Figure 27 : Structure de : Amoxicilline (a) et Acarbose (b) extraites de la base de données DrugBank

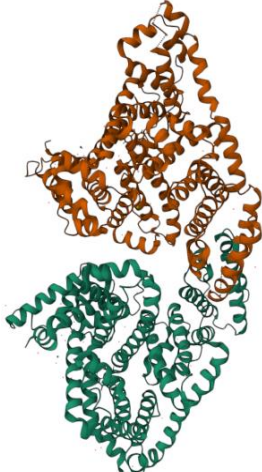
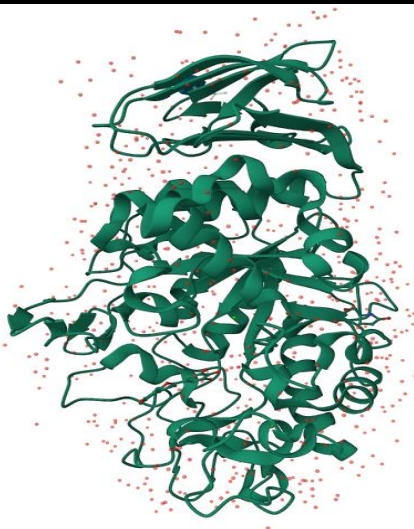
II.5.2.2. Préparation des récepteurs :

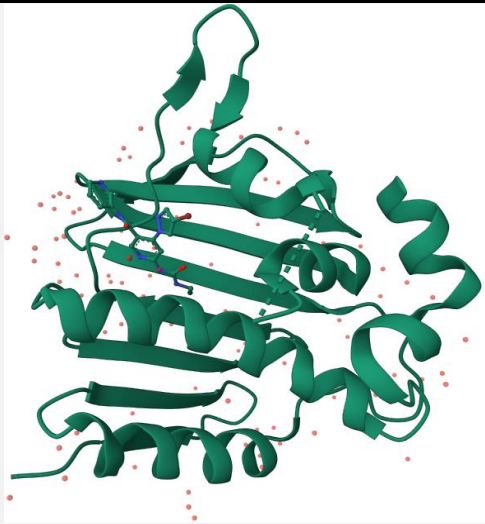
Les structures 3D des récepteurs, y compris le récepteur de l'ADN humain (PDB ID : 1W0) (**Court et al. 2005**), l'albumine de sérum bovin (PDB ID : 6QS9) (**Castagna et al. 2019**), l'alpha-amylase pancréatique humaine (PDB ID : 4GQR) (**Williams et al. 2012**), cyclooxygénase (PDB ID : 4OTY) (**Windsor et al. 2013**), Escherichia coli (PDB ID : 6F86) (**Narramore 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 05** 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 05 : 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 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 :

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 06**, 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 06 : 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
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 Orange. 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, 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 28**) avec une 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 28 : 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 29**) 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).

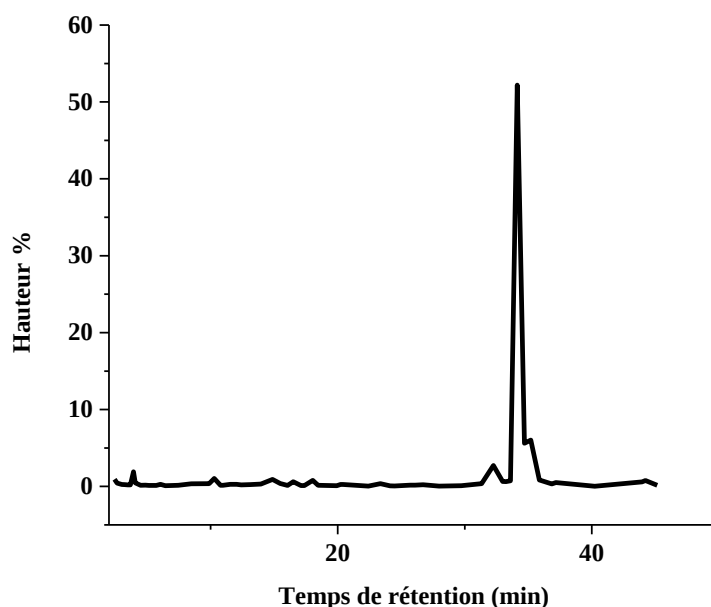


Figure 29 : Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine.

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 30**).

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.

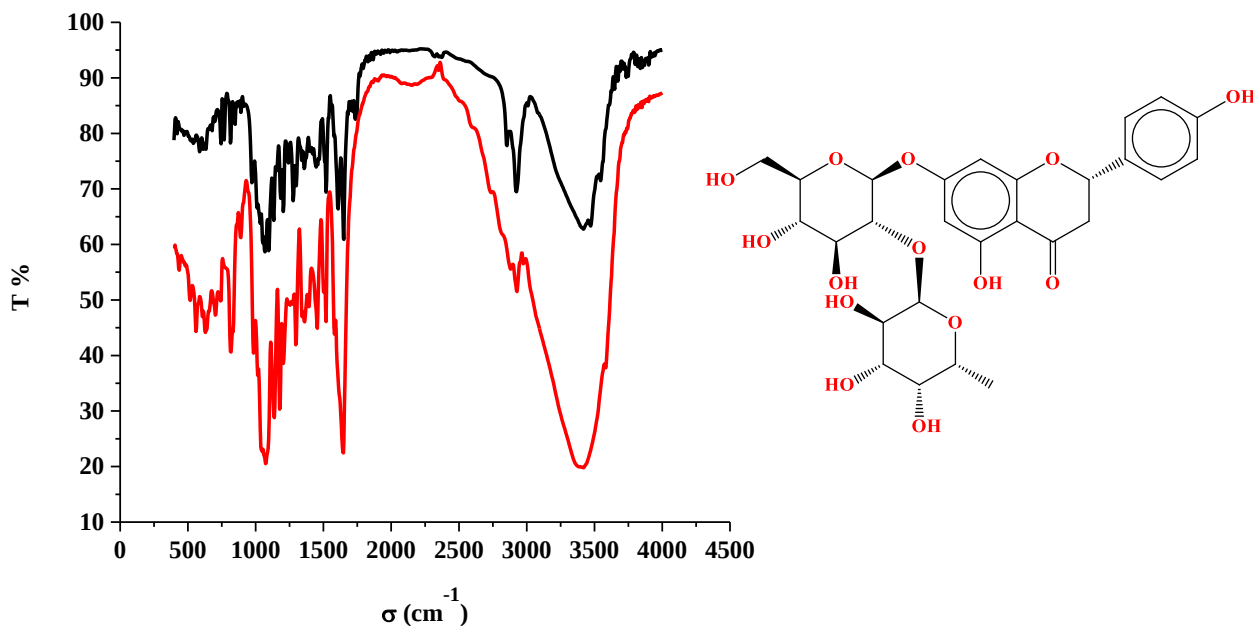


Figure 30 : Caractérisation du naringine extrait (Ligne noire) et naringine référence (Ligne rouge) par spectroscopie infrarouge (IR).

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 Orange (**Ghosal, Ghosh, and Das 2018**).

I.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption UV-visible a été utilisée pour caractériser le naringine extrait d'Orange. Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de 283 nm (**Figure 31**), 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 Orange (**Cordenonsi et al. 2017**).

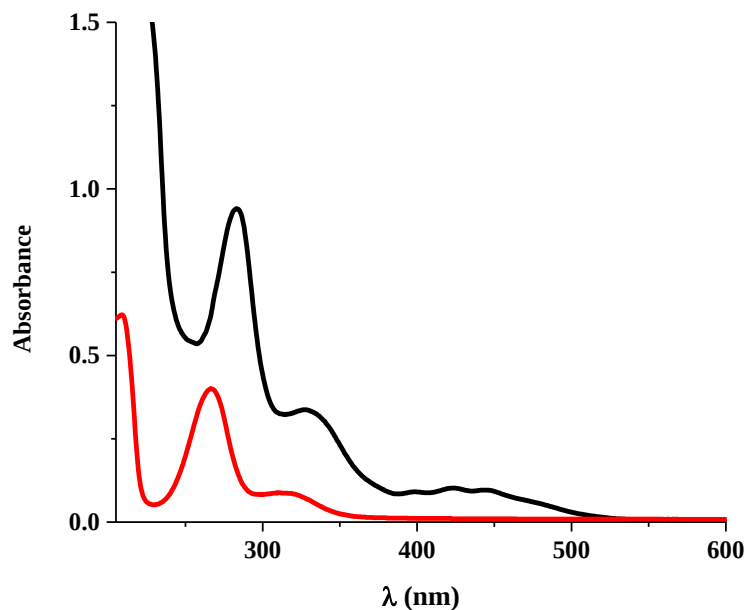


Figure 31 : Spectre UV du naringine extrait (Ligne noire) et de naringine référence (Ligne rouge).

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 32). 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.

