



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar- EL-Oued

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

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 activités biologiques de naringin extraite
des fruits de citron**

Présenté Par :

Melle :Dardouri Nadhira

Melle :Tedjani Siham

Mme : Mannana Nadia

Devant le jury composé de :

- Président : GHANIA Ahmed M.C.B, Université d'El Oued
- Examinatrice : ZEGHIB Khaoula M.C.B, Université d'El Oued
- Promoteur : LANEZ El Hafnaoui M.C.B, Université d'El Oued

Année Universitaire : 2022-2023.

Remerciements

Avant tout, on remercie Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force, la persistance et de nous avoir permis de finaliser ce modeste travail dans de meilleures conditions.

Nous remercions Monsieur LANEZ Elhafnaoui , l'encadreur de notre mémoire; merci de nous avoir guidé tout au long de cette mémoire, de nous avoir permis de mieux appréhender l'utilisation de nombreux outils et méthodes nécessaires au bon déroulement de cette mémoire.

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 Mr Tliba Ali.

A toute nos familles. Merci pour votre soutien et vos encouragements, à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail. Trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.



Dédicace

Avec mes sincères remerciements et ma profonde gratitude, je vous dédie ,
A mon cher père, à celui qui m'a appris la réussite et la patience, à celui qui m'a appris que rien
n'est impossible dans la vie, je te dédie ce travail.

A ma chère maman, je veux toujours te remercier pour tout ce que tu as fait jusqu'à nos jours
pour assurer l'éducation et la formation de tous tes enfants. Je me souviens vraiment de tous vos
efforts avec moi depuis mon plus jeune âge. Je reconnais sincèrement que tu as été pour moi la
lumière qui guide mon chemin et qui m'emmène sur les chemins du succès, et c'est grâce à toi
que je dois tout mon succès. J'espère que mon travail témoignera de ma plus profonde gratitude
et de mon respect.

A mes frères et soeurs et à toute ma famille; Toute ma gratitude pour leur confiance et leur
soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Je remercie M. Elhafnaoui Lanez pour vos efforts tout au long de la période d'achèvement du
travail pour vous avec tout le respect et l'appréciation qui lui sont dus.

Aux médecins, au directeur et à mes amis au travail pour le Centre d'imagerie médicale Elwahat
, je vous remercie pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance en moi.

A mes chers amis merci pour votre amitié et votre confiance et aussi pour tous les bons moments.

Merci tout le monde.



Tedjani Siham

Dédicace

Louange à Dieu, avec la grâce duquel les bonnes actions sont accomplies, et prières et paix sur notre maître Mohammed, paix et bénédictions sur lui .

Je dédie le fruit de mes humbles efforts

A celui dont je porte le nom avec fierté, à celui qui s'est efforcé et a lutté pour jouir du confort et de la béatitude, qui n'a rien lésiné pour le pousser sur le chemin du succès, qui m'a appris à gravir l'échelle de la vie avec sagesse et patience, mon cher père, que Dieu le protège et nous accorde la santé.

A mon premier modèle, mon battement de cœur, à celui qui me salue avec un sourire et me dit adieu, à celui qui m'a tout donné, à mon ange dans la vie, au sens de l'amour et de la tendresse, à mon essence dans la vie et le secret de l'existence, qui a tissé le chemin de ma réussite avec les fils de ses prières qui ne se lassent pas de me soutenir jusqu'à ce que j'atteigne ce niveau, à ma perle, ma mère bien-aimée que Dieu la garde.

A mes frères Bachir et sa fille Yakout... Mohammed el-Habib et ses filles Hana , Ihsan... Fathi et ses deux fils Mohammed Zaineb , Hanin... Et mon frère Muaouia... Talha... Tu es mon soutien et compagnons sur mon chemin, que Dieu vous protège... Et mes sœurs Wassila , Sabrina et Salima et son fils Afrah et Nouri ton soutien et le sourire de ma vie et aux maris de mes frères Khadija, Sarah et Abir.

À tous ceux que j'ai aimés et liés d'amitié au cours des cinq dernières années

Je remercie M. Elhafnaoui Lanez pour vos efforts tout au long de la période d'achèvement du travail pour vous avec tout le respect et l'appréciation qui lui sont dus.



Dardouri Nadhira

Dédicace

Dédier mes simples mots ne remplira pas le droit de tous ceux qui m'ont aidé, mais c'est la preuve de
ma gratitude envers vous

Chers parents, les mots du monde sont incapables de décrire l'étendue de ma gratitude envers vous.

Que mon Seigneur m'informe

Et je peux rattraper ta fatigue et te rendre la pareille

. Mon cher frère Abdel Raouf, mon soutien et ma force, s'il vous plaît Ali, je ne l'oublierai pas tant que
je vivrai, et ma chère sœur Fatima Zahraa, et mon frère Ayoub et Louie, que Dieu vous protège et vous
protège et perpétue notre l'amour et nos frères.

À mon cher mari, qui a été ma meilleure aide dans ma carrière, merci d'avoir été à mes côtés dans un
tel succès.

Aux compagnons de route qui ont partagé ses moments avec moi, que Dieu les protège et leur accorde
le succès

A tous ceux qui ont marqué ma vie et à tous ceux que mon coeur a aimés et que ma plume a oubliés.



Mennana Nadia

Résumé

Cette mémoire se concentre sur l'évaluation de l'activité antidiabétique et antioxydant de naringine extraite des citrons. Cette analyse permet de comprendre comment la naringine interagit avec l'enzyme alpha-amylase, impliquée dans la dégradation de l'amidon, et d'évaluer son potentiel antidiabétique en inhibant cette enzyme. Des expériences *in vitro* ont également permis d'évaluer l'activité antidiabétique de la naringine par rapport à l'acarbose, qui est un médicament courant utilisé pour traiter le diabète. Des tests sont effectués à l'aide de l'enzyme alpha-amylase pour évaluer l'effet de la naringine et de l'acarbose sur la dégradation de l'amidon et la régulation du glucose. De plus, des tests d'activité antioxydante sont effectués pour évaluer la capacité de la naringine à neutraliser les radicaux libres et à protéger les cellules des dommages oxydatifs. La naringine a été comparée à d'autres antioxydants connus en utilisant l'enzyme alpha-tocophérol réductase pour évaluer sa capacité à réduire les radicaux libres et à prévenir les réactions oxydatives. Ensuite, l'utilisation de la préparation enzymatique avec la naringine, dans le milieu réactionnel, permet de déterminer les paramètres : IC₅₀ et ΔG à partir desquels on est arrivé à l'activité biologique des composés étudiés. Ces résultats indiquent que la naringine présente une activité inhibitrice de l'alpha-amylase, bien qu'elle soit moins puissante que celle de l'acarbose (naringine IC₅₀ = 1,503 mg/ml et acarbose IC₅₀ = $1,651 \times 10^{-1}$ mg/ml) et qu'elle possède également une activité inhibitrice moins puissante de la réductase. L'activité de l'alpha-tocophérol (naringine IC₅₀ = $2,946 \times 10^{-1}$ mg/ml et alpha-tocophérol IC₅₀ = $0,311 \times 10^{-1}$ mg/ml) et les constantes de liaison des données relatives et les énergies libres de liaison de la naringine avec l'alpha-amylase indiquent qu'il est moins efficace que l'acarbose, comme c'est le cas pour leur énergie libre standard et dans leurs constantes de liaison et leurs énergies libres ($-\Delta G$) (Naringine $-\Delta G$ = 18,31 KJ. mol⁻¹ et acarbose $-\Delta G$ = 17,98 KJ. mol⁻¹) et dans les constantes de liaison et les énergies libres de liaison de la naringine avec moins de réduction d'alpha-tocophérol (naringine $-\Delta G$ = 33,63 KJ.mol⁻¹ et alpha-tocophérol $-\Delta G$ = 46,55 KJ.mol⁻¹) les résultats obtenus par docking moléculaire. Confirmer les résultats au laboratoire.

Les résultats obtenus *in silico* et *in vitro* suggèrent que le naringin présente une activité antidiabétique prometteuse en inhibant l'enzyme alpha-amylase et en régulant le glucose. De plus, le naringin démontre une activité antioxydant en comparaison avec l'alpha-tocophérol par son action sur l'enzyme réductase.

Mots clés : naringine, réductase, alpha-amylase, activité antidiabétique, activité antioxydante, acarbose, alpha-tocophérol, docking moléculaire

Abstract:

This thesis focuses on the evaluation of the antidiabetic and antioxidant efficacy of naringin extracted from lemon. In this thesis an *in silico* approach was used to predict the molecular interactions and physical and chemical properties of naringenin. This analysis makes it possible to understand how naringenin interacts with the enzyme alpha-amylase, which is involved in the hydrolysis of starch, and to evaluate its antidiabetic potential by inhibiting this enzyme. *In vitro* experiments were also used to evaluate the antidiabetic activity of naringin compared to acarbose, which is a common drug. Use to treat diabetes. Tests are performed using the enzyme alpha-amylase to evaluate the effect of naringin and acarbose on starch breakdown and glucose regulation. In addition, antioxidant activity tests are performed to evaluate naringin's ability to neutralize free radicals and protect cells from oxidative damage. Naringin has been compared with other known antioxidants using the enzyme alpha-tocopherol reductase to assess its ability to reduce free radicals and prevent oxidative reactions. Then, the use of the enzymatic preparation with naringenin, in the reaction medium, makes it possible to determine the parameters: IC₅₀ and ΔG from which we concluded the biological activity of the studied compounds. These results indicate that naringin exhibits phalamylase inhibitory activity, although it is less potent than that of acarbose (naringin IC₅₀ = 1.503 mg/ml and acarbose IC₅₀ = 1.651×10^{-1} mg/ml) and that it also has less potent reductase-inhibiting activity. of alpha-tocopherol activity (naringin IC₅₀ = 2.946×10^{-1} mg/ml and alpha-tocopherol IC₅₀ = 0.311×10^{-1} mg/ml) and the relative data binding constants and binding free energies of naringin with alpha-amylase indicate that it is less efficient than acarbose, as is For their standard free energy and in their binding constants and free energies ($-\Delta G$) (Naringin $-\Delta G = 18.31$ KJ. mol⁻¹ and acarbose $-\Delta G = 17.98$ KJ. mol⁻¹) and in the binding constants and binding free energies of naringenin with less alpha-tocopherol reduction (naringin $-\Delta G = 33.63$ KJ.mol⁻¹ and alpha-tocopherol $-\Delta G = 46.55$ KJ.mol⁻¹) the results obtained by molecular docking Confirm the results in the laboratory.

Results obtained *in silico* and *in vitro* indicate that naringin shows promising antidiabetic activity by inhibiting the glucose-regulating alpha-amylase enzyme. In addition, naringin exhibits comparable antioxidant activity to alpha-tocopherol through its effect on the enzyme reductase.

Keywords: naringin, reductase, alpha-amylase, antidiabetic activity, antioxidant activity, acarbose, alpha-tocopherol, molecular docking

ملخص :

فيما يلي ملخص للأطروحة بعنوان "دراسات في المختبر والسيليكو للأنشطة البيولوجية للنارينجين المستخلصة من ثمار الليمون". تركز هذه الأطروحة على تقييم الفعالية المضادة لمرض السكر ومضادات الأكسدة للنارينجين المستخرجة من الليمون. في هذه الأطروحة تم استخدام نهج في السيليكو للتنبؤ بالتفاعلات الجزيئية والخصائص الفيزيائية والكيميائية للنارينجين. يجعل هذا التحليل من الممكن فهم كيفية تفاعل النارينجين مع إنزيم ألفا أميلاز ، الذي يشارك في تحلل النشاء ، وتقييم إمكاناته المضادة لمرض السكر عن طريق تثبيط هذا الإنزيم ، و أيضا تم استخدام التجارب في المختبر لتقييم النشاط المضاد لمرض السكر للنارينجين مقارنةً بالأكاربوز ، وهو دواء شائع الاستخدام لعلاج مرض السكري. يتم إجراء الاختبارات باستخدام إنزيم ألفا أميلاز لتقييم تأثير النارينجين و أكاربوز على تكسير النشاء وتنظيم الجلوكوز. بالإضافة إلى ذلك ، يتم إجراء اختبارات نشاط مضادات الأكسدة لتقييم قدرة النارينجين على تثبيت الجذور الحرة وحماية الخلايا من الضرر التأكسدي. تتم مقارنة النارينجين مع مضادات الأكسدة المعروفة باستخدام إنزيم ألفا توكوفيرول اختزال لتقيي مقدرتها على تقليل الجذور الحرة ومنع تفاعلات الأكسدة . بعد ذلك ، فإن استخدام المستحضر الأنزيمي مع نارينجين ، في وسط التفاعل ، يجعل من الممكن تحديد المعلمات: IC50 و ΔG التي توصلنا منها إلى الفعالية البيولوجية للمركبات المدروسة. وتشير هذه النتائج إلى أن النارينجين يعرض نشاطا مثبطا لالفا اميلاز ، على الرغم من أنه أقل فعالية من نشاط أكاربوز (نارينجين IC50 = 1.503 mg/ml و الأكاربوز IC50 = 1.651 × 10⁻¹ mg/ml) كما أنه يحتوي أيضًا على نشاطا تثبيط اختزال أقل فعالية من نشاط الفا توكوفيرول (نارينجين IC50 = 2.946 × 10⁻¹ mg/ml و الفا توكوفيرول IC50 = 0.311 × 10⁻¹ mg/ml) وثابت ربط البيانات النسبية والطاقات الحرة الملزمة للنارينجين مع الفا اميلاز تشير إلى أنه أقل كفاءة من أكاربوز ، كما هو الحال بالنسبة لطاقتهم الحرة المعيارية وفي ثابت الربط والطاقات الحرة (ΔG) (نارينجين $\Delta G = 18.31 \text{ KJ. mol}^{-1}$ - و الأكاربوز $\Delta G = -17.98 \text{ KJ. mol}^{-1}$) وفي ثوابت الربط ولطاقات الحرة الملزمة للنارينجين مع اختزال أقل بألفا توكوفيرول (نارينجين- $\Delta G = 33.63 \text{ KJ. mol}^{-1}$ و الفا توكوفيرول $\Delta G = 46.55 \text{ KJ. mol}^{-1}$) النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق الالتحام الجزيئي تؤكد النتائج في المختبر.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها في السيليكو وفي المختبر إلى أن النارينجين يظهر نشاطاً واعدًا مضاداً لمرض السكر عن طريق تثبيط إنزيم ألفا أميليز وتنظيم الجلوكوز. بالإضافة إلى ذلك ، يظهر النارينجين نشاطاً مضاداً للأكسدة مقارنةً بألفا توكوفيرول من خلال تأثيره على إنزيم اختزال الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: نارينجين ، اختزال ، ألفا أميليز ، نشاط مضاد لمرض السكر ، نشاط مضاد للأكسدة ، أكاربوز ، ألفا توكوفيرول ، الإلتحام الجزيئي.

Liste des abréviations

Å : Ångström.

Abs :Absorbance.

CCM : chromatographie sur couche mince

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

g : gramme

HPLC: La chromatographie liquide haute performance

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

I : Inhibition

IR : Spectroscopie Infrarouge

K : constant de liaison

KJ : Kilojoule

L : litre .

M : molaire

Mg : Millgramme .

pH : potentiel hydrogen .

R % : Rendement en pourcentage .

UV :Ultra-violet.

Vis : Visible.

% : pourcentage .

µl : Microliter

°C : Degrés Celsius.

ΔG : Energie libre de liaison.

Liste Des Figures

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Structure de L'alpha Amylase	07
Figure 02	la digestion enzymatique de l'amidon	08
Figure 03	Formule développée de l'acarbose.	10
Figure 04	l'alpha amyhase en complexe avec l'acarbose	10
Figure 05	Coupe transversale de fruit d'un Citrus	17
Figure 06	Structure 2D du naringin	22
Figure 07	Naringin 6-311++G(d,p)	22
Figure 08	Les étapes de docking moléculaire	29
Figure 09	fruits limon	33
Figure 10	Les croûtes de citron limon pendant le séchage	34
Figure 11	Poudre de croûtes sec	34
Figure 12	Montage d'évaporation a pression réduit	35
Figure 13	Montage de chauffage	35
Figure 14	Montage de cristallisation	36
Figure 15	Structure de naringin optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p	42
Figure 16	Structure de Acarbose extraite de la base de données DrugBank	42
Figure 17	Représentation PyMOL de l'alpha-Tocopherol PubChem CID: 1742129	42
Figure 18	Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringin	46
Figure 19	Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringin	47
Figure 20	Caractérisation du naringin extrait (Linge noire) et naringin référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)	48
Figur 21	Spectre UV du naringin extrait (Linge noire) et de naringin référence	49

	(Linge rouge)	
Figure 22	Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringin (a) et Acarbose (b)	51
Figure 23	Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringin]$ (a) et $1/[Acarbose]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison	53
Figure 24	Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringin (a) et Alpha-tocophérol (b)	54
Figure 25	Représente les graphes de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[Composé]$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des composés naringin (a) et alpha-tocophérol (b) avec DPPH.	57
Figure 26	Présentation 2D et 3D du ligand naringin avec l' α -amylase	61
Figure 27	Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase	61
Figure 28	Présentation 2D et 3D du ligand naringin avec la réductase	64
Figure 29	Présentation 2D et 3D du ligand alpha-tocophérol avec la réductase	64

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Composition biochimique moyenne dans 100 g de citron	18
Tableau 02	la classification des flavonoïdes d'agrumes et les structures chimiques des principaux flavonoïdes.	19
Tableau 03	Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire	43
Tableau 04	Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible.	44
Tableau 05	Valeurs des absorbances tirées à partir du test d'alpha-amylase	50
Tableau 06	Activité antidiabétique de naringin et acarbose par le test d'inhibition de l' α -amylase	51
Tableau 07	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l'alpha-amylase calculées à partir des données UV-Vis.	53
Tableau 08	Valeurs des Inhibition tirées à partir du test DPPH	54
Tableau 09	Valeurs IC ₅₀ (mg/mL) obtenues en utilisant l'activité de piégeage des radicaux DPPH.	55
Tableau 10	Valeurs des absorbances obtenues par test DPPH	56
Tableau 11	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringin et Alpha-tocophérol avec le DPPH calculées à partir des données UV-Vis à T= 298K.	57
Tableau 12	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringin et acarbose avec l' α -amylase	59
Tableau 13	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringin et alpha-tocophérol avec la réductase	62
Tableau 14	Comparaison des paramètres de liaison et d'IC ₅₀ pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire	64

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
PARTIE I	
BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 01	
Activité anti-diabète et anti-oxydant	
Activité anti-diabète	06
I. L'alpha amylase	06
1-Définition	06
2-Nomenclature	06
3-Les types	06
4-Structure de l'alpha amylase	06
5- Le rôle d'alpha-amylase	07
6- Mécanisme d'action	07
II.2-Anti-Diabète	08
1. Définition du diabète sucré	08
2.Classification du diabète	09
2.1.Le diabète de b type 1 (anciennement insulino dépendant DID)	09
2.2. Le diabète de type 2 (anciennement appelé le diabète non insulino dépendant DNID)	09
2.3.Le diabète gestationnel	09
2.4.Autres types de diabète	09
III- Acarbose	10
1.Définition:	10
2.Mode d'action d'Acarbose	10
Activité anti-oxydant	11
I.1. Le stress oxydatif	11
Définition	11
1-radicaux libres	11