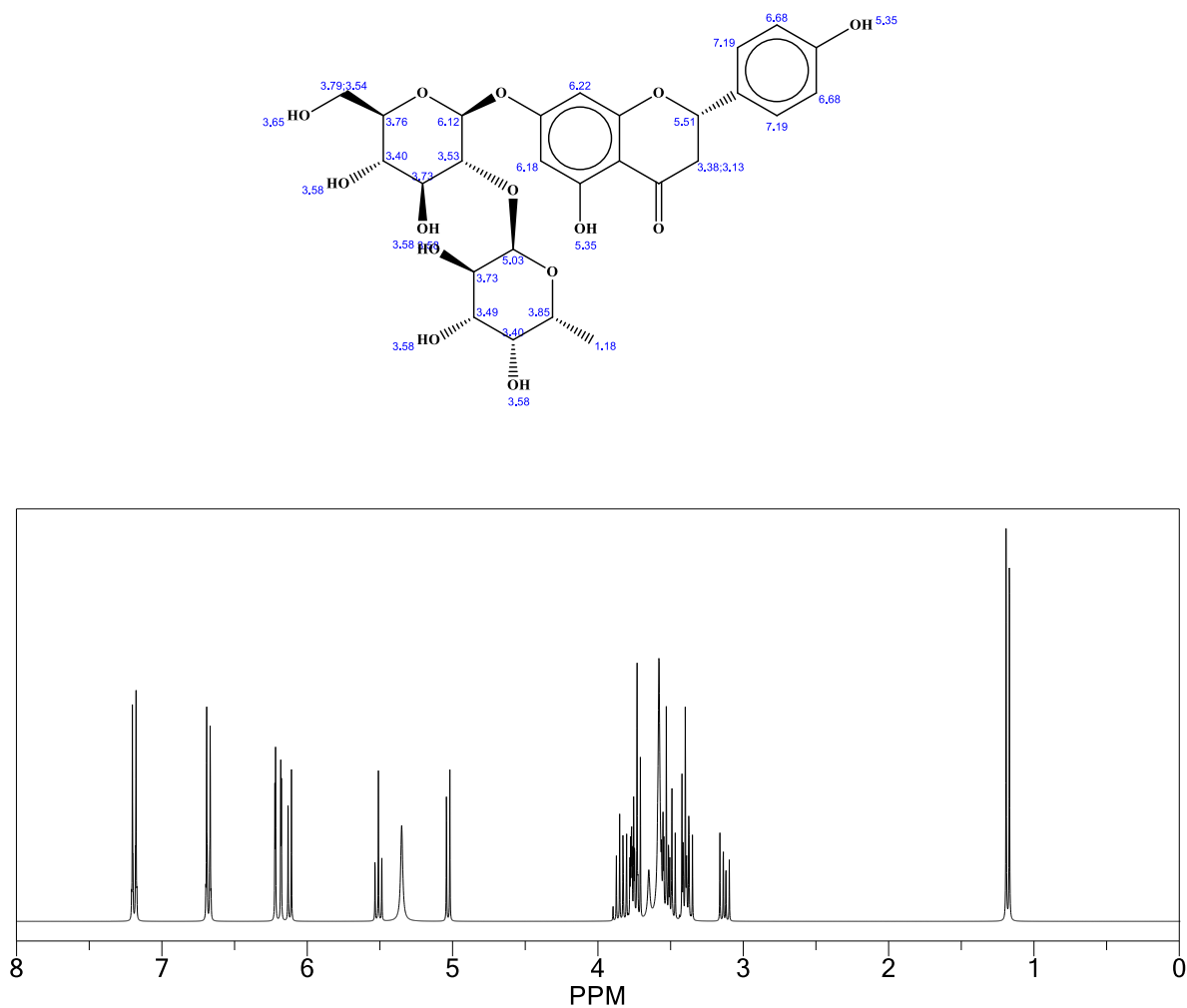
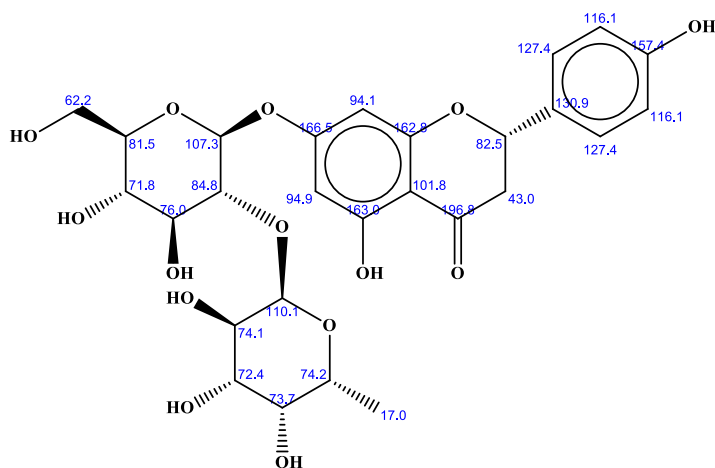


Figure 32 : Spectre RMN du ^1H de naringine.

De même, le spectre RMN du carbone (^{13}C) du naringine (**Figure 33**) 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.



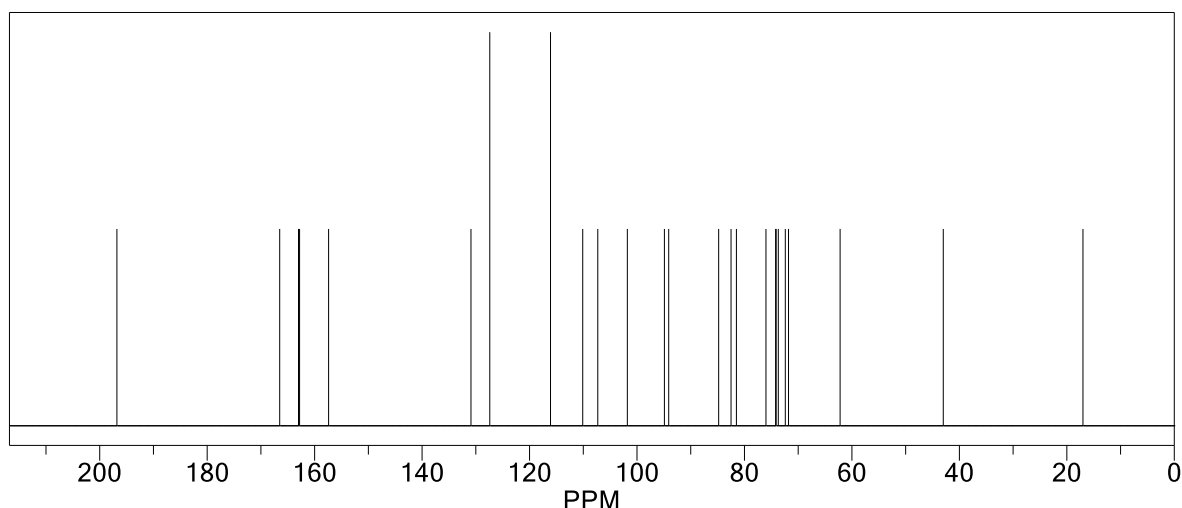


Figure 33: Spectre RMN du ^{13}C de naringine.

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 34**. 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**).

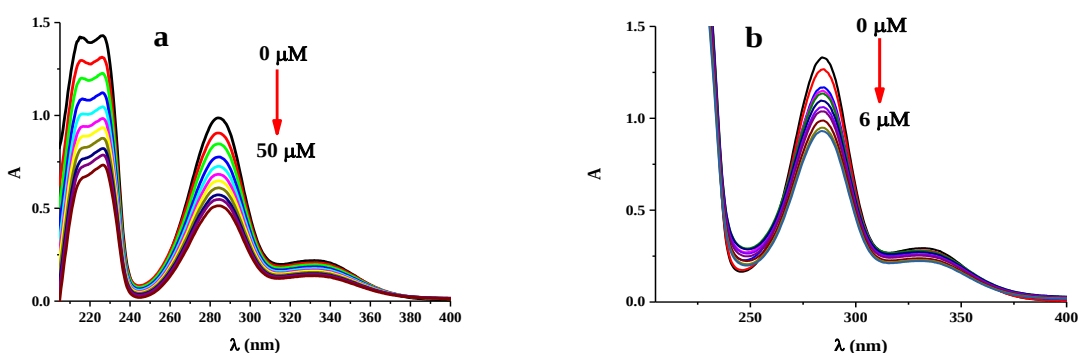


Figure 34 : Spectres d'absorption UV-visible de 1 mM de naringine en absence et en présence de concentrations croissantes d'ADN (a) et de BSA (b) dans une solution 90% éthanol/tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1 M à un pH de 7.2 et à température de 298 K.

Les concentrations d'ADN et de BSA ajoutées ainsi que les valeurs d'absorbance obtenues à partir des spectres électroniques de la **Figure 34** sont regroupées dans le **Tableau 07** suivant :

Tableau 07 : Valeurs des absorbances tirées à partir du spectre électroniques UV-VIS de la **Figure 34**

[ADN] (μM)	Absorbance	[BSA] (μM)	Absorbance
0.00	1.85	0.00	1.98
6.35	1.56	0.73	1.85
12.32	1.39	1.41	1.74
17.92	1.17	2.05	1.65
23.19	0.93	2.66	1.57
28.16	0.88	3.23	1.53
32.85	0.8	3.77	1.47
37.29	0.74	4.28	1.41
41.49	0.7	4.76	1.36
45.48	0.64	5.22	1.41
49.28	0.61	5.66	1.27

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 $1/[\text{ADN}]$ ou $1/[\text{BSA}]$ (**Figure 35**) selon l'Équation 1 citée auparavant. La constante de liaison est calculée du rapport pente/interception.

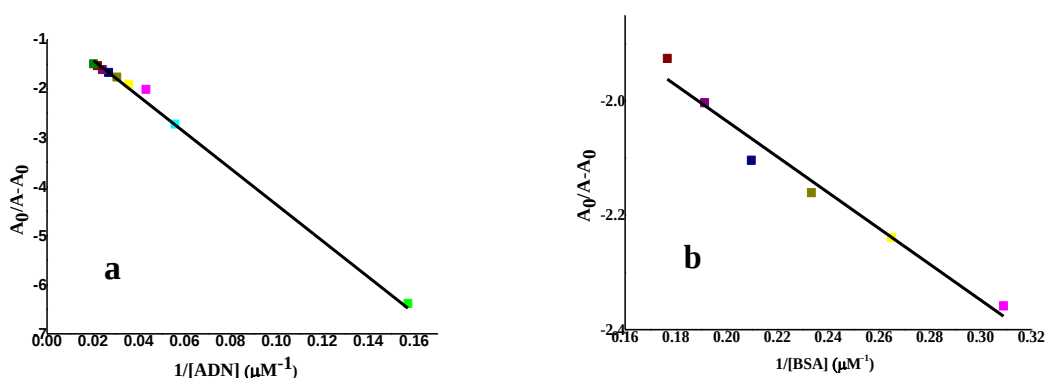


Figure 35 : Les droites de régression linéaire de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[\text{ADN}]$ (a) et $1/[\text{BSA}]$ (b) ont été utilisés pour calculer les constantes de liaison de naringine l'ADN et BSA.

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, $8.32 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ et T est la température absolue, 298K .

Les paramètres de liaison sont répertoriés dans le **Tableau 08**.

Tableau 08 : Constante de liaison et énergie libre de liaison pour le naringine avec l'ADN et le BSA à partir des données UV à $\text{pH} = 7.2$ et $T = 298 \text{ K}$

Adduits	Équations	R^2	$K (\text{M}^{-1})$	$-\Delta G (\text{KJ.mol}^{-1})$
Naringine_ADN	$y = 36.866x - 0.679$	0.989	1.84×10^4	24.35
Naringine_BSA	$y = -10.244x - 1.125$	0.997	1.09×10^5	28.77

Les résultats obtenus montrent que la naringine a une forte affinité avec l'ADN et le BSA, avec des constantes de liaison élevées de $1.84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour l'ADN et $1.09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 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 $-24.35 \text{ KJ.mol}^{-1}$ pour l'ADN et de $-28.77 \text{ KJ.mol}^{-1}$ 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 09** suivant :

Tableau 09 : 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 Orange a été étudié en utilisant le modèle d'inhibition de l'α-amylase et les résultats sont présentés dans le **Tableau 10**. 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 36**), tous les composés étudiés ont augmenté significativement l'inhibition de l'α-amylase (%) avec une augmentation correspondante de la concentration de ligand.

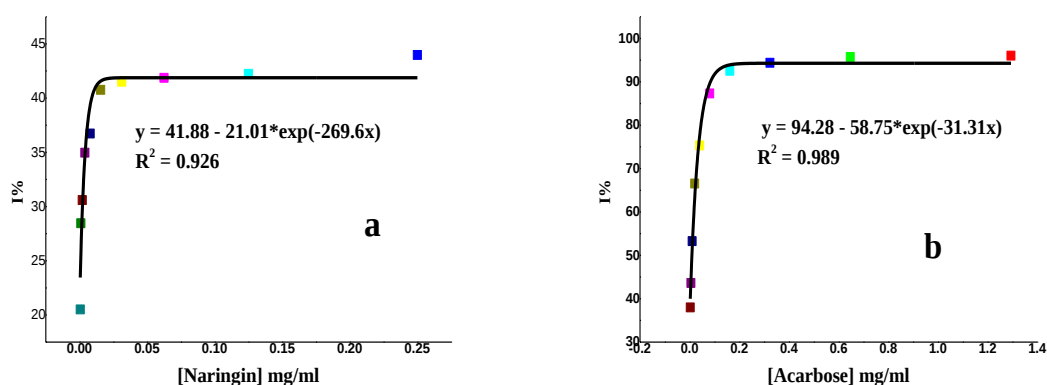


Figure 36 : Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringine (a) et Acarbose (b).

Tableau 10 : 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
IC₅₀ = 3.5 µg/ml		IC₅₀ = 9.02 µg/ml	

La naringine montre une inhibition de l' α -amylase croissante avec l'augmentation de sa concentration. À une concentration de 0.031 mg/ml, l'inhibition est de 41.51%, et elle augmente progressivement pour atteindre 43.97% à une concentration de 0.25 mg/ml. À des concentrations plus faibles de naringine (inférieures à 0.25 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' α -amylase, est de 3.5 µg/ml.

En comparaison, l'acarbose, un médicament couramment utilisé comme inhibiteur de l' α -amylase dans le traitement du diabète, montre une inhibition plus forte de l'activité de l' α -amylase à des concentrations plus élevées. Par exemple, à une concentration de 0.002 mg/ml, l'inhibition de l'acarbose est de 38 %, et elle augmente pour atteindre 96.04 % à une concentration de 1.294mg/ml. L'IC₅₀ de l'acarbose est de 9.02 µg/ml, ce qui est plus élevé que celui de la naringine (environ (5.52 fois).

Ces résultats suggèrent que la naringine présente une activité inhibitrice de l' α -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 37) a donné une pente de $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon) K_b$ et une intersection "y" égale à $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)$, où K_b est le rapport de la pente sur l'intersection "y".

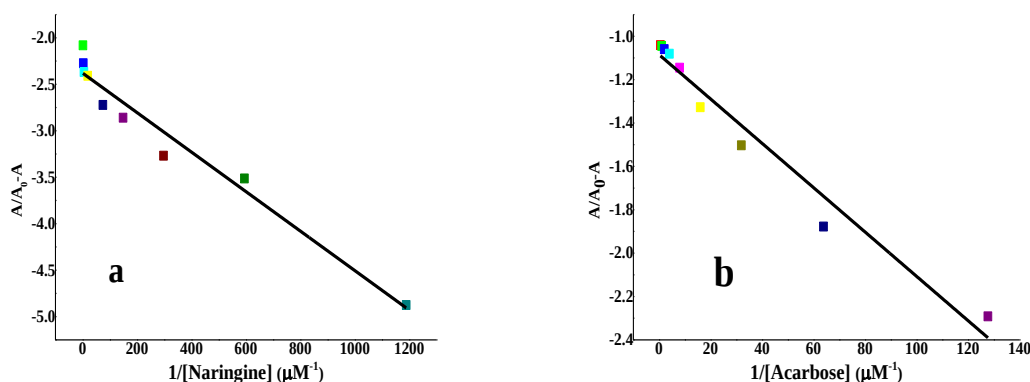


Figure 37 : Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringine]$ (a) et $1/[Acarbose]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison.

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 étudiées, 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 11.

Tableau 11 : Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l'alpha-amylase calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R ²	K (M^{-1})	$-\Delta G$ (KJ.mol ⁻¹)
Naringine_α-amylase	$y = -0.002x - 2.380$	0.952	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 0.952, 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'alpha-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'alpha-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.

1.2.3. 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.

1.2.3.1. 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.



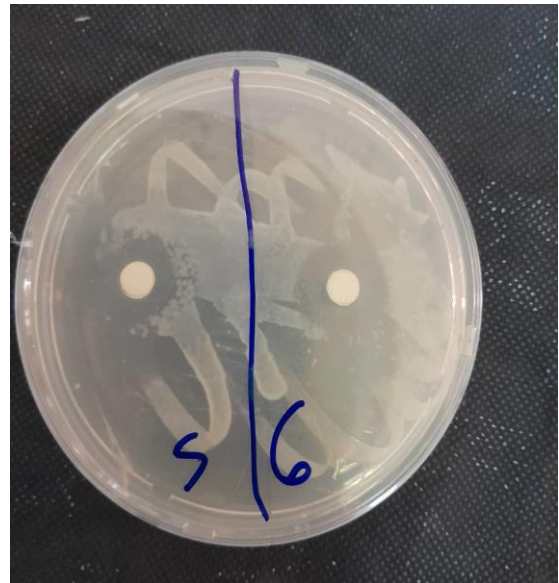
Zone d'inhibition de la naringine contre *E. coli*



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



Zone d'inhibition de naringine contre *S. aureus*



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

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 12** suivant :

Tableau 12 : Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre *E. coli* et *S. aureus*.

Antibiotique	Bactérie	Diamètre de zone (mm)
Naringine	<i>Escherichia coli</i>	18.5
Amoxicilline	<i>Escherichia coli</i>	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*.

1.2.3.2. Activités inhibitrice 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 15 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 13** suivants :

Tableau 13 : Valeurs des absorbances tirées 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	2.288	2.358	0.01	2.117	1.954
2	2.261	2.231	0.02	1.718	1.816
3	2.152	2.214	0.04	1.658	1.626
4	2.041	2.168	0.08	1.103	1.389
5	2.01	2.059	0.16	0.828	1.344
6	1.928	2.057	0.31	0.677	0.868
7	1.753	1.953	0.63	0.638	0.21
8	1.72	1.772	1.25	0.395	0.197
9	1.693	1.701			
10	1.669	1.525			
11	1.658	1.43			
12	1.656	1.399			

13	1.647	1.218
14	1.579	0.958
15	1.52	0.815

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 14**.

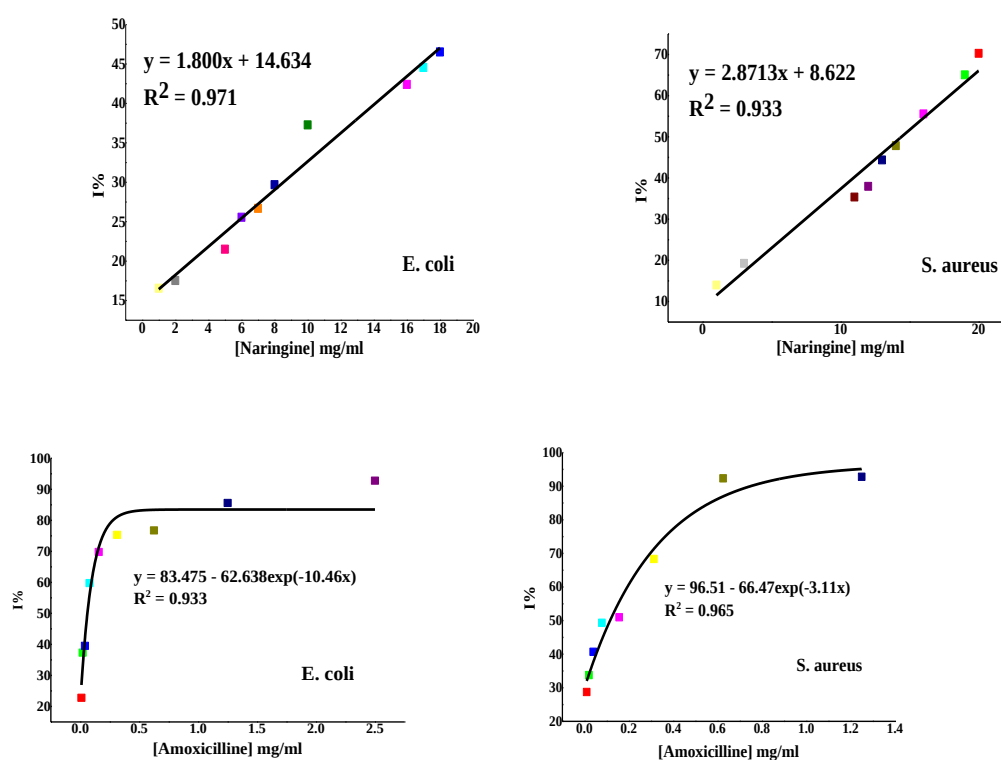


Figure 39: Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline.