2-Les différents types des radicaux libres	11
2.a.Les radicaux libres primaires	11
2.b.Les radicaux libres secondaires	11
2.c. Les espèces actives de l'oxygène	11
II.Les Anti oxydants	11
1.Définition:	11
2. Classifications des antioxydants	12
2.1-Antioxydants naturels	12
2.2-Antioxydants synthétiques	12
3. Mécanismes d'action des antioxydants	12
III-DPPH	13
1.Définition	13
2.Test DPPH	13

Chapitre 02

Naringin

I. Généralités sur les agrumes	15
II. Citron	15
1. Définition	15
2-Structure et développement	16
3-Composition chimique	17
4.Utilisations de citron	18
III. Les flavonoïdes	19
1.Définition	19
2. La classification et les structures chimiques des flavonoïdes d'agrumes	19
IV . Naringin :	21
1. Histoire de naringin	21
2. Définition	21
3. Liaisons et structures électroniques du naringin	21
4. Noms et identifiants du naringin	23
5. Propriétés du naringin	23
5.1. Propriétés chimiques et physiques	23
5.2. Propriétés aromatiques de naringin	24
5.3.Propriétés spectroscopiques et UV visible	24
A. Spectroscopie infrarouge (IR)	24
B. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN.	24

C. Spectrophotométrie UV-visible	24
6. Rôle de naringin	25

Chapitre 03

Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées

I-La spectroscopie UV-Visible	27
1.Définition	27
2.Principe	27
3.Propriétés des UV	27
4.Loi d'absorption de la lumière-Loi de Beer-Lambert	27
5. Condition d'utilisation de la loi de Beer et Lambert:	28
II-L'amarrage moléculaire	28
1-Principe	28
2-Les étapes de docking	28

PARTIE II EXPÉRIMENTALE

Chapitre 1 Matériels et Méthodes

I. Matériels	32
I.1. Réactifs utilisés	32
I.2. Matériels de laboratoire	32
I.3. Produits chimiques	33
II. Méthodes	33
II.1. Extraction de Naringin	33
II.2. Rendement d'extraction	36
II.3. Caractérisation du Naringin	37
II.3.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	37
II.3.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	38
II.3.3. Caractérisation par Infrarouge (IR)	39
II.3.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	39
II.4. Méthodes d'évaluation <i>In Vitro</i> des activités biologiques	40
II.4.1. Evaluation in vitro de l'activité antidiabétique	40

II.4.2. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant :	41
II.5. Méthodes d'évaluation In Silico des activités biologiques	41
II.5.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	41
II.5.1.1. Préparation des ligands	41
II.5.1.2. Préparation des récepteurs	43
II.5.2.3. Expériences d'amarrage Moléculaire	44

Chapitre 02

Résultats et Discussion

I.1. Caractérisation :	46
I.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	46
I.1.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	46
I.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR)	47
I.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	48
I.2. Évaluation In Vitro des activités biologiques	49
I.2.1. Évaluation de l'activité antidiabétique	49
I.2.2. Activités inhibitrices de l'alpha-amylase (IC ₅₀)	50
I.2.2.1. Constantes de liaison	52
I.2.2.2. Énergie libre de liaison	53
I.2.2. 3.Évaluation de l'activité antioxydant	54
I.2.2.4. Etude spectroscopique de l'interaction avec DPPH	56
I.2.2.5. Constantes de liaison	56
I.3. Énergie libre de liaison	57
I.3.1. Évaluation In Silico des activités biologiques	58
I.3.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	58
I.3.1.1. Évaluation de l'activité antidiabétique	59
I.3.1.2. Évaluation de l'activité antioxydant	61

<i>Conclusion générale et perspective</i>	67
<i>Références bibliographiques</i>	70

Introduction générale



Introduction

La phytothérapie est considérée comme une branche de la médecine complémentaire ou alternative, car les plantes médicinales jouent un rôle important dans la protection de la santé humaine et l'amélioration du cours de sa vie, et de nombreuses cultures traditionnelles apprécient encore la valeur des prescriptions à base de plantes et leur importance préventive et curative et d'autres avantages.

Une plante médicinale est définie comme une plante qui contient dans un ou plusieurs de ses différents organes une ou plusieurs substances chimiques à faible ou forte concentration, et qui a la capacité physiologique de traiter une maladie spécifique, ou du moins de réduire les symptômes d'une infection par cette maladie. maladie si elle est administrée au malade soit sous sa forme pure après extraction de la matière végétale, soit si elle est utilisée alors qu'elle est encore sous sa forme originale sous forme d'herbe végétale fraîche ou séchée ou partiellement extraite (naringin).

Et notre pays, l'Algérie, possède une immense richesse de plantes et de fruits naturels qui se répartissent sur de vastes étendues dans des environnements climatiques différents, ce qui lui confère une grande diversité botanique.

Dans ce but, un grand nombre de recherches ont été menées sur divers fruits, dont les agrumes. Récemment, il a été prouvé que les polyphénols d'agrumes avaient de nombreuses applications thérapeutiques. Des études épidémiologiques ont prouvé que la consommation d'oranges et de citrons peut protéger la santé contre diverses maladies grâce à leur richesse en diverses molécules d'anticorps antioxydants dont l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les polyphénols et la naringin(**Kim et al.2002**).

Après cette richesse, l'extraction des composés phénoliques des agrumes a suscité un grand intérêt scientifique pour leur utilisation comme antioxydants naturels, conservateurs principalement dans l'alimentation mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Ramful et al. 2010**).Développé comme traitement antidiabétique potentiel . Il existe plusieurs mécanismes pour les médicaments antidiabétiques tels que le retardement de la digestion et de l'absorption des glucides intestinaux pour l'entretien postprandial. Niveaux de glucose (**Menesis et al. 2015**). Une approche thérapeutique de la gestion du diabète consiste à réduire l'hyperglycémie postprandiale en retardant la digestion et l'absorption des glucides tels que l'alpha-glucosidase et l'alpha-amylase dans le tube digestif.

L'objectif de cette mémoire est d'explorer plus en détail l'activité biologique de la naringin extraite du citron en utilisant une approche in silico et des tests in vitro. Les méthodes in silico permettent de prédire les interactions moléculaires et les propriétés physicochimiques de la

Introduction

naringine, tandis que les tests in vitro évaluent directement son activité antidiabétique et antioxydante.

La première but de cette étude consiste à comparer l'activité antidiabétique de la naringin avec celle de l'acarbose, un inhibiteur de l'alpha-amylase largement utilisé dans le traitement du diabète. L'enzyme alpha-amylase joue un rôle clé dans la dégradation de l'amidon en glucose, et l'inhibition de cette enzyme peut contribuer à la régulation de la glycémie.

La deuxième but de la mémoire se concentre sur l'activité antioxydante de la naringin , en comparaison avec l'alpha-tocophérol, un antioxydant bien connu. Les tests in vitro utilisent l'enzyme réductase pour évaluer la capacité de la naringin à neutraliser les radicaux libres et à prévenir les dommages oxydatifs.

En résumé, cette mémoire vise à approfondir notre compréhension des propriétés biologiques de la naringin extraite du citron, en se concentrant sur son activité antidiabétique et antioxydante. Les résultats de cette étude pourraient contribuer au développement de nouveaux traitements naturels et à base de plantes pour le diabète et les maladies associées au stress oxydatif. En outre, l'utilisation de la naringin comme médecine alternative et naturelle pourrait offrir une approche plus sûre et plus durable pour la gestion de ces conditions de santé. Pour réaliser cette recherche, elle a été divisée en deux parties :

- Partie bibliographique

Chapitre 01: Activité anti-diabète et anti-oxydants

Chapitre 02: Naringin.

Chapitre 03: Contexte théorique des différentes techniques expérimentales utilisées

- Partie Expérimentale

Chapitre 01: Matériels et Méthodes.

Chapitre 02: Résultats et Discussion.

Nous avons terminé ce travail par une conclusion générale , nous espérons que ce modeste travail vaudra de la peine d'être lu par votre attention.

Partie I : bibliographique



Chapitre 01

Activité anti-diabète et anti-
oxydant

Activité anti-diabète

I.L'alpha amylase:

1-Définition:

L'amylase est une enzyme produite les glandes salivaires et les glandes pancréatiques sous une forme directement active, et éliminée dans les urines. L'amylase est une saccharides, c'est-à-dire que cette enzyme brise les polysaccharides (des sucres).

L'alpha amylase est l'une des enzymes industrielles les plus importantes et les plus anciennes (**Gupta et al., 2008**). C'est une macromolécule qui appartient à la classe des protéines globulaires (**Alais et al., 2008**).

c'est une enzyme digestive (**Kelly et al., 1997**).

et ubiquitaire, synthétisée chez tous les êtres vivants (**Merabti, 2006**).

Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines

(**Kelly et al., 1997**).

2-Nomenclature :

- Nom codifié : EC 3.2.1.1
- Nom commun : alpha -amylase
- D'autres nom (s): glycogénase, α -amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase.
- Nom systématique : 1,4 – alpha -D-glucane-4-glucano hydrolase (**Schamburg et Slzmann, 1991 ; Dauter et al., 1999 ; Nouadri., 2011**)

3-Les types :

Plusieurs types d'amylase existent, alpha (3.2.1.1), bêta (3.2.1.2) et gamma (3.2.1.3) (**Yamamoto, 1995**).

La bêta-amylase et la gamma-amylase (glucoamylase) sont généralement d'origine végétale ou microbienne quoique la glucoamylase ait été retrouvée chez certains mammifères ou espèces aquatiques (**Shetty., 2006**).

4-Structure de l'alpha amylase :

L'alpha amylase est considérée comme une glycoprotéine avec 478 acides aminés et un poids moléculaire de 57,6 KDa. La première structure tridimensionnelle de l'alpha amylase déterminée expérimentalement indique que l'alpha amylase a trois domaines caractéristiques : A, B et C (**Chiba, 1988**) ; (**Burhan et al., 2003**). Ces domaines sont liés par une chaîne polypeptidique qui est principalement des résidus hydrophobes (**Banner et al., 1975**). Le domaine A est formé d'un cylindre concentrique d'hélice alpha contenant 8 feuillets bêta parallèles (**Whintcomb et Lowe, 2007**). Il est composé de deux résidus d'acide aspartique et un résidu d'acide glutamique qui jouent un rôle essentiel dans la catalyse et se trouvent dans le site actif de ce domaine (**Sarian et al 2017**).

Pour le domaine B, il se compose principalement de feuilles bêta et il est adjacent à la structure cylindrique du domaine A. Le domaine C est constitué d'un tonneau de huit feuillets β antiparallèles (Alais et al., 2008).

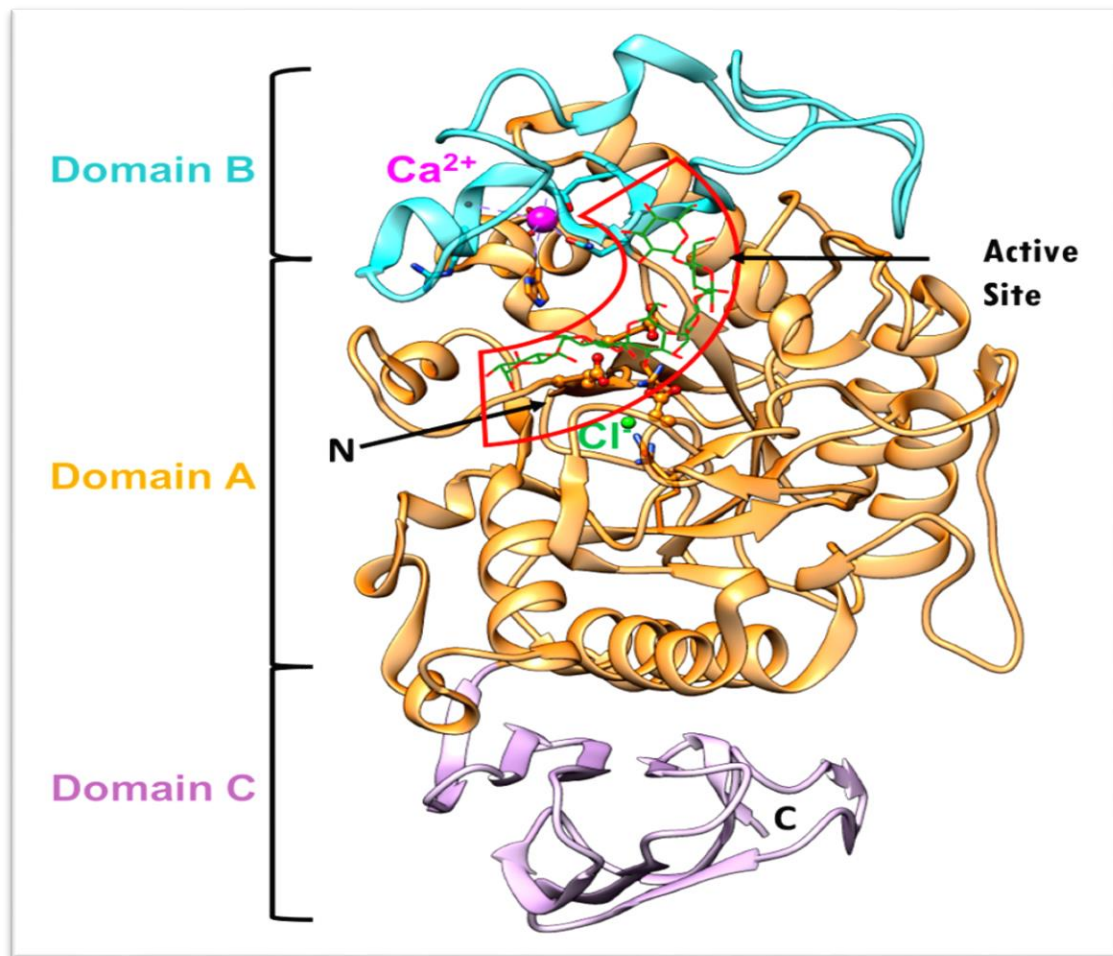


Figure 01 : Structure de L'alpha Amylase (PDB ID 5TD4;Zhang et al.,2016).

5- Le rôle d'alpha-amylase :

La principale source de glucides pour l'homme est la digestion de l'amidon qui commence dans la bouche. La salive contient de l' α amylase, qui hydrolyse toutes

les liaisons glycosidiques α (1-4) sauf les plus extrêmes et celles proches de points de branchement (Voet.D et Voet.J., 2005).

6- Mécanisme d'action:

L'alpha-amylase (E.C. 3.2.1.1) est une enzyme clé du système digestif. Elle déclenche l'hydrolyse de l'amidon qui est ensuite rupturé par l'alpha-glucosidase en glucose puis transporté dans le sang (Ben Jamaa et al., 2017). Ses actions peuvent être menées à bien de différentes manières :

- ❖ Attaque aléatoire : en coupant les liaisons α (1-4) à partir de l'extrémité non réductrice. Cela entraînera la formation de glucose, de maltose, en particulier de dextrine (**Scriban, 1999**).
- ❖ Mécanisme uni-chaîne : dans lequel l' α -amylase dégrade d'abord une chaîne, puis passe à la suivante (**Berry et Paterson, 1990**).
- ❖ Mécanisme multi-chaîne : la dégradation des chaînes se fait simultanément (**Kandra et al., 1997**).
- ❖ Attaque multiple ou répétitive : le déplacement d'enzyme fixée tout au long de la chaîne, provoque plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe enzyme-substrat (**Kandra et al., 1997**).

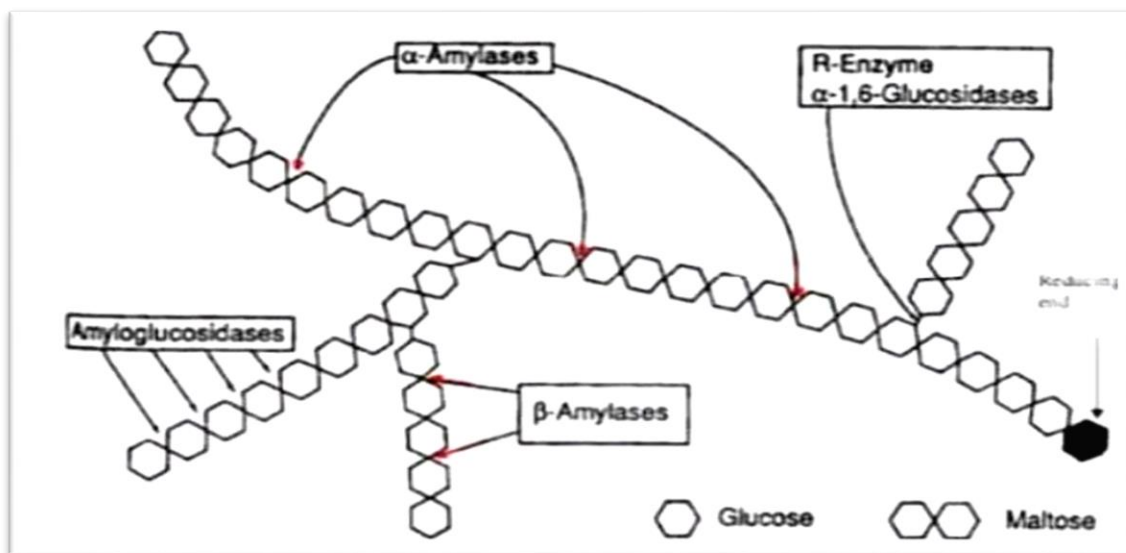


Figure 02: la digestion enzymatique de l'amidon (**Tormo et al., 2004**).

II.2-Anti-Diabète :

1. Définition du diabète sucré:

est pathologie caractérisée par une hyperglycémie chronique ce qui entraîne une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la concentration de glucose dans le sang causé par un déséquilibre dans la production d'insuline ou action d'insuline ou les deux (**Errajraji et al., 2010 ; Eddouks et al., 2007**).

l'absorption Un des traitements de l'hyperglycémie consiste à retarder ou réduire la digestion et des glucides en inhibant les enzymes de digestion telle que l' α -amylase (**Khacheba et al., 2014**). Les inhibiteurs de cette enzyme retarde la digestion des glucides et prolonge sa durée, ce qui entraîne une diminution du taux d'absorption du glucose, qui à son tour conduit à une diminution du glucose plasmatique après un repas (**Rhabasa-Lhoret et Chiasson, 2004 ; Bhandari et al., 2008**).

Cette hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes séquelles à long terme, particulièrement à des lésions, des anomalies et une insuffisance de divers organes, surtout les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (**Saha, et al, 2012**).

2.Classification du diabète:

2.1.Le diabète de type 1 (anciennement insulino-dépendant DID)

Représente 10 % environ des cas de diabète et apparait le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou le jeune adulte, suite à une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules β fonctionnelles .Elle est liée à un déficit en insuline (**Zerriouh., 2008**).

2.2. Le diabète de type 2 (anciennement appelé le diabète non insulino-dépendant DNID)

C'est la forme de diabète la plus répandue représentant près de 90% des cas diagnostiqués. Ce type de diabète se manifeste communément chez les adultes après l'âge de 40 ans, mais son incidence augmente rapidement chez les plus jeunes. Il est très répandu et représente 90 % des cas de diabète (**Boussoussa., 2016**). Est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie, résultant d'une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, notamment les muscles, et d'une diminution de la capacité du foie à produire du glucose. (**Slama-Chaudhry et al., 2013**).

2.3.Le diabète gestationnel:

Il s'agit d'un trouble de la tolérance glucidique entraînant une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse. Cette forme de diabète est généralement transitoire et disparaît dans les semaines suivant l'accouchement. Il existe cependant un risque plus élevé de 50% permanente d'un diabète lors d'une grossesse ultérieure. Les femmes ayant souffert de diabète gestationnel risquent davantage de développer un diabète type 2 par la suite (**Pirosa et al., 2019**).

2.4.Autres types de diabète :

le diabète secondaire (spécifique) Le diabète sucré peut être secondaire à une pancréatopathie (pancréatite chronique ou (aiguë, tumeur, l'hémochromatose), à diverses endocrinopathies phéochromocytomes, acromégalie, syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, tumeurs endocrines pancréatiques et digestives) à des dysfonctionnements d'origine génétique des cellules β (diabète

MODY [Maturity Onset Diabetes of the Young] et diabète mitochondrial). Elle peut également être à l'origine des médicaments, de composés chimiques ou de composés toxiques. (**Azizzi; Maugendre et al., 2007**).

III- Acarbose

1.Définition:

L'acarbose est le premier inhibiteur de l' α -glucosidase utilisé en thérapeutique pour régulariser la digestion et l'absorption des glucides (**Faure, 2017**).

2.Mode d'action d'Acarbose :

L'acarbose (commercialisée en Algérie sous le nom de Acorbay 50mg) est un oligosaccharide complexe qui inhibe l'activité des α -glucosidases de la bordure en brosse de l'intestin grêle.

-Il n'accroît pas l'insulinosécrétion.

- L'action antihyperglycémique de ce médicament résulte de l'inhibition compétitive et réversible de l' α -amylase pancréatique et des hydrolases des α - glucosides liées à la membrane intestinale.

- L' α -amylase pancréatique transforme les amidons complexes en oligosaccharides dans la lumière de l'intestin grêle, tandis que les α -glucosidases liées à la membrane intestinale transforment les oligosaccharides, trisaccharides et disaccharides en glucose et autres monosaccharides dans la bordure en brosse de l'intestin grêle.

- La plupart des inhibiteurs des α -amylase, vont interagir avec les sites actifs d'une manière analogue au substrat, le mécanisme d'inhibition se produit à travers le blocage direct du centre actif de plusieurs sous-sites de l'enzyme (**Tormo et al., 1998**).

- Chez les patients diabétiques, cette inhibition enzymatique retarde l'absorption du glucose et atténue la hausse postprandiale de la glycémie, ce qui améliore l'équilibre de la glycémie.

-Parce que l'acarbose a un mécanisme d'action différent, son effet favorable sur l'équilibre de la glycémie s'ajoute à celui des sulfonylurées, de la metformine et de l'insuline quand on l'associe à un de ces médicaments.

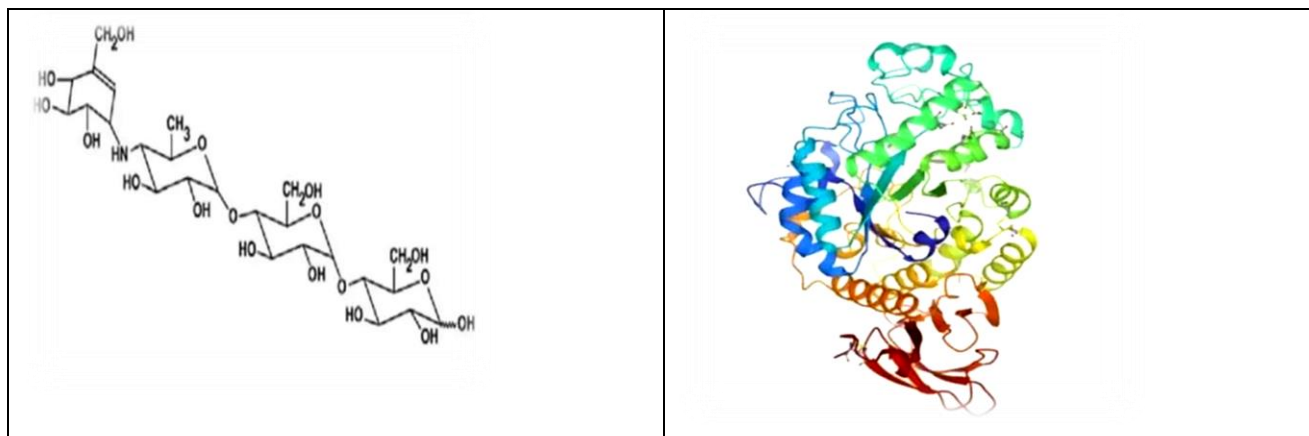


Figure 03: Formule développée de l'acarbose.	Figure 04: l'alpha amylase en complexe avec l'acarbose (PDB, 1998)
---	---

Activité anti-oxydant

I.1. Le stress oxydatif

Définition

est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et al., 2003).

1-radicaux libres

Une espèce chimique (atome, molécules ou fragment de molécule contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe ce qui augmente sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour devenir stable (Bonnerfont et al , 2003). Les radicaux libres proviennent à la fois de sources endogènes (mitochondrie, réticulum endoplasmique, cellules phagocytaires...) et de sources exogènes (pollution, alcool, fumée de tabac, solvants industriels, pesticides et rayonnement) (Phaniendra et al ., 2015). Lorsque ces radicaux livres sont produits plus rapidement ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydant ce qui permet le développement de stresse oxydatif (Picchi, 2006).

2-Les différents types des radicaux libres

Parmi les composés oxydants formés après réduction de l'oxygène que nous respirons. On distingue:

2.a.Les radicaux libres primaires

Ils dérivent directement de l'O₂ par une réaction de reduction.(Magali, 2013).

2.b.Les radicaux libres secondaires

Ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires (Magali, 2013) .

2.c. Les espèces actives de l'oxygène

Ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres (Magali, 2013).

-Les radicaux libres primaires et secondaires et les espèces actives de l'oxygène sont regroupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO ou EOA (ou « ROS » en anglais pour Reactive Oxygen Species).

II.Les Anti oxydants

1.Définition:

sont des substances qui peuvent directement ou indirectement piéger les radicaux libres (**2002, Yilmaz**) Les antioxydants peuvent être divisés selon leur méthode d'inhibition du stress oxydatif.

2. Classifications des antioxydants :

Il existe de nombreuses sources d'antioxydants tant fabriqué par l'organisme que ceux qui sont fournis par les aliments ou ceux de synthèse. Ils sont classés :

2.1-Antioxydants naturels :

Les antioxydants naturels comprennent de nombreux éléments naturellement présents dans nos aliments tels que les fruits et légumes, les oligo-éléments et les plantes qui ont un effet combiné pour aider à protéger les cellules du corps contre l'effet des radicaux libres.

Les fruits et légumes : Se concentrent sur les principaux antioxydants : vitamines C et E, bêta-carotène et autres caroténoïdes et poly phénols.

Les oligo-éléments : Les oligo-éléments se définissent comme une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme comme les deux oligoéléments le sélénium et le zinc.

2.2-Antioxydants synthétiques :

Les antioxydants synthétiques, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Plusieurs antioxydants synthétiques comme le BHA (L'hydroxyanisolebutylé), le TBHQ (La tert-butylhydroquinone), le BHT (L'hydroxytoluènebutylé), sont utilisés dans les cosmétiques et les huiles végétales. En raison de l'instabilité des antioxydants naturels, de nombreux antioxydants synthétiques ont été utilisés pour stabiliser les graisses et les huiles (en particulier celles d'origine animale). L'hydroxytoluène butyle BHT et l'hydroxyanisole butyle BHA qui sont des composés aromatiques utilisés comme additif alimentaire ainsi que dans les produits cosmétiques et d'hygiène, Leur utilisation dans les aliments pour les humains et les aliments pour les animaux soulève des soupçons de toxicité cancérigène, dysfonctionnelle et de perturbation endocrinienne. Cependant, ces composés sont utilisés depuis 1954 comme antioxydants dans les aliments destinés à la consommation humaine et peuvent être les plus utilisés aujourd'hui.

3. Mécanismes d'action des antioxydants :

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation (**Leger, 2006**). Selon cette classification, certains antioxydants présentent plus d'un

mécanisme d'activité, par conséquent, appelés antioxydants multiples-fonctions. Une autre classification couramment utilisée catégorise les antioxydants en antioxydants primaires : piègeurs de l'oxygène, et antioxydants secondaires : enzymatiques et chélateurs/séquestrants (**Wanasundara et Shahidi, 2005**). Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs (ou retardeurs), empêchent la formation ou piègent les ERO responsables de l'initiation de l'oxydation (O_2 , $1O_2$...). Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne interceptent les radicaux propagateurs de l'oxydation (lipoperoxyradicaux, ou $ROO\bullet$) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation.

III-DPPH:

1.Définition:

DPPH - Abréviation commune pour le composé chimique organique 2,2-diphényl-1 Picrylhydrazyle.

C'est une poudre cristalline de couleur foncée composée de radicaux libres stables

Particules.

– Le test au DPPH. LE DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil) est un radical de couleur violet intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH

2.Test DPPH :

Dans cette analyse, la couleur violette de la racine DPPH est basée sur la couleur Casserole en milieu jaune par des molécules antioxydantes. Sa capacité de capture est évaluée a matière organique en observant la diminution de l'absorption à -515 par 528 nm jusqu'à ce qu'elle reste une. (**1995 .al et Williams-Brand**). La capacité des composés organiques est déterminée L'absorption est constante sur les antioxydants en mesurant la concentration restante de radical DPPH après sa réaction avec les antioxydants (**Milardovic et al. 2006**).

Chapitre 02:

Naringin



I. Généralités sur les agrumes

La culture des agrumes a été pratiquée il y a au moins 4000 ans dans les régions tropicales et subtropicales du continent asiatique et de l'archipel malaisien (**Dugo et Di Giacomo, 2002 ; Batchelor and Sinclair, 1961**). Le commerce, les guerres et l'émigration, associés au parfum et à la saveur attrayants du fruit ; ont entraîné la diffusion des agrumes au début du Moyen âge dans le Moyen-Orient et le Bassin méditerranéen, grâce au Arabes andalou ; dont le mot « orange » provenant de l'arabe « narandj » aussi bien que eux qui emploient le mot « Tchina », indiquant l'origine orientale du fruit. Et beaucoup plus tard vers l'Amérique et l'Australie grâce à (**Christophe Colombus**). Ces fruits sont universellement populaires en raison de leur saveur, de leur goût et de leurs arômes distinctifs, ainsi que de leurs nombreux avantages pour la santé (**Choi Et al., 2007**). Actuellement, on trouve des Citrus cultivés dans toutes les parties du monde jouissant d'un climat sans hivers rigoureux, entre les latitudes comprises 40 ° N et 40 ° S. La production des agrumes est la deuxième plus importante au monde avec une production algérienne équivalente de 14 millions de quintaux en 2018

Le terme agrumes, agrios ou citricos en espagnol, provient du latin acrumen (aigre), qui signifie dans l'antiquité la saveur âcre (acide) (**Ladaniya, 2008 ; Khan et al, 2010 ; Davies and Albrigo, 1994**). Les agrumes se répartissent en plusieurs genres dont Poncirus, Fortunella et Citrus. Dans ce dernier qu'appartiennent les principales espèces cultivées, à savoir : Citrus reticulata (Mandarinier), Citrus clementina (clémentinier), Citrus grandis (Pomplemoussier), Citrus medica (Cédratier), Citrus aurantium (bigaradier), Citrus sinensis (Oranger) et Citrus limon (Citronnier). Dans notre partie pratique, nous allons nous intéresser au dernier genre.

II- Citron

1. Définition :

Citron est l'un des types de fruits les plus populaires dans le monde entier, largement cultivé dans les régions tropicales, subtropicales, et bien d'autres domaines. Chaque année sont produites environ 121 millions de tonnes d'agrumes (**Patsalou et al., 2017**).

Fruits de citron sont riches en composés phénoliques (**Al-Qassabi et al., 2018**). L'acide ascorbique est l'une des vitamines les plus importantes pour son activité antioxydante et avantage nutritionnels, et la teneur en acide ascorbique diminue dans la pâte au cours de la maturation des fruits (**Alós et al., 2014**).

Les Fruits de citron peuvent être utilisés pour la consommation fraîche, la production et la décoration des plats juicing, selon les préférences des consommateurs (**Ngugi et al., 2017**).

Les Citronniers portent des fruits couventine toute l'année et les fruits peuvent être récoltés à plusieurs fois par an aussi longtemps qu'il réponde aux normes de maturité et les exigences du marché. Les fruits de citron sont riches en nutriment et de composés bioactifs, tels que vitamines, diététique Fibre, des minéraux, des caroténoïdes, des composés phénoliques, et des huiles essentielles (**del Rió et al., 2004; Gil-Izquierdo et al., 2004; González-Molina et al., 2010**).

Le degré de maturité de fruits de citron affecte non seulement la qualité commerciale, mais aussi les composés phénoliques et de capacité antioxydante dans les fruits (**Mcharek et Hanchi al. 2017**).

2-Structure et développement

Les citrons sont des fruits de forme ovale, pointus et mamelonnés à leur sommet, de 8 à 12cm de long. Leur écorce (zeste) épaisse de couleur verte vire au jaune à la maturité contenant une essence à odeur caractéristique. Sa pulpe est acide et les graines qu'il contient ont des cotylédons blancs. On pratique 2 récoltes par an : une en été pour les fruits, et l'autre en hiver pour le jus et l'huile essentielle (**Goetz, 2014; Faucon, 2015**).

Tous les fruits des Citrus cultivés ont presque la même structure, ils sont composés essentiellement de deux parties morphologiques : le péricarpe et l'endocarpe (pulpe) (**Figure 05**) (**Terol et al. 2010**).

- le péricarpe est nommé aussi l'écorce, il est composé du zeste (épicarpe ou flavédo), partie la plus externe de ce péricarpe, de couleur orangée ou jaune, contenant de nombreuses poches sécrétrices de type schizolysigènes, riche en huile essentielle(**Chavanne, 2011; Faucon, 2015**).
- Un mésocarpe (ou albédo) de couleur blanche, de texture souvent cotonneuse ou spongieuse, de nature cellulosique, d'épaisseur variable, est la partie la plus intérieure du péricarpe (**Janati et al. 2012; Faucon, 2015**).
- La partie interne, l'endocarpe ou pulpe constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et ont une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (**Bousbia, 2011**).

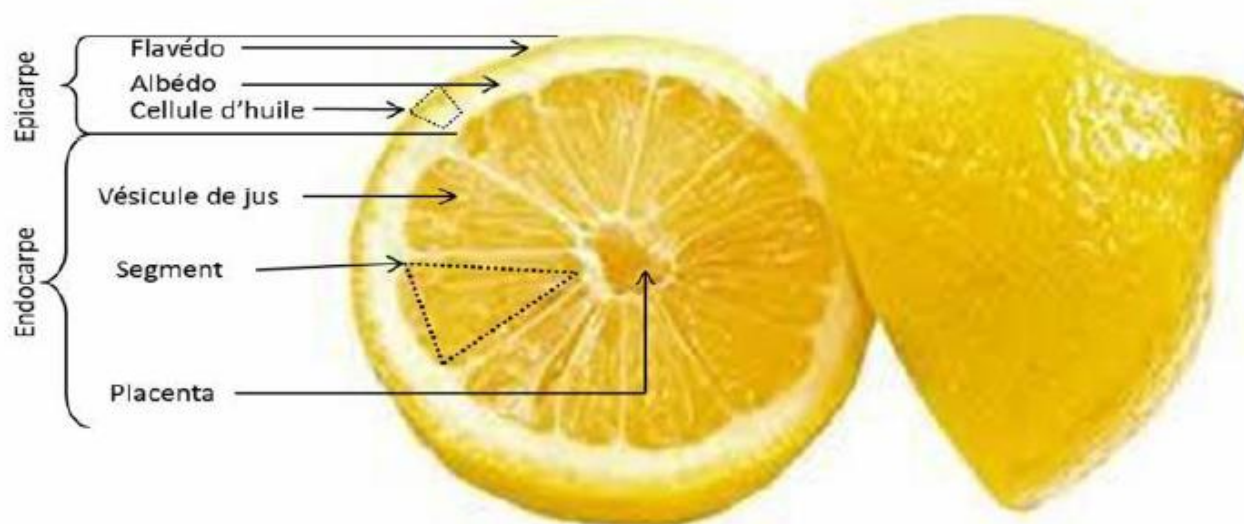


Figure 05 : Coupe transversale de fruit d'un Citrus (Duan et al. 2014).

3-Composition chimique :

Comme les autres agrumes, les feuilles et les fruits très juteux de citron sont des sources de composés naturels, tels que 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3), dont l'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le citron est un fruit remarquable par sa haute teneur en vitamine C et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (naringosides, hesperidosides) et des polyphénols. Les citrons frais sont faibles en calories et en sucre, mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron, il est riche en calcium, magnésium et potassium qui est le minéral le plus abondant.

Composition moyenne donnée à titre indicatif : les valeurs sont à considérer comme des ordres de grandeur, susceptibles de varier selon les variétés, la saison, le degré de maturité, les conditions de culture, etc. Les données sur les polyphénols sont issues de la base Phénol-Explorer 3.0. Toutes les autres données sont issues de la Tableau de composition nutritionnelle des aliments (Ciquel, 2017) Pour chaque nutriment, le tableau apportent une information sur la quantité moyenne pour 100 g net de citron.