Tableau 14 : 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>

16.55	14.00	22.794	28.738
17.54	19.25	37.345	33.771
21.51	20.93	39.533	40.700
25.56	35.37	59.774	49.344
26.69	37.96	69.803	50.985
29.68	44.38	75.310	68.344
37.27	47.84	76.732	92.341
42.41	55.57	85.594	92.815
44.56	65.06	92.77	
46.53	70.27	IC ₅₀ = 0.059 mg/ml	IC ₅₀ = 0.115 mg/ml
IC ₅₀ = 3.29 mg/ml	IC ₅₀ = 5.46 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 3.29 mg/ml et 5.46 mg/ml respectivement.

En ce qui concerne la naringine, les résultats montrent une inhibition de la croissance de bactéries allant jusqu'à 46.53 % pour *E. coli* et 70.27 % pour *S. aureus*, à la concentration la plus élevée testée (15 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* à la concentration la plus élevée testée (1.25mg/ml). Cela confirme l'efficacité bien connue de l'amoxicilline en tant qu'antibiotique contre les infections bactériennes.

I.2.3.3. 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 ($K_b = \text{pente}/\text{intersection}$).

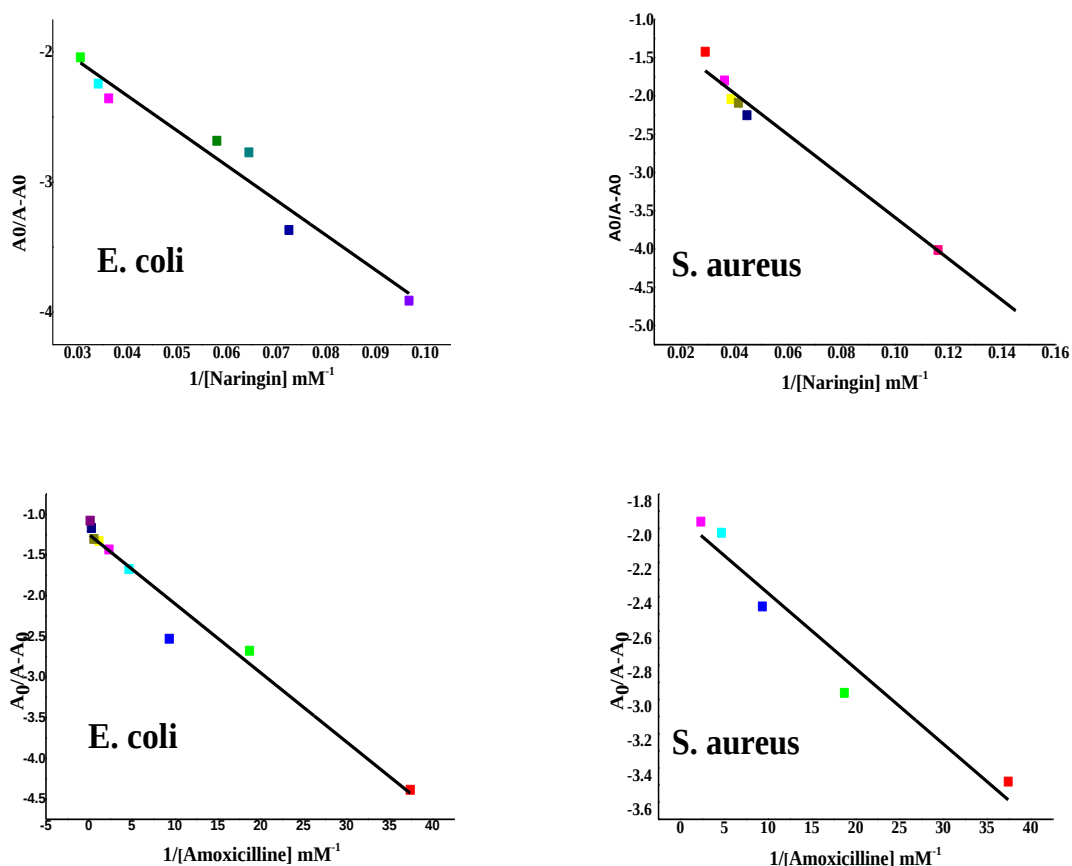


Figure 40: Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[\text{Naringine}]$ et $1/[\text{Amoxicilline}]$ utilisées pour calculer les constantes de liaison.

I.2.3.4. 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 15**.

Tableau 15 : 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	$y = -26.787x - 1.264$	0.918	3.70×10^5	31.79
Naringine_Staphylococcus aureus	$y = -27.005x - 0.886$	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	$y = -0.040x - 1.939$	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 16**), ses propriétés physico-chimiques (**Tableau 17**), ses caractéristiques de lipophilie et de solubilité dans l'eau (**Tableau 18 et 19**), ses paramètres pharmacocinétiques (**Tableau 20**), sa conformité aux règles de similarité aux médicaments et son score de biodisponibilité (**Tableau 21**) ainsi que ses propriétés de chimie médicinale (**Tableau 22**). Les résultats obtenus pour la naringine ont été comparés aux médicaments standards (Acarbose, Amoxicilline).

Le **Tableau 17** 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), à l'amoxicilline (25). Les composés aromatiques ont été évalués en comptant le nombre d'atomes aromatiques lourds, où la naringine en a 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 18** 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. 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 plus lipophile que l'acarbose et l'amoxicilline.

Le **Tableau 19** présente les prévisions de la solubilité des composés étudiés (Naringine, Acarbose, 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, 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**).

Tableau16 : 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
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=C(C=C(O)C=C1)C(O)=O</chem>	365.40

Tableau 17: Propriétés physico-chimiques des composés étudiées.

Propretés	Naringine	Acarbose	Amoxicilline
Num. Atomes lourds	41	44	25
Num. arom. Atomes lourds	12	0	6
Fraction Csp3	0.52	0.88	0.44
Num. Liaisons rotatives	6	13	5
Num. Accepteurs de liaisons hydrogène	14	19	6
Num. Donneurs de liaisons hydrogène	8	14	4
Réfractivité molaire	134.91	137.92	94.59
+TPSA (Å²)	225.06	329.01	158.26

Tableau 18 : Caractéristiques de lipophilicité des composés étudiés.

Properties	Naringine	Acarbose	Amoxicilline
iLOGP	1.96	0.17	0.95
XLOGP3	-0.44	-8.82	-1.99
WLOGP	-1.49	-8.72	-0.68
MLOGP	-2.77	-7.45	0.23
SILICOS-IT	-1.64	-6.36	-0.45
Consensus Log Po/w	-0.87	-6.24	-0.39

Tableau 19 : Caractéristiques de solubilité dans l'eau des composés étudiés.

Composés	ESOL				Ali				SILICOS-IT			
	Log S (ESO L)	Solubilité		Class	Log S (Ali)	Solubilité		Class	Log S (SILICOS-IT)	Solubilité		Class
		mg/ml	mol/L			mg/ml	mol/L			mg/ml	mol/L	
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
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 20 : Paramètres pharmacocinétiques des composés étudiés.

Propriétés	Naringine	Acarbose	Amoxicilline
GI absorption	Faible	Faible	Faible
BBB perméant	No	No	No
P-gp substrat	Yes	Yes	No
CYP1A2 inhibitoire	No	No	No
CYP2C19 inhibitoire	No	No	No
CYP2C9 inhibitoire	No	No	No
CYP2D6 inhibitoire	No	No	No

CYP3A4 inhibitoire	No	No	No
Log Kp (Skin Perméation) (cm/s)	-10.15	-16.50	-9.94

Tableau 21 : Règle de druglikeness et score de biodisponibilité des composés étudiés.

Propriétés	Naringine	Acarbose	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
Ghose	No ; 4 violations : MW>480, WLOGP<-0.4, MR>130	No ; 4 violations : MW>480, WLOGP<-0.4, MR>130	No ; 1 violations : WLOGP<-0.4
Veber	No ; 1 violation : TPSA>140	No ; 1 violation : TPSA>140	No ; 1 violation : TPSA>140
Egan	No ; 1 violation : TPSA>131.6	No ; 1 violation : TPSA>131.6	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	No ; 1 violations : TPSA>150
Bioavailability score	0.17	0.17	0.55

Tableau 22 : Propriétés de chimie médicinale des composés étudiés.

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

Les résultats du **Tableau 20** 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. 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 21** présente différentes propriétés des composés étudiés : Naringine, Acarbose, 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 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 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 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 Amoxicilline ne la respectent pas. En ce qui concerne la règle de Muegge, Naringine ne la respecte pas, tandis qu'Acarbose, 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 Amoxicilline 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 22** montre que ces trois 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 deux 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, 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 23 : 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
Amoxicilline	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	15000	6

Les tests de toxicité dans le **Tableau 23** 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, 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 24).

Tableau 24: Les paramètres de liaison obtenu 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 acide aminé 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 41). 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 42**).