Tableau 01: Composition biochimique moyenne dans 100 g de citron

Constituant	Teneur moyenne	Constituant	Teneur moyenne
Eau (g)	89	Sélénium (µg)	2.09
Protéines (g)	0.84	Sodium (mg)	0.99
Glucides (g)	3.1	Zinc (mg)	0.054
Lipides(g)	0.7	Provitamine A Béta-carotène (µg)	3
Sucres(g)	2.85	Équivalent Vitamine A (µg)	0.5
Fibres(g)	1.2	Vitamine B1 (mg)	0.043
Acides gras saturés (g)	0.15	Vitamine B2 (mg)	0.025
Acides organiques (g)	4.88	Vitamine B3 (mg)	0.15
Calcium (mg)	13.7	Vitamine B5 (mg)	0.21
Cuivre (mg)	0.034	Vitamine B6 (mg)	0.07
Fer (mg)	0.34	Vitamine B9 (µg)	21.5
Iode (µg)	0.3	Vitamine C (mg)	51
Magnésium (mg)	8.54	Vitamine E (mg)	0.48
Manganèse (mg)	0.015	Polyphénols (totaux (mg)):	36.91
Phosphore (mg)	18.4	Flavonoïdes (mg)	36.89
Potassium (mg)	157	Lignanes (mg)	0.02

4.Utilisations de citron :

De nombreuses études ont montré que les espèces du genre Citrus sont riches en principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans le domaine cosmétique ou alimentaire. (**Kahkonen et al., 1999 ; Shahib et al., 2011**).

- Le citron a été utilisé pour l'insomnie et l'asthme et pour dissoudre les cristaux rénaux ,(**Emenik et Okwu, 2006**).
- Stimulation de l'appétit (**Santo et al., 2011 ; Karimi et al. 2012**).
- Activité antimicrobienne, antidiabétique , anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse (**Del-rio et al., 2004**).
- Réduire la tension artérielle et traiter l'obésité (**Ramful et al., 2011**)

III.Les flavonoïdes

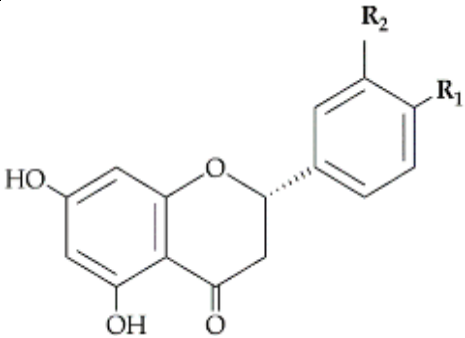
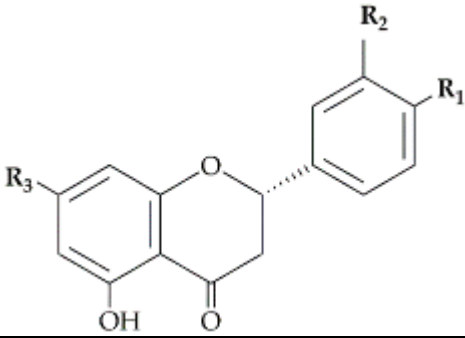
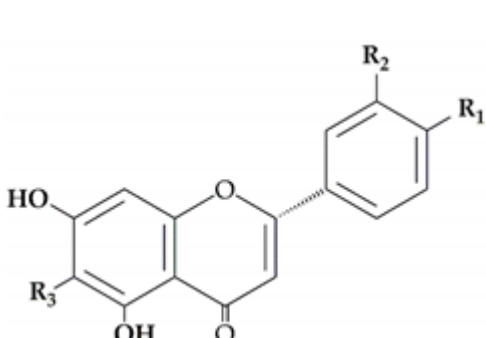
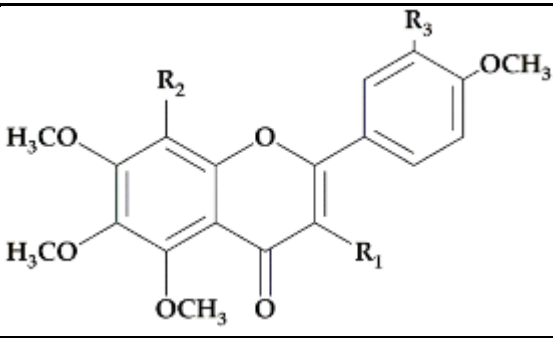
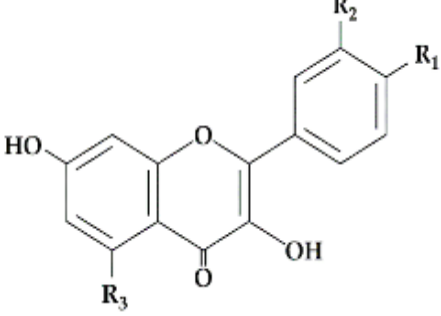
1.Définition :

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques ayant une structure phényl benzopyrone (**Amiot, Marie Josèphe *Apidologie* 20.2 (1989)**), représentant deux cycles benzéniques (C6) reliés par une chaîne linéaire à trois carbones (C3), avec un groupe carbonyle en position C. Bien que les flavonoïdes soient généralement considérés comme des agents non nutritifs, leur rôle potentiel dans la prévention des principales maladies chroniques a attiré l'attention de nombreux chercheurs. Les flavonoïdes d'agrumes comprennent une classe de glycosides, comme la naringine. Les flavonoïdes ont augmenté la capacité antioxydante du sérum contre la peroxydation lipidique et ont réduit le stress oxydatif chez les personnes âgées. Ces composés possèdent les effets bénéfiques d'anti-inflammatoire, antitumoral et anti-athérosclérose. En outre, ceux-ci servent également de complément à la chimiothérapie médicamenteuse, au diabète et aux médicaments neuroprotecteurs.

2. La classification et les structures chimiques des flavonoïdes d'agrumes:

Les flavonoïdes sont subdivisés en flavanols, anthocyanidines, flavanones, flavones et chalcones. La structure générique des flavonoïdes et le système de numérotation utilisé pour distinguer les positions du carbone autour de la molécule sont présentés dans le **tableau 2**. Les trois cycles phénoliques qui composent la molécule de flavonoïde sont appelés cycles pyraniques. Les flavonoïdes d'agrumes sont divisés en trois types principaux, à savoir les flavanones, les flavones et les flavonols (**Barboni, Toussaint. 2006**). Dans le **tableau 2**, la classification des flavonoïdes d'agrumes et les structures chimiques des principaux flavonoïdes sont présentées. Les principaux flavonoïdes trouvés dans les espèces de Citrus sont l'hespéridine, la narirutine, la naringine et l'ériocitrine.

Tableau 02: la classification des flavonoïdes d'agrumes et les structures chimiques des principaux flavonoïdes.

Flavonoïdes d'agrumes	Colonne vertébrale de la structure	Exemples	
Flavanones		Hesperetin	R ₁ =O-CH ₃ R ₂ =OH
		Naringenin	R ₁ =OH
			R ₂ =H
Flavanones glycosides		Narirutin	R ₁ =O-CH ₃ R ₂ =H R ₃ =7-O-rutinoside
			R ₁ =OH
			R ₂ =H
		Naringin	R ₃ =O-7-Rhamnoglucoside
Flavones		Apigenin	R ₁ =OH R ₂ =R ₃ =H
		Luteolin	R ₁ =R ₂ =OH
			R ₃ =H
Polymethoxylated Flavones		Nobiletin	R ₁ =H R ₂ =R ₃ =OCH ₃
		Tangeretin	R ₁ =R ₃ =H
			R ₂ =OCH ₃
Flavonols		Quercetin	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH
		Kaempferol	R ₁ =R ₃ =OH
			R ₂ =H

IV . Naringin :

1. Histoire de naringin

L'histoire de la découverte du naringin remonte au début du 20ème siècle. En 1920, un chimiste japonais du nom de Yoshimasa Kiso a réussi à isoler pour la première fois le naringin à partir d'extraits de peau de citrons. Le nom "naringin" a été donné à cette substance en référence au nom botanique de la famille des agrumes, *Citrus naringa*.

Au fil des années, la recherche sur le naringin a révélé ses nombreuses propriétés médicinales et ses avantages pour la santé (**Douffi 2021**), notamment ses effets antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux, anticancéreux et neuroprotecteurs. Il a également été découvert que le naringin peut aider à abaisser le taux de cholestérol dans le sang, à réguler la glycémie et à renforcer le système immunitaire.

Le naringin a également connu une utilisation croissante dans l'industrie alimentaire, où il est utilisé comme additif alimentaire pour améliorer la saveur et la texture des aliments et des boissons (**Jaubert, Jean-Noël.2009**) . Il est également utilisé comme édulcorant pour masquer les saveurs désagréables et donner une saveur d'agrumes à certains produits alimentaires.

Aujourd'hui, le naringin est largement utilisé dans les suppléments alimentaires et les produits de santé, en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé et de ses nombreux avantages potentiels pour le corps humain. La recherche sur le naringin se poursuit encore aujourd'hui, avec l'objectif de découvrir de nouvelles utilisations et avantages pour cette substance naturelle.

2. Définition :

Le naringin est un composé végétal appartenant à la famille des flavonoïdes, présent naturellement dans les agrumes limon (**Taileb, Nadia 2009**) , Il a un poids moléculaire de 580,4 g/mol et la formule moléculaire $C_{27}H_{23}O_{14}$. Il est présent en plus grande quantité dans la partie blanche de l'écorce des agrumes et dans les membranes entourant les segments de pulpe .

3. Liaisons et structures électroniques du naringin :

La structure électronique du naringin est déterminée par les liaisons entre les atomes qui le composent. La molécule de naringin contient des liaisons covalentes entre les atomes d'oxygène, de carbone et d'hydrogène(**Rouaissia Hamida; 2020**).

Plus précisément, la naringin est constituée d'un noyau flavone (2-phénylchromén-4-one) qui contient deux cycles aromatiques fusionnés. Le cycle A est un cycle benzénique (C_6H_5) et le cycle B est un cycle pyranique (C_5H_4O).

Le noyau flavone est lié à une chaîne latérale de trois unités de sucre : deux molécules de glucose et une molécule de ramnose. Cette chaîne latérale est attachée au cycle A du noyau flavone par une liaison glycosidique entre le carbone C7 du cycle A et le carbone C1 de la première molécule de glucose.

La naringin possède également un groupe acide, qui est situé à l'extrémité de la chaîne latérale de sucre, attaché au carbone C2 de la ramnose.

La structure électronique de la naringin est déterminée par la répartition des électrons dans les liaisons covalentes et les orbitales moléculaires (Fiorucci, Sébastien.2006). La présence de groupes fonctionnels tels que les groupes hydroxyle et acide carboxylique confère à la molécule des propriétés chimiques uniques (Fiorucci, Sébastien.2006).

En résumé, la naringin est une molécule complexe constituée d'un noyau flavone et d'une chaîne latérale de sucre. La structure électronique de la naringin est déterminée par les liaisons covalentes entre les atomes qui la composent, ainsi que par la répartition des électrons dans les orbitales moléculaires (Bendjabeur, Salah. Diss. 2019).

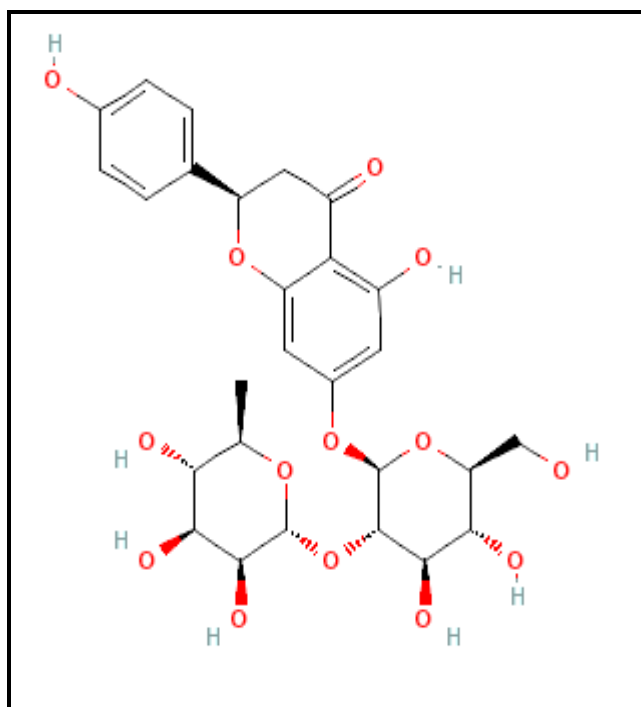


Figure 06 : Structure 2D du naringin.

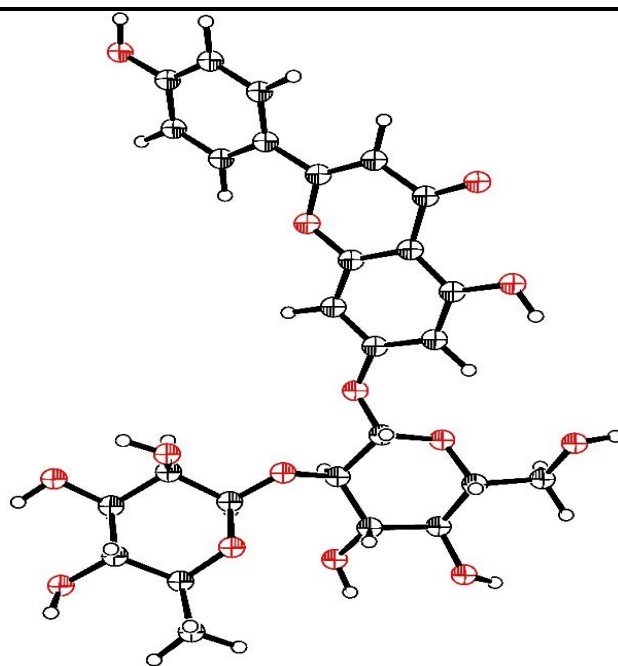


Figure 07 : Naringin 6-311++G(d,p).

4. Noms et identifiants du naringin :

Le naringin a plusieurs noms et identifiants :

- Nom IUPAC : (S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one 7-rhamnoglucoside
- Autres noms courants : naringine, narirutine, naringoside
- Numéro CAS : 10236-47-2
- Numéro CE : 233-899-5
- Numéro EINECS : 233-899-5
- Numéro FEMA : 2772
- Numéro MDL : MFCD00150024
- SMILES :
C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(O2)C=C(C=C3)O)O)O)[C@@H]4C@@(HO)O
- InChI : InChI=1S/C27H32O14/c28-10-4-13(32)12-6-22(41-27-25(39)24(38)23(37)19(11-29)42-27)26(40)21(35)18(34)8-36-20(12)7-14(33)16-15(30)5-3-9(31)17(16)6/h3-5,11-13,18-19,21-29,31,34-39H,6-10H2,1-2H3/t12-,13-,18-,19-,21+,22+,23-,24+,25-,26+,27+/m1/s1
- Formule moléculaire : C₂₇H₂₃O₁₄

Ces noms et identifiants sont utilisés pour identifier et caractériser le naringin dans les différentes applications industrielles et scientifiques.

5. Propriétés du naringin :

5.1. Propriétés chimiques et physiques:

Les propriétés chimiques et physiques du naringin sont les suivantes :

Poids moléculaire : 580,53 g/mol

Point de fusion : 171-174°C

Solubilité : légèrement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétone et le diméthylsulfoxyde (DMSO)

pH : le naringin est acide, avec un pKa de 7,8

Stabilité : le naringin est stable à pH neutre et acide, mais peut se décomposer en milieu basique

Couleur : le naringin est un solide cristallin blanc à jaune clair (Belhaddad, Oum-elkheir Diss. 2018).

5.2. Propriétés aromatiques de naringin :

Le naringin est un composé phytochimique qui n'a pas d'odeur perceptible à température ambiante. Cependant, il est possible que le naringin contribue à l'arôme des aliments et des boissons dans lesquels il est présent en tant que composé naturel.

5.3. Propriétés spectroscopiques et UV visible :

Le naringin présente plusieurs propriétés spectroscopiques et UV-visible qui sont importantes pour son identification et sa caractérisation (Mihoune, Youssra. 2021):

A. Spectroscopie infrarouge (IR) : Le spectre IR du naringin montre des bandes de vibration caractéristiques pour les groupes fonctionnels présents dans la molécule, notamment les groupes OH, CO, et C=C. Ces données peuvent être utilisées pour identifier la structure de la molécule et pour confirmer sa pureté.

B. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) : Les spectres RMN du naringin montrent des signaux pour les atomes de carbone et d'hydrogène présents dans la molécule (Chebil, Latifa; 2006). Cette technique permet de déterminer la structure moléculaire et la connectivité atomique.

C. Spectrophotométrie UV-visible : Le naringin présente une forte absorption dans la région du spectre UV-visible, avec un maximum d'absorption à environ 283 nm. Cette propriété peut être utilisée pour quantifier le naringin dans des échantillons, ainsi que pour étudier ses interactions avec d'autres composés.

En résumé, les propriétés spectroscopiques et UV-visible du naringin sont utiles pour son identification, sa caractérisation et sa quantification, ainsi que pour étudier ses interactions avec d'autres composés et son rôle dans la santé.

6. Rôle de naringin :

Le naringin a plusieurs rôles importants dans le corps humain en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé (**Fritah, Khadidja. Diss. 2015**). Voici quelques-uns des rôles les plus importants du naringin :

1. Antioxydant : Le naringin est un antioxydant puissant qui aide à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules instables produites par le corps lorsqu'il est exposé à des facteurs de stress environnementaux tels que la pollution, la fumée de cigarette et les rayons UV. Les radicaux libres peuvent endommager les cellules et les tissus du corps (DE ES, I. T. E. N. F. R;2021) , ce qui peut entraîner des maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiaques et le vieillissement prématuré.
2. Anti-inflammatoire : Le naringin a des propriétés anti-inflammatoires qui aident à réduire l'inflammation dans le corps (**Hamideche, Lynda,; 2016**). L'inflammation est une réponse immunitaire normale du corps à une blessure ou à une infection, mais une inflammation chronique peut entraîner des maladies chroniques telles que l'arthrite, le diabète et les maladies cardiaques.
3. Anticancéreux : Des études ont montré que le naringin a des effets anticancéreux potentiels en inhibant la croissance des cellules cancéreuses et en induisant l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules cancéreuses (**Mahdjoub Wedjdane, 2017**).
4. Régulateur de la glycémie : Le naringin peut aider à réguler la glycémie en augmentant la sensibilité à l'insuline et en inhibant l'absorption du glucose dans l'intestin. Cela peut être bénéfique pour les personnes atteintes de diabète de type 2.
5. Abaissement du cholestérol sanguin : Le naringin peut aider à réduire le taux de cholestérol sanguin en inhibant la production de cholestérol dans le foie et en augmentant l'excrétion de cholestérol par les selles (**Pomerleau, Sonia;2004**).
6. Protection du cerveau : Le naringin peut aider à protéger le cerveau contre les dommages causés par la maladie d'Alzheimer, les accidents vasculaires cérébraux et d'autres maladies neurodégénératives. Il peut également améliorer la fonction cognitive et la mémoire.

En résumé, le naringin a des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, régulatrices de la glycémie, de réduction du cholestérol sanguin et de protection du cerveau, qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine.

Chapitre 03 :

**Context théorique des
différentes techniques
expérimentales utilisées**

I-La spectroscopie UV-Visible

1.Définition

est la plus ancienne et la plus utilisée des méthodes d'analyse dans les laboratoires. Elle permet notamment des applications quantitatives par application de la loi de Beer-Lambert. Cependant, elle ne fournit que peu d'informations structurales (Analyse qualitative) comparées aux autres méthodes spectroscopiques (IR, RMN et SM).

2.Principe:

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (160 à 665 kJ·mol⁻¹). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. L'absorption de photons se traduit par des transitions d'électrons engagés dans les orbitales moléculaires (les électrons des liaisons σ et π ainsi que les non liants n) de l'état fondamental et les niveaux non occupés des états excités (σ^* et π^*). Chaque transition est caractérisé à la fois par sa longueur d'onde λ_{max} et par son coefficient d'absorption molaire: ϵ_{max} à cette longueur d'onde.

3.Propriétés des UV

- 210-280nm propriétés bactéricide (désinfection) UV-C.
- 280-315nm favorise la production de la vitamine D qui est anti rachitique (assimilation du Calcium) UV-B.
- 315-400nm favorise la pigmentation de la peau UV-A.

4.Loi d'absorption de la lumière-Loi de Beer-Lambert

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

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

Avec ϵ_{λ} : coefficient d'absorption (ou d'extinction) molaire du composé à la longueur d'onde λ .
L'unité du coefficient d'adsorption molaire est : Lmol⁻¹ cm⁻¹ , C'est une grandeur qui dépend de

l'espèce chimique considérée, de la longueur d'onde d'analyse, du solvant et de la température (Mesplede, J., Randon J. 2004 et Boutiti A., 2010).

5. Condition d'utilisation de la loi de Beer et Lambert:

- La lumière doit être monochromatique.
- Les solutions doivent être diluées (Concentration faibles).
- Les solutions utilisées ne doivent pas être colloïdales. (homogène) Ce qui éviterait les pertes de rayonnement par réflexion ou diffusion.

II-L'amarrage moléculaire :

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

1-Principe :

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

2-Les étapes de docking

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

♦ Le Docking

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

♦ Le Scoring

Est une méthode mathématique pour le classement, utilisées pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules et de donner un score aux poses obtenues lors de la

phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (EL Hadj, 2016 ; LANEZ, 2016).

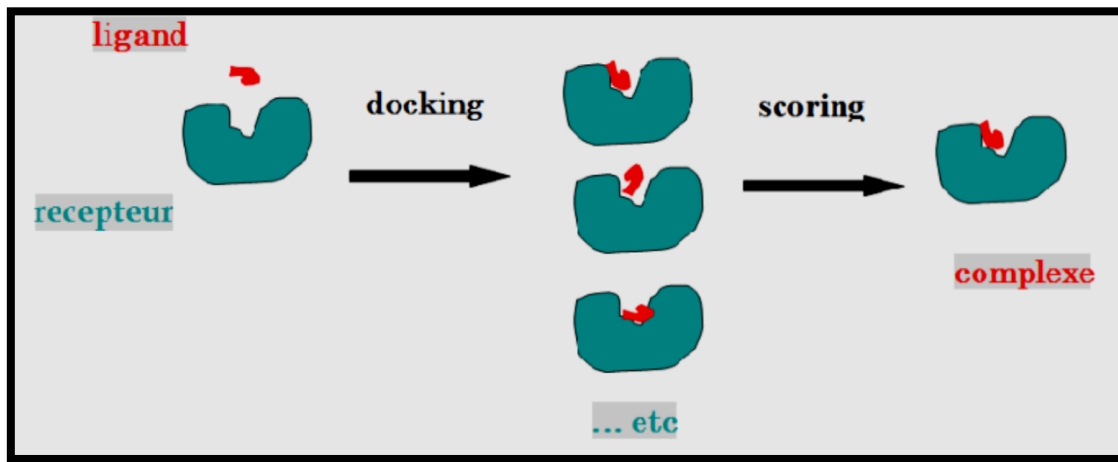


Figure 08 : Les étapes de docking moléculaire (EL Hadj, 2016).

Partie II :

Expérimentale



Chapitre 1 :

Matériels et Méthodes



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

I. Matériels :

I.1. Réactifs utilisés :

- **Alpha Amylase :**

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

- **Acarbose :**

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

- **Substrat :**

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

- **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.

- **Une solution d'alpha-tocophérol :**

Une solution d'alpha-tocophérol est une solution contenant une quantité mesurable de l'antioxydant alpha-tocophérol, généralement dissous dans un solvant approprié tel que l'huile de maïs ou l'huile d'olive. Cette solution est souvent utilisée pour ses propriétés antioxydantes potentielles (ph = 7) .

- **DPPH :**

Préparation de la solution de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en dissolvant le DPPH dans une quantité suffisante de solvant (Acétonitrile) , elle utilisé pour mesurer le potentiel antioxydant .

I.2. Matériels de laboratoire :

✓ Plaque chauffante	✓ Auto clave	✓ Vortex
✓ Balance électrique	✓ Bain marie	✓ PH-mètre
✓ UV spectrophotometer	✓ Portoir pour tubes spéciaux	✓ Pipettes pasteur
✓ UV-visible spectroscopy	✓ Centrifugeuse	✓ Bec benzène

✓ Etuve

✓ Micropipettes ajustables

✓ Papier filtre

I.3. Produits chimiques :✓ Acétonitrile (CH_3NC)✓ Acide hydrochlorique (HCl)

✓ Lugol

✓ DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

✓ Ethanol (EtOH)✓ Phosphate dipotassique (K_2HPO_4)✓ Méthanol (MeOH)✓ Dichlorométhane (CH_2Cl_2)✓ Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)✓ Eau distillée (H_2O)**II. Méthodes :****II.1. Extraction de Naringin :**

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

a. **Épluchage** : 3 kg de Citron limon bien lavé ont été épluchés à l'aide d'un couteau aiguisé **Figure 09**.



Figure 09 : fruits limon

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 10**. Le poids des croûtes séchées était de 75.95 g.



Figure 10 : Les croûtes de citron limon pendant le séchage.

c. Broyage : Les croûtes séchées ont été broyées pour obtenir une poudre **Figure 11**.



Figure 11 : Poudre de croûtes sec.

d. Extraction : 25 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 12**.



Figure 12 : Montage d'évaporation a pression réduit

- e. Dissolution :** Soixante millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à l'extrait méthanoïque, puis le mélange a été agité à bain-marie (**Figure 13**) à une température de 70°C pendant une durée de 30 minutes.

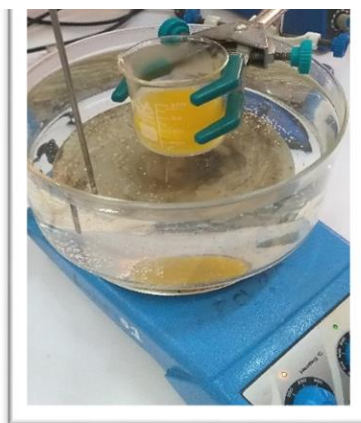


Figure 13 : Montage de chauffage

- f. Cristallisation :** Le mélange a été transféré dans un ampoule a décanté (**Figure 14**) 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 14 : Montage de cristallisation.

g. Récupération : Les cristaux de naringin 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**):

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

Où la masse de Naringin 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 naringin était de **0.72%** (poids sec). Ces résultats indiquent que la méthode d'extraction par solvant n'était pas efficace pour extraire le naringin du citron limon .

II.3. Caractérisation du Naringin :

La caractérisation de naringin 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 naringin 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 naringin 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 naringin 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 (**Zuvela et al. 2019**).

✓ Appareillage :

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

II.3.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

La caractérisation par infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui utilise la spectroscopie infrarouge pour déterminer la présence de liaisons chimiques dans les molécules (**López-Lorente and Mizaikoff 2016**). Le principe de cette technique est basé sur l'absorption de la lumière infrarouge par les liaisons chimiques des molécules. Chaque type de liaison chimique absorbe une fréquence d'onde spécifique, ce qui permet d'identifier les différentes liaisons présentes dans la molécule (**Boskey and Mendelsohn 2005**).

✓ Appareillage :

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

✓ Procédure :

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

II.3.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

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

✓ Appareillage :

Les mesures UV-Vis ont été effectuées en utilisant un spectromètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et une cellule de quartz ayant une capacité volumétrique de 3 ml. L'acquisition de données a été accomplie 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 naringin par UV, on prépare une solution de méthanol à une concentration connue du naringin, puis on la place dans la cuve du spectrophotomètre. On sélectionne ensuite le domaine de balayage de la longueur d'onde (de 900 à 200 nm) et on mesure l'intensité de la lumière transmise par la solution.

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

II.4.1.1. Mode opératoire :

Cette étude a été menée en utilisant une méthode modifiée de Laraoui et al. (Laraoui et al. 2023). Pour ce faire, un volume total de 250 μ L de naringin (0.3 mg/mL à 10 mg/mL) a été placé dans un tube et 250 μ L de tampon de phosphate de sodium salin 0.02 M (pH = 6.4) 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 μ L 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 μ L de réactif dinitrosalicylique acide (DNS). Les tubes ont ensuite été incubés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes et refroidis à température ambiante. Le mélange réactionnel a été dilué avec 5 mL d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un contrôle a été préparé en utilisant la même procédure, mais en remplaçant le naringin 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).

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

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

La variation des valeurs d'absorbance en fonction de la concentration d'alpha-amylase ou de acarbose a été utilisée pour évaluer la constante de liaison intrinsèque en utilisant l'Equation 2 suivante (Khennoufa et al. 2021) :

$$\frac{A}{A_0 - A} = \frac{\epsilon G - H}{\epsilon G - \epsilon G - H} + \frac{\epsilon G - H}{\epsilon G - \epsilon G - H} \frac{1}{Kb[\alpha\text{-amylase}]} \quad (2)$$

Où $[alpha\text{-amylase}]$ est la concentration d'alpha-amylase, K_b est la constante de liaison, A_0 et A sont respectivement l'absorbance du naringin en l'absence et en présence d'alpha-amylase, ϵ_0 et ϵ sont leurs coefficients d'extinction respectifs.

II.4.2. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant :

II.4.2.1. Mode opératoire :

Ce test a été réalisé selon le protocole de **Bouhamdi et al. (2012)**. Ce test a été réalisé en préparant une solution mère de naringin en dissolvant 25 mg de naringin dans 35 ml d'acétonitrile répartis sur 18 tubes de concentrations différentes. D'autre part, une deuxième solution a été préparée en dissolvant 3 mg de DPPH dans 40 ml d'acétonitrile et ajout de cette solution. Pour la solution mère répartie sur les tubes, à des concentrations égales de 2 ml, puis incubation de ces tubes à l'obscurité pendant 30 minutes à une température de 37 °C. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde de 520 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. L' α -Tocophérol est utilisé comme standard antioxydant.

$$\text{Inhibition \%} = \left(\frac{\text{Abs (Control)} - \text{Abs (Naringin)}}{\text{Abs (Control)}} \right) \times 100 \quad (3)$$

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

II.5.1. 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.5.1.1. 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 15**.

Pour les structure bidimensionnelle (2D) de l'acarbose celle-ci est été extraite de la base de données DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) (**Wishart et al. 2018**) est présenté dans la **Figure 16**, et la structure tridimensionnelle de l'alpha-tocophérol (Numéro d'accès PubChem: 1742129) provienne du Bank du Médicament (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) est présenté dans la **Figure 17** (**Clissold SP et al., 1988**) .

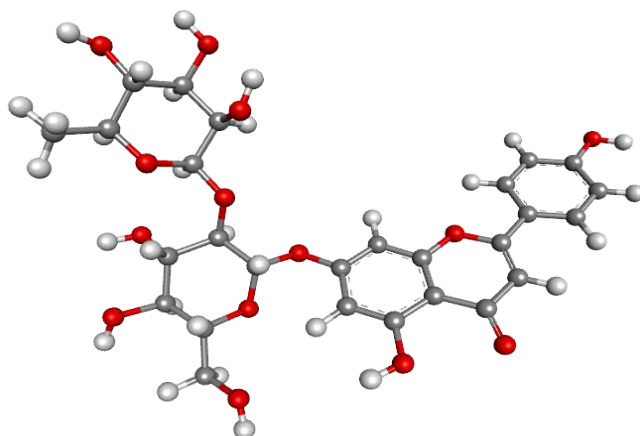
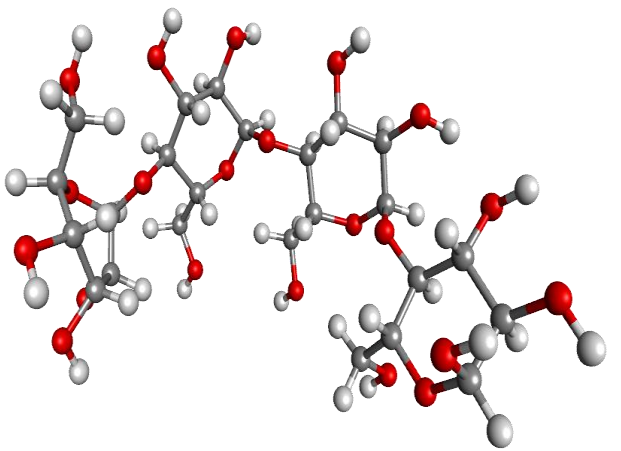
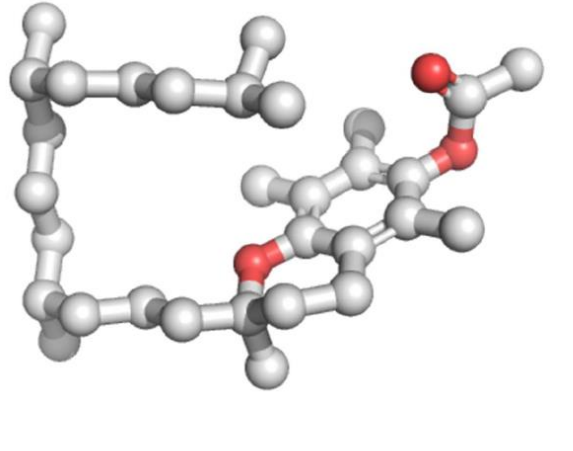


Figure 15 : Structure de naringin optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)

	
Figure 16 : Structure de Acarbose extraite de la base de données DrugBank	Figure 17 : Représentation PyMOL de l'alpha-Tocopherol PubChem CID: 1742129

II.5.1.2. Préparation des récepteurs :

Les structures 3D des récepteurs, y compris le récepteur de l'alpha-amylase pancréatique humaine (PDB ID : 4GQR) (Williams et al. 2012), enzyme raffinée (PDB ID : 1GRE) (Karplus et al 1994) . Les informations relatives aux récepteurs, y compris leurs noms et leurs PDB ID, ont été répertoriées dans le Tableau 03 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 03 : Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire.

	<i>Human Pancreatic alpha-amylase in complex with myricetin</i>	
	PDB ID	4GQR
	Résolution (Å)	1.20
	Mutation	No
	R-Value Free:	0.198
	R-Value Work:	0.180
	Chaînes	A
	<i>Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 angstroms resolution</i>	
	PDB ID	1GRE
	Résolution (Å)	2.00
	Mutation	No
	R-Value	0.155

	Chaînes	A
	Organisme	Homo sapiens

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 04**, 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 04 : Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible.

Récepteur	Centre de grille			Taille de grille (Å)		
	X	Y	Z			
α -amylase	10.800	16.530	39.740	70	70	70
Réductase	59.532	48	15	60	60	60

Chapitre 02 :

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 naringin, un composé présent dans la plante de citron limon. L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'activité biologique potentielle du naringin 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 naringin, ainsi que sur son activité anti-diabétique, anti-oxydant 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 naringin 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 naringin a été réalisée pour déterminer sa structure et sa pureté. Des analyses telles que la spectroscopie UV-Vis, la spectroscopie infrarouge (IR) 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 naringin présentait une tache unique (**Figure 18**) avec une R_f (rapport frontal, $R_f = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance totale parcourue par le solvant}$) de 0.7407 lorsqu'il était évalué à l'aide de solvant Hexane-méthanol (7:3). La tâche de naringin 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 naringin dans l'extrait de la plante de citron limon (**Giannuzzo et al. 2003**).



Figure 18: Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringin

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

Les résultats de la HPLC ont montré que le naringin présentait un temps de rétention de 34.128 ± 0.5 minutes (**Figure 19**) lorsqu'il était séparé en utilisant le gradient de solvant acétonitrile-méthanol. De plus, les résultats de la HPLC ont montré que le naringin présentait un pic unique avec une pureté de 60%. Cela indique que le naringin a été correctement séparé des autres composants dans l'extrait et que la méthode de purification était efficace (**Yusof, Ghazali, and King 1990**).

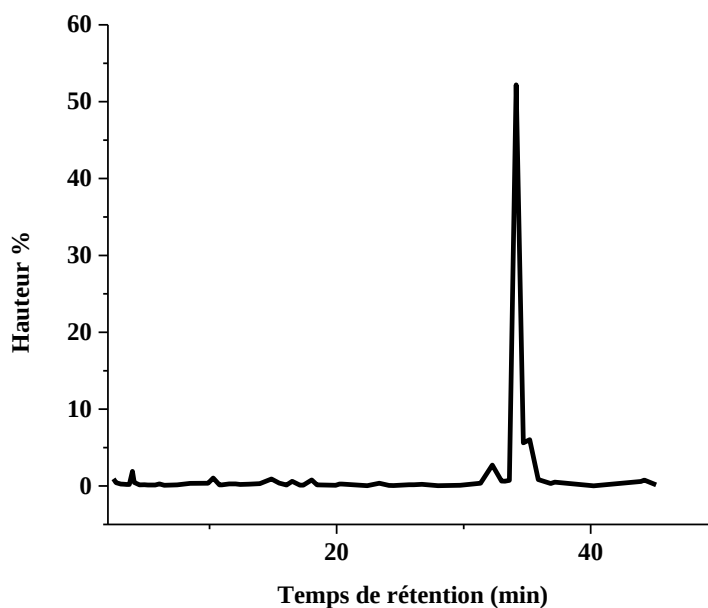


Figure 19 : Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringin

I.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

Le naringin extrait de **citrons** a été caractérisé par spectroscopie infrarouge (IR) pour confirmer la présence de groupes fonctionnels caractéristiques de la molécule. Le spectre IR du naringin a été comparé à un spectre IR de référence de naringin, obtenu depuis Alfa Aesar (**Figure 20**).

Le spectre IR du naringin 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 naringin. 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 naringin, 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.