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 :

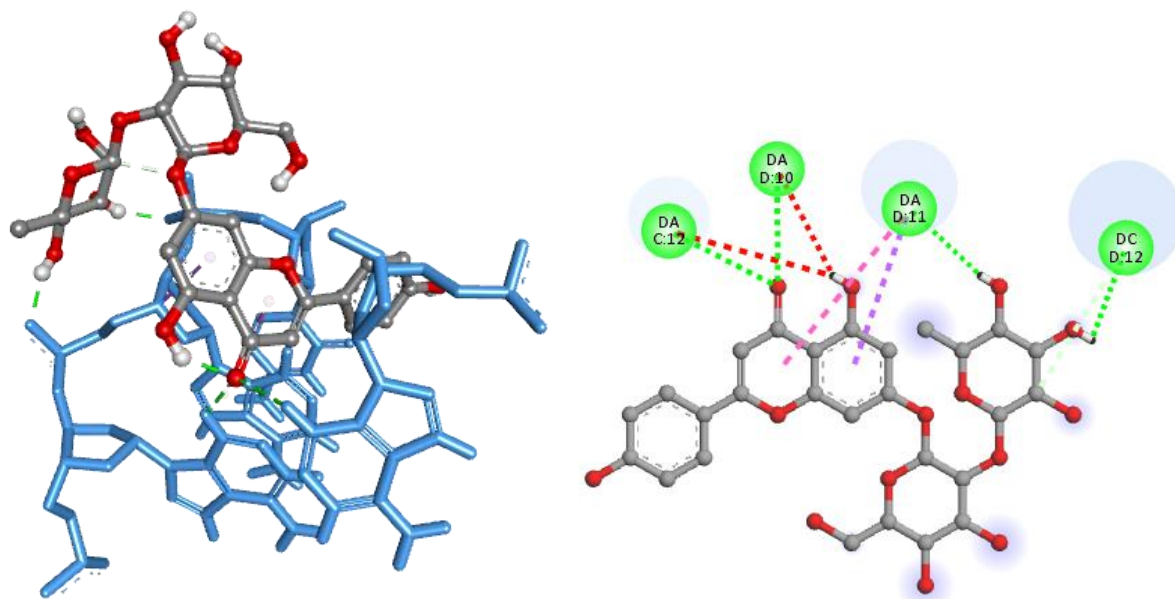


Figure 41: Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe ADN

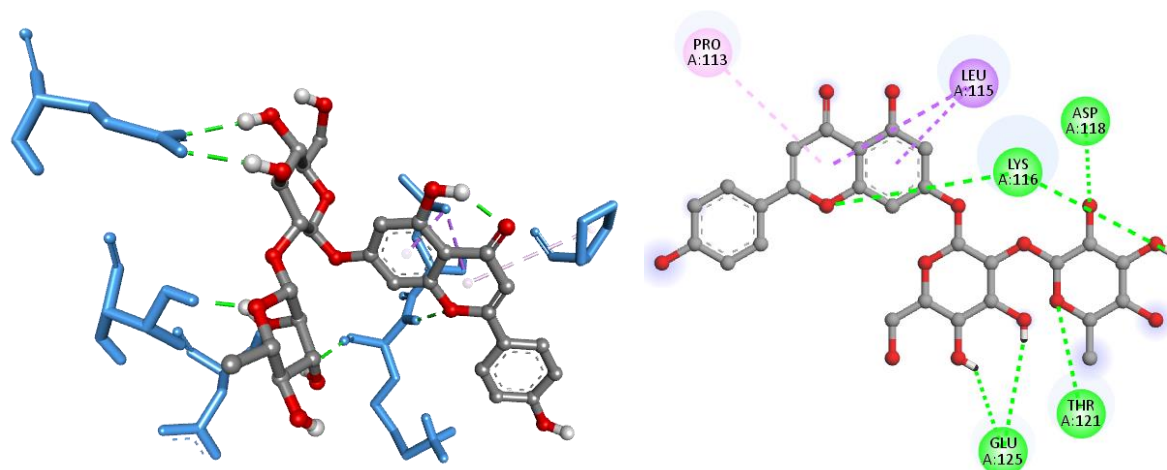


Figure 42 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le complexe BSA.

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 25** 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 25 : 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 (μM)
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		
Acarbose_ α -amylase	Liaison Hydrogène	HIS 305	2.64	25.12	39.14
		ASP 356	4.01		
		TYR 62	4.53		
		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 μM.

Pour Acarbose, des liaisons hydrogène ont été observées avec GLN 63, HIS 101, THR 163, ARG 195, 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 μM.

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 μM, contre 39.14 μM 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 25** révèlent que le naringine interagit 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 étudiés 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 étudiés avec l' α -amylase sont présentés dans la **Figure 43 et 44** suivants :

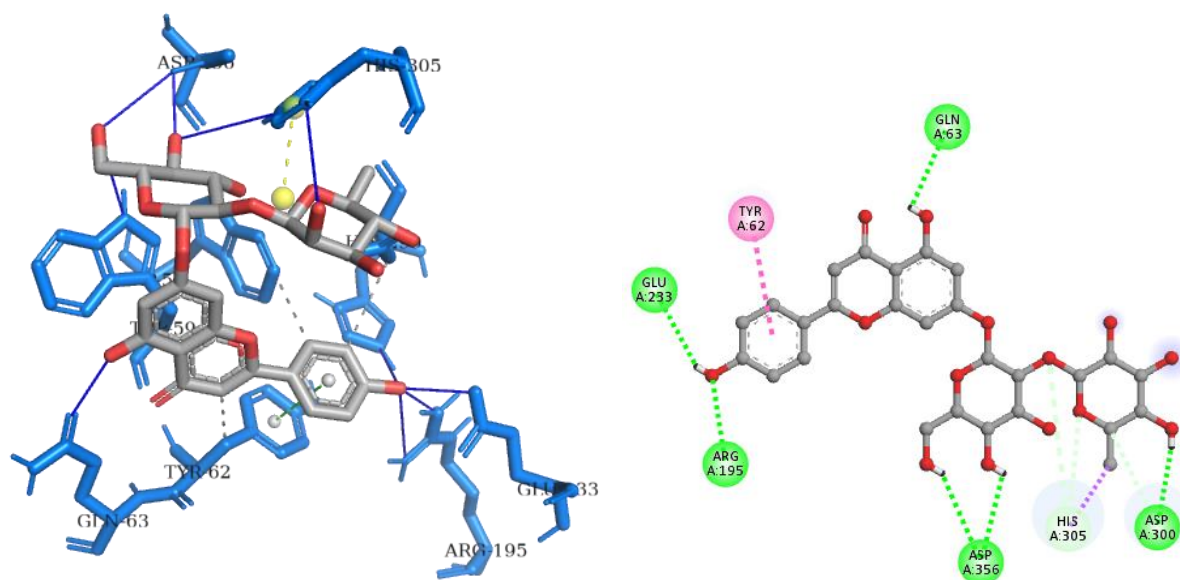


Figure 43 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l' α -amylase.

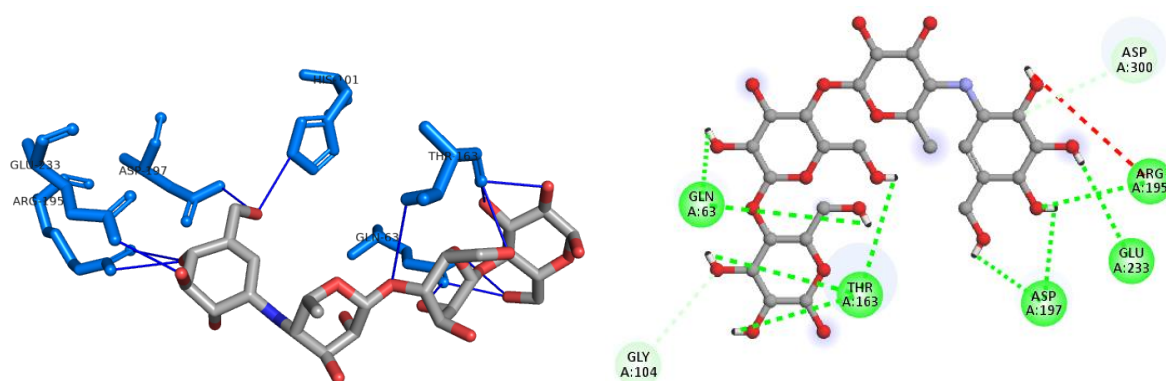


Figure 44: Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase.

I.3.2.4. 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 26** suivants :

Tableau 26 : 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)	$-\Delta G$ (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
Naringine_ <i>Escherichia coli</i>	Interaction Hydrophobique	ASN 46	3.93	28.34	10.74
		ARG 76	3.40		
		ILE 78	3.96		
	Liaison Hydrogène	ASN 46	3.43		
		ASP 49	2.75		
		ASP 49	4.08		
		GLU 50	2.58		
		GLU 50	2.84		
		ASP 73	3.66		
		ARG 76	3.06		
		GLY 77	2.96		
		THR	3.48		

		165			
	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 VAL 87 THR 198 THR 198 TYR 216 TYR 216 GLN 218 GLN 218	3.91 3.58 3.10 3.04 2.71 2.74 4.05 2.68 3.69 2.71		

		ASN 242 ASP 244			
	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 accord avec ce qui obtient expérimentalement par la méthode spectroscopique.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec l' α -amylase sont présentées dans les **Figures 45-48** suivants :

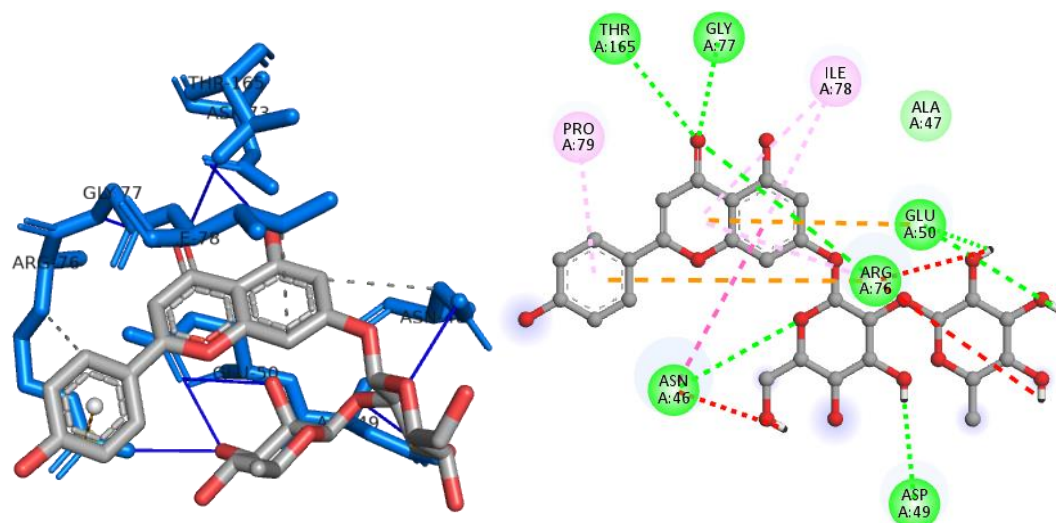


Figure 45 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli.