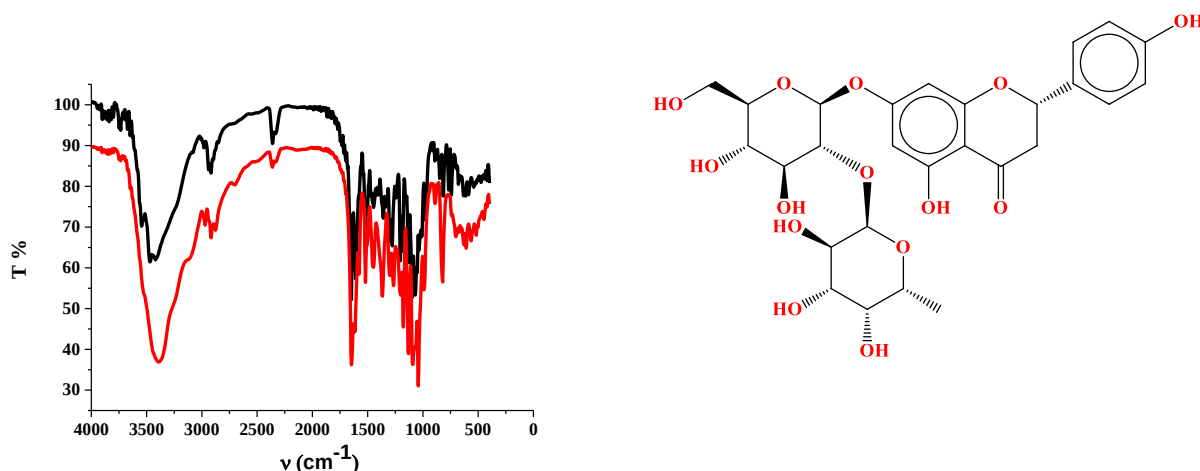


Figure 20 : Caractérisation du naringin extrait (Linge noire) et naringin référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)

En comparant le spectre IR du naringin extrait avec le spectre IR de naringin référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics de vibration similaires, confirmant la présence du naringin dans l'échantillon extrait de citron limon (**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 naringin extrait de citron limon. Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de 283 nm (**Figure 21**), correspondant au maximum d'absorption du naringin.

Le spectre d'absorption UV-visible du naringin 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 naringin, sont responsables de l'absorption dans cette région du spectre électromagnétique.

En comparant le spectre d'absorption UV-visible du naringin avec celui de la naringin de référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics d'absorption similaires, confirmant la présence du naringin dans l'échantillon extrait de citron limon (**Cordenonsi et al. 2017**).

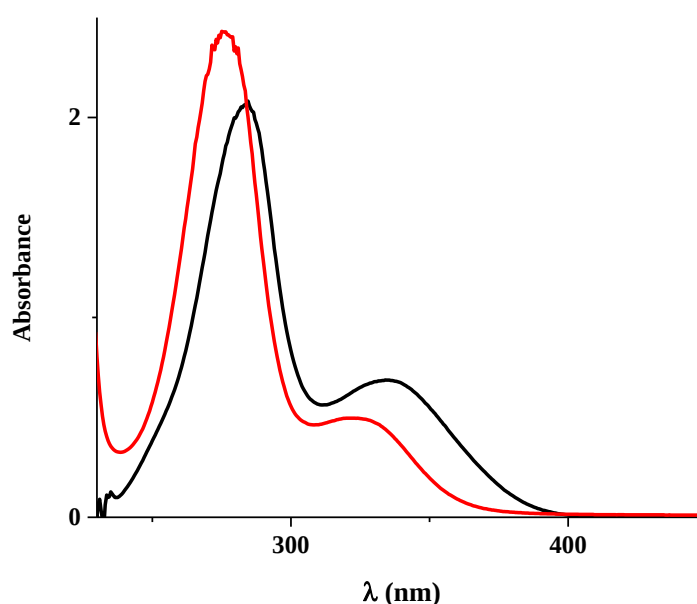


Figure 21 : Spectre UV du naringin extrait (Linge noire) et de naringin référence (Linge rouge)

I.2. Évaluation In Vitro des activités biologiques :

I.2.1. Évaluation de l'activité antidiabétique :

L'activité antidiabétique du naringin a été évaluée par la méthode spectrophotométrique d'interaction de l'alpha-amylase avec le naringin . 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 naringin . 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'α-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 05** suivant :

Tableau 05 : Valeurs des absorbances tirées à partir du test d'alpha-amylase:

Composes	Concentration mg/ml	Absorption
Naringin	0.00	0.058
	25	0.507
	6.25	0.319
	3.125	0.206
	1.5625	0.143
	3.81×10^{-4}	0.101
	1.91×10^{-4}	0.098
	9.54×10^{-5}	0.073
	4.77×10^{-5}	0.059
Acarbose	0.00	0.124
	4.04×10^{-1}	0.377
	2.02×10^{-1}	0.278
	1.01×10^{-1}	0.199
	5.05×10^{-2}	0.165
	2.53×10^{-2}	0.15
	1.26×10^{-2}	0.14
	6.32×10^{-3}	0.136
	3.16×10^{-3}	0.186
	1.58×10^{-3}	0.135
	7.90×10^{-4}	0.125

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

Le potentiel antidiabétique *in vitro* de naringin extraits de citron a été étudié en utilisant le modèle d'inhibition de l'α-amylase et les résultats sont présentés dans le **Tableau 06** . À partir des régressions exponentielles de la concentration de naringin et acarbose (mg/ml) par rapport à l'inhibition de l'α-amylase en pourcentage (**Figure 22**), tous les composés étudiés ont augmenté significativement l'inhibition de l'α-amylase (%) avec une augmentation correspondante de la concentration de ligand.

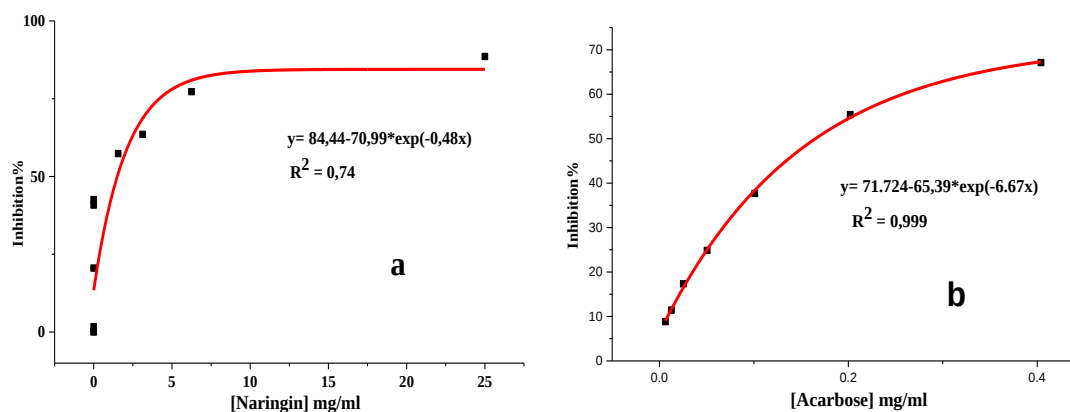


Figure 22 : Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de Naringin (a) et Acarbose (b)

Tableau 06 : Activité antidiabétique de naringin et acarbose par le test d'inhibition de l' α -amylase.

Composes	Concentration mg/ml	Inhibition %
Naringin	25	88.56
	6.25	81.818
	3.125	71.845
	1.563	59.44
	3.81×10^{-4}	42.574
	1.91×10^{-4}	40.816
	9.54×10^{-5}	20.548
	4.77×10^{-5}	1.695
	IC₅₀ = 1.503 mg/ml	
Acarbose	4.04×10^{-1}	67.11
	2.02×10^{-1}	55.396
	1.01×10^{-1}	37.688
	5.05×10^{-2}	24.848
	2.53×10^{-2}	17.33
	1.26×10^{-2}	11.429
	6.32×10^{-3}	8.824
	3.16×10^{-3}	33.33
	1.58×10^{-3}	8.148
	7.90×10^{-4}	0.8
	IC₅₀ = 0.1651 mg/ml	

La naringine montre une inhibition de l' α -amylase croissante avec l'augmentation de sa concentration. À une concentration de 1.503 mg/ml, l'inhibition est de 59.44%, et elle augmente progressivement pour atteindre 88.56 % à une concentration de 25 mg/ml. À des concentrations

plus faibles de naringine (inférieures à 25 mg/ml), l'inhibition diminue, avec 1.695 % d'inhibition à une concentration de 4.77×10^{-5} mg/ml. L'IC₅₀ de la naringine, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de l'alpha-amylase, est de 1.503 mg/ml.

En comparaison, l'acarbose, un médicament couramment utilisé comme inhibiteur de l'alpha-amylase dans le traitement du diabète, montre une inhibition plus forte de l'activité de l'alpha-amylase. Par exemple, à une concentration de 7.90×10^{-4} mg/ml, l'inhibition de l'acarbose est de 0.8 %, et elle augmente pour atteindre 67.11 % à une concentration de 4.04×10^{-1} mg/ml. L'IC₅₀ de l'acarbose est de 0.1651 mg/ml, ce qui est plus élevé que celui de la naringine (environ 0.11 fois).

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

I.2.2.1. 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 2 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 23**) 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".

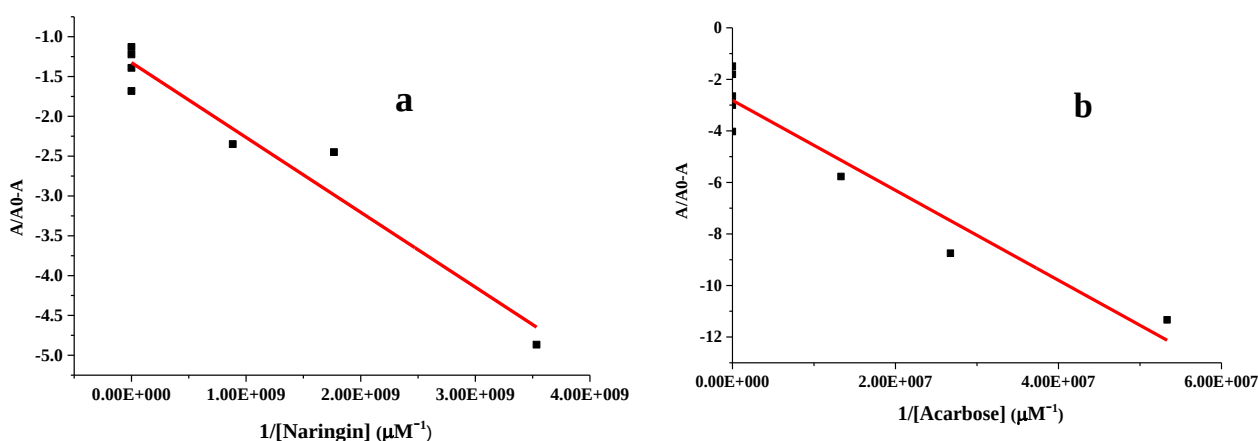


Figure 23 : Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringin]$ (a) et $1/[Acarbose]$ (b) utilisées pour calculer les constantes de liaison

1.2.2.2. Énergie libre de liaison :

La variation de l'énergie libre de liaison a été calculée en utilisant l'Équation 4 suivante (B. L. Wang et al. 2020):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

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 valeurs négatives de ΔG indiquent la spontanéité de l'interaction entre l' α -amylase et les composés étudiés, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands (Adisa, Choudhary, and Olorunsogo 2011). Les valeurs obtenues pour les constantes de liaison et leurs énergies libres de liaison correspondantes sont résumées dans le Tableau 07.

Tableau 07 : Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Acarbose avec l' α -amylase calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R^2	$K (\text{M}^{-1})$	$-\Delta G (\text{KJ.mol}^{-1})$
Naringin_ α -amylase	$y = -1.33 x - 0.94$	0.935	1.41×10^3	17.98
Acarbose_ α -amylase	$y = -2.82 x - 1.75$	0,907	1.61×10^3	18.31

Pour la naringin, le coefficient de détermination (R^2) associé à cette équation est de 0.935, 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 naringin et l' α -amylase, est de $1.41 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Une valeur plus élevée de K indique une liaison plus forte entre la naringin et l'enzyme (Hirose 2001). La variation d'énergie libre ($-\Delta G$), qui représente la spontanéité de la réaction d'adduction, est de 17.98 kJ/mol .

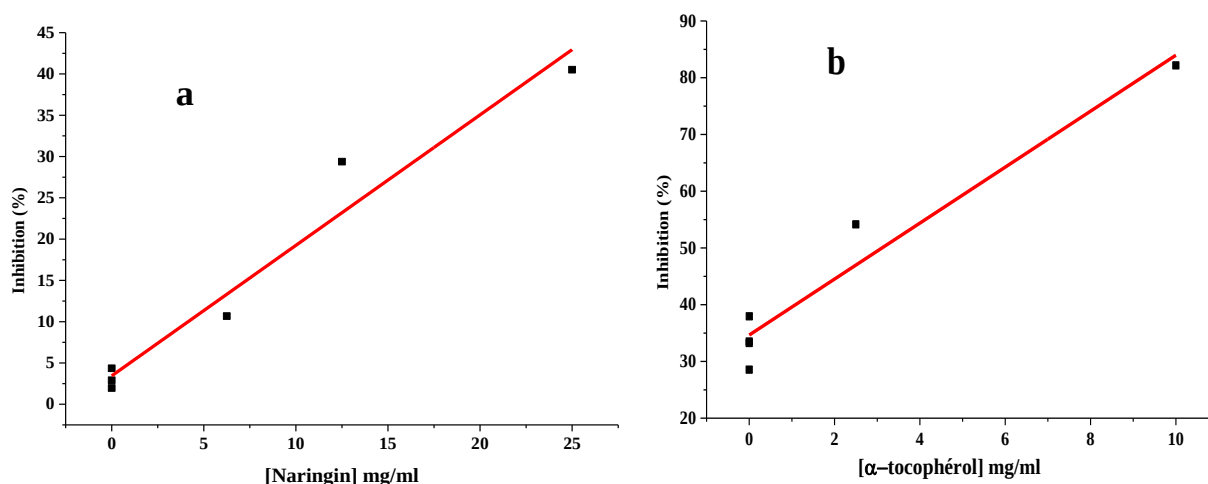
Pour l'acarbose, un coefficient de détermination (R^2) de 0.907. La constante de liaison (K) est de $1.61 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, ce qui indique une liaison plus forte entre l'acarbose et l' α -amylase par rapport à la naringin. La variation d'énergie libre standard ($-\Delta G$) est de 18.31 kJ/mol .

Ces données indiquent que l'acarbose forme des affinités légèrement plus fortes avec l' α -amylase qu'avec la naringin, comme indiqué par une valeur K plus élevée et un changement légèrement plus important de l'énergie libre standard ($-\Delta G$).

I.2.2.3. Évaluation de l'activité antioxydante :

Cette section décrit l'évaluation de l'activité antioxydant de la naringine en mesurant sa capacité à piéger les radicaux DPPH. Les valeurs IC₅₀ ont été calculées en traçant l'activité de piégeage des radicaux DPPH en fonction des différentes concentrations de naringine pour obtenir des courbes cinétiques. La capacité antioxydant de la naringine a été exprimée en tant que IC₅₀.

La **figure 24** montre la courbe d'étalonnage linéaire dans la plage de concentration étudiée (mg/mL) pour la naringin et l'alpha-tocophérol.



Les courbes de régression exponentielle de pourcentage d'inhibition en fonction de la :**24Figure** concentration de Naringin (a) et Alpha-tocophérol (b)

Tableau 08: Valeurs des Inhibition tirées à partir du test DPPH

[Naringin] (mg/ml)	Inhibition	[α-tocophérol](mg/ml)	Inhibition
25	40.52	10	82.17
12.5	29.39	2.5	54.16
6.25	10.67	1.22×10^{-3}	37.94
3.052×10^{-3}	4.35	1.525×10^{-4}	33.51
7.629×10^{-4}	2.90	7.63×10^{-5}	33.24
1.907×10^{-4}	1.97	1.91×10^{-5}	28.55

La naringin montre une inhibition du radicaux libres croissante avec l'augmentation de sa concentration. À une concentration de 6.25 mg/ml, l'inhibition est de 10.67 %, et elle augmente progressivement pour atteindre 40.52 % à une concentration de 25 mg/ml. À des concentrations plus faibles de naringin (inférieures à 25 mg/ml), l'inhibition diminue, avec 1.97 % d'inhibition à une concentration de 1.907×10^{-4} mg/ml en comparaison l'alpha-tocophérol, un médicament

couramment utilisé comme inhibiteur du radicaux libres dans le traitement du stress oxydant, montre une inhibition plus forte du radicaux libres . Par exemple, à une concentration de 1.91×10^{-5} mg/ml, l'inhibition de l'alpha-tocophérol est de 28.55 %, et elle augmente pour atteindre 82.17 % à une concentration de 10 mg/ml. Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

Dans cette section, les courbes d'étalonnage linéaires ont été construites pour déterminer la relation entre l'absorbance de DPPH (représentée par y) et les concentrations d'échantillons de naringine et alpha-tocophérol (représentées par x) dans la plage de concentration étudiée. Les équations obtenues ont été résumées dans le **Tableau 09**.

Tableau 09 : Valeurs IC₅₀ (mg/mL) obtenues en utilisant l'activité de piégeage des radicaux DPPH.

Adduits	Équations	R ²	IC ₅₀ (mg/ml)
Naringin	$y = 1,58 x + 3,44$	0,948	2.946×10^{-1}
Alpha-tocophérol	$y = 4.93 x + 34.65$	0,935	0.311×10^{-1}

Ces valeurs d'IC₅₀ indiquent la concentration (exprimée en mg/mL) nécessaire pour que la moitié des radicaux DPPH soient piégés par les composés testés. La naringine a une valeur d'IC₅₀ plus élevée de 2.946×10^{-1} mg/mL, ce qui signifie qu'elle est moins efficace pour piéger les radicaux DPPH par rapport à l'alpha-tocophérol qui a une valeur d'IC₅₀ de 0.311×10^{-1} mg/mL. Cela suggère que l'alpha-tocophérol a une activité antioxydant plus forte que la naringine.

Ces résultats suggèrent que la naringine présente une activité inhibitrice de DPPH, bien que moins puissante que celle de l'alpha-tocophérol . Cependant, il est important de noter que la naringine est un composé naturel présent dans certains aliments (Ghosal, Ghosh, and Das, 2018).

Il a été démontré que les molécules antioxydantes, telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Bougandoura & Bendimerad, 2012).

Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé du groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim et al., 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo et al., 2007), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituant sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxylés, glycosylés) et le

degré de polymérisation (Popovici et al., 2010). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo et al., 2010).

I.2.2.4. Etude spectroscopique de l'interaction avec DPPH

Le **tableau 10** présente l'indépendance de l'absorbance lors de l'ajout progressif de concentrations de naringine et alpha-tocophérol au DPPH. Le tableau montre clairement la diminution de l'absorbance suite à l'ajout des composés étudiés.

Tableau 10 : Valeurs des absorbances obtenues par test DPPH .

[Naringine] (mg/ml)	Absorbance	[α -tocophérol](mg/ml)	Absorbance
0.00	1.93	0.00	0.746
25	1.148	10	0.133
12.5	1.363	2.5	0.342
6.25	1.724	1.22×10^{-3}	0.463
3.052×10^{-3}	1.846	1.525×10^{-4}	0.496
7.629×10^{-4}	1.874	7.63×10^{-5}	0.498
1.907×10^{-4}	1.892	1.91×10^{-5}	0.533

I.2.2.5. Constantes de liaison :

La diminution graduelle des valeurs d'absorption de la solution de DPPH par l'augmentation des concentrations de naringin et d'alpha-tocophérol peut être exploitée pour calculer la constante de liaison en appliquant l'Équation 2 citée auparavant.

La constante K_b est obtenue à partir du rapport de l'interception et de la pente du graphique de $A_0/(A - A_0)$ en fonction de $1/[\text{composé}]$, **Figure 25**.

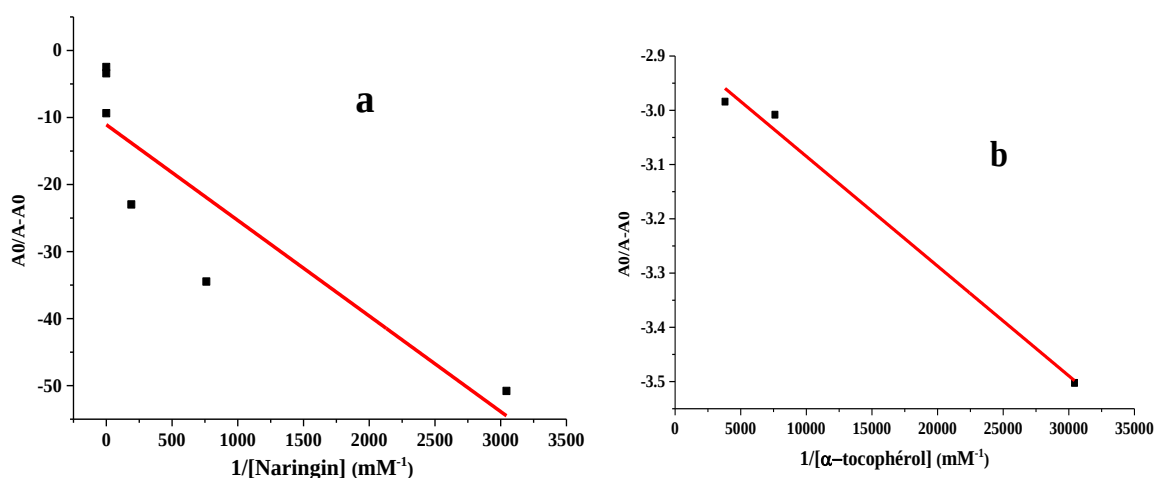


Figure 25 : Représente les graphes de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[\text{Composé}]$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des composés naringin (a) et alpha-tocophérol (b) avec DPPH.

I.2.2.3. Énergie libre de liaison :

La variation de l'énergie libre de liaison a été calculée en utilisant l'Équation 4 citée auparavant, Les valeurs sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringin et Alpha-tocophérol avec le DPPH calculées à partir des données UV-Vis à $T = 298\text{K}$.

Adduits	Équations	R^2	$K (\text{M}^{-1})$	$-\Delta G (\text{KJ.mol}^{-1})$
Naringin	$y = -0,015x - 11,081$	0,737	7.78×10^5	33.63
Alpha-tocophérol	$y = -2.022 \times 10^{-5} x - 2.88$	0,983	1.42×10^8	46.55

Les résultats obtenus montrent que la naringine et alpha-tocophérol a une forte affinité avec DPPH, avec des constantes de liaison élevées de $7.78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour la naringin et $1.42 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ pour l'alpha-tocophérol. Ces valeurs indiquent une forte interaction entre la naringine et l'alpha-tocophérol et la macromolécule biologique étudiée (**Khenoufa et al., 2021**). En outre, les valeurs de l'énergie libre de liaison (ΔG) sont également élevées, de $-33.63 \text{ KJ.mol}^{-1}$ pour la naringin et de $-46.55 \text{ KJ.mol}^{-1}$ pour l'alpha-tocophérol, ce qui suggère que la liaison entre la naringine et l'alpha-tocophérol et la macromolécule biologique est thermodynamiquement favorable (**Lanez, Bechki, and Lanez, 2019**).

L'étude de la variation d'absorbance en fonction de l'inverse de la concentration de naringin et alpha-Tocophérol donne des valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs pour les composés étudiés l'extrait ; en général, quand une molécule interagit avec DPPH et forme un complexe, les changements d'absorbance se produisent. Les valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs indiquent la spontanéité (la réversibilité) (**Hachem Randa, 2020**). de l'interaction de cette molécule avec naringin ou alpha-tocophérol par interaction physique.

Les valeurs négatives de ΔG indiquent la spontanéité de l'interaction entre DPPH et les composés étudiés, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands (**Adisa, Choudhary, and Olorunsogo, 2011**).

Pour le naringin, le coefficient de détermination (R^2) associé à cette équation est de 0,737, ce qui indique une bonne adéquation du modèle aux données expérimentales. La constante de liaison (K), qui est une mesure de la force de liaison entre la naringin et DPPH, est de $7.78 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Une valeur plus élevée de K indique une liaison plus forte entre la naringin et l'enzyme (**Hirose, 2001**).

La variation d'énergie libre ($-\Delta G$), qui représente la spontanéité de la réaction d'adduction, est de -33.63 kJ/mol.

Pour l'alpha-tocophérol, un coefficient de détermination (R^2) de 0.983. La constante de liaison (K) est de $1.42 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, ce qui indique une liaison moins forte entre l'alpha-tocophérol et le DPPH par rapport à la naringin. La variation d'énergie libre standard ($-\Delta G$) est de -46.55 kJ/mol. Ces données indiquent que l'alpha-tocophérol forme des affinités légèrement plus fortes avec DPPH qu'avec la naringin, comme indiqué par une valeur K plus élevée et un changement plus important de l'énergie libre standard ($-\Delta G$).

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

I.3.1. 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.3.1.1. Évaluation de l'activité antidiabétique :

Le naringin 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 12** montrent l'interaction des composés Naringin et Acarbose avec l' α -amylase pancréatique humaine par amarrage moléculaire. L'affinité de liaison de l' α -amylase de la naringin étaient plus faibles de celle de l'acarbose (naringin $\Delta G = -29,30 \text{ kJ/mol}$, (acarbose $\Delta G = -31,47 \text{ kJ/mol}$) (naringin $IC_{50} = 7.27 \times 10^{-3} \text{ mM}$, acarbose $IC_{50} = 5.31 \times 10^{-2} \text{ mM}$)

Tableau 12 : Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringin et acarbose avec l' α -amylase

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	$-\Delta G \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$	$IC_{50} \text{ (mM)}$
---------	-----------------	-------------	--------------	--	------------------------

Naringin_α-amylase	Interaction Hydrophobique	TRP 59	3.48	29.30	7.27×10^{-3}
		TYR 62	3.08		
		ASP 300	3.89		
	Liaison Hydrogène	TRP 59	3.72		
		GLN 63	2.51		
		ASP 197	4.09		
		GLU 233	2.85		
		HIS 299	2.79		
		ASP 300	4.10		
		HIS 305	2.64		
		ASP 356	4.01		
Acarbose_α-amylase	π-Empilements	TYR 62	4.53	31.47	5.31×10^{-2}
	Ponts de sel	HIS 305	3.13		
	Liaison Hydrogène	GLN 63	2.63		
		HIS 101	2.83		
		THR 163	3.38		
		ASP 197	2.96		
		GLU 233	3.61		

Pour Naringin , 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 -29.30 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 7.27×10^{-3} mM.

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 -31.47 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 5.31×10^{-2} mM.

Les résultats suggèrent que les composés Naringin et Acarbose ont une forte affinité de liaison à l'α-amylase pancréatique humaine (HPA). En outre, la Naringin a montré une moins grande activité inhibitrice que l'Acarbose avec une concentration inhibitrice efficace de 7.27×10^{-3} mM, contre 5.31×10^{-2} mM 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 12** révèlent que le naringin interagit avec un ensemble similaire de résidus d'acides aminés au site actif de la protéine. Le composé naringin, 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 naringin, peut être celui d'un mode d'inhibition compétitive (**Corsini, Maggi, and Catapano 1995**). Dans l'ensemble, l'analyse *in-silico* de l'interaction ligand-protéine des composés étudiées avec les résidus d'acides aminés présents dans le domaine du site actif de l' α -amylase donne du crédit à l'effet inhibiteur des composés rapportés dans cette étude. De plus, elle confirme également la possibilité de l'interaction de liaison entre l' α -amylase et le naringin, qui a été observée en utilisant des méthodes spectroscopiques.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec l' α -amylase sont présenté dans la **Figure 26 et 27** suivants :

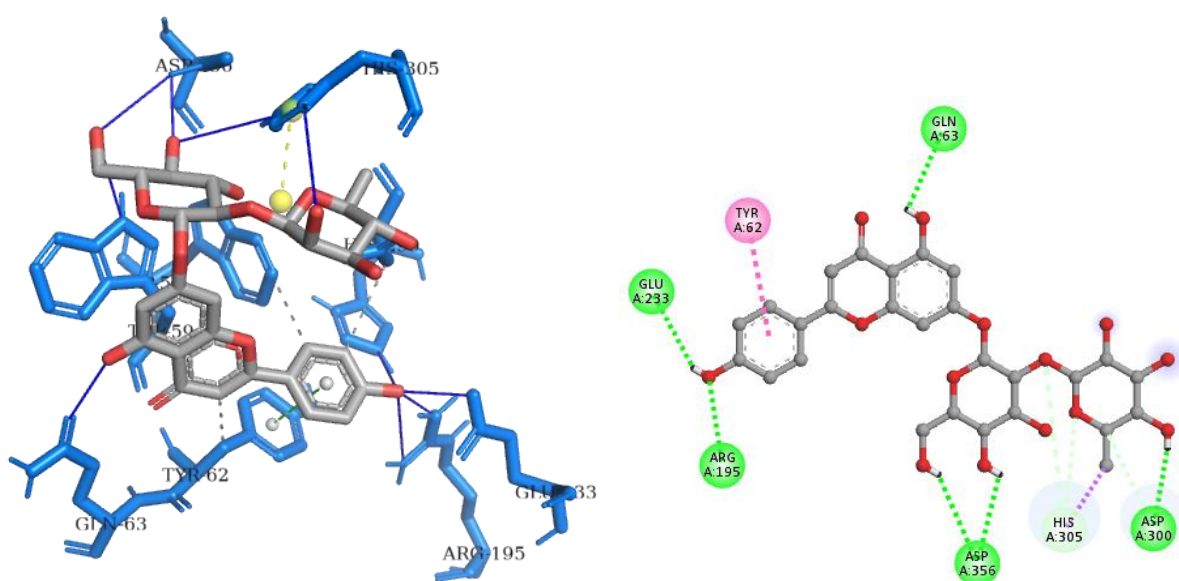


Figure 26 : Présentation 2D et 3D du ligand naringin avec l' α -amylase

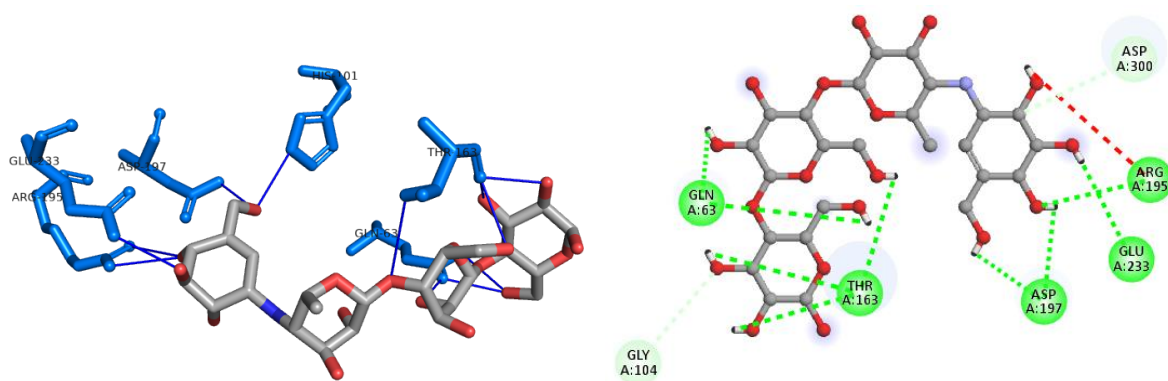


Figure 27 : Présentation 2D et 3D du ligand acarbose avec l' α -amylase

I.3.1.2. Évaluation de l'activité antioxydant :

Etude de liaison par affinité de la naringin et de l'alpha-tocophérol avec réductase a été réalisée dans le cadre de l'évaluation de leur activité antioxydante par amarrage moléculaire.

Les résultats ont montré que l'alpha-tocophérol avait une forte affinité de liaison avec la réductase, avec une énergie de liaison significative (-43.98 KJ/mol). De plus, le naringin a également montré une affinité de liaison élevée avec la réductase , avec une énergie de liaison de -33.52 KJ/mol.

Tableau 13 : Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringin et alpha-tocophérol avec la réductase .

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	$-\Delta G$ (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (mM)
Naringin_réductase	Interaction Hydrophobique	THR57	3.76	33.52	2.076×10^{-2}
	Liaison Hydrogène	GLY29	2.60		
		GLY31	2.92		
		GLY32	3.36		
		GLU50	2.71		
		SER51	2.92		
		HIS129	3.99		
		ALA155	2.42		
		ASP178	2.64		
		ASN294	3.91		
		LEU337	3.16		
Alpha-tocophérol réductase	Interaction Hydrophobique	THR57	3.55	43.98	1.31×10^{-3}
		THR156	3.28		
		ALA342	3.68		

	Liaison Hydrogène	SER51	2.85		
		HIS52	3.81		
		HIS129	3.07		

Pour Naringine, les résultats montrent des interactions hydrophobes avec THR57 avec de distance de liaison de 3.76 Å. De plus, des liaisons hydrogènes ont été observées avec GLY29, GLY31, GLY32, GLU50, SER51, HIS129, ALA155, ASP178, ASN294, LEU337, avec des distances de liaison allant de 2.42 Å à 3.99 Å.

Les résultats montrent également une énergie de liaison de -33.52 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 2.076×10^{-2} mM.

Pour Alpha-tocophérol, des liaisons hydrogènes ont été observées avec SER51, HIS52, HIS129, avec des distances de liaison de 2.85 Å, 3.81 Å, et 3.07 Å respectivement. De plus, des interactions hydrophobes avec THR57, THR156, ALA342 avec des distances de liaison de 3.55 Å, 3.28 Å, 3.68 Å respectivement. Les résultats montrent également une énergie de liaison de -43.98 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 1.31×10^{-3} mM.

Les résultats suggèrent que les composés Naringine et Alpha-tocopherol ont une forte affinité de liaison à réductase. En outre, l'alpha-tocopherol a montré une plus grande activité inhibitrice que la naringine, avec une concentration inhibitrice efficace de 1.31×10^{-3} mM, contre 2.076×10^{-2} mM pour naringine. L'IC50 est un indicateur important de l'activité inhibitrice d'un composé sur une cible biologique.

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 l'alpha-tocopherol et les acides aminés cibles. 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. En ce qui concerne les types d'acides aminés impliqués dans les interactions moléculaires entre la naringine et le réductase, il est intéressant de noter que la naringine se lie à des acides aminés chargés (GLU et HIS) 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 alpha-tocophérol et la cible réductase 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 ligandcible formés lors de l'amarrage moléculaire.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec la réductase sont présentées dans la **Figure 28** et **29** suivants :

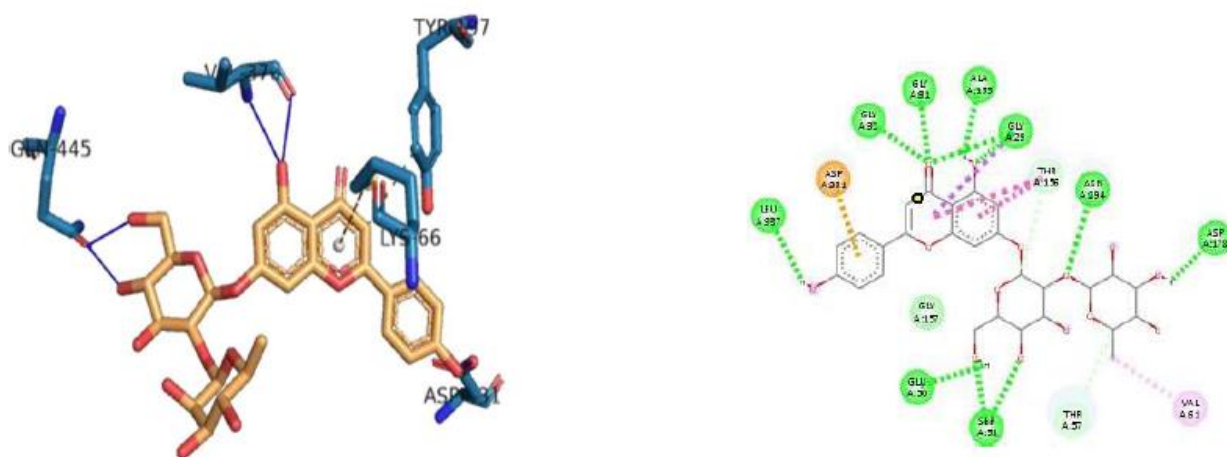


Figure 28 : Présentation 2D et 3D du ligand naringin avec la réductase

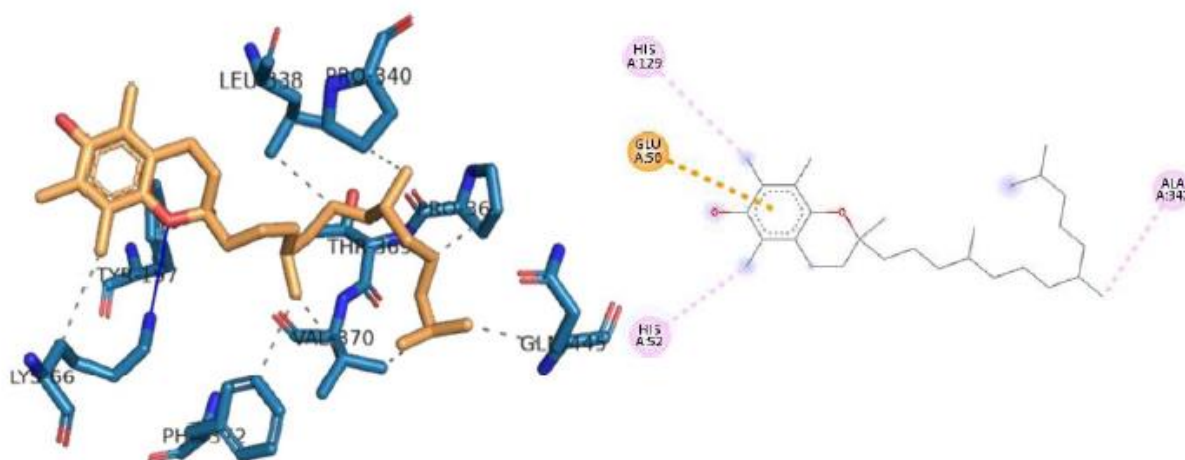


Figure 29 : Présentation 2D et 3D du ligand alpha-tocophérol avec la réductase

Le **Tableau 13** 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 14 : 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 (mM)	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (mM)	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Antidiabétique	α-Amylase	Naringin	1.503	1.41 × 10 ³	17.98	7.27 × 10 ⁻³	2.51 × 10 ³	29.30
		Acarbose	0.165	1.61 × 10 ³	18.31	5.31 × 10 ⁻²	1.42 × 10 ³	31.47
Antioxydante	réductase	Naringin	2.946 × 10 ⁻¹	7.78 × 10 ⁵	33.63	2.07 × 10 ⁻²	3.98 × 10 ⁵	33.52
		α - tocophérol	0.311 × 10 ⁻¹	1.42 × 10 ⁸	46.55	1.31 × 10 ⁻³	9.21 × 10 ⁸	43.98

La comparaison entre les résultats obtenus par les tests *in vitro* (UV-Vis) et *in-silico* (amarrage moléculaire) dans le **Tableau 14** 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 naringin, les résultats montrent que les valeurs d'IC₅₀ obtenues par les tests *in vitro* varient de 0.311 × 10⁻¹ mM à 1.503 mM, tandis que les valeurs d'IC₅₀ prédites par l'amarrage moléculaire *in-silico* varient de 1.31 × 10⁻³ mM à 5.31 × 10⁻² mM. 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 **(Tokath 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)**.