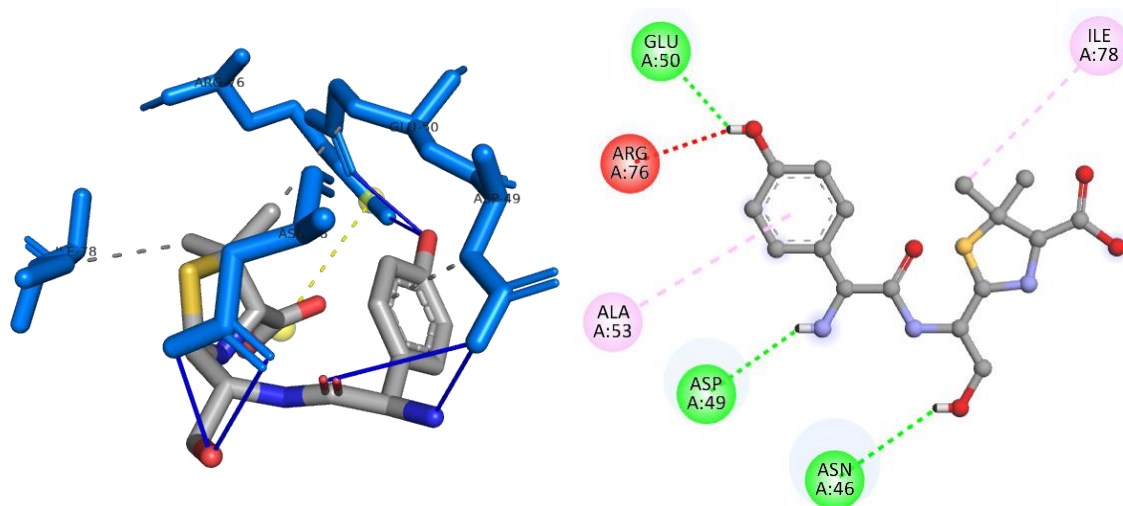


Figure 46 : Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli.

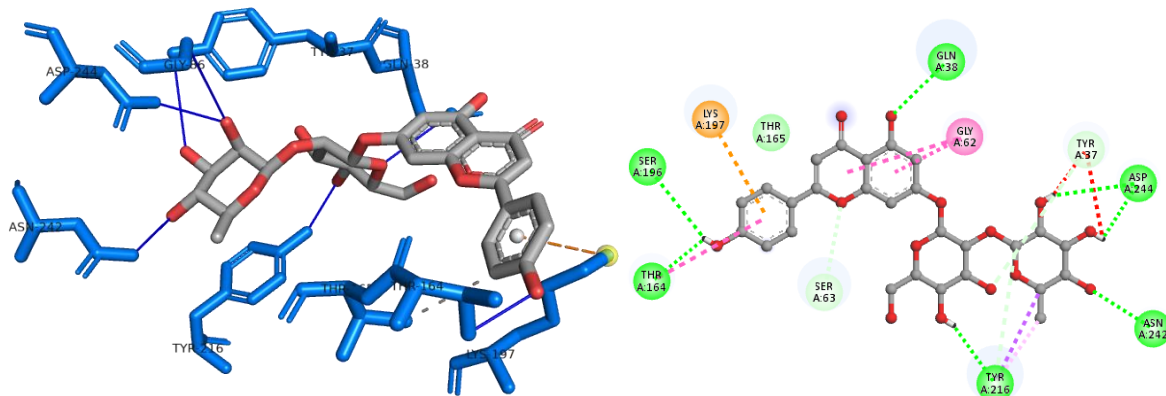


Figure 47 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le S. aureus.

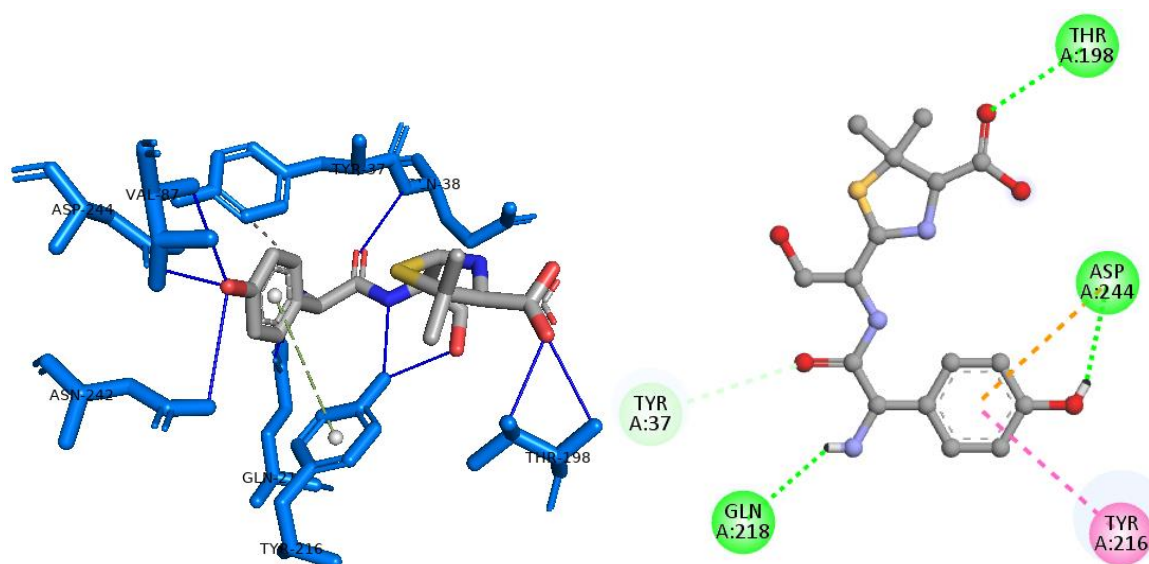


Figure 48: Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le *S. aureus*.

Le **Tableau 27** fournit une analyse comparative approfondie des valeurs d'énergie de liaison et d'IC₅₀ 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 27 : Comparaison des paramètres de liaison et d'IC₅₀ pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire.

Technique			UV-Vis			Amarrage moléculaire		
			IC ₅₀ (μM)	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Anti-cancéreux	ADN	Naringine	--	1.84× 10 ⁴	24.35	25.95	3.82 × 10 ⁴	26.16
	BSA	Naringine	--	1.09 × 10 ⁵	28.77	17.69	5.54 × 10 ⁴	27.08
Antidiabétique	α- Amylase	Naringine	9.82	1.11 × 10 ⁶	34.52	5.67	1.75 × 10 ⁵	29.92
		Acarbose	13.98	1.06 × 10 ⁵	28.69	39.14	2.51 × 10 ⁴	25.12
Antibactérien	E. coli	Naringine	3.29× 10 ⁶	4.72 × 10 ⁴	26.68	10.74	9.21 × 10 ⁴	28.34
		Amoxicilline	163.9	1.47 × 10 ⁴	23.79	303.54	3.27 × 10 ³	20.06
	S. aureus	Naringine	5.46× 10 ⁶	3.28 × 10 ⁴	25.78	15.51	5.84 × 10 ⁴	27.21

		Amoxicilline	314.5	4.40×10^4	26.51	18.11	5.45×10^4	27.04
--	--	--------------	-------	--------------------	-------	-------	--------------------	-------

La comparaison entre les résultats obtenus par les tests *in vitro* (UV-Vis) et *in-silico* (amarrage moléculaire) dans le **Tableau 27** 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 9.82 μM à $5.46 \times 10^6 \mu\text{M}$, tandis que les valeurs d'IC₅₀ prédites par l'amarrage moléculaire *in-silico* varient de 5.67 μM à 25.95 μM . 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**).

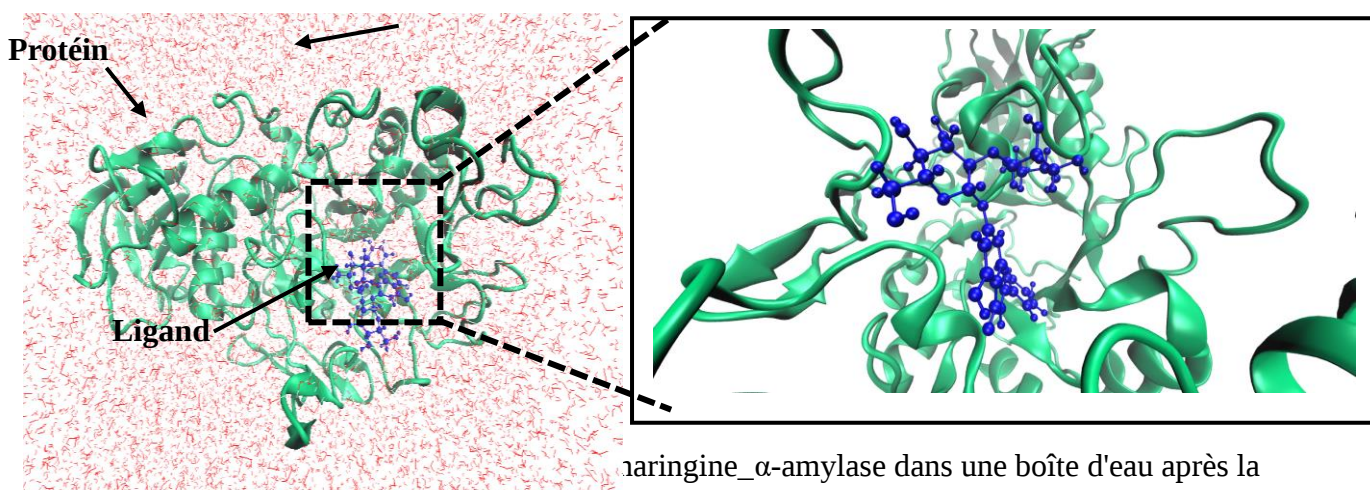
I.3.3. Évaluation de l'activité biologique par dynamique moléculaire :

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'alpha-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 49).

Solvant



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.

1.3.3.1. 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 α a été calculée sur une simulation de 1000 ps. La **Figure 50** 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.

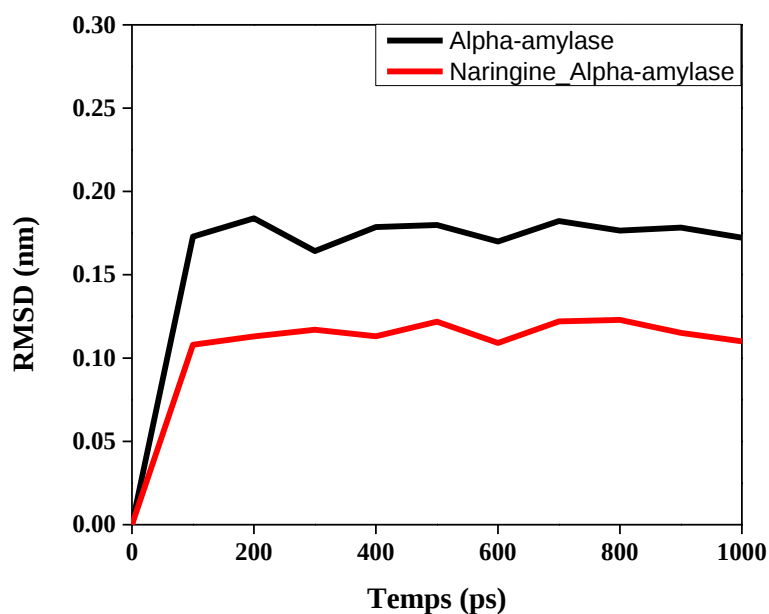


Figure 50 : RMSD du complexe naringine_ α -amylase et du α -amylase.

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 (**Sigtryggsson 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 51** 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.

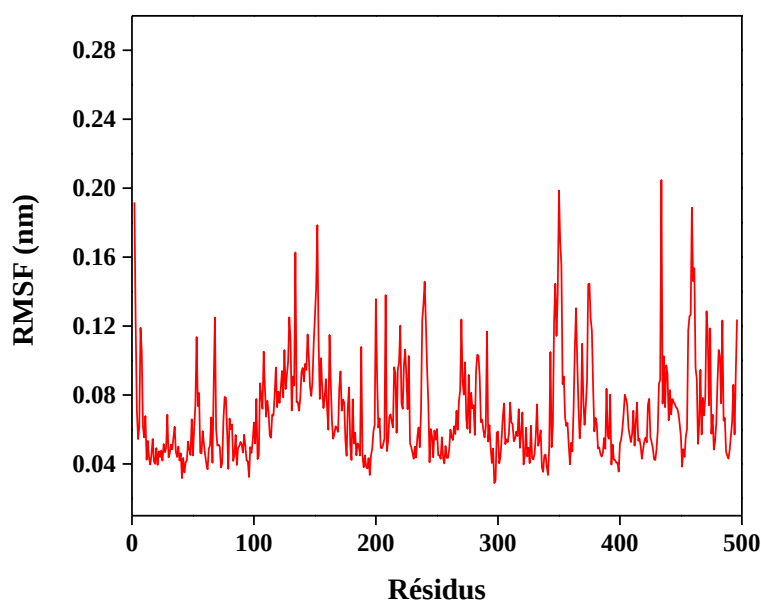


Figure 51: RMSF du complexe naringine_α-amylase.

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 52** montre que le complexe naringine_α-amylase avait en moyenne cinq liaisons hydrogène.

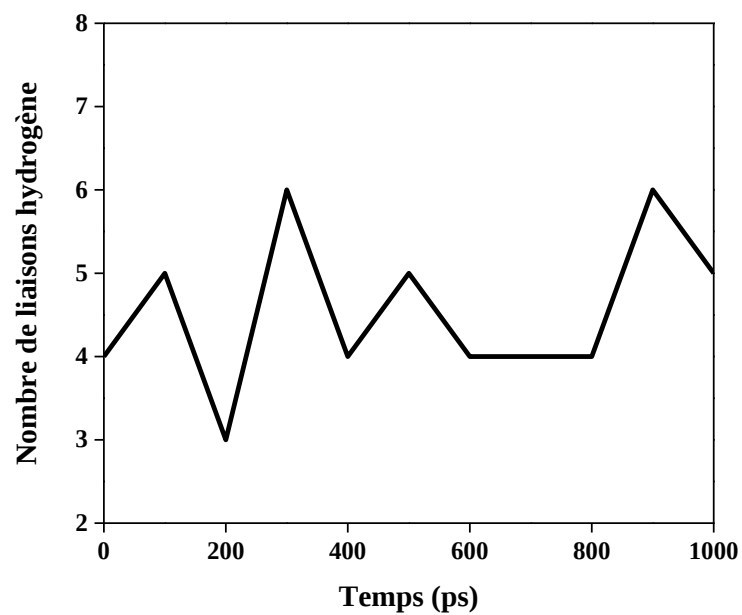


Figure 52 : Nombre moyen de liaisons hydrogène entre le naringine et l' α -amylase.³³

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 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. 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. 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, 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.

Conclusion générale et perspective

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:*

Références bibliographiques:

- ADA, American Diabetes Association. (2014). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2014, 37: S14–S80.
- ADA.(2007). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 30(1): S4-S41.
- Adaika A. (2016).Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN., UniversitéEchahidHamma Lakhdar -El OUED., Algérie, 90p
- 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>.
- Agregé S., Belguith J., Hadiji R., 2015. Généralités sur les Anti-infectieux, en médecine vétérinaire. Thèse : Méd. Vét, école nationale de médecine vétérinaire Sidi Thabet, P :13-14.
- Alan Crozier et al. (2009) . Dietary flavonoids and health: broadening the perspective"
- Alberts, B « The Structure and Function of DNA ». *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/> , al. 2002.
- Albert, Klaus, and Ernst Bayer. 1991. "Characterization of Bonded Phases by Solid-State NMR Spectroscopy." *Journal of Chromatography A* 544: 345–70.
- Albrigo L.G., Carter D. (1970). *Citrus science and technology*. Ed Nagy.
- Alfonso Clemente et al. (2018). "Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Orange Juice: Fortification Strategies and Effects on Health"
- 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.
- Asses,Y.(2011).Conceptionparmodélisationetcriblageinsilicod'inhibiteursdurécepteurcMet.Thèsededoctorat.-UniversitéHenriPoincaré–NancyI.
- 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."

Références bibliographiques

- 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.
- Benaouida K., 2008. - Etude de l' α -amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant les sources thermale) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. In Biotechnologie microbienne. Université Mentouri, Constantine, République Algérienne Démocratique et Populaire. p. 67.
- Berry D. et Paterson A., 1990. Enzymes in food industry. In: Sucking C.J. (ed.), Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall London, 2nd edition, pp. 306 – 351
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P (2011.)Écologie microbienne, Microbiologie des milieux naturels et anthropisés, PUPPA (Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour).
- 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.
- Boubekeur. H, (2019). Activités biologiques d'*Helichrysum stoechas* (Thèse de doctorat). Farhat Abbas Sétif.
- Brüschweiler, Rafael. 2003. “Efficient RMSD Measures for the Comparison of Two Molecular Ensembles.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50(1): 26–34.
- Brut,M.(2009).Nouvelleapproche 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.
- Bryskier A. (1999). Antibiotiques et agents Antibactériens : classification et relation structure activité. In : Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses, Paris. pp. 54-57.
- 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

Références bibliographiques

- 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.
- Chaouki, S. (2012). Valorisation d’une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l’extrait aqueux à l’inhibition de corrosion d’un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. TLEMEN : UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID.TLEMEN.
- 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.
- ChengF.,LiW.,ZhouY.,ShenJ.,WuZ.,LiuG.,TangY.2012.admetSAR:acomprehensivesourceandfree toolforassessmentofchemicalADMETproperties.JournalofChemical InformationandModeling.2012,52,3099-3105.
- Chiba S., 1988. - Amyloglycosidase. In Handbook of Amylases and related enzymes. The Amylase Research Society of Japan, Pergamum Press, Oxford, U.K. pp. 104-116.
- 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.
- coordonné par Grimaldi A. , EMC référence, Elsevier, Paris. P : 83-101.
- 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 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.
- 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.
- Davies, Frederick S. (2019). *The Citrus Industry: History, Botany and Breeding*
- 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.
- DeFronzo R.A., Ferrannini E., Alberti K.G.M.M., Zimmet P. & Alberti G., (2015). *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 2 volume Set. John Wiley & Sons. p. 1228
- 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.
- ELHadj, S.K. (2016). Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de master. Université de Tlemcen. P19-20.
- Fasquelle, R. (1971) *Eléments de virologie médicale*, Flammarion, Paris Javillier, M., et al. (1972) *Traité de biochimie générale*, Tome III, fasc. III, Masson & Cie, Paris

Références bibliographiques

- Fauchère JL. et Avril JL. (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses, Paris.365 :367 :520p.
- Ferrer M., Golyshina O.V., Plou F.J., Timmis K.N. & Golyshin P.N., 2005. - A novel alphanaglucosidase from the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* strain Y with high transglycosylation activity and an unusual catalytic nucleophile. *Biochemical Journal*, 391(Pt 2): 269-276. doi: 10.1042/BJ20050346.
- 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.
- 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.
- 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.
- Görmen, M. (2010). Synthèse de composés organométalliques de la série du ferrocénophane et évaluation de leurs activités antiprolifératives sur les cellules du cancer du sein et de la

- prostate, Cancer. Chimie ParisTech, 2010. Français, 244p.
- Gutyj, B et al. 2018. “Preclinical Searches of the Preparation Thireomagnile.” *Ukrainian Journal of Ecology* 8(1): 688–95.
- H. Yamaguchi, K. Kamiie, Y. Kidachi, T. Noshita, H. Umetsu, Y.Fuke, K. Ryoyama. 1, International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling. Open Access, , Vol. 3, P310-314.2014.
- Hanane, Bouanane, and Benloucif Ahlam. 2016. “Approche Pour La Conception de Médicaments Assistée Par Ordinateur.”
- Hansson, Tomas, Chris Oostenbrink, and WilfredF van Gunsteren. 2002. “Molecular Dynamics Simulations.” *Current opinion in structural biology* 12(2): 190–96.
- Hart T, Shears P.(1997). Atlas de poche de microbiologie (1 édition).france :flammarion
- 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.
- Hooper DV. (2002). Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *EmergingInfectiousDiseases*. 7, 337-341.
- 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*.
- Huet R. (1991). Les huiles essentielles d'agrumes. D-Technologie d'extraction. Fruits, 46,551-564
- 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.
- Hyman, Clarissa. 2013. Oranges: A Global History. Reaktion Books,.

Références bibliographiques

- J. Sánchez et al. (2013). "Naringin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone"
- 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.
- Jacqueline L.Ch. (2000). UE2 Cancérologie ; Le cancer par le gène
- 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.
- Jegham, H.(2009).etude de l'activite biologique et du mécanisme d'action de dérivés stéroïdiens à potentiel anticancéreux., université lavalquébec, p16-17.
- 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.
- Kato N., Suyama S., Shirokane M., Kato M., Kobayashi T. & Tsukagoshi N., 2002. - Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1250-1256.
- 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.
- Kelly C.T., Bolton D. & Fogarty W.M., 1997. - Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnology*, 19(7): 675-677.
- 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.

Références bibliographiques

- Klaus H. Overgaard et al. (2017), "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?"
- Lacave, R., Larsen, Ch-J., Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale*, John LibbeyEurotext, Paris, 437p.
- Lacombe, J et al. 2011. "Intérêt Des Marqueurs Sanguins Dans La Prédiction de La Toxicité Radio-Induite." *Cancer/Radiothérapie* 15(5): 390–93.
- Lambert NZ. (1995). *Antibiothérapie en pratique clinique*. Edition : Bergogne-Berezin P.Dellamonica. 33-35 p.
- LANEZ, Elhafnaoui. "Synthèse, Caractérisation et Étude in Vitro et in Silico de l'activité Biologique de Quelques Dérivés Ferrocénylméthyl-Bases Nucléiques."
- Lanez,E.(2016).Etudeinsilicoetinvitrodel'interactiondequelquesamidesferrocéniquesavecl'AD N.Mémoiredemaster.UniversitéMohamedKhider–Biskra
- 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.
- Lämmerhofer, M., & Weckwerth, W. (Eds.). (2017). *Chromatographic Methods in Metabolomics*. Wiley-VCH.
- 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.
- Laszlo, Pierre. *Citrus: A history*. 2007
- 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.
- Li Li et al. (2018). "Naringin and naringenin: Two flavonoids derived from naringin"
- 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.
- Luka, C., Olatunde, A., Tijjani, H., Olisa-Enewe, I., Luka, C., Olatunde, A., . . . Olisa-Enewe, I. (2013). EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF PHASEOLUS VULGARIS L. (RED KIDNEY BEANS) ON ALLOXAN-INDUCED DIABETIC WISTAR RATS. *science inventions today*, 292-301.
- 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.
- Mazur A. K. et Nakatani H., 1993. Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Arch. Bioch. Biophysics*. Vol., 306 (1), pp. 29-38.
- 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.
- Merabti R., 2006. - Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Université Mentouri, Constantine. p. 85.
- 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.
- N. K. Rastogi et al. (2019). "Potential Applications of Flavonoids in Food Preservation"
- 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.

Références bibliographiques

- Nasiri, H, M Forouzandeh, M J Rasaei, 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.
- Nauciel C et Vildé JL. (2005). Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action Edition : Masson. Paris .p:49-56.
- 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.
- Nielsen J.E ., Borchert T. V and Vriend .G. (2001). The determinants of α -amylase pH– activity profiles . Protein Engineering, Oxford University Press. 14 (7), p:505-512.
- 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.
- Nouadri T.(2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification,Caractérisation et immobilisation. Thèse de Doctorat d'Etat ; Option Biochimie Biotechnologies. Université Mentouri-Constantine, 125p.
- 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.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2003.
- Panchal C.J., 1990. - Yeats strain selection. In Marcel Dekker, USA. p. 189.
- 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.
- Parekar et al. (2014). "Therapeutic potential of naringin: an overview" V
- 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.
- Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrydziak D.M., Ryui D.D.Y., 1997. Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Biol. Chem.,

- 272 (11), pp.6876-6881.
- Perrin, Charles L, and Jennifer B Nielson. 1997. "'Strong' Hydrogen Bonds in Chemistry and Biology." *Annual review of physical chemistry* 48(1): 511–44.
- Perronne C., 1999. Maladies infectieuses. Wolters kluwerFrance.p: 406.
- 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.
- Prescott L., Harley J., Klein D., 2003. Microbiologie. Ed. De Boek université
- 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).
- 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 Mauritiana Jacq." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(5): 2063–73.
- Reguieg. L, (2011). Using medicinal plants in Algeria. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3): 126-127
- 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.
- Rodier M.(2001). Définition et classification du diabète. Médecine nucléaire imagerie fonctionnelle et métabolique. Edition Centre Hospitalier Universitaire-Nimes. 25(2): 91-
- S. B. Dandekar et al. (2019). "Naringin and Its Nano-Formulations for Fungal Infection: A Review"93.
- S. B. Patel et al. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of naringin and its therapeutic potential" S. B. Patel et al. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of naringin and its therapeutic potential" Rose, Peter W et al. 2016. "The RCSB Protein Data Bank: Integrative View of Protein, Gene and 3D

Références bibliographiques

- 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.
- Sachon C., Cornet P. & Grimaldi A. (2004). Diagnostic du diabète. In Diabète de type II.
- 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.
- Schaefer-Graf, Thomas, B., Anny H, X., Ruth K, P., Siri L, K. S.-G., Thomas, B., . . . Siri L, K. (2002). Clinical predictors for a high risk for the development of diabetes mellitus in the early puerperium in women with recent gestational diabetes mellitus. Departments of Obstetrics and Gynecology, 751-756.
- Schaffer, B., & Wolstenholme, B. N. (Eds.). (2019). The citrus industry (Vol. 1). Elsevier
- Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, pp.149-159.
- Sedrati A., 2014. Étude de l’antibiorésistance des souches bactériennes à l’origine des infections infantiles à L’EPH d’Ouargla. Mémoire. Université Kasdi Merbah-Ouargla.44 P.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W. (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rd ed.). Wiley.
- Seo S.H., Choi K.H., Hwang S., Kim J., Park C.S., Rho J.R. & Cha J., 2011. - Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum* alpha-glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72: 305-312.
- Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et la bactériologie.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch, S.R. (2017). Principles of Instrumental Analysis (7th ed.). Cengage Learning.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). Handbook of Thin-Layer Chromatography (3rd ed.). CRC Press.
- Stahl, E. (1969). Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. Springer.

Références bibliographiques

- 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.
- Sigtryggssdóttir, 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 Rigin 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.
- Swynghedauw, B., & Silvestre, J. S. (2008). *Biologie et génétique moléculaires: aide-mémoire*. Dunod.
- Systèmes, Dassault. 2016. "Biovia, Discovery Studio Modeling Environment." *Dassault Systèmes Biovia: San Diego, CA, USA*.
- 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.
- Teniou, S. (2011). Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses, Université Mentouri Constantine., diplôme de magistère, Algérie .p11-13.
- Terstappen, Georg C, and Angelo Reggiani. 2001. “In Silico Research in Drug Discovery.” *Trends in pharmacological sciences* 22(1): 23–26.
- Teste, K. (2008). Synthèses et évaluations biologiques d’agents alkylants hétérocycliques thèse de doctorat, université de limoges Ecole doctorale Sciences-Technologique-Santé Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.
- Tokatlı, 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.
- Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., de Tejada, A. R., & Campillo, J. E. (2004). Hypoglycaemic and anorexigenic activities of α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British journal of nutrition*, 92(05), 785-790
- 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.
- Veyssier P. (1999). Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, nitrohétérocycles et 8-hydroxyquinoléines. In : Bryskier A (Eds.), Antibiotique, agents antibactériens et antibiotiques. Ellipses, Paris, pp. 1008-1009.
- 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.

Références bibliographiques

- Voet, D. & Voet, J. G. (2005). Biochimie. Bruxelles. Editions de Boeck Université. 2ème édition. pp. 1600
- 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.
- Wareham DW et Wilson P. (2002). Chloramphénicol in 21st century. 63, 157-161.
- 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 Caffeate on Human Amylase, an Antidiabetic Target.” *Journal of medicinal chemistry* 55(22): 10177–86.
- 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.
- Yala D, Merad AS, Mohamedi D. et Ouarkorich MN. (2001). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb. 91, 6-14.
- Yusof, Salmah, Hasanah Mohd Ghazali, and Gan Swee King. 1990. “Naringin Content in Local Citrus Fruits.” *Food Chemistry* 37(2): 113–21.

Références bibliographiques

- 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.