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 naringin possède plusieurs activités biologiques intéressantes, notamment anti-diabétique et antioxydante , ce qui en fait un composé potentiellement utile pour la médecine et la pharmacologie.

Les tests *in vitro* ont révélé que la naringin a une activité nti-diabétique importante en inhibant l'activité de l'amylase. Elle a également montré une activité antioxydante contre radicaux libres . Ces résultats suggèrent que la naringin a un potentiel thérapeutique important pour le traitement de diverses maladies.

Les tests *in-silico* par amarrage moléculaire ont confirmé les résultats des tests *in vitro* en montrant que la naringin se lie aux sites actifs de certaines enzymes impliquées dans le diabète et le stress oxydant.

Les prévisions de toxicité ont montré que la naringin 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 naringin 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 diabète et stress oxydant . Des études complémentaires pourraient être menées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activité biologique de la naringin , notamment l'effet sur d'autres enzymes impliquées dans ces maladies.

En outre, l'étude de la structure de naringin pourrait être approfondie pour améliorer sa bioactivité en concevant des analogues de naringin 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 naringin chez l'homme et pour établir une dose thérapeutique optimale.

Conclusion générale et perspective:

Enfin, puisque l'étude a également révélé que la naringin est capable d'être utilisée contre d'autres maladies comme le cancer, les infections, les bactéries... il serait très intéressant de la découvrir et de la développer.

Références

Références :

- 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.
- Alais , C ; Linden , G ; Miclo , L . (2008). Production and characterization of alpha amylase. *Biochimie alimentaire* .(6) :67-71
- Ali, Jogothe 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.
- Amiot, Marie Josèphe, et al. "Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles." *Apidologie* 20.2 (1989): 115-125 .
- 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. Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c Met. Thèse de doctorat. - Université Henri Poincaré – Nancy
- Auroma OI, Landes B, Ramful-Baboolall D. Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Prev Med.* 2012; 54: 12-16.
- AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility." *Journal of computational chemistry* 30(16): 2785–91.2009
- Banner , D.W , Bloomer , A, C, Petsko , G.A, Phillips ,D,C, Pogson , C,I, Wilson , I. A.....et Priddle , J.D. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution : using amino acid sequence data .*Nature* , 255(5510), 609-614
- Banner , D.W , Bloomer , A, C, Petsko , G.A, Phillips ,D,C, Pogson , C,I, Wilson , I. A.....et Priddle , J.D. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution : using amino acid sequence data .*Nature* , 255(5510), 609-614.
- Barret, Roland. 2018. Principes Fondamentaux de Chimie Thérapeutique: Médicaments, Propriétés Physico-Chimiques, Prodrogues, Pharmacophore. ISTE Group.
- Bayer Inc.(2014). Monographie de produit de GLUCOBAY
- Becke, A D. 1993. "Density-Functional Thermochemistry. III The Role of Exact Exchange *J Chem Phys* 98: 5648–5652".

Références:

- 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.
- Belhaddad, Oum-elkheir. *Phytochimie, fractionnement et activités antioxydante et antibactérienne des extraits de Urginea maritima et Urtica pilulifera*. Diss. 2018
- Ben Jamaa H, Ben Jemia A, Khelifi S, Ben Ahmed H, Ben Slama F , Benzarti A , Elati J , Aouidet A . (2017, 13 janvier). *Activité antioxydante et potentiel inhibiteur de alpha amylase de rosa canina*
- BENDJABEUR, Salah. *Etude phytochimique et activités biologique des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de teucrium polium subsp capitatum thymus algeriensis et ammoides verticillata*. Diss. 2019.
- Berry, D. R., Paterson, A.,. . (1990). *Enzymes in food industry. Enzyme chemistry impact and application*. (2): 306-351
- 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.
- Bonnefont -Rousselot D., Thérond P., Delattre J.2003.Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. *Biochimie pathologique*. Flammarion, Paris, 317.
- Boskey, Adele L, and Richard Mendelsohn. 2005. "Infrared Spectroscopic Characterization of Mineralized
- Boussoussa H. (2016). *Étude phytochimique et activités biochimiques des extraits phénoliques de l'espèce Rhanterium adpressum*, (Doctoral dissertation, L'École Normale Supérieure de Kouba-Alger ; 185
- Boutiti, A. 2010. *Étude phytochimique de l'espèce globulariaaalytum*. Grade de magister. Université Mentouri Constantine., p41.
- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). *Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé*. *Glycoscience& Nutrition*. 4 (6):7.(cited in Mohammedi Z, 2005(
- 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. *Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques*. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier. P90
- Burhan A, Nisa U , Gokhan C , Omer C , A shabil A , Osmanc G. (2003). *Enzymatic properties of novel thermostable , thermophilic , alkalineand chelator resistant amylase from an alkaliphic Bacillus sp . Isolate ANT-6 . Process Biochem .38 , p: 1397 -1403*.

Références:

- Cáceres, Elena L, Matthew Tudor, and Alan C Cheng. 2020. "Deep Learning Approaches in Predicting ADMET Properties." *Future Medicinal Chemistry* 12(22): 1995–99.
- calvet, Raoul. *Le sol: propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales. Vol. 2.* France Agricole Editions, 2003
- Castagna, Rossella et al. 2019. "Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of Ketoprofen Drug from Water." *ACS omega* 4(8): 13270–78.
- 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.
- Chebil, Latifa. *Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia: études cinétique, structurale et conformationnelle.* Diss. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'institut national polytechnique de Lorraine. INPL, Nancy, 2006 .
- 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.
- Chiba S . (1988). *Amyl glycosidase* . In . *Handbook of Amylases and related enzymes* (The Amylase Research Society of Japan ,éd).Pergamum Press , Oxford , U.K,pp104-1
- 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.
- Corsini, Alberto, Franco M Maggi, and Alberico L Catapano. 1995. "Pharmacology of Competitive Inhibitors of HMG-CoA Reductase." *Pharmacological research* 31(1): 9–27.
- 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.
- 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.
- Dauter, Z. Dauter, M. Brzozowski, .A.M. Christensen, .S. Borchert, T.V, Beier, .L Wilson Delluc G. Delluc B. & Roques M. 2003. - *La nutrition préhistorique.* In *Ellipses.* p. 223
- DE ES, I. T. E. N. F. R. "Antioxydants: ennemis des radicaux libres." (2021).
- Decesari, Stefano, Maria Cristina Facchini, Sandro Fuzzi, and Emilio Tagliavini. 2000. "Characterization of Water-soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosol: A New Approach." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105(D1): 1481–89.
- Delaney, John S. 2004. "ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure." *Journal of chemical information and computer sciences* 44(3): 1000–1005.
- DeLano, Warren L. 2002. "Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool." *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* 40(1): 82–92.

Références:

- 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.
- DOUFFI, Anissa, and Youssra AMROUNE. *Artemisia herba-alba et Juniperus communis: Phytochimie et Pharmacologie (Synthèse théorique)*. Diss. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA, 2021.
- DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018." *Nucleic acids research* 46(D1): D1074–82.
- 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 .
- EL Hadj, S. K. 2016. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Mémoire de master. Université de telemcen. P1
- Errajraji. A., Ouhdouch , F., El-Anssari, N. (2010). Usage des plantes médicinales dans le traitement diabète de type 2 au Maroc : Use of medicinale plants for type 2 diabetes traitement , in Morocco.Médecine des maladies Métaboliques , 4(3), 301-304.
- Frisch, M J et al. 1988. "Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004; C. Lee, W. Yang, RG Parr." *Phys. Rev. B* 37: 785.
- Fritah, Khadidja. *Traitement des déchets de l'industrie agro-alimentaire*. Diss. 2015
- Gaussian .Wallingford CT Gaussian. Wallingford, CT .2009
- 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.

Références:

- Gupta A, Gupta V-K , Modi D-R , Yadava L-p . (2008). Production and characterization of alpha amylase from *Aspergillus Niger* .*Biotechnologie* 7 (3) , pp.551 -556. Asian Network For Scientific Information .ISSN 1686-296X
- Gutyj, B et al. 2018. “Preclinical Searches of the Preparation Thireomagnile.” *Ukrainian Journal of Ecology* 8(1): 688–95..
- Hanane, Bouanane, and Benloucif Ahlam. 2016. “Approche Pour La Conception de Médicaments Assistée Par Ordinateur”.
- Hirose, Keiji. 2001. “A Practical Guide for the Determination of Binding Constants.” *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 39: 193–209.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299310000801>.
- Hubbard, Roderick E, and Muhammad Kamran Haider. 2010. “Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength.” eLS.
- Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agr Food Chem*. 2012; 60(4): 877-885.
- Interaction of N-Ferrocenylmethylnitroanilines with Bovine Serum Albumin.” *Journal of Molecular Structure* 1224: 129052.
- Jablonský, M, J Kočiš, 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..
- 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.
- jaubert, Jean-Noël. "Additifs aromatisants et additifs exhausteurs de goût." *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires* (4e ed.) (2009): 277.
- 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.
- Kandra, L., Guémant G., Zajacz, A., Batta, G., . (1997). . Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. (319): 1265 -
- 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 DJ , Fogarty W.M. (1997). Bi-phasic production of alpha amylase of *Bacillus flavothermus* in bath fermentation. *Biotechnology* .19(7) , p: 675-677.
- Kerwin, Sean M. 2010. “ChemBioOffice Ultra 2010 Suite”.

Références:

- Khacheba I., Djeridane A., and Yousfi M. . (2014). Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of α -Amylase Activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. p:12.
- Lacombe, J et al. 2011. “Intérêt Des Marqueurs Sanguins Dans La Prédiction de La Toxicité Radio-Induite.” *Cancer/Radiothérapie* 15(5): 390–93.
- LANEZ, Elhafnaoui. “Synthèse, Caractérisation et Étude in Vitro et in Silico de l’activité Biologique de Quelques Dérivés Ferrocénylméthyl-Bases Nucléiques”.
- 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.
- Lead-and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution.” *Drug discovery today: Technologies* 1(4): 337–41.2004
- Li S, Wang H, Guo L, Zhao H, Ho CT. Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. *J Funct Foods*. 2014; 6(1): 2-10.
- Li, Dong-Dong et al. 2020. “Molecular Dynamics Analysis of Binding Sites of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors.” *ACS omega* 5(26): 16307–14.
- Lipinski, Christopher A, 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 .
- 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.
- 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.
- Magali, M. (2010). "Les Caractères, Jean de La Bruyère (1688)-le portrait de Ménippe." Publications Pimido.
- 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.
- Maugendre, D., Yaouanq, J., Guilhem, I., Campion, L., Lorcy, Y., Leguerrier, A. M., & Allannic, H. (2007). Etiologie et physiopathologie des diabètes secondaires. *Encyclopédie Médico-chirurgicale. Endocrinologie-Nutrition*. Editions scientifiques et médicales, Elsevier Masson SAS, 10-366
- .
- Mesplede, J. Randon, J. 2004. 100 manipulations de chimie générale et analytique .Editions Bréal p249.

Références:

- 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.
- Mihoune, Youssra. Biosynthèse des nanoparticules à base d'extrait de plante et la caractérisation des leurs activités biologiques. Diss. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA, 2021.
- 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.
- Morris, Garrett M, Ruth Huey, and Arthur J Olson. 2008. "Using Autodock for Ligand-receptor Docking." *Current protocols in bioinformatics* 24(1): 8–14.
- Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and the prevention of artherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Disord: Drug Targets*. 2012; 12(2): 84-91..
- 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.
- 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. Diplôme de Doctorat, Université Mentouri, Constantine, p 19
- Ononamadu, Chimaobi, and Aminu Ibrahim. 2021. "Molecular Docking and Prediction of ADME/Drug-Likeness Properties of Potentially Active Antidiabetic Compounds Isolated from Aqueous-Methanol Extracts of *Gymnema Sylvestre* and *Combretum Micranthum*." *BioTechnologia* 102(1): 85–99.
- Pandey, Rajan Kumar et al. 2017. "Exploring Dual Inhibitory Role of Febrifugine Analogues against Plasmodium Utilizing Structure-Based Virtual Screening and Molecular Dynamic Simulation." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35(4): 791–804.
- Park, Kwan-Hwa et al. 2000. "Structure, Specificity and Function of Cyclomaltodextrinase, a Multispecific Enzyme of the α -Amylase Family." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478(2): 165–85.
- Perrin, Charles L, and Jennifer B Nielson. 1997. "'Strong' Hydrogen Bonds in Chemistry and Biology." *Annual review of physical chemistry* 48(1): 511–44.

Références:

- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasany L. 2015. Free radicals: properties, sources, Targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30 (1):11 -26
- Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules.” *Scientific reports* 7(1): 1–13.
- Picchi A. 2006. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ . Res*, 99: 69-77 p
- Pinzi, Luca, and Giulio Rastelli. 2019. “Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery.” *International journal of molecular sciences* 20(18): 4331 .
- Pirosa, E. A., Grósz, A., Kis, J. T., Schandl, L., & Kautzky, L. (2019). A Study Assessing an Injection Port of Administration of Insulin. *Endocrinol Diabetes Res* 5: 1. of, 4, 3-5.
- Pliska, Vladimir et al. 1996. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. VCH Weinheim.
- Pomerleau, Sonia. *Fruits citrins, flavonoïdes et profil lipidique*. National Library of Canada= Bibliothèque nationale du Canada, Ottawa, 2004.
- 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.
- Rhabasa-Lhoret R., Chiasson J.L. (2004). (Eds.), *International Textbook of Diabetes Mellitus*, vol. 1, third ed. John Wiley & Sons Ltd., UK. 2004; pp 901–914.
- 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.
- Rose, Peter W et al. 2016. “The RCSB Protein Data Bank: Integrative View of Protein, Gene and 3D Structural Information.” *Nucleic acids research*: gkw1000.
- Saha, S k, Haque E, Islam D, Matiar Rahman, Islam R, Parvin A, Rahman S., 2012.
- 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.
- Savjani, Ketan T, Anuradha K Gajjar, and Jignasa K Savjani. 2012. “Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques.” *International Scholarly Research Notices* 2012.

Références:

- Schomburg, D and Salzmann, M. 1991. Enzyme Hand book 4. Nouadri, T. 2011. L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Diplôme de Doctorat, Université Mentouri, Constantine, p 19.
- Schomburg, D and Salzmann, M. 1991. Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. P : 1-12.
- 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.
- Sigtryggsdóttir, 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.
- Slama-Chaudhry, A., Mavromati, M., & Golay, A. (2013). Diabete type II. Hopitaux Universitaires de Geneve (HUG), Geneve.adical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 545-553
- Spangenberg, Bernd, Colin F Poole, and Christel Weins. 2011. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. Springer Science & Business Media.
- 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.
- SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate.2017
- Systèmes, Dassault. 2016. "Biovia, Discovery Studio Modeling Environment." Dassault Systèmes Biovia: San Diego, CA, USA.
- Taileb, Nadia. Recherche de métabolites secondaires à intérêt biologique dans les jus commerciaux à base naturelle. Diss. 2009.

Références:

- Tang, Chuan-He, and Lan Shen. 2013. "Role of Conformational Flexibility in the Emulsifying Properties of Bovine Serum Albumin." *Journal of agricultural and food chemistry* 61(12): 3097–3110.
- Terstappen, Georg C, and Angelo Reggiani. 2001. "In Silico Research in Drug Discovery." *Trends in pharmacological sciences* 22(1): 23–26.
- 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.
- 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.
- Tricoli, J.V., Shows, T.B. (1984). Regional assignme
- 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.
- Van Der Spoel, David et al. 2005. "GROMACS: Fast, Flexible, and Free." *Journal of computational chemistry* 26(16): 1701–18.
- 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.
- 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.

Références:

- Whintcomb D.C, Lowe M.E. (2007). "Human pancreatic digestive enzymes " .Digestive Diseases and Sciences , 52 , p.1-17
- Wild, Frank. 2003. Characterization of Organic Compounds. CUP Archive.
- Williams, Leslie K, Chunmin Li, Stephen G Withers, and Gary D Brayer. 2012. "Order and Disorder: Differential Structural Impacts of Myricetin and Ethyl Caffate on Human Amylase, an Antidiabetic Target." *Journal of medicinal chemistry* 55(22): 10177–86.
- Windsor, Matthew A et al. 2013. "Exploring the Molecular Determinants of Substrate-Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Lumiracoxib." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23(21): 5860–64.
- Wishart, David S. 2013. "Characterization of Biopharmaceuticals by NMR Spectroscopy." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 48: 96–111.
- Yang, Zi-Yi et al. 2021. "Benchmarking the Mechanisms of Frequent Hitters: Limitation of PAINS Alerts." *Drug Discovery Today* 26(6): 1353–58.
- Yilmaz , Y. (2002). Antioxidant activities of grape skin and grape seed polyphenolics and potential use of antioxidants in food as a functional food ingredient Ph. D. dissertation. Athens , Georgia
- Yuan, Gaofeng et al. 2006. "Natural Products and Anti-Inflammatory Activity." *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 15(2).
- Yusof, Salmah, Hasanah Mohd Ghazali, and Gan Swee King. 1990. "Naringin Content in Local Citrus Fruits." *Food Chemistry* 37(2): 113–21 .
- Zerriouh, M. (2008). Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique de la globularine, un iridoïde isolé des feuilles de *Globularia alypum* L. chez le rat Wistar (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen ; 138(
- Zhang, X., Caner, S., Kwan, E., Li, C., Brayer, G.D., Withers, S.G.(2016) .Starch binding sites on the Human pancreatic alpha amylase D300N variant complexed with an octaose substrate.DOI: 10.2210/pdb5TD4/pdb
- Žuvela, Petar et al. 2019. "Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography." *Chemical reviews* 119(6): 3674–3729.

Références:
