

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 حمه لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lackdar –El OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté de 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

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Etude *In-Silico* et *In-Vitro* de l'activité antioxydant
de La plante de Mandarine**

Présenté Par :

M^{elle}. Belila Ouarda et M^{elle}. Abdessettar Ikhlas

Devant le jury composé de :

Présidente : Mr. Kiram Abderrazak M.A.A, Université d'El Oued

Examinatrice : Mr. Medjour Abdellhak M.A.A, Université d'El Oued

Promoteur : Mr. Lanez Elhafnaoui M.C.B, Université d'El Oued

Année Universitaire : 2022/2023

REMERCIEMENTS

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant de nous ». Avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Tout d'abord, nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promoteur Monsieur **Lanez Elhafnaoui** Maître de conférences à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, qui nous ont fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Nous remercions aussi monsieur **Lanez Touhami** le directeur de laboratoire de valorisation et technologie des ressources saharienne pour nous avoir accueilli et nous a fournis les produits nécessaires dans son laboratoire pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes du laboratoire VTRS et surtout à **M. Tliba Ali**.

Nous ne saurions omettre d'adresser nos remerciements et nos reconnaissances à tous les enseignants de l'Université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, pour le soutien et la formation qu'ils nous ont prodigué tout au long de notre études, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profond respect et grande considération.

Enfin, nous remercions nos proches et amis (es). Merci à nos parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de nous avoir soutenu et supporté tout au long de notre formation.



Dédicace

🌸 *Nous dédions ce modeste travail qui été fait avec
amour :*

*A notre très chères pères qui nous a toujours soutenu, et
qu'étaient toujours présents pour nous*

*A les plus chères au monde, nos mères qu'étaient
toujours nous encouragé durant notre études*

A nos sœurs

A nos frères

A toutes nos familles

A toutes nos amies

A toute personne qui nous connaissent

WARDA & IKHLAS

Résumé :

Les mandarines, tout comme d'autres fruits et légumes, revêtent une importance capitale en tant que source de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et l'acide ascorbique. Ces composés exercent des effets bénéfiques sur la santé humaine, du fait de leurs nombreuses activités biologiques telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne, qui protègent et inhibent les effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain. Ainsi, notre travail vise à étudier *in vitro* et *in silico* l'activité antioxydante de la naringine extraite de la croûte de mandarine, tout en déterminant la structure ainsi que les propriétés physiques et chimiques de ce composé.

L'extraction de la naringine a permis d'obtenir un rendement d'environ 3,5 %. L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) a révélé une seule tache (spot) avec des valeurs de R_f et une coloration orange-brun caractéristiques, ce qui confirme la présence et la pureté de la naringine dans l'extrait de la plante de mandarine. Le spectre d'absorption UV-visible de la naringine a montré un pic extrême à 283 nm, qui est caractéristique de la présence de groupes phénoliques dans la molécule de naringine.

L'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant, réalisée à l'aide de la méthode du DPPH, a révélé que l'extrait de naringine possède un pouvoir antioxydant relativement modéré par rapport à celui de l'alpha-tocophérol. Cette évaluation a également permis de déterminer les paramètres tels que l'IC₅₀ et ΔG . La valeur de l'IC₅₀ de la naringine a révélé une activité inhibitrice très importante, en comparaison avec l'alpha-tocophérol.

Par ailleurs, les résultats obtenus par l'amarrage moléculaire confirment les résultats *in vitro*, ils présentent des valeurs négatives de ΔG , traduisant ainsi une bonne affinité des ligands avec la cible biologique. La formation de liaisons hydrogène entre la naringine et l'enzyme confirme l'efficacité antioxydante de cet extrait, ce qui permet de le considérer comme un potentiel médicament antioxydant pour l'avenir.

Mots-clés : mandarine, naringine, activité antioxydante, chromatographie sur couche mince, alpha-tocophérol, DPPH, amarrage moléculaire.

Abstract:

Mandarins, like other fruits and vegetables, are critically important as a source of bioactive compounds such as phenolic compounds, flavonoids and ascorbic acid. These compounds have beneficial effects on human health because of their many biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activity, which protect and inhibit the harmful effects of free radicals on the human body. Thus, our work aims to study *in vitro* and *in silico* the antioxiding activity of the naringin extracted from the mandarin peel, while determining the structure as well as the physical and chemical properties of this compound.

The naringin extraction yielded approximately 3.5%. Thin-layer chromatography (TLC) analysis revealed a single spot with characteristic orange-brown R_f values. This confirms the presence and purity of naringin in the extract of the mandarin plant. The UV-visible absorption spectrum of the naringin showed an extreme peak at 283 nm, which is characteristic of the presence of phenolic groups in the naringin molecule.

The *in vitro* evaluation of antioxidant potency, carried out using the DPPH method, revealed that naringin extract has a relatively moderate antioxidant potency compared to alpha-tocopherol. This assessment also identified parameters such as IC₅₀ and ΔG . The IC₅₀ value of the naringin showed very high inhibitory activity compared to alpha-tocopherol.

In addition, the results obtained by molecular docking confirm the *in vitro* results, they have negative ΔG values, reflecting a good affinity of the ligands with the biological target. The formation of hydrogen bonds between naringin and the enzyme confirms the antioxidant efficacy of this extract, which allows it to be considered as an antioxidant drug potential for the future.

Key words: mandarin, naringin, antioxidant activity, thin-layer chromatography, alpha-tocopherol, DPPH, molecular docking.

الملخص

الماندرين، مثل الفواكه والخضروات الأخرى، مهمة للغاية كمصدر للمركبات النشطة بيولوجيًا مثل المركبات الفينولية والفلافونويد وحمض الأسكوربيك. هذه المركبات لها آثار مفيدة على صحة الإنسان بسبب أنشطتها البيولوجية العديدة مثل مضادات الأكسدة والنشاط المضاد للالتهابات والبكتيريا، والتي تحمي وتمنع الآثار الضارة للجذور الحرة على جسم الإنسان. وبالتالي، يهدف عملنا إلى دراسة نشاط مضادات الأكسدة في المختبر والسيليكو للنانجين المستخرج من قشرة الماندرين، مع تحديد البنية وكذلك الخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذا المركب.

أنتج استخراج النانجين ما يقرب من 3.5%. كشف تحليل الكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة (TLC) عن بقعة واحدة ذات قيم R_f برتقالية وبنية مميزة. وهذا يؤكد وجود ونقاء النانجين في مستخلص نبات الماندرين. أظهر طيف الامتصاص المرئي للأشعة فوق البنفسجية للنانجين ذروة قصوى عند 283 نانومتر، وهي سمة من سمات وجود المجموعات الفينولية في جزيء النانجين.

كشف التقييم المختبري لفاعلية مضادات الأكسدة، الذي تم إجراؤه باستخدام طريقة DPPH، أن مستخلص النانجين له فاعلية معتدلة نسبيًا مضادة للأكسدة مقارنة بألفا توكوفيرول. وحدد هذا التقييم أيضًا مقاييس مثل IC_{50} و ΔG . أظهرت قيمة IC_{50} للنانجين نشاطًا مثبطًا عاليًا جدًا مقارنة بألفا توكوفيرول.

بالإضافة إلى ذلك، تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق الالتحام بالمحاكاة الجزيئية النتائج في المختبر، لديها قيم سالبة ل ΔG ، وبالتالي يعكس التقارب الجيد للروابط مع الهدف البيولوجي. يؤكد تكوين روابط الهيدروجين بين النانجين والإنزيم فعالية مضادات الأكسدة لهذا المستخلص، مما يسمح باعتباره دواءً مضادًا للأكسدة في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: الماندرين، النانجين، النشاط المضاد للأكسدة، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، ألفا توكوفيرول، DPPH، الالتحام، بالمحاكاة الجزيئية.

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure de la 2-phényl-1,4-benzopyrone	07
Figure 2	Biosynthèse des flavonoïdes	09
Figure 3	Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde	11
Figure 4	Coupe transversale schématique d'une orange (a) et détails (b)	13
Figure 5	Structure moléculaire de la naringine	16
Figure 6	Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR	20
Figure 7	Structure de l'acide ascorbique	23
Figure 8	Composants naturels de la vitamine E	24
Figure 9	Structures chimiques des principaux caroténoïdes présents dans le plasma humain.	25
Figure 10	Protocole de CCM	28
Figure 11	Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC	29
Figure 12	Les étapes de docking moléculaire	32
Figure 13	la mandarine.	37
Figure 14	Les croûtes de mandarine après le séchage.	37
Figure 15	Poudre de croûtes sec.	38
Figure 16	Montage d'évaporation à pression réduite.	38
Figure 17	Montage de chauffage.	38
Figure 18	Montage de cristallisation.	39
Figure 19	Forme libre et réduite du DPPH•	43
Figure 20	Structure de naringine optimisée avec B3LYP/6-311++G(d,p)	45
Figure 21	Représentation PyMOL de l'alpha-Tocopherol PubChem CID: 1742129	46
Figure 22	Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine	49
Figure 23	Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine	50
Figure 24	Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine de référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)	51

Figure 25	Spectre UV du naringine extrait (Linge noire) et de naringine référence (Linge rouge)	52
Figure 26	Droites de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour Naringine (a) et Alpha-tocophérol (b).	52
Figure 27	représente les graphes de $A_0/(A-A_0)$ en fonction de $1/[Composé]$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des composés naringine (a) et alpha-tocophérol (b) avec DPPH.	55
Figure 28	Poses d'amarrage de naringine et alpha-tocophérol avec glutathion réductase (PDB ID : 1GRE) illustrant l'interaction de tous les ligands.	58
Figure 29	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec 1GRE.	60
Figure 30	Présentation 2D et 3D du ligand alpha-tocoferol avec 1GRE.	61

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	principales classes des flavonoïdes	08
Tableau 2	La composition chimique de la mandarine	14
Tableau 3	Espèces réactives de l'oxygène	20
Tableau 4	Structure tridimensionnelle de glutathionne réductase (PDB ID : 1GRE).	46
Tableau 5	Les paramètres de docking sélectionnés pour le récepteur cible.	47
Tableau 6	Valeurs IC50 (mg/mL) obtenues en utilisant l'activité de piégeage des radicaux DPPH.	53
Tableau 7	Valeurs des absorbances obtenues par test DPPH	54
Tableau 8	Les valeurs de la constante de liaison et de l'énergie libre de liaison pour naringine et alpha-tocophérol avec le DPPH à partir des données UV à T = 298K	56
Tableau 9	L'énergie libre de liaison ΔG et IC50 de Naringin et Alpha- Tocophérol obtenu par amarrage moléculaire.	58
Tableau 10	Les distances des liens formés entre 1GRE et Naringin et Alpha-Tocophérol.	59
Tableau 11	Comparaison des paramètres de liaison et d'IC50 pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire.	61

Liste des abréviations

Å : Ångström

CCM : chromatographie sur couche mince

C° : Degrés Celsius C

DPPH: Diphényl picryl hydrazyl

GSH : Glutathion réduite

GST : glutathion-transférase

H₂O : eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : La chromatographie liquide haute performance

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

IR : Spectroscopie Infrarouge

K : constant de liaison

KJ : Kilojoule

M : molaire

mg : milligramme

R (%) : Rendement en %

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

UV : Ultraviolet

µl : microliter

ΔG : Energie libre de liaison

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	

Chapitre I : Généralité sur les agrumes

I .1. Les plantes médicinales.....	5
I .1.1. Définition	5
I .1.2. L'utilisation.....	5
I .1.3. La phytochimie.....	5
I .2. Les métabolites secondaires	6
I .2.1. Définition	6
I .2.1. Classification des métabolites secondaires	6
I .2.3. Les polyphénols.....	6
I .2.3.1. Les flavonoïdes	7
I .3. Généralités sur les agrumes	10
I .3.1. Situation économique des agrumes	10
I .3.2. Systématique des agrumes	11
I .4. Oranges	12
I .4.1. Définition de l'orange.....	12
I .4.2. Cycle de vie des oranges.....	12
I .4.3. Structure d'orange	12
I .4.4. Les mandarines (<i>Citrus Reticulata</i> Blanco)	13
I .4.5. La valeur nutritionnelle de l'orange.....	15
I .5. La naringine	16

Chapitre II : Le stress oxydatif et les antioxydantes

II.1. Généralités	19
II.1.1. Le stress oxydatif	19
II.1.2. Les radicaux libres	19
II.1.3. Production des radicaux libres	19
II.1.4. Les espèces réactives oxygénées.....	19
II.1.5. Les conséquences du stress oxydatif.....	20
II.1.6. Les antioxydants	21

Chapitre III : Contextes théoriques des techniques expérimentales utilisées

III.1. Technique chromatographique.....	27
III.1.1. Chromatographie sur couche mince.....	27
III.1.2. La chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	28
III.2. Technique spectroscopique.....	30
III.2.1. Spectroscopie d'absorption dans le domaine UV-Visible	30
III.2.2. Spectroscopie Infrarouge (IR)	30
III.3. L'amarrage moléculaire	31
III.3.1. Principe	31
III.3.2. Les étapes de docking	31
III.3.3. Les différents types d'amarrage moléculaire	32

PARTIE II : EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et Méthodes

I.1. Matériels.....	36
I.1.1. Matériel végétal.....	36
I.1.2. Réactifs utilisés	36
I.1.3. Matériels de laboratoire	36
I.1.4. Produits chimiques :	36
I.2. Méthodes	36
I.2.1. Extraction de Naringine	36

I.2.2. Rendement d'extraction.....	39
I.2.3. Caractérisation du Naringine	40
I.2.3.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M):.....	40
I.2.3.2. Caractérisation par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC): ...	41
I.2.3.4. Caractérisation par Infrarouge (IR).....	42
I.2.3.5. Caractérisation par spectroscopie UV-visible	42
I.2.4. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité biologique.....	43
I.2.4.1. Évaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre (DPPH))	43
I.2.4.2. Méthodes d'évaluation in silico de l'activité biologique	44
I.2.4.2.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	44

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Caractérisation.....	49
II.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M.).....	49
II.1.2. Caractérisation par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	49
II.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR).....	50
II.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-visible	51
II.2. Évaluation In Vitro de l'activité antioxydant :	52
II.2.1. Etude spectroscopique de l'interaction avec DPPH.....	54
II.2.1. Constantes de liaison.....	54
II.2.2. Énergie libre de liaison.....	55
II.3. Évaluation in silico de l'activité biologique.....	57
II.3.1. Évaluation de l'activité antioxydant.....	57
II.3.1.1. Simulations d'amarrage.....	57
Discussion générale.....	62
Conclusion générale et perspective	65
Références.....	67

Introduction



Introduction

Aujourd'hui, il y a un grand nombre de plantes médicinales qui possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie, et l'agriculture. Les plantes ont constitué donc la source majeure des médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires (**HAM-DAOUI, N. HEDOUD, H. 2019**).

L'arboriculture fruitière fait partie intégrante de la vie économique et sociale des pays à travers le monde entier. Les agrumes, encore appelés Hespérides dans la mythologie grecque, se distinguent par leur grande diversité de leurs familles et de leurs ordres. L'agrumiculture des pays du bassin Méditerranéen est diversifiée, tant au niveau des espèces cultivées (oranges, mandarines, clémentines, pomelos, citrons, limes, pamplemousses, pour ne citer que les plus courants) reflète d'une certaine manière la richesse et la variabilité de ces arbres, du fait de l'extension de cette culture (**Abouo, Sadat, Akmel, Assidjo, & Amani, 2016**).

Parmi toutes les espèces d'agrumes, la mandarine « *Citrus reticulata* blanco » est très populaire (**Mukhar et al., 2005; Li et al., 2006**). Les différentes variétés de *Citrus reticulata* blanco ont été largement utilisées comme médicament par les chinois pendant une longue période en raison de leur activité pharmacologique (**Yu et al., 2009**). Des études récentes ont montré que les écorces de *Citrus reticulata* blanco sont une source de composés biologiquement actifs. Elles sont riches en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles (**Huang Y, 2010; Moulehi et al., 2012**).

Les fruits *Citrus reticulata* sont riches en flavonoïdes notamment la naringine (**Sun et al., 2010**) est un métabolite secondaire végétal bien étudié. C'était trouvé pour la première fois par De Vry dans des fleurs de pamplemousse en 1857 (**Ragaswami et Seshadri, 1939**). Il est le principal hétéroside des flavonoïdes du pamplemousse et donne aux jus de pamplemousse une saveur amère (**Hadj Salem, 2009**) ; il présente aussi dans les agrumes et de nombreux médicaments traditionnels chinois (**Marais et al., 2006**), où il est l'un des principaux citroflavonoïdes isolée en grands nombres des écorces jetées de l'orange ordinaire *Citrus aurantium* L. = l'oranger amer (**Chandrasekhar et al., 2005**), *Citrus reticulata* = le mandarine (**Ishii et al., 1997**), *Citrus medica* = citron (**Johnson et al., 2013**), et d'autres espèces du genre *Citrus* (appartenant à la famille des Rutacées) (**Keli et al., 1996**). Aussi, dans des genres Fabacées, Bétulacées, Lamiacées, et Papilionacées (l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) (**Keli et al., 1996; Fuh et al., 1995**).

Notre travail s'articule autour de l'étude de la plante de mandarine ainsi que sur l'évaluation de l'activité antioxydante d'extrait préparé.

On a envisagé cette étude en deux parties ; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier est consacré aux agrumes, oranges et mandarine. Le deuxième chapitre concerne le stress oxydative et les antioxydantes. Et enfin, Le troisième chapitre concerne une contextes théoriques des techniques expérimentales utilisées.

La deuxième partie quant à lui, il est partie en deux chapitres.

Le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- L'extraction de naringine.
- l'analyse de l'extrait par CCM, HPLC, Infra rouge, UV-Visible.
- Une étude de l'activité antioxydante de l'extrait par le piégeage du radical libre DPPH.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons les résultats obtenus et leur discussion.

Partie I :

Synthèse Bibliographique



Chapitre I :

Généralité sur les agrumes



I .1. Les plantes médicinales

I .1.1. Définition

Ce sont des espèces botaniques utilisés pour très longtemps en phytothérapie et médecine populaire pour traiter les maladies courantes et plus graves. Leurs actions proviennent de leurs composés chimiques: des métabolites primaires et secondaires, et sans doute de la synergie entre les différents composés présents (**Reguieg, 2011**).

Les plantes médicinales sont une source importante de substances chimiques qui ont des effets thérapeutiques bénéfiques sur la santé humaine, et les systèmes à base de plantes contiennent de jouer un rôle essentiel dans les soins de santé primaires de près de 65% de la population mondiale (**Farnsworth et al., 1985**).

I .1.2. L'utilisation

L'homme utilise les plantes médicinales pour traiter les maladies depuis des millénaires. Parmi les médicaments obtenus à partir des plantes, on trouve le Paclitaxel qui a sa place dans le traitement des différents cancers ovaire et poumon (**Erick et al., 1997**).

La phytothérapie peut se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et ou certains états pathologiques au moyen de plantes de parties de plantes ou de préparations à base de plantes qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (**Wichtl, 2003**).

La phytothérapie offre des possibilités très complètes que bien souvent la chimiothérapie conventionnelle ne peut pas égaler puisque l'on peut aussi bien rétablir les grands équilibres physiologiques neuro endocriniens immunitaires qu'agir sur les fonctions et donc intervenir appareil par appareil locomoteur cardio vasculaire etc. Il est également possible d'avoir une action thérapeutique spécifique sur chacun des organes du corps de façon précise et ciblée pour chaque plante utilisée (**Boggia, 2015**).

I .1.3. La phytochimie

C'est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction, ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles des plantes. Elle est indissociable d'autres disciplines comme la pharmacognosie (**Marouf A., Reynaud J**).

Aujourd'hui, la phytochimie utilise couramment les cultures *in vitro* pour étudier les voies de biosynthèse des métabolites secondaires dans des conditions expérimentales plus favorables que les plantes entières, et pour obtenir des molécules pharmacologiquement actives à bas prix, souvent plus que toute autre méthode de recherche. (**Bruneton, 2009**).

I.2. Les métabolites secondaires

I.2.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes ; ce sont des produits à structure chimique souvent complexe, ils sont très dispersés et très différents selon le type d'espèce (Lutge U *et al.*, 2002). Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores et dans les relations entre la plante et son environnement (Abderrazak M, et Joël R, 2007).

Ces molécules biologiques ne sont pas par définition nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme, mais elles ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes. Elles sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Ces composés marquent, de manière originale, un genre, une famille, ou une espèce des plantes et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (Gravot, 2008).

I.2.1. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faibles quantités ; il en existe plus de 200000 qui sont classées, selon leur apparence chimique, en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes photochimiques, sources de molécules biologiquement actives et regroupés en trois classes principales :

- Les composés aromatiques (les composés phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).
- Les composés azotés.
- Les trapénoïdes et les stéroïdes.
- La catégorie des **hétérosides**, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extraction dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).
- Les molécules désignées sous le terme de « **composés mixtes** » ou « **composés d'origine mixte** », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut. Mais souvent, les composés mixtes peuvent être rattachés à l'une des catégories précédentes (Gravot A., 2008).

I.2.3. Les polyphénols

Composés aromatiques possédant au moins 1 groupement phénol. Il en existe plusieurs

sous- groupes : acides phénols, flavonoïdes, coumarines, tanins. Toute la classe des polyphénols est surtout utilisée dans les phytomédicaments pour traiter les troubles de la circulation veineuse. Les molécules sont souvent sous forme d'hétérosides (ce qui est très rarement le cas pour les alcaloïdes) (**khenaka k., 2011**).

Ces composés jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction, offrant une protection contre prédateurs et agents pathogènes (**BRAVO, 1998**), en plus de contribuer vers la couleur et de caractéristiques sensorielles fruits et légumes. Le bénéficiaire effets dérivés de composés phénoliques a été attribué à leur activité antioxydant (**BOULANGER et POLONVSKI, 1969 ; BALASUNDRAM et al., 2006**).

Ces composés ont été signalés de posséder non seulement une activité anti-oxydante, mais aussi des propriétés antiviraux et antibactériens (**KAN Y et al., 2007**).

I .2.3.1. Les flavonoïdes

- Définition

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires majeurs dérivés de la voie des phénylpropanoïdes végétaux (**Wang et al., 2020**), sont de faible poids, qui jouent un rôle crucial dans divers processus biochimiques et physiologiques des plantes (**Gharibi et al., 2019**), représentant plus de 5000 composés différents (**González Sarrías et al., 2020**).

La famille des flavonoïdes descend formellement du squelette de base de la 2- phényl-1,4- benzopyrone (Figure 6) (**Barreca et al., 2020**), avec la structure générale du squelette C6 – C3 – C6 dans lequel les deux unités C6 (anneau A et anneau B) En raison du modèle d'hydroxylation et des variations du cycle chromane (anneau C) (**Cirkovic Velickovic et Stanic-Vucinic., 2018**).

Les flavonoïdes fonctionnent également comme des composés antimicrobiens ou des insectifuges défendant contre les phytopathogènes et protégeant les plantes de l'irradiation UV (**Zhang et al., 2017**). Plus de 9000 flavonoïdes trouvés dans les fruits, les légumes, les céréales, l'écorce, les racines, les tiges, les fleurs, le thé (**Zhao et al., 2019**).

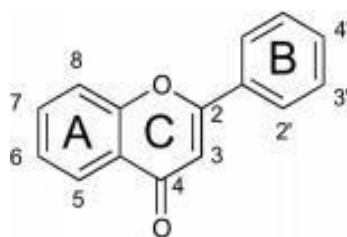


Figure 1 : Structure de la 2-phényl-1,4-benzopyrone (**Barreca et al., 2020**).

- **Classification des flavonoïdes**

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituant portés sur le cycle C (**Pietta., 2000**) (tableau 01).

Tableau 1 : Principales classes des flavonoïdes (**Narayana et al., 2001 ; W- Erdman et al., 2007**).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genistéine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

- **Biosynthèse des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone, Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3, on parle alors de chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (**Heller et Forkmann, 1993 ; Griesbach, 1996 ; Hashimoto et al., 2004**).

La biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (figure 2). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en naringine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner : apigénine ou le dihydroflavonol. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols et anthocyanidols ; ce dernier sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocya-

noside (Marfek, 2003).

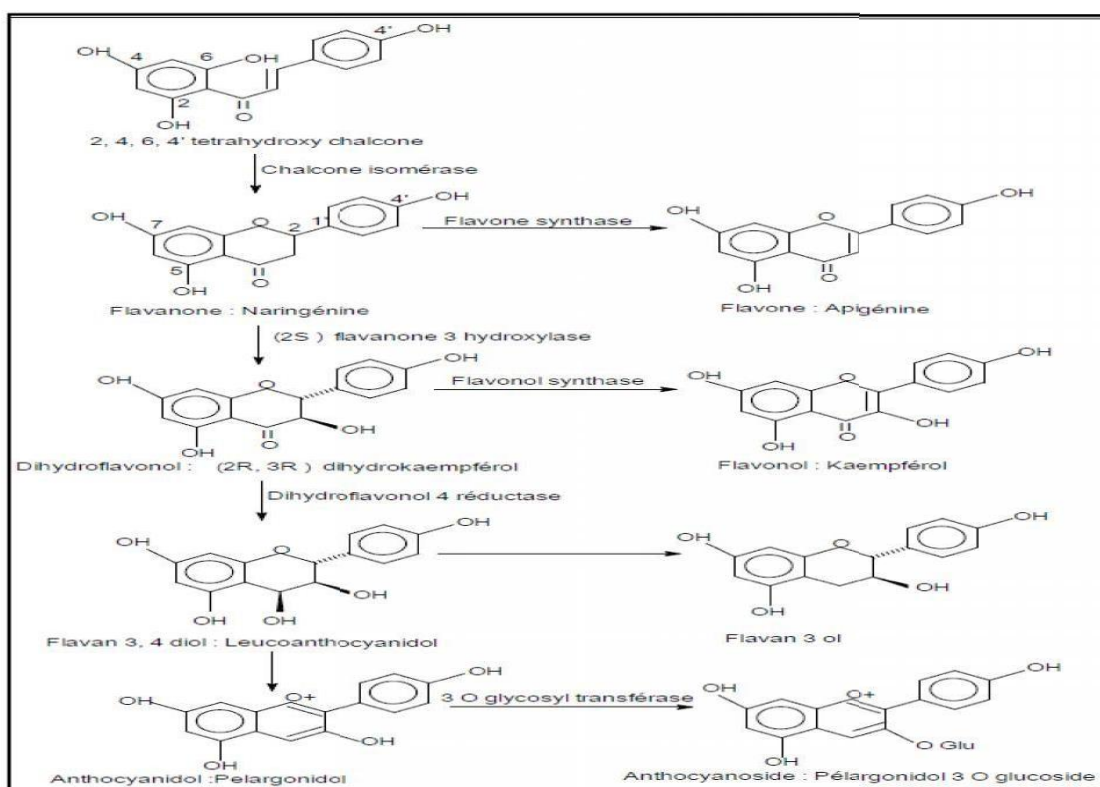


Figure 2 : Biosynthèse des flavonoïdes (Winkel –Shirley, 2001 ; Subsamanian et al., 2007).

• Rôles et propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes ; ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles (Jensen, 1992). C'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (Marfek, 2003).

Sur le plan thérapeutique, leurs propriétés sont largement étudiées dans le domaine médical, où on leur reconnaît des activités antivirales, anti tumorales, anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques, et antioxydants (Harborne & Williams, 2000). Par exemple : l'apigénine une flavone trouvée dans de nombreuses plantes appartient à la famille des astéracées, possède encore des propriétés antioxydants, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses (Shukla & Gupta, 2010).

I .3. Généralités sur les agrumes

Le mot « agrume » dérive de latin agrus qui, autrefois, désignait les plantes dont les fruits ont une saveur aigre, par exemple l'ail ou les oignons. Avec le temps, sa signification évolua et il fut utilisé pour décrire un groupe de plantes de la famille des Rutacées, en particulier celles appartenant au genre de Citrus (**Colombo, 2004**).

Parmi les six genres botaniques de la famille des Rutacées représentant les agrumes, les plus connus sont originaires du Sud-Est asiatique : Citrus, Fortunella et Poncirus. Les agrumes des genres Poncirus et Fortunella sont originaires de zones septentrionales de l'Est de la Chine, tandis que ceux du genre Citrus ont une origine méridionale entre l'Inde et l'Indonésie (1).

Cultivés, consommés et appréciés partout dans le monde, les agrumes sont pratiquement indispensables de par leur teneur élevée en acide ascorbique. La vitamine C. Les agrumes ont une grande importance économique, non seulement au niveau de la production du fruit (80 Millions de tonnes par ans) mais également pour d'autres secteurs, par exemple l'industrie des parfums. N'oublions pas non plus leurs caractéristiques ornementales : leur port noble, leurs feuilles persistantes d'un beau vert brillant, le parfum délicat de leurs fleurs (**Colombo, 2004**).

I .3.1. Situation économique des agrumes

- **Dans le monde**

Les agrumes sont les fruits les plus produits dans le monde. Les principaux pays producteurs sont le Brésil avec 18.5 millions de tonnes, les États-Unis avec 14.9 millions de tonnes, et la Chine avec 9.3 millions de tonnes (**F.A.O, 2002**). Dans le bassin méditerranéen, l'agrumiculture s'étend sur une superficie de 600.000 hectares pour une production moyenne de 9 à 10 millions de tonnes et présente une part de marché sur les exportations mondiales d'agrumes de près de 55% (**M.A.P, 1997**). Parmi les différentes espèces d'agrumes cultivées dans le monde, les oranges prédominent avec un taux de 61,8 % (**F.A.O, 2002**), Il en est de même pour les pays du bassin méditerranéen ; note une prédominance des oranges avec un taux de 50 % par rapport aux autres espèces d'agrumes.

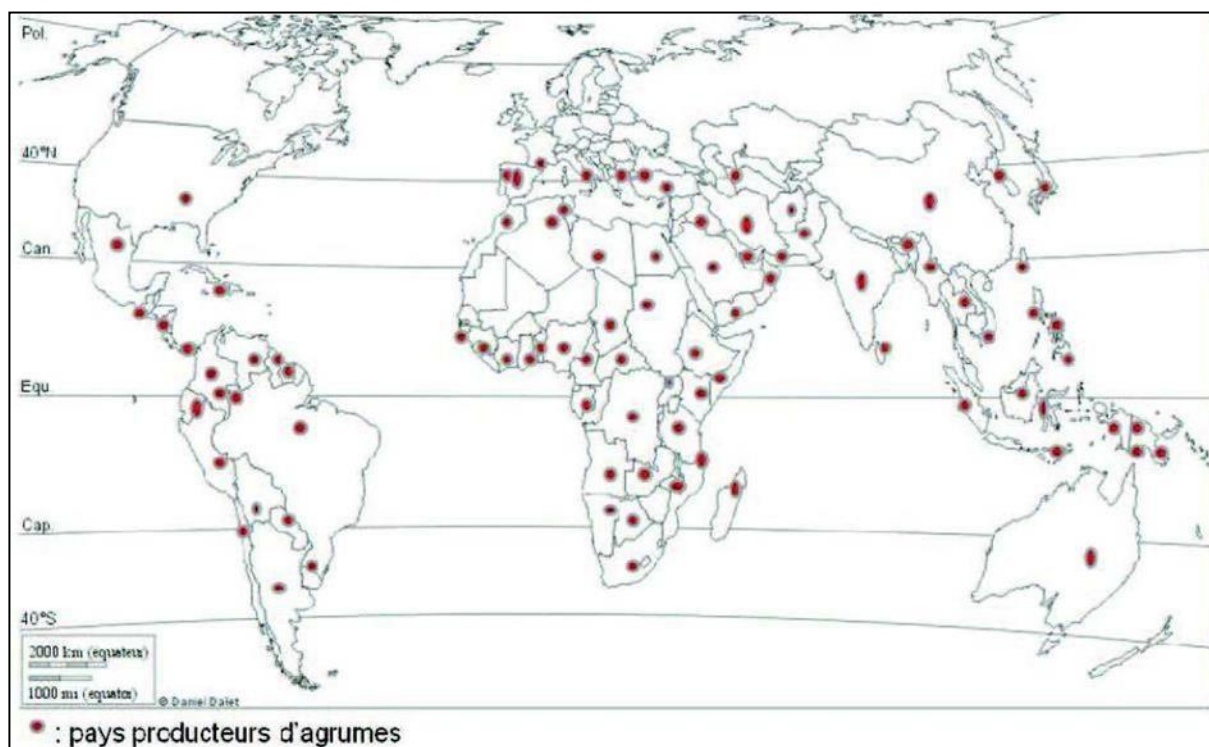


Figure 3 : Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde (Cassin, 1984).

- **Les agrumes en Algérie**

Selon (Aouane et Ghezli, 2001). À l'instar de l'arboriculture fruitière, l'agrumiculture occupe une place primordiale et constitue l'une des préoccupations majeures des décideurs au niveau du ministre de l'agriculture algérien.

Le verger agrumicole algérien occupe une superficie de 64154 ha dont 50873 ha se répartissent en majorité dans Wilaya de Blida (26%). Chlef (9%), Alger (8%).

Les principales espèces cultivées dans ces régions sont les oranges, les clémentines, les citrons, et pomelos. En termes de production, L'Algérie a atteint le niveau de 8 552 654 quintaux soit un rendement moyen de 16.8T/ha, les différentes composantes de cette production sont 72% pour les oranges, 16% pour la clémentine, 7% pour les citrons, 3% pour la mandarine, et 0.1 % pour les pomelos (MADR, 2009).

I .3.2. Systématique des agrumes

La classification des agrumes dans le règne végétal est présentée comme suit selon (Loussert, 1989).

- Règne : Végétal

- Embranchement: Spermaphytes
- Classe: Dicotylédones
- Ordre: Geraniales
- Famille: Rutacées
- Genres: *Fortunella*; *Poncirus*; *Citrus*

I .4. Oranges

I .4.1. Définition de l'orange

L'orange est un petit arbre ou *arbuste*, pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur environ. L'arbre est à rameaux nombreux ; formant une cime touffue, avec un feuillage vert sombre, glabre, persistant, et légèrement ailé. Les feuilles sont persistantes, cireuses, coriaces et alternes, la floraison blanche très parfumée. Le fruit est une baie, ronde ou allongée, souvent pourvue d'un mamelon proéminent du côté opposé au pédoncule fructifère. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir ; ils sont de taille moyenne et de couleur caractéristique orange. L'intensité de la couleur et la forme du fruit sont caractéristiques pour chaque variété (**Loussert R, 1989**).

I .4.2. Cycle de vie des oranges

Les orangers sont des espèces fruitières à feuilles persistantes ; le cycle de vie de cet arbre débute par une phase de dormance suivi par une phase de débourrement ou il y a le gonflement des bourgeons et le développement des feuilles suivis par une phase de floraison (début, pleine et fin) (**Agustí et al., 1997**).

I .4.3. Structure d'orange

L'orange est une baie particulière partagée en une dizaine de « *quartiers* ». Dans chaque quartier, les pépins se trouvent insérés près de l'axe (placentation axile). *L'épicarpe* (zeste) contient de nombreuses glandes à essences. Le mésocarpe blanc a une consistance spongieuse. *L'endocarpe* (épiderme interne d'un carpelle) est une fine peau qui entoure les quartiers et émet des poils succulents qui remplissent l'intérieur des *loges carpellaires* et constituent la partie charnue consommée (figure 4).

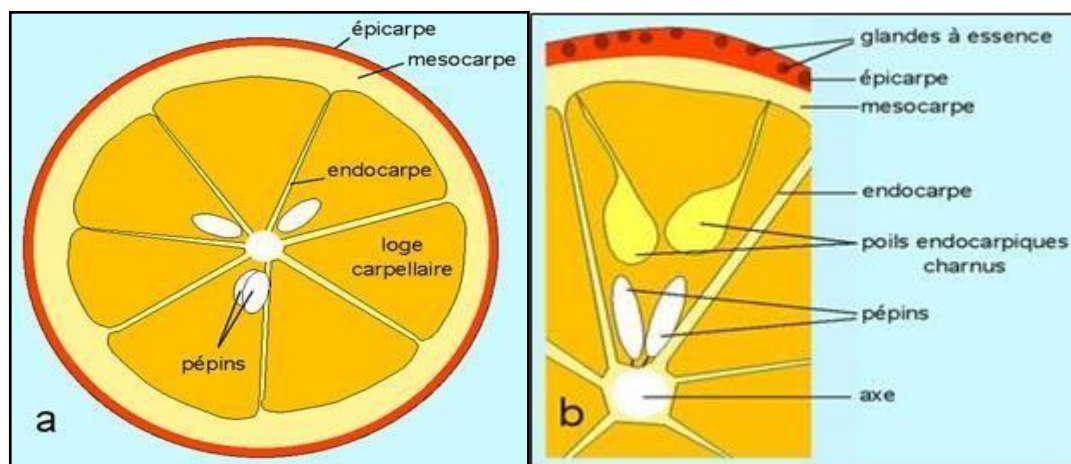


Figure 4 : Coupe transversale schématisée d'une orange (a) et détails (b) (Aoudache k, AribD, 2019).

I .4.4. Les mandarines (*Citrus Reticulata* Blanco)

Citrus reticulata blanco communément appelée « mandarine » elle est l'une des trois agrumes originaux du genre *Citrus* et parmi les agrumes frais les plus commercialisés. C'est un petit arbre épineux au sommet dense de fines branches, qui aurait été introduit au cours du huitième siècle (Apraj et Pandita, 2014). Ses feuilles sont lancéolées, vert foncé, persistantes, et brillantes (Barbelet, 2015). Le fruit est sphérique d'environ 6,5 à 7,5 cm de diamètre, de forme aplati (Dugo et Giacomo, 2002). L'écorce est verte au moment de la récolte et devient orange lors de la maturation (Ladaniya, 2011), et elle a une épaisseur moyenne et une surface lisse, dans laquelle se trouvent les glandes remplies d'huiles essentielles (Bousbia, 2011). Elles sont cultivées dans les pays méditerranéens. Elle est beaucoup plus résistante au froid que l'orange douce, et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (Lim, 2012).

• Les variétés

Il existe plusieurs variétés de mandarines :

- Mandarine (*Citrus reticulata* Blanco)
- Mandarine commune (*Citrus reticulata* « Ponkan »)
- Mandarine clémentine
- Tangerine
- Satsumas (*Citrus unshin*): mandarines précoces, déjà mures quand la peau est encore verte.
- Mandarine méditerranéenne Willowleaf (*Citrus deliciosa*): les fruits sont sphériques et aplatis aux pôles avec une peau fine, lisse, colorée en jaune orangée. La pulpe,

orange claire, juteuses, tendre, agréablement parfumée mais présentant de nombreux pépins
Mandarine king (*Citrus nobilis*) (BOUSBIA N, 2011).

- **Composition chimique de la mandarine**

Le tableau 2 donne une composition chimique en métabolites primaires et secondaires de lamandarine.

Tableau 2 : La composition chimique de la mandarine (Tripoli *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2013; Rapisarda *et al.*, 2009; Vinson *et al.*, 2002; Tumbas *et al.*, 2010; Rincon *et al.*, 2005; Menichini *et al.*, 2011; Mukhtar *et al.*, 2005; Lim, 2012).

Composants	Localisation
Les sucres : Fructose, Glucose, Saccharose.	Fruit, feuilles, écorce.
Protéines et les fibres.	Fruit, écorce, feuilles.
Sels minéraux : Calcium, Fer, Mg, Phosphore, sodium, Zinc, Cuivre, Mn, Se.	Fruit, feuille, écorce
Les vitamines : Thiamine (B1), Riboflavine (B2), B3, Pyridoxine (B6), Acide ascorbique (C), Vitamine A, Vitamine E.	Fruit, feuilles
Acides aminés : Tryptophane, Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Valine, Arginine, Histamine, Alanine, Acide Aspartique, Acide Glutamique, Glycine, Proline et Serine.	Fruit
Les métabolites Secondaires : Acide Phénoliques, Flavonoïdes (Flavanone, Flavone, Flavonol, Hespéridine), Huiles essentielles, limonoïdes incluant : obacumone 17 beta D- glucopyranoside, acidemomilinique 17 beta-D glucopyranoside, limonemi, monilline. Fruit, Feuilles, Ecorce	Fruit, Feuilles, Ecorce

- **Principaux hybrides d'importance commerciale**

- ✓ **Mandarine** (*Citrus reticulata* Blanco)
- ✓ **Mandarine commune:** *Citrus reticulata* _Ponkan'; Ponkan (suntara); Changasha; Pixie ;Daisy; Gold Nugget; Fuzhu; antillan.
- ✓ **Clémentine:** Algérienne; carte noire; Caffin; Clemenules; Clémentine hybride:

Fina ;Marisol ; Monreal; Nour; Sidi Aissa; Oroval.

- ✓ **Tangerines:** Beauté (Beauté d'Australie et la Retraite Gley); Dancy (Tangerine Rouge, Moragne)
- ✓ **Satsumas:** Premières variétés (Wase; Miyagawa; Okitsu; Sito; Miho; Kuno). Variétés Unshiu tardives (Owari; Silverhill; Dobashi Beni; Kimob rough; Aoshima). Variétés Satsuma les plus récentes (Amstrong; Dat North; Dart South; Xie Shan).
- ✓ **Mandarine méditerranéenne: (Willowleaf)**
- ✓ **Mandarine King:** Cambodgiens (Yellow king); King (de Siam); King Japonaise Les variétés hybrides issues de croisement entre les mandarines et les mandarines petit-fruits sont:
- ✓ **Tangors:** Temple; Ortanique; Ellendale; Murcott; Dweet; Ambersweet.
- ✓ **Tangelos:** Minneola; Pearl; Orland ; Sunshine; Allspice; Mandalo; Wikiwa; Ugli. Hybrides Tangelo x Clémentine: Fairchild; Lee; Nova (Clemenvilla); Oscelo; Page; Robinson (**BOUSBIA, 2011**).

- **L'utilisation**

Les mandarines occupent une place de plus en plus importante dans le marché des agrumes frais, du fait que le marché mondial a considérablement changé durant les 20 dernières années avec une préférence accrue des consommateurs vers des mandarines sans pépins, savoureuses dotées d'une peau d'une peau de belle couleur d'un épluchage facile. Par conséquent, les mandarines sont désormais le plus grand secteur de l'industrie des agrumes frais dans le monde. Le nombre de variétés de mandarines commercialisées est presque égal au nombre de tous les types d'agrumes horticoles (**BOUSBIA, 2011**).

I .4.5. La valeur nutritionnelle de l'orange

L'orange apporte une quantité modeste d'énergie, de glucides, de fibres alimentaires et pratiquement pas de protéides ni de lipides, elle est assez riche en vitamine C et constitue une source de calcium, de cuivre et de vitamines (B1, B5, B9), ainsi qu'elle est une source d'antioxydants, ils auraient selon certaines études, la capacité d'inhiber le développement des cellules cancéreuses et de réduire la tension artérielle et le taux sanguin des triglycérides. La vitamine C à elle seule, contribue à l'essentiel de l'activité anti-oxydante de ce fruit. Les différents caroténoïdes, le bêta-carotène, la lutéine, et la zéaxanthine, sont présents en quantité intéressante. Ces substances ont une activité antioxydante avérée (**ZAIDI et al., 2012**).

I .5. La naringine

• Découverte

Naringine a été découvert pour la première fois par De Vry dans les fleurs de pamplemoussiers poussant à Java en 1857, mais il n'a pas publié ses découvertes à cette époque (**Rangaswami S et al., 1939**). Des recherches approfondies sur ce « nouveau composé » ont été menées dans les années à venir par De Vry et Hoffman, puis par Will (Sinclair WB, 1972). Le nom naringin est probablement dérivé du terme sanskrit « naringi », signifiant « orange » (**Sinclair WB, 1972**). Il est présent dans les agrumes et les raisins, les haricots, les cerises, le cacao, l'origan et les tomates (**Ho PC et al., 2000 ; Minoggio M et al., 2003**). Il est présent dans le jus de pamplemousse jusqu'à des concentrations de 800 mg/L (**Rouseff RL et al., 1987**). La structure chimique de la naringine a été élucidée pour la première fois en 1928 par Asahina et Inubuse (**Asahina Y et al., 1928**).

• Définition

La naringine est un important flavonoïde soluble dans l'eau isolé des agrumes (**Tripoli E et al., 2007**), Il a un poids moléculaire de 580,4 g/mol et sa formule moléculaire est C₂₇H₂₃O₁₄ (figure 4), Il a un potentiel antioxydant et joue un rôle important dans le développement des feuilles, des fleurs, des bourgeons, et des fruits des plantes, Il a induit en outre l'amertume des fruits comme dans le raisin, Cependant, l'amertume peut être réduite lors de la réduction par l'enzyme naringinase (**Ho PC et al., 2001**).

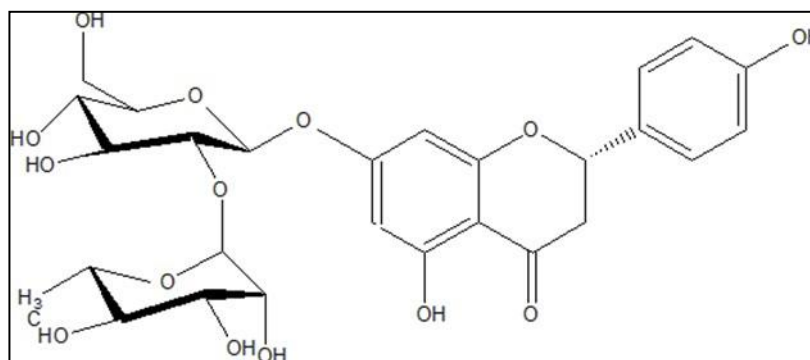


Figure 5 : Structure moléculaire de la naringine (**Yuta H et al., 2022**).

• Bioapplication de la Naringine

La naringine est un médicament utilisé pour traiter le diabète, l'herpès, l'insuffisance cardiaque, l'alcoolisme, et l'insuffisance veineuse chronique. La naringine est fréquemment utilisée dans l'industrie de la nutrition pour stimuler l'absorption de suppléments comme la caféine (**Choi MS et al., 2001**). Il améliore le métabolisme de l'éthanol et atténue les ef-

fets négatifs de la consommation d'éthanol; il agit comme antioxydant et piègeur de radicaux libres; et il inhibe de manière significative l'oxydation des LDL. Réduit la cytotoxicité, agit comme un agent anti-apoptotique et possède des propriétés antifongiques. La naringine inhibe l'inhibition de la dégradation des protéines endogènes, autophagiques-lysosomales causée par l'acide okadaïque, ainsi que l'absorption et la dégradation des glycoprotéines médiées par les récepteurs. La naringine peut être utilisée pour prévenir les pathologies l'hyperphosphorylation, les effets secondaires des médicaments chimiothérapeutiques, et les toxines environnementales. La naringine (25 mg) augmente la biodisponibilité des nutriments et des médicaments (Suseem SR *et al.*, 2019).

Chapitre II :

Le stress oxydatif et les antioxydantes



II.1. Généralités

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddour, 2001**).

II.1.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif 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**)

II.1.2. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Jacques et André., 2004**) ; cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité ; une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Martinez-Cayuela, 1995**).

II.1.3. Production des radicaux libres

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respiration oxydative. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie ; elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (RLO). (**Chu et al., 2010**).

Les autres sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories : les sources endogènes ou les RL sont des produits des réactions de l'organisme, et les sources exogènes, tels que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels, et la pollution (**Pastre, 2005**).

II.1.4. Les espèces réactives oxygénées

Parmi les espèces réactives oxygénées les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives radicalaires qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène par addition d'un électron. Les principales espèces réactives de l'oxygène radicalaire sont : le radical

superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante, tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (Gutteridge, 1993 ; Jacques et André, 2004).

Tableau 3 : Espèces réactives de l'oxygène (Kohen et Nyska, 2002)

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
Radical hydroxyle OH^{\bullet}	Peroxyde organique $ROOH$
Radical peroxyde ROO^{\bullet}	Acide hypochlorique $HOCl$
Radical alkoxyde RO^{\bullet}	Oxygène singulet 1O_2
Monoxyde d'azote NO^{\bullet}	Peroxyde d'azote $ONOO^-$

II.1.5. Les conséquences du stress oxydatif

Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone (Favier, 2003), En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Georgetti et al., 2003; Atawodi, 2005).

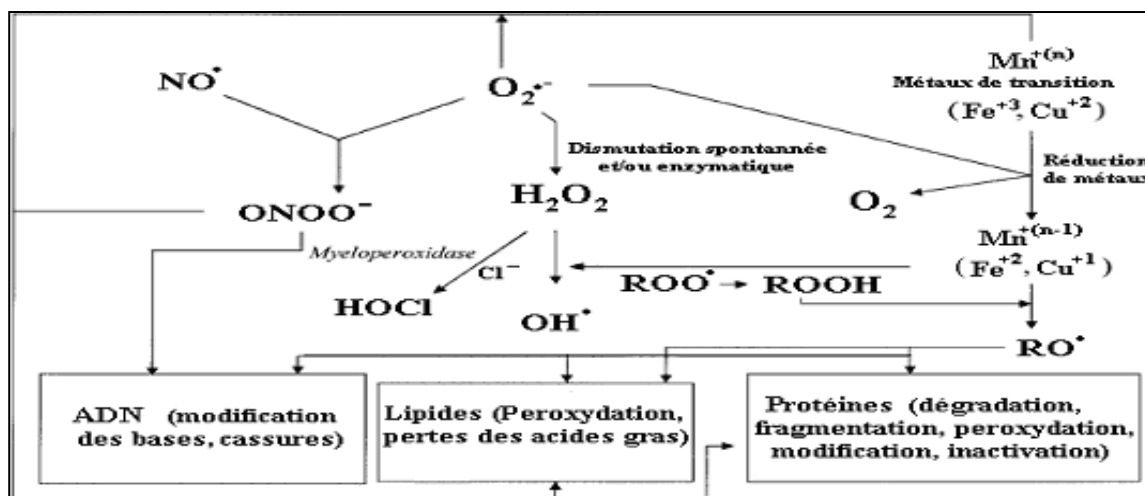


Figure 6 : Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

II.1.6. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme toute substance qui lorsqu'elle est trouvée à des concentrations faibles par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat (**Asgarpanah et Kazemivash, 2012**).

- **Mécanisme d'action des antioxydants**

Les antioxydants peuvent protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces réactives comme suit :

-Inhibition de la formation des radicaux libres.

-Neutralisation des radicaux libres.

-Augmentation du système de défense du corps.

-Réparation des dommages résultants de radicaux libres (**Lamina et al., 2013 ; Liochev, 2013**).

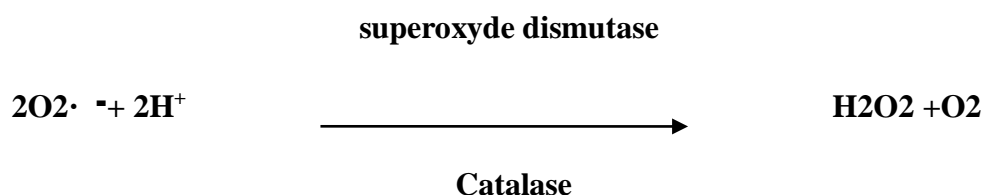
- **Types des antioxydants**

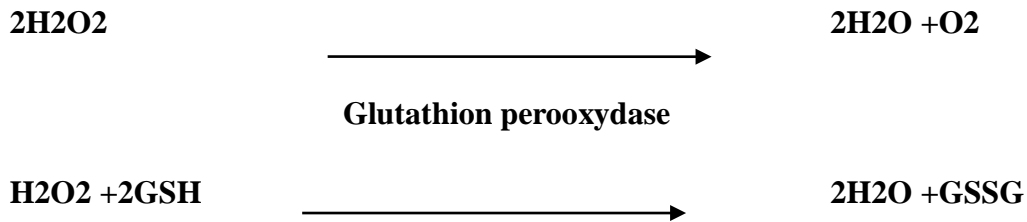
Pour contrôler la production permanente des espèces réactives, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages de ces radicaux (Rajesh et al., 2013). Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes ou proviennent de l'alimentation ou la médication et sont donc exogènes.

- **Les antioxydants endogènes (enzymatiques)**

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydant. Les trois enzymes antioxydants majeures sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx), et la catalase (CAT).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, conduisant à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).





✓ La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation ; elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène.

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD), et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (**Jacques et André, 2004**).

✓ La catalase

Est une protéine formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT. Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (**Delattre et al., 2005**).

✓ La glutathion peroxydase

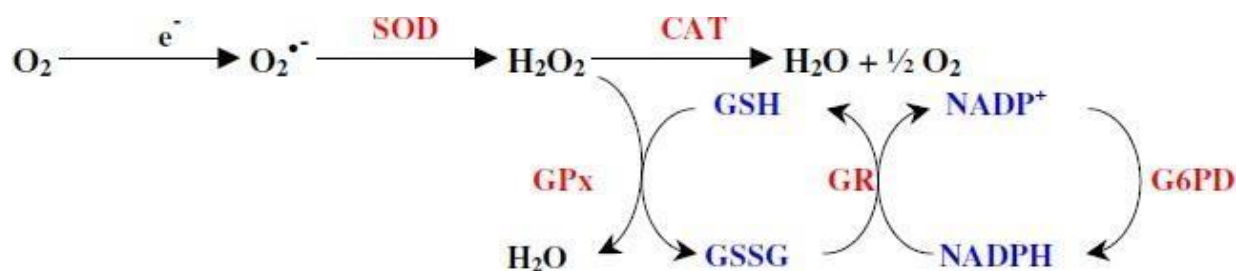
La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (**Ganther, 1999**).

La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries ; elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium.

En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau.

Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré ; cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (**Jacques et André, 2004**).

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant :



- **Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)**

Ce groupe comprend plusieurs composés alimentaires aux propriétés antioxydantes, qui proviennent normalement de sources naturelles telles que les fruits, les légumes, et les extraits de plantes (Kruidenier et Verspaget, 2002).

- ✓ **Acide ascorbique (vitamine C)**

La vitamine C, ou acide ascorbique représentée par la (figure 7), est une vitamine hydro-soluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets, et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire ; celui-ci provient essentiellement des fruits et légumes frais (Fain. O, 2004).

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique, sauf les singes et les humains, en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase (Naidu. K. A, 2003).

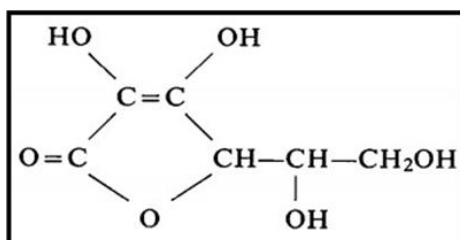


Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique (Hvoslef, 1967).

- ✓ **La Vitamine E**

La vitamine E constitue le principal antioxydant liposoluble dans le corps (Herrera et Barbas, 2001). La vitamine E naturelle comprend deux groupes de composés liposolubles étroitement apparentés, les tocophérols et les tocotriénols, En fonction du nombre et de la po-

sition des groupes méthyles attachés au cycle aromatique, il existe quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ (Figure 8) (Azzi et Stocker, 2000). La vitamine E joue un rôle scavenger des radicaux oxygène libres et dans la stabilisation des membranes cellulaires, préservant ainsi sa perméabilité (Ognjanović et al., 2003). La vitamine E est présente dans toutes les plantes et il y a une forte corrélation entre sa teneur et la quantité d'acides gras insaturés dans les huiles végétales (Herrera et Barbas, 2001).

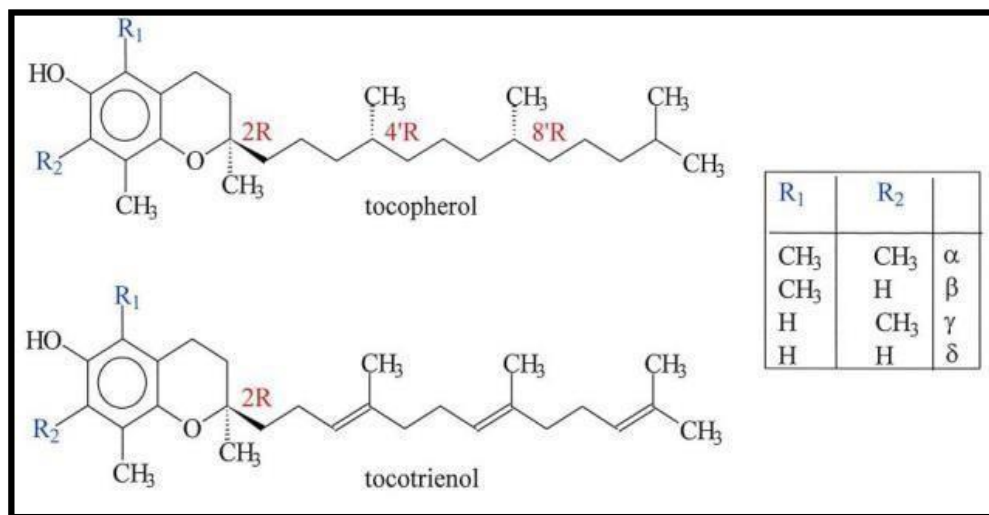


Figure 8 : Composants naturels de la vitamine E (Azzi et Stocker, 2000).

✓ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels, synthétisés par les plantes et les microorganismes et sont responsables des couleurs de divers fruits et légumes. Ce sont des molécules hautement lipophiles, généralement situées à l'intérieur des membranes cellulaires (Paiva et al., 1999; Fiedor et Burda, 2014). Bien que non synthétisés par l'homme et l'animal, ils sont présents dans le sang et les tissus qui contiennent environ 20 types dont les plus importants sont: β -carotène, α -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine, α -cryptoxanthine, γ -carotène, neurosporène, δ -carotène, phytofluène, et phytoène (Figure 9) (Fiedor et Burda, 2014). Les caroténoïdes sont considérés comme antioxydants puissants, ils sont efficaces contre les espèces réactives de l'oxygène telles que l'oxygène singulier, ainsi que des agents de rupture de chaîne radicalaires (Hix et al., 2004).

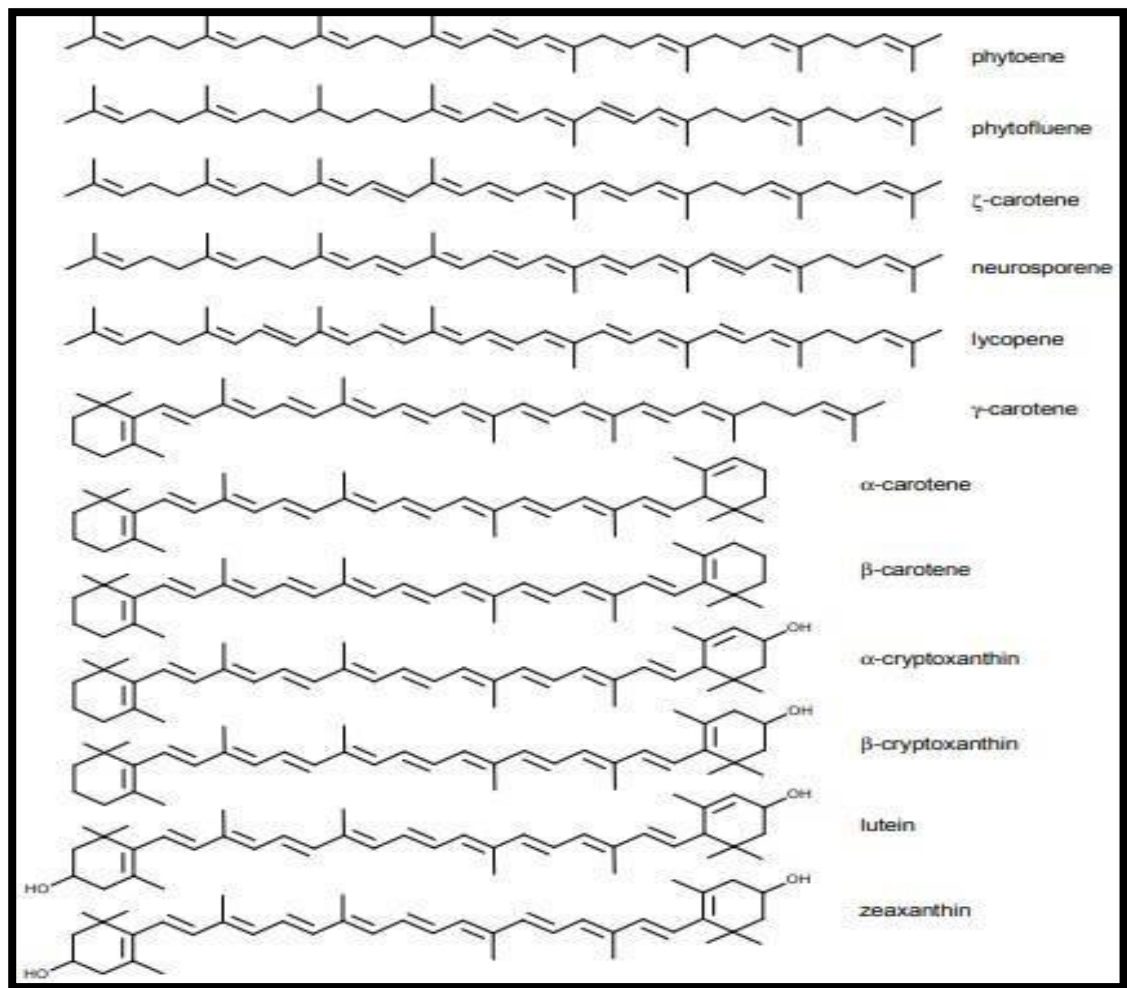


Figure 9 : Structures chimiques des principaux caroténoïdes présents dans plasma humain (Fiedor et Burda, 2014).

Chapitre III :
Contextes théoriques des
techniques expérimentales
utilisées

Ces techniques fournissent des données conduisant à l'identification de structures moléculaires organiques. Les plus utilisés dans nos travaux sont : **CCM, HPLC, UV, IR, L'amarrage moléculaire.**

III.1. Technique chromatographique :

La chromatographie est une technique souvent utilisée pour séparer et identifier les produits chimiques qui composent les objets.

Bien que la technique ait été développée à l'origine pour séparer les substances colorées par leur nom (couleur khrôma en grec), elle est très efficace pour l'analyse des substances organiques (**Mohamed, 2010**).

III.1.1. Chromatographie sur couche mince :

- **Définition**

La chromatographie sur couche mince est un phénomène d'adsorption, principalement pour l'analyse et la séparation des substances chimiques qui composent les objets, et l'équipement utilisé pour la chromatographie sur couche mince est relativement simple. Il se compose d'une plaque et d'une fente rectangulaire pour l'élution. Cette dernière dépend du choix de la phase stationnaire et de la phase mobile (éluant), les phases stationnaires les plus couramment utilisées en chromatographie sur couche mince sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre. Nous rapportons ci-dessous le protocole réalisé pour l'huile essentielle de Bryon (**Mohamed, 2010**).

- **Protocole expérimental**

Sur une planche en silicone de 2×5 cm, utilisez un crayon pour tracer une ligne horizontale à 0,5 cm du bord inférieur et à 0,2 cm du bord supérieur. Diluer H.E dans de l'éther et déposer une goutte sur la ligne du bord inférieur. La plaque est ensuite placée dans une cuve avec éluant : éther/éther de pétrole (1 : 4) à une hauteur de 0,5 cm. Lorsque l'éluant atteint l'avant de la plaque, retirer la plaque du réservoir Puis sécher (**Mohamed, 2010**). Les taches apparaissant à l'aide d'un révélateur sont caractérisées par un facteur de rétention (Rf) qui est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par la substance (X) sur la distance parcourue par le front de l'éluant (Y) :

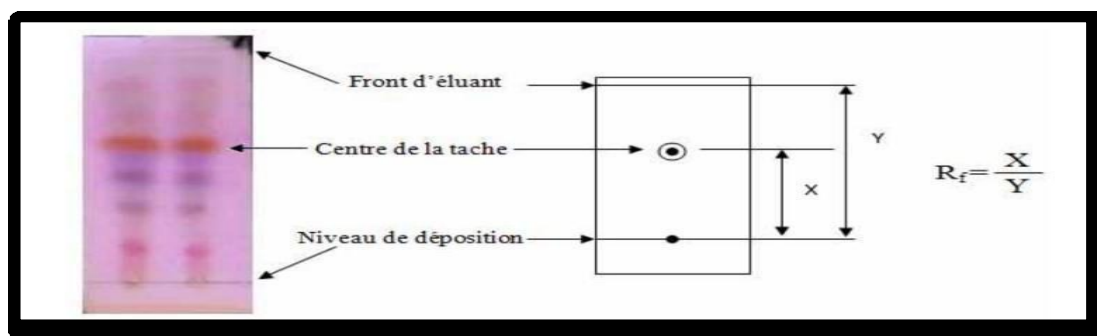


Figure 10 : Protocole de CCM (Mohamed, 2010).

III.1.2. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

La chromatographie liquide à haute performance consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases, l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité, ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique. Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption. La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme (Panaiva, 2006).

- **Principe**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire

(Jean, 2001).

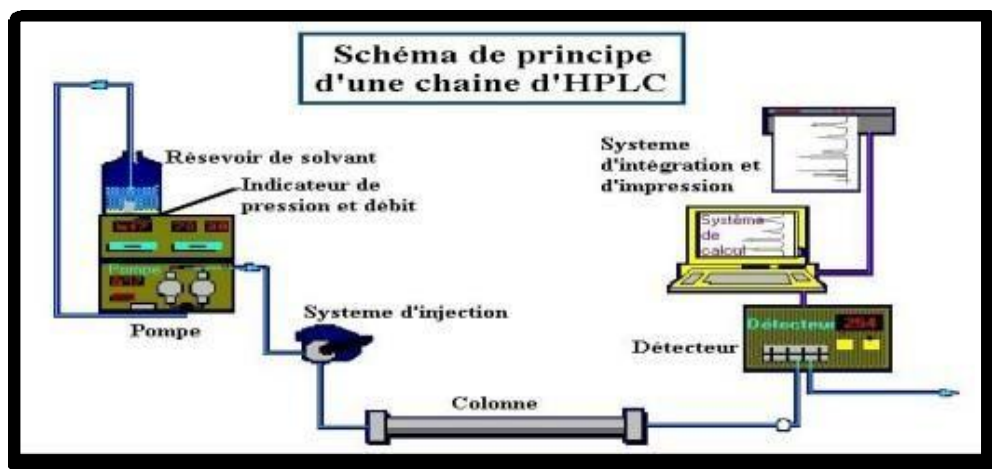


Figure 11 : Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC (Colomb, 2016).

- **Appareillage**

HPLC est composée des éléments suivants (Ghnimi, 2015) :

A. La colonne : généralement, c'est un tube en acier de 5 à 15 cm de longueur et de diamètre de 5 mm qui contient une phase stationnaire. Il existe plusieurs types de phases stationnaires parmi lesquelles on trouve principalement

B. Les silices non greffées : Les silices greffées par des groupements polaires: pour lesquelles l'éluant utilisé est apolaire. On parle alors de chromatographie en phase normale.

C. Les silices greffées par des groupements apolaires (chaines carbonées linaires plus ou moins longues) : pour lesquelles l'éluant utilisé est polaire, dans ce cas il s'agit de chromatographie en phase inverse.

D. Injecteur : il est constitué d'une vanne haute pression appelé vanne rhéodyne et d'une boucle d'échantillonnage d'une capacité comprise entre 10 et 50 μl . Cette boucle permet une fois remplie de déposer l'échantillon à l'entrée de la colonne sans perte de pression.

E. La pompe : elle permet d'introduire la phase mobile dans l'appareil sous un débit constant et à forte pression.

F. Détecteur : il existe plusieurs types des détecteurs. Parmi les quels, des détecteurs à absorptiomètre dans l'UV-Visible, des réfractomètres différentiels ou des détecteurs électrochimiques.

III.2. Technique spectroscopique :

L'identification des structures moléculaires organiques est généralement réalisée en utilisant une combinaison de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectroscopie UV, la spectroscopie IR.

III.2.1. Spectroscopie d'absorption dans le domaine UV-Visible :

Les domaines de longueurs d'onde considérés ici sont, pour la radiation ultraviolette (UV), compris entre 190 et 400 nm et entre 400 et 800 nm pour la radiation du domaine visible (**Biemont.É, 2008 ; Gratien.E, 2008**).

- **Principe de spectroscopie d'absorption dans l'UV visible**

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

- **Loi de Beer-Lambert**

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

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

Avec ϵ_{λ} : coefficient d'absorption (ou d'extinction) molaire du composé à la longueur d'onde λ . L'unité du coefficient d'absorption molaire est : $\text{Lmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 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 ; Boutiti A., 2010**).

III.2.2. Spectroscopie Infrarouge (IR) :

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique analytique principalement utilisée pour déterminer la présence de groupes fonctionnels dans la structure des molécules organiques et de certaines molécules simples. Il est basé sur l'absorption du rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Les fonctions chimiques présentes dans l'échantillon sont analysées, (Peter et *al.*, 2004). Les nombres d'onde $\tilde{\nu}$, il est défini comme :

$$\tilde{\nu} = 1 / \lambda$$

Où λ est la longueur d'onde dans le vide mesurée en cm. L'unité du nombre d'onde est donc le cm^{-1} .

III.3. L'amarrage moléculaire :

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

III.3.1. Principe :

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

III.3.2. 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 qui proposent (**EL Hadj., 2016 ; LANEZ, 2016**).

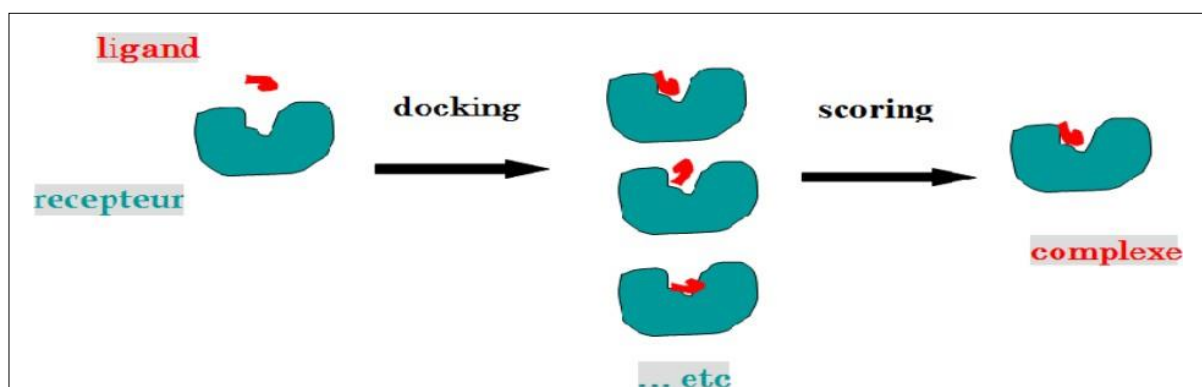


Figure 12 : Les étapes de docking moléculaire (EL Hadj, 2016).

III.3.3. Les différents types d'amarrage moléculaire :

Il existe trois grands types de docking moléculaire. Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système récepteur-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de récepteur et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible, et le dernière type le docking semi-flexible. Sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif du récepteur. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés (Asses, 2011).

- **Modélisation du potentiel énergétique:**

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

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

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

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

ΔG_{elec} : énergie des interactions électrostatiques,

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

ΔG_{tor} : est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction

des rotors libres du ligand et à la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation au récepteur,

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

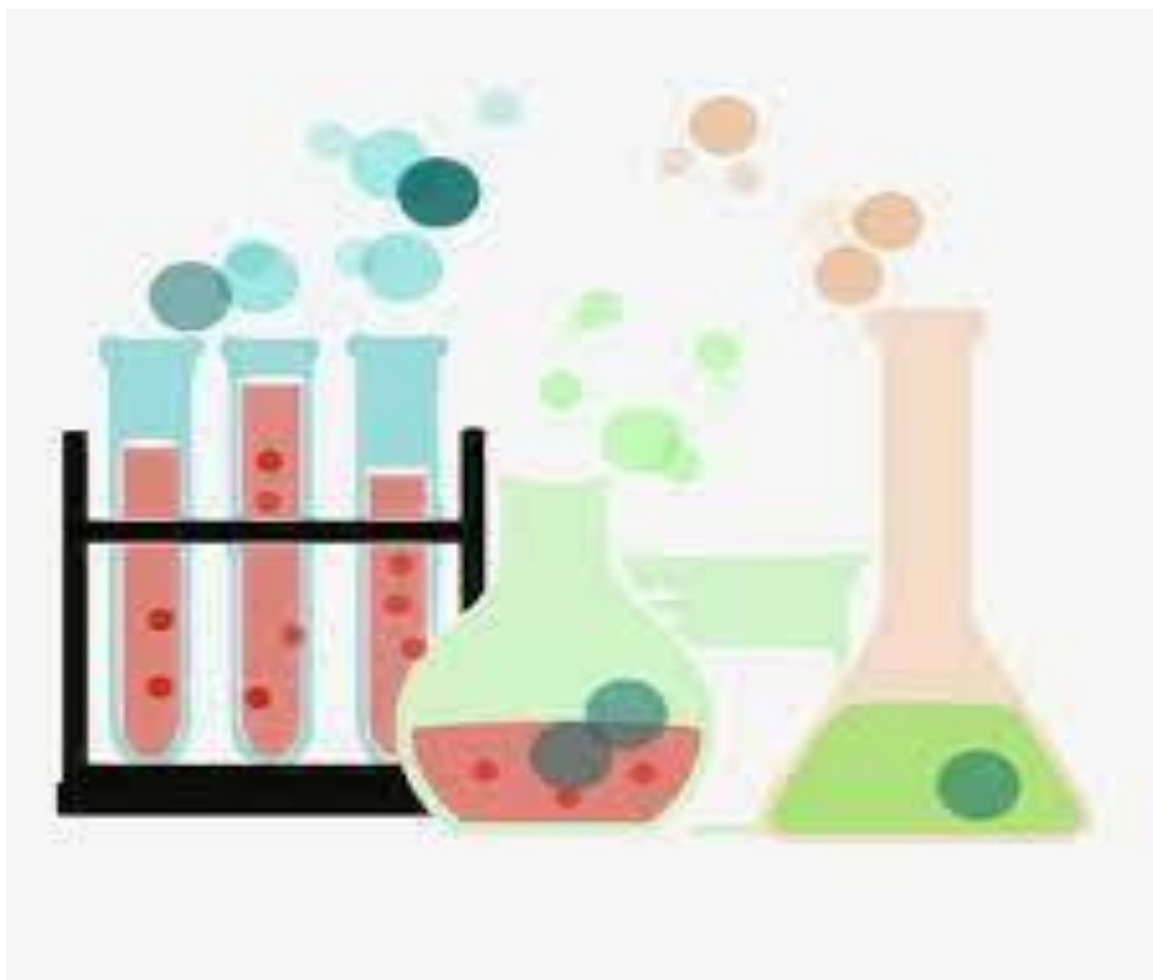
Le passage par une relation empirique de type QSAR est nécessaire pour relier la structure des complexes et l'énergie libre de liaison. Le modèle empirique utilisé dans AUTO-DOCK est une régression linéaire multiple des différents termes de l'équation d'énergie libre. Chaque terme est ainsi pondéré par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

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

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

Partie II :

Expérimentale



Chapitre I :

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.1. Matériels :

I.1.1. Matériel végétal :

La plante étudiée Mandarine, a été récoltée dans la région Boufarik (Blida).

Au laboratoire, les croûtes sont séchées, broyées, et conservées. La poudre sera utilisée dans les différentes analyses ultérieures.

I.1.2. Réactifs utilisés :

- **Diphényle-picryl-hydrazyle (DPPH)**

Une solution de DPPH a été préparée par 2.4 mg de DPPH dans un 100 ml de méthanol, conservé à l'obscurité.

- **Alpha-Tocophérol**

L'alpha-tocophérol de densité 0.92 a été préparée dans 10 ml méthanol.

I.1.3. Matériels de laboratoire :

✓ Plaque chauffante	✓ Auto clave	✓ Vortex
✓ Balance électrique	✓ Micropipettes ajustables	✓ Portoir pour tubes spéciaux
✓ Etuve	✓ Papier filtre	✓ Bain marie

I.1.4. Produits chimiques :

✓ Dichlorométhane (CH ₂ Cl ₂)	✓ Ethanol (EtOH)
✓ Eau distillée (H ₂ O)	✓ Méthanol (MeOH)

I.2. Méthodes :

I.2.1. Extraction de Naringine :

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

- a. Épluchage :** 5 kg de mandarine bien lavé ont été épluchés à l'aide d'un couteau aiguisé. Figure 13.



Figure 13 : La Mandarine

- 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 14. Le poids des croûtes séchées était de 117.9615 g.



Figure 14 : Les croûtes de mandarine après le séchage

- c. Broyage :** Les croûtes séchées ont été broyées pour obtenir une poudre Figure 15.



Figure 15 : Poudre de croûtes sec.

d. Extraction : 20 g de la poudre ont été mélangés avec 200 ml de méthanol et laissés pendant 3 jours. La bouillie obtenue a été filtrée et l'extrait méthanique obtenu a été séché avec un évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°C pour évaporer le méthanol. Figure 16.



Figure 16 : 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 17) à une température de 70°C pendant une durée de 30 minutes.



Figure 17 : Montage de chauffage.

f. Cristallisation : Le mélange a été transféré dans une ampoule à décanté (Figure 18) 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.

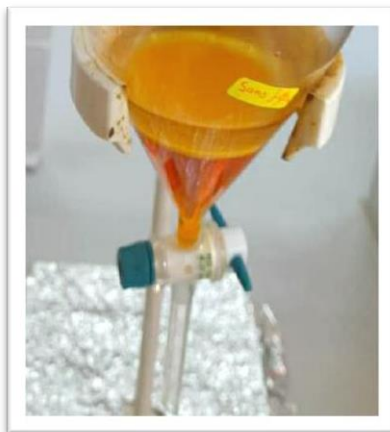


Figure 18 : Montage de cristallisation

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

I.2.2. 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 (**Kawahima et al., 2010**). Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage et est souvent utilisé pour évaluer l'efficacité d'une méthode d'extraction et pour optimiser les conditions d'extraction (**Ngamwonglumlert, Devahastin, and Chiewchan, 2017**).

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

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

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

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

I.2.3. Caractérisation du Naringine

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

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

I.2.3.1. 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 les 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 (ccm) est une technique rapide et économique qui permet de séparer et d'identifier efficacement différents composants d'un mélange. C'est une méthode courante en chimie analytique pour la caractérisation de composés organiques et elle est utilisée dans de nombreux domaines de recherche, notamment la chimie, la biochimie, et la pharmacologie (**Sherma 2000**).

✓ Appareillage

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

✓ Procédure

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

1. Préparer la plaque de silice gel en coupant la taille souhaitée pour l'expérience et en la marquant sur un côté avec un crayon graphite.

2. Préparer la solution de naringine à tester en la diluant dans l'éthanol et en l'appliquant sur la plaque à l'aide d'une pipette.
3. Laisser sécher la plaque jusqu'à ce que la solution soit complètement absorbée et que la plaque soit sèche.
4. Placer la plaque dans une cuve contenant l'éthanol de manière à ce que la plaque soit immergée de quelques millimètres dans le solvant.
5. Laisser la plaque dans la cuve jusqu'à ce que le solvant ait migré sur toute la hauteur de la plaque.
6. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher.
7. Révéler les composants de l'échantillon en utilisant un 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.

I.2.3.2. Caractérisation par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC):

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

✓ Appareillage

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

✓ Procédure

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

I.2.3.4. 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.

I.2.3.5. Caractérisation par spectroscopie UV-visible :

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

✓ Appareillage

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

✓ Procédure

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

I.2.4. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité biologique :

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).

I.2.4.1. Évaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre (DPPH))

A. Principe

D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant des groupes SH, NH et OH. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un azote. Ce radical ne forme pas des dimères, il reste donc sous sa forme monomère qui est relativement stable. (Popovici et al., 2009).

La réduction du DPPH par un agent antioxydant en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle (Figure 19). (Molyneux, 2004).

Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Popovici et al., 2009) peut être suivie spectrophotométriquement en mesurant la diminution de son absorbance entre 515-518 nm (Molyneux, 2004).

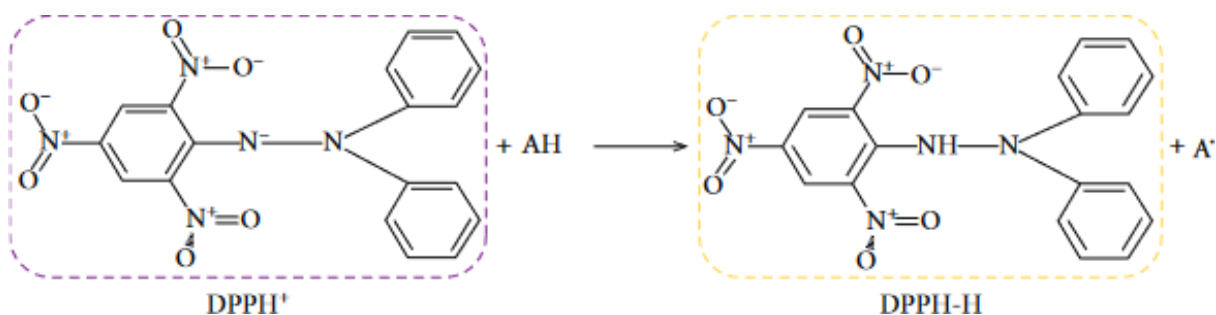


Figure 19 : Forme libre et réduite du DPPH• (Allaoui et al., 2020)

B. Protocole de l'activité anti-radicalaire par le test DPPH

Selon le protocole décrit par (Bouhamdi, 2012). Le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène. Le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine).

- **Préparation de dilutions d'extrait**

Des dilutions dans méthanol va préparer à partir de l'extrait brut (solution mère 10 mg/ml). Pour différentes concentrations de 8mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, et 2.5 mg/ml.

En utilisant la formule suivante $C_1 V_1 = C_2 V_2$

- ✓ C1: Concentration de l'extrait dans 1 ml ;
- ✓ C2: Concentration voulu dans la dilution ;
- ✓ V1: Volume rechercher ;
- ✓ V2: Volume final. Une fois le volume rechercher (V1) est calculé. Le reste du volume est complété pour atteindre le volume final.

- ✓ **Mode opératoire**

- Nous avons préparé une solution de DPPH (0.024 mg/ml) par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.
- Les tubes control contiennent à la place de l'extrait 50 µl de méthanol et 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH fraîchement préparée.
- Les autres contiennent 50 µl de différentes concentrations de l'extrait et 1.950 ml de solution de DPPH.
- Le mélange est laissé à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes et mesurée à 517 nm

- ✓ **Expression des résultats**

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire\%} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 12,5mg/ml. Alors que pour l'antioxydant standard (alpha-tocoferol), est comprises entre 0 et 0,1 mg/ml.

IC50 : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

I.2.4.2. Méthodes d'évaluation in silico de l'activité biologique :

I.2.4.2.1. 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).

A. 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 20.

La structure tridimensionnelle de l'alpha-tocophérol (Numéro d'accès PubChem: 1742129) provienne du Bank du Médicament (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) est présentée dans la Figure 21 (Clissold SP et al., 1988).

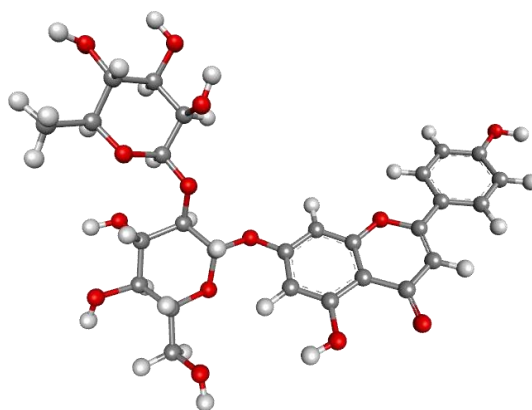


Figure 20 : Structure de naringine optimisée avec B3LYP/6-311++G(d,p)

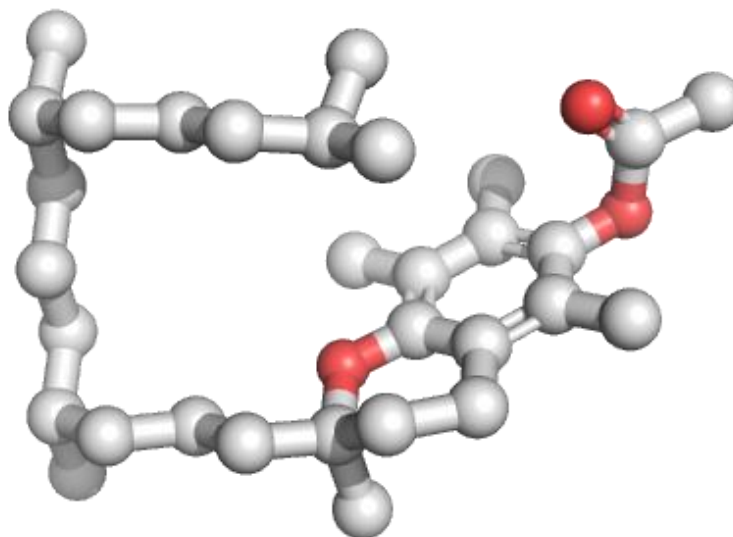


Figure 21 : Représentation PyMOL de l'alpha-Tocopherol PubChem CID: 1742129

B. Préparation des récepteurs

Les études d'amarrage moléculaire des ligands Naringine et Alpha-Tocopherol ont été réalisées sur une structure cristalline tridimensionnelle (Tableau 4), l'enzyme glutathionne réductase (PDB ID: 1GRE) avec une longueur de séquence égal à 478 acide aminé, extrait de la Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) (Gilles, C et al., 1996).

Tableau 4 : Structure tridimensionnelle de glutathionne réductase (PDB ID : 1GRE).

	<i>glutathione reductase</i>	
	PDB ID	1GRE
	Resolution (Å)	2.00
	Mutation	No
	R-Value	0.155
	Space Group	B 1 1 2
	Chains	A
	Organism	Homo sapiens

C. 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 le récepteur, tel qu'indiqué dans le tableau 5, 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 5 : Les paramètres de docking sélectionnés pour le récepteur cible

Récepteur	Centre de grille			Taille de grille (Å)		
	X	Y	Z			
1GRE	59.532	48	15	60	60	60

Chapitre II :

Résultats et Discussion



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

II.1. Caractérisation :

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

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

Les résultats de la CCM ont montré que le naringine présentait une tache unique (Figure 22) avec une R_f (facteur de rétention) de 0.7407 lorsqu'il était évalué à l'aide de solvant hexane- méthanol. La tâche de naringine a été révélée en utilisant l'iode solide, qui a montré une coloration orange-brun caractéristique. Ces résultats ont confirmé la présence et la pureté de naringine dans l'extrait de la plante de mandarine (**Giannuzzo et al., 2003**).

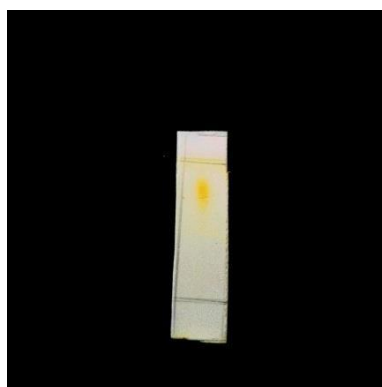


Figure 22 : Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine

II.1.2. Caractérisation par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait un temps de rétention de 34.128 ± 0.5 minutes (Figure 23) lorsqu'il était séparé en utilisant le gradient de solvant acétonitrile-méthanol. De plus, les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait un

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

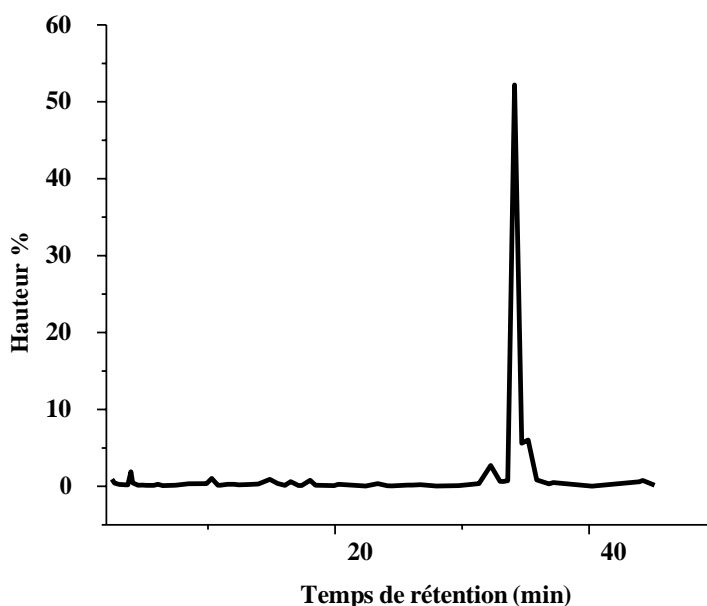


Figure 23 : Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine

II.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

Le naringine extrait de mandarine a été caractérisé par spectroscopie infrarouge (IR) pour confirmer la présence de groupes fonctionnels caractéristiques de la molécule. Le spectre IR du naringine a été comparé à un spectre IR de référence de naringine, obtenu depuis Alfa Aesar (Figure 24).

Le spectre IR du naringine a montré des pics de vibration caractéristiques pour les liaisons O-H, C-H, C=O, et C-O. Le pic à 3404.91 cm^{-1} correspond à la liaison O-H caractéristique des groupes phénoliques présents dans la molécule de naringine. Le pic à 2933.92 cm^{-1} correspond à la vibration des liaisons C-H de l'anneau aromatique. Le pic à 1264.53 cm^{-1} correspondent à la vibration de la liaison C-O, qui est caractéristique des groupes ester et éther. Dans le cas de la naringine, cette bande est attribuée à la présence d'un groupement éther. Le pic à 1519.95 cm^{-1} est due à la vibration de déformation de la liaison C-C et C-O, qui est caractéristique des cycles aromatiques. Le pic à 1037.76 cm^{-1} est due à la vibration d'élongation de la liaison C-O-C, qui est caractéristique des groupes éther.

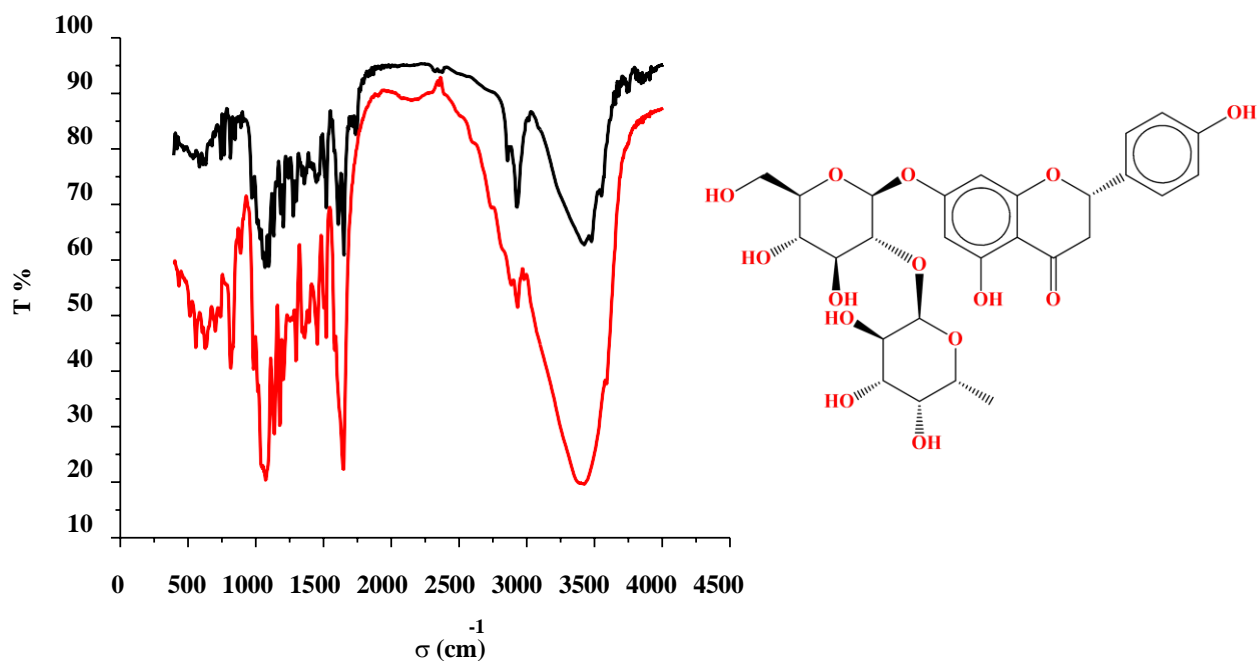


Figure 24 : Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)

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

II.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-visible :

La spectroscopie d'absorption UV-visible a été utilisée pour caractériser le naringine extrait de mandarine. Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de 283 nm (Figure 25), correspondant au maximum d'absorption du naringine.

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

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

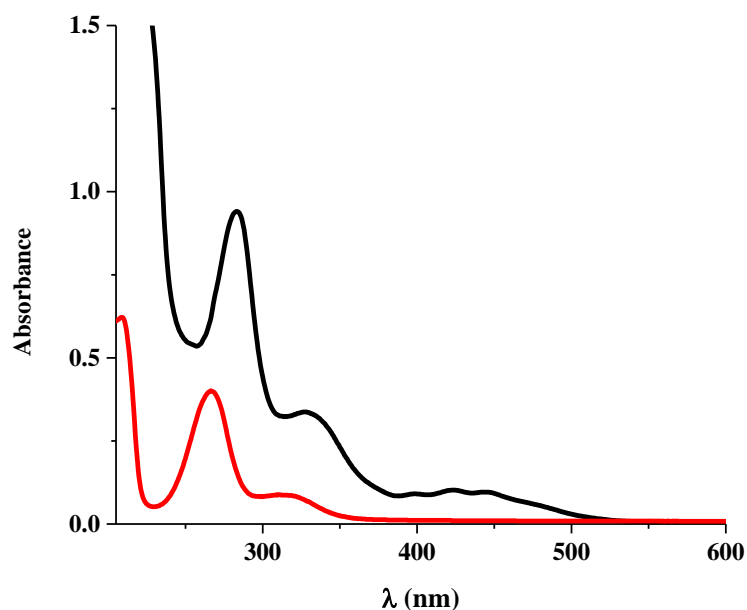


Figure 25 : Spectre UV du naringine extrait (Ligne noire) et de naringine référence (Ligne rouge)

II.2. Évaluation In Vitro de l'activité antioxydant :

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 26 montre la courbe d'étalonnage linéaire dans la plage de concentration étudiée (mg/mL) pour la naringine et l'alpha-tocophérol.

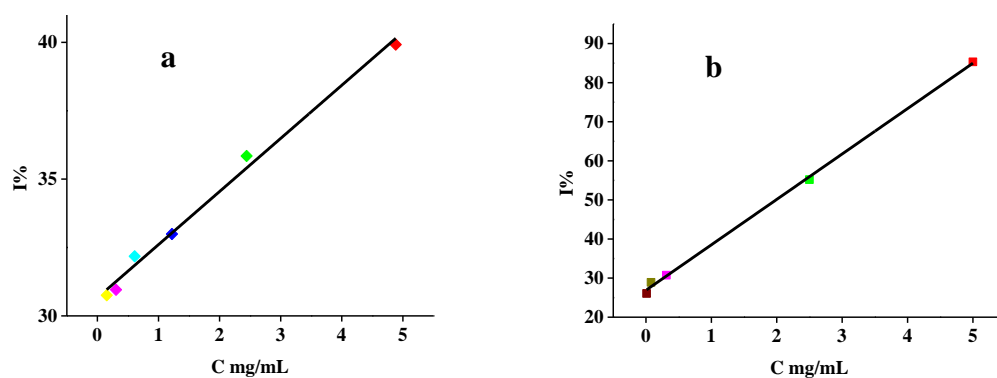


Figure 26 : Droites de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour Narin-

gine (a) et Alpha-tocophérol (b).

On a remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui des standards pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 2.8 mg/ml le standard ont révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 54% pour l'alpha-tocopherol, et de 37% pour l'extrait naringine. Concernant le naringine et le standard, pour une concentration de 5 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 40 % pour le naringine tandis que le standard est de 85%. 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 6.

Tableau 6 : Valeurs IC50 (mg/mL) obtenues en utilisant l'activité de piégeage des radicaux DPPH.

Composé	Équation	R ²	IC50
Naringine	$y = 1.941x + 30.66$	0.990	0.099
Alpha-tocophérol	$y = 11.619x + 26.89$	0.998	0.019

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 0.099 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 0.019 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-tocopherol 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**).

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 de 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**).

II.2.1. Etude spectroscopique de l'interaction avec DPPH :

Le tableau 7 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 7 : Valeurs des absorbances obtenues par test DPPH

Naringine		Alpha-tocophérol	
C mg/ml	Abs	C mg/ml	Abs
10	0.1	10	0.078
5	0.342	5	0.072
2.5	0.376	2.5	0.22
1.25	0.334	1.25	0.351
0.625	0.361	0.625	0.334
0.3125	0.351	0.3125	0.34
0.15625	0.38	0.15625	0.338
0.078125	0.346	0.078125	0.349
0.0390625	0.391	0.0390625	0.313
0.01953125	0.335	0.01953125	0.348
0.009765625	0.347	0.009765625	0.363
0.004882813	0.295	0.004882813	0.324
0.002441406	0.32	0.002441406	0.307
0.001220703	0.337	0.001220703	0.305
0.000610352	0.315	0.000610352	0.302
0.000305176	0.329	0.000305176	0.299

II.2.1. Constantes de liaison :

La variation des valeurs d'absorbance par l'augmentation de la concentration de naringine

et alpha-tocophérol a été utilisée pour évaluer la constante de liaison intrinsèque en utilisant l'équation (1) suivante (Li et al., 2005 ; Aslanoglu, 2006).

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

Où [composé] est la concentration de naringine ou alpha-tocophérol, Kb est la constante de liaison, A0 et A sont respectivement l'absorbance de DPPH en l'absence et en présence de agent antioxydant, et ε_G et ε_{H-G} sont leur coefficient d'extinction respectif.

La constante Kb 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 27.

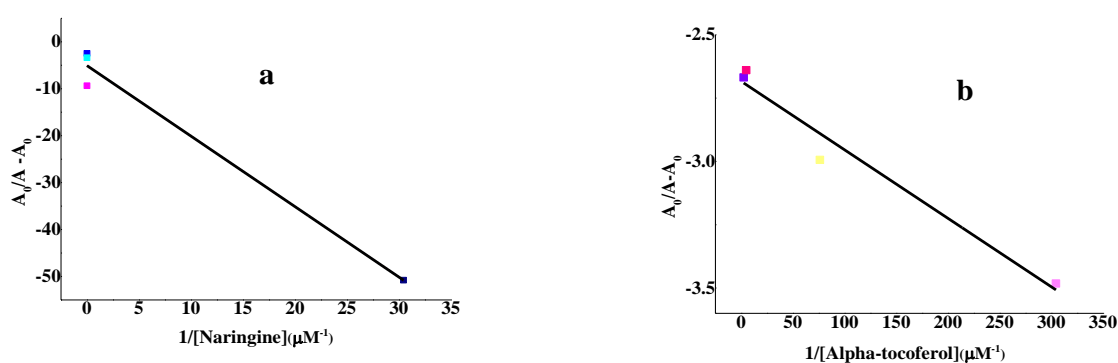


Figure 27 : Représente les graphes de $A_0/(A - A_0)$ en fonction de $1/[\text{Composé}]$ utilisés pour calculer les constantes de liaison des composés naringine (a) et alpha-tocophérol (b) avec DPPH.

II.2.2. Énergie libre de liaison :

Le changement d'énergie libre de liaison a été calculé en utilisant l'équation (2) suivante (B. L. Wang et al., 2020) :

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (2)$$

Où ΔG est l'énergie libre de liaison en KJ.mol^{-1} , R est la constante des gaz parfaits, $8,32 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, et T est la température absolue, 298K. Les valeurs sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Les valeurs de la constante de liaison et de l'énergie libre de liaison pour naringine et alpha-tocophérol avec le DPPH à partir des données UV à T = 298K

Composés	Equations	R ²	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Naringine	y = -0.015x - 5.079	0.973	3.38 × 10 ⁵	-31.56
Alpha- tocophérol	y = -2.7 x - 2.684	0.950	9.92 × 10 ⁴	-28.52

Les résultats obtenus montrent que la naringine et alpha-tocophérol a une forte affinité avec DPPH, avec des constantes de liaison élevées de $3.38 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour la naringine et $9.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour l'alpha-tocophérol. Ces valeurs indiquent une forte interaction entre la naringine et l'alpha-tocophérol et la macromolécule biologique étudiée (**Khennoufa et al., 2021**). En outre, les valeurs de l'énergie libre de liaison (ΔG) sont également élevées, de -31.56 KJ.mol⁻¹ pour la naringine et de -28.52 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 naringine 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 naringine 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 la naringine, le coefficient de détermination (R²) associé à cette équation est de 0.973, 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 naringine et DPPH, est de $3.38 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Une valeur plus élevée de K indique une liaison plus forte entre la naringine et l'enzyme (Hirose, 2001). La variation d'énergie libre ($-\Delta G$), qui représente la spontanéité de la réaction d'adduction, est de -31.56 kJ/mol.

Pour l'alpha-tocophérol, un coefficient de détermination (R²) de 0.950. La constante de

liaison

(K) est de $9.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, ce qui indique une liaison moins forte entre l'alpha-tocophérol et le DPPH par rapport à la naringine. La variation d'énergie libre standard ($-\Delta G$) est de -28.52 kJ/mol .

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

II.3. Évaluation in silico de l'activité biologique :

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.

II.3.1. Évaluation de l'activité antioxydant :

II.3.1.1. Simulations d'amarrage :

L'étude de l'amarrage moléculaire des composés naringine et alpha-tocophérol ont été ancrés dans l'enzyme glutathione réductase afin de prédire le mode de liaison possible des complexes avec la protéine et de mieux visualiser les interactions. Les études de simulation moléculaire prédisent également le site de liaison sélectionné ainsi que la meilleure configuration des ligands étudiés à l'intérieur de l'enzyme.

Avant d'effectuer les calculs d'amarrage, toutes les molécules d'eau cristallographiques ont été retirées de la structure cristalline de glutathione réductase, des atomes d'hydrogène ont été ajoutés, et des charges partielles ont été attribuées au fichier de structure de glutathione réductase.

Les énergies libres de liaison, les constantes de liaisons, et les valeurs de l'IC50 résultante des adduits ancrés glutathione-réductase_naringine et glutathione-réductase_alpha-

tocophérol est résumée dans le tableau 9.

Tableau 9 : L'énergie libre de liaison ΔG et IC50 de Naringine et Alpha-Tocophérol obtenu paramarrage moléculaire.

Adduct	Naringine	Alpha-tocopherol
$\Delta G / \text{kJ.mol}^{-1}$	-33.98	-35.98
IC50 / μM	20.64	1.31

La vue de l'interaction présentée dans la (Figure 28) indique le positionnement des complexes étudiés dans le site actif de la protéine.

De plus, les résultats d'amarrage de naringine et alpha-tocophérol avec le glutathion réductase ont clairement montré la formation des liaisons électrostatiques (Figure 28) entre les acides aminés de l'enzyme et les ligands étudiés.

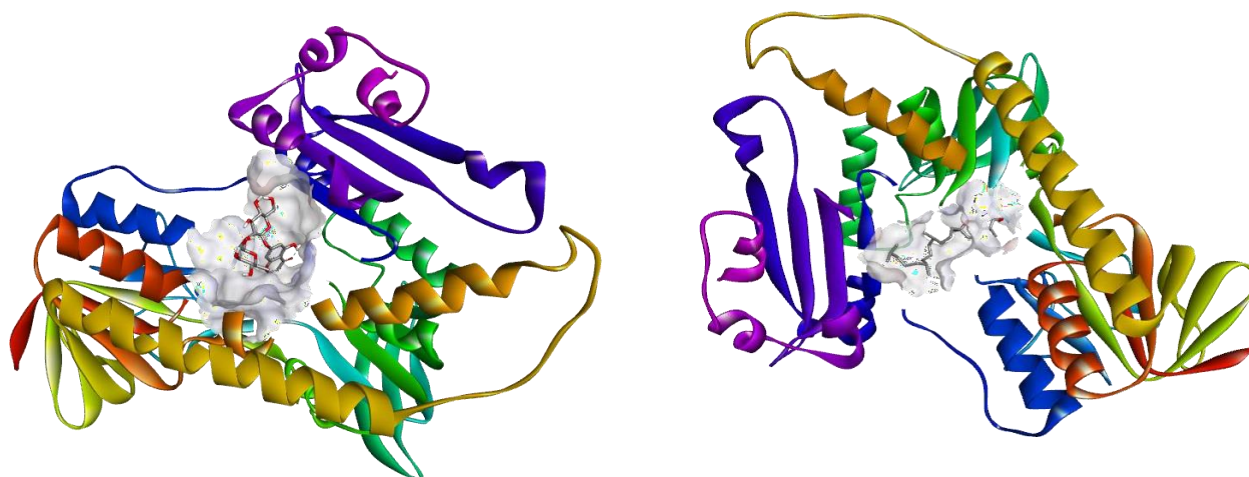


Figure 28 : Poses d'amarrage de naringine et alpha-tocophérol avec glutathion réductase (PDBID : 1GRE) illustrant l'interaction de tous les ligands.

La distance entre des liaisons formées sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Les distances des liens formés entre 1GRE et Naringine et Alpha-Tocophérol.

Molécule	Type de liaisons	Acide aminé (numéro de liaison/interactions)	Distance, Å

Naringine_1GRE	Liaison H	GLY29, GLY31, GLY32, GLU50, SER51, HIS129, ALA155, ASP178, ASN294, LEU337	2.60, 2.92, 3.36, 2.71, 2.92, 3.99, 2.42, 2.64, 3.91, 3.16
	Interactions Hydrophobique	THR57	3.76
Alpha- to- cophérol_1GRE	Liaison H	SER51, HIS52, HIS129	2.85, 3.81, 3.07
	Interactions Hydrophobique	THR57, THR156, ALA342	3.55, 3.28, 3.68

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 -33.98 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 20.64 µM.

Pour Alpha-tocoferol, 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 -35.98 kJ/mol et une concentration inhibitrice efficace de 1.31 µM.

Les résultats suggèrent que les composés Naringine et Alpha-tocoferol ont une forte affinité de liaison à 1GRE. En outre, l'alpha-tocoferol a montré une plus grande activité inhibitrice que la naringine, avec une concentration inhibitrice efficace de 1.31 µM, contre 20.64 µM 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-tocoferol 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 1GRE, 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 1GRE sont des indicateurs importants de la nature et de la force des interactions moléculaires. Ils fournissent des informations clés pour comprendre la stabilité et la spécificité des complexes ligand-cible formés lors de l'amarrage moléculaire.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec 1GRE sont présentées dans les figures 29-30 suivants :

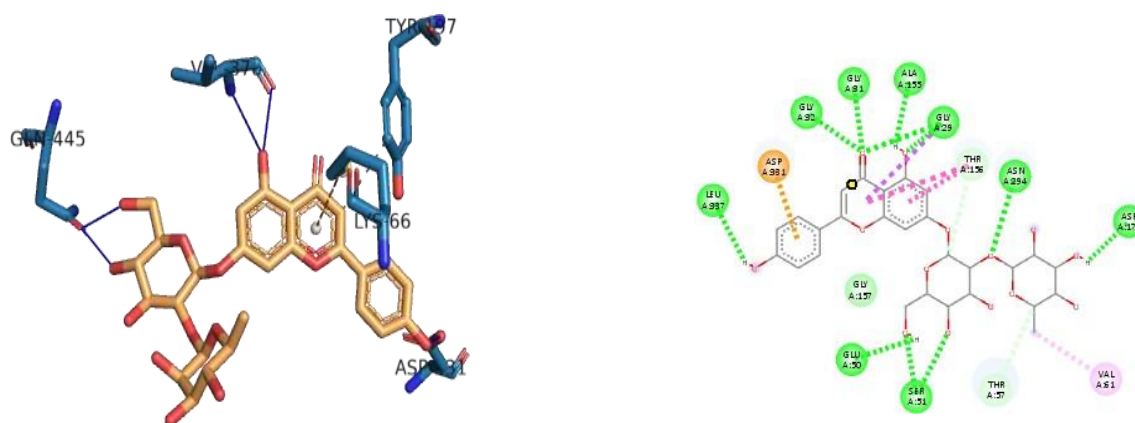


Figure 29 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec 1GRE.

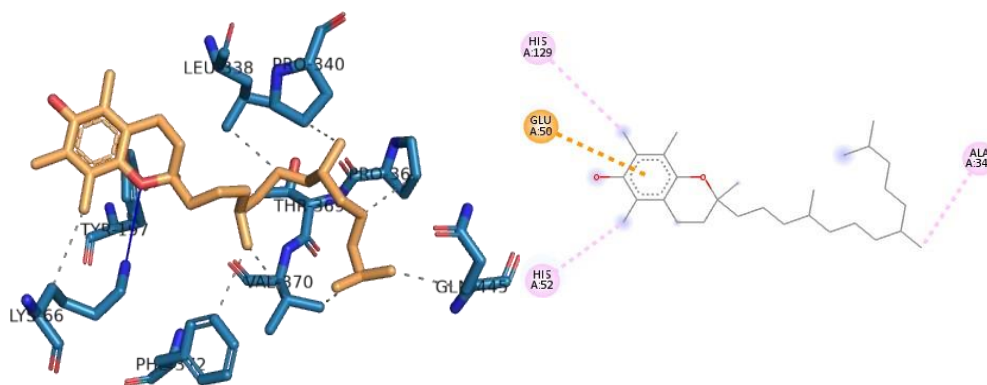


Figure 30 : Présentation 2D et 3D du ligand alpha-tocophérol avec 1GRE.

Le tableau 11 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 11 : Comparaison des paramètres de liaison et d'IC₅₀ pour les activités biologiques obtenues par UV et amarrage moléculaire.

	UV-Vis			Amarrage moléculaire		
	IC ₅₀ (μM)	K (M^{-1})	$-\Delta\text{G}$ (KJ.mol^{-1})	IC ₅₀ (μM)	K (M^{-1})	$-\Delta\text{G}$ (KJ.mol^{-1})
Naringine	171.63	3.38×10^5	-31.56	20.64	8.95×10^5	-33.98
Alpha-tocophérol	34.252	9.92×10^4	-28.52	1.31	2.01×10^6	-35.98

La comparaison entre les résultats obtenus par les tests *in vitro* (UV-visible), et *in silico* (amarrage moléculaire), dans le tableau 11 peut fournir des informations intéressantes sur la corrélation entre les données expérimentales et les prédictions basées sur la modélisation moléculaire.

Dans le cas de la naringine, les résultats montrent que les valeurs d'IC₅₀ obtenues par les tests *in vitro* est de 171.63 μM , tandis que le valeur d'IC₅₀ prédites par l'amarrage moléculaire *in silico* est de 20.64 μM . On observe donc une différence notable entre les deux méthodes, avec des valeurs d'IC₅₀ généralement plus élevées obtenues par les tests *in vitro* par rapport à

l'amarrage moléculaire in silico.

De plus, les valeurs 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).

Discussion générale :

Les résultats in vitro, par la méthode de la spectroscopie électronique révèlent que le naringine étudié montrent une inhibition vis-à-vis le DPPH. Les résultats sont exprimés dans un premier temps en pourcentage d'inhibition et ensuite par les IC50 (la concentration d'échantillon nécessaire pour diminuer l'activité radicalaire à 50%). Le pourcentage d'inhibition varie d'un composé à un autre en fonction de la concentration utilisée ; il augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les valeurs de l'énergie libre de liaison varient dans le même ordre que celle de la constante de liaison ; leur insigne indique la spontanéité de la réaction d'interaction de DPPH avec les composés étudiés.

La complexité des extraits bruts en substances poly phénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydant a été signalée par (Atti Ikram, 2014).

Boland et Tenhave ont postulé en 1947 que les réactions selon lesquelles les composés phénoliques interfèrent avec l'oxydation des lipides en cédant leurs hydrogènes aux radicaux lipidiques, puis entrent en compétition avec les réactions de propagation (Atti Ikram, 2014).

Plusieurs études, ont rapporté que les propriétés thérapeutiques des plantes utilisées en médecine traditionnelle sont dues à leurs richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les triterpénoïdes, les stérols, les tannins, les alcaloïdes, les sesquiterpénoïdes, les curcumines, les coumarines, les composés phénoliques, les caroténoïdes, les vitamines (A, E et C), les huiles essentielles et volatiles et les polysaccharides (**Iwalewa et al., 2007 ; Satyanarayana et al., 2008**).

Les aliments riches en polyphénols et en flavonoïdes présentent des effets bénéfiques à l'égard de la santé humaine (**Ad Nessorine, 2019**).

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité anti-oxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (**Atti Ikram, 2014**).

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine de plus en plus utilisée à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes, ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques (**Djedioui, 2010**).

Les composés polyphénoliques sont bien connus comme des agents antioxydants (**Lebham, 2005**).

Notre travail est complété par l'étude de plusieurs conformations d'un ligand in-silico via l'amarrage moléculaire. L'amplitude des énergies libres de liaison calculées indique une affinité de liaison élevée entre glutathion réductase et les ligands étudiés. Les constantes de liaison ont été conclues à partir des valeurs d'énergie de liaison à l'aide de l'équation (1) décrite précédemment. Les valeurs d'énergie libre de liaison obtenues ainsi que l'IC50 sont très proches de celles obtenues par spectroscopie électronique. Ainsi, nous pouvons voir qu'il y avait un complément mutuel entre les études expérimentales et la technique d'amarrage moléculaire, ce qui peut valider nos tests expérimentaux et fournit une preuve supplémentaire de l'interaction d'inhibition.

L'analyse des données a montré que tous les composés sélectionnés ont formé des liaisons électrostatiques soit de type hydrogène ou bien hydrophobique avec l'enzyme cible ; il est remarquable que tous les composés interagissent avec les acides aminés de site actif.

Une étude réalisée par (**Kumar VS et al. J Biomed Res, 2014, 28**) Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de la naringine sur la maladie intestinale inflammatoire induite expéri-

mentalement chez le rat a été déduit que le traitement avec la naringine a augmenté de manière significative la diminution du niveau de GSH (glutathione) et stoppé la progression du stress oxydatif. Le GSH est un membre indispensable de la famille des piègeurs de radicaux libres antioxydants, qui convertit le H₂O₂ en H₂O (**Sies H, 1999**).

Par conséquent, des niveaux inférieurs de GSH montrent la progression du stress oxydatif et l'épuisement de l'équilibre entre les enzymes pro et oxydatives dans les cellules (**Hagar HH et al, 2007**). Le glutathion réduit (GSH) est le principal agent antioxydant non enzymatique intracellulaire (**Jacob, 2007**). Le GST est l'enzyme qui catalyse la conjugaison du glutathion (GSH), celui-ci possède la capacité de désintoxication, où semble leur rôle dans la protection cellulaire du stress oxydatif (**Schwab, 2011**).

La naringine est un puissant antioxydant avec capacité de piègeur de radicaux libres, et divers chercheurs ont également signalé sa chélation des métaux potentiel (**Chen et al., 2013**).

Conclusion générale et perspective



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. Les résultats ont montré que la naringine possède plusieurs activités biologiques intéressantes, notamment antioxydant, ce qui en fait un composé potentiellement utile pour la médecine et la pharmacologie.

Concernant l'activité antioxydant, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de l'extrait de mandarine par la capacité de piégeage de radical libre DPPH. Nous avons constaté pour l'activité antioxydant par la méthode de DPPH, ont remarqué une activité antioxydant très importante de naringine. Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que l'extrait de la plante de mandarine ont une bonne activité antioxydant et une capacité de piégeage de radicaux libres intéressante.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres.

On conclut que nos dérivés ayant un potentiel d'inhibition de DPPH et nous espérons que l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances biologiquement actives visés à traiter le stress oxydatif.

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 stress oxydatif. Des études complémentaires pourraient être menées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activité biologique de la naringine, notamment l'effet sur d'autres enzymes impliquées dans cette maladie.

En outre, l'étude de la structure de naringine pourrait être approfondie pour améliorer sa bio activité en concevant des analogues de naringine plus efficaces. Les méthodes *in-silico* pourraient être utilisées pour prédire l'activité biologique de ces analogues avant leur synthèse et leur test *in vitro*. Des études cliniques pourraient également être envisagées pour évaluer l'efficacité de la naringine chez l'homme et pour établir une dose thérapeutique optimale.

Enfin, étant donné que l'étude a également révélé des résultats prometteurs pour l'utilisation de la naringine comme agent antioxydant contre le stress oxydatif, il serait intéressant d'explorer davantage son potentiel en tant qu'agent antioxydant dans des modèles *in vivo*.

Références

Références :

- ✓ Abderrazak M., & Joël R., 2007 : La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. ISBN 10: 2100506382.P:177.
- ✓ Abouo, V. N., Sadat, A., Akmel, C. D., Assidjo, E. N., & Amani, G. N. (2016). Impact of Solar and Microwave Oven Drying on A Few Chemical Parameters of Market Value Quality of Fermented Forastero (*Theobroma Cacao* L.). *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 12(4), 402-406.
- ✓ Ad Nessrine, 2019. " Caractérisation phytochimique et étude de quelques activités biologiques de deux plantes *Capparis spinosa* et *Camellia sinensis*", mémoire de master en biochimie appliqué, Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued. 36p.
- ✓ Adisa, Rahmat A, Mohammed I Choudhary, and Olufunso O Olorunsogo. 2011. -Hypoglycemic Activity of *Buchholzia Coriacea* (Capparaceae) Seeds in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats and Mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63(7):619–25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299310000801>.
- ✓ Agustí, M., Zaragoza, S., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Klose, R., & Staub, R. (1997). Adaptation de l'échelle BBCH à la description des stades phénologiques des agrumes du genre *Citrus*. *Fruits*, 52(5), 287-295.
- ✓ Albert, Klaus, and Ernst Bayer. 1991. -Characterization of Bonded Phases by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 544: 345–70.
- ✓ Allaoui, S., Bennani, M. N., Ziyat, H., Qabaqous, O., Tijani, N., Ittobane, N., Barbouchi, M., Bouymajane, A., & Filali, F. R. (2020). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenols Extracted after Adsorption onto Natural Clay Ghassoull. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2020/8736721>
- ✓ Apraj VD, Pandita NS, 2014. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Citrus Reticulata* blanco peel. In : School of Science, SVKM's NMIMS, Vile-Parle (W), Mumbai 400 056, India. 6(2); 328-33.
- ✓ Asahina Y, Inubuse M. Über die Konstitution des Naringenins (II. Mitteilung über die Flavanon-Glucoside). *Chemische Berichte* 1928; 61: 1514.
- ✓ Asgarpanah J. and Kazemivash N. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrum sativum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(31): 2340-2345.
- ✓ Aslanoglu, M. (2006). Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Interaction of Proflavine with DNA. *Anal. Sciences*, 22, 439.

- ✓ Atawodi S. E. (2005). Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotech.* 4 (2): 128- 133.
- ✓ Atti Ikram, 2014 "Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices Ras elhanout" Mémoire de Master en Biochimie appliqué. Université KASDI MERBAH Ouargla. 58p.
- ✓ AutoDock4 and AutoDockTools4: 2009. – Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry* 30(16): 2785–91.
- ✓ Azzi, A., and Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Pro.Lipid Res*, 39(3), 231- 255.
- ✓ BALASUNDRAM N., SUNDRAM K., et SAMMAN S., 2006- Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, Vol. 99: 191–203.
- ✓ Barbelet, S. (2015). Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle, Université de Lorraine.
- ✓ Baudoux D., Breda M., Zhiri A., 2012, Aromathérapie scientifique : Huiles essentielles chémotypées. 1e éd. Belgique : J.O.M, 98 pages.
- ✓ Becke, A D. 1993. –Density-Functional Thermochemistry. III The Role of Exact Exchange *J Chem Phys* 98: 5648–5652.
- ✓ Begum, Robina et al. 2018. –Applications of UV/Vis Spectroscopy in Characterization and Catalytic Activity of Noble Metal Nanoparticles Fabricated in Responsive Polymer Microgels: A Review. *Critical reviews in analytical chemistry* 48(6): 503–16.
- ✓ Boggia, R., Zunin, P., Hysenaj, V., Bottino, A., & Comite, A. (2015). Dehydration of Basil Leaves and Impact of Processing Composition. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 645–653.
- ✓ Boskey, Adele L, and Richard Mendelsohn. 2005. –Infrared Spectroscopic Characterization of Mineralized Tissues. *Vibrational Spectroscopy* 38(1–2): 107–14.
- ✓ Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*,(9), 14 – 19.
- ✓ Bouhamdi, A. (2012). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des feuille de *Pergularia tomentosa L.* de la région d'Adrar. Mémoire de Master en Biochimie appliqué. Université Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen. 57 p.

- ✓ BOULANGER P et POLONVSKI J., 1969- Traité de biochimie. Tome III. Ed. Masson, Paris: 760-770.
- ✓ BOUSBIA, NABIL. 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. 2011. Thèse de doctorat. Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie).
- ✓ Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., 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).
- ✓ Bruneton J., Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales (4eme Ed.). Tec & Doc/Lavoisier, Paris, 2009, p. 279-281.
- ✓ Cassin J.P., 1984 – Comportement des variétés dans les différentes régions de la production. *Revue fruits*, vol.4, pp 263-276.
- ✓ Chandrasekhar S, Vijeender K et Reddy KV (2005) New synthesis of flavanones catalyzed by L-proline. *Tetrahedron Letters*. 46 : 6991–6993.
- ✓ 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.
- ✓ Characterization of Water-soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosol: A New Approach. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105(D1): 1481–89.
- ✓ Chen, Y., Nie, Y.C., Luo, Y.L., Lin, F., Zheng, Y.F., Cheng, G.H., Wu, H., Zhang, K.J., Su, W.W., Shen, J.G., Li, P.B., 2013. Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Food Chem Toxicol* 58, 133-140.
- ✓ Choi MS, Do KM, Park YS, Jeon SM, Jeong TS, et al. (2001) Effect of naringin supplementation on cholesterol metabolism and antioxidant status in rats fed high cholesterol with different levels of vitamin E. *Annals of Nutrition and Metabolism* 45(5): 193-201.
- ✓ Chu W. L , Lim Y.W, Radhakrishnan A . K. & Lim P. E. 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementar and alternative Medicine*, 10(59):2-8.
- ✓ Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties : Phenolic compounds in protein digestion.... *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety, 17(1), 82- 103.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>.
- ✓ Colombo, A. 2004. La culture des agrumes. Vecchi S.A, Paris. 8548.133p.
 - ✓ Cordenonsi, Leticia Malgarim et al. 2017. -Study of Flavonoids Presente in Pomelo (Citrus Máxima) by DSC, UV-VIS, IR, 1H and 13C NMR and MS. *Drug Analytical Research. Porto Alegre. Vol. 1, n. 1 (2017), p. 31-37.*
 - ✓ Decesari, Stefano, Maria Cristina Facchini, Sandro Fuzzi, and Emilio Tagliavini. 2000.
 - ✓ DeLano, Warren L. 2002. -Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* 40(1): 82–92.
 - ✓ Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.
 - ✓ 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.
 - ✓ Djediou A., (2010). Evaluation De L'activité Hypoglycémiant et Anti-hyperglycémiant De L'extrait Aqueux D'Inulaviscosa ; Une Plante De L'est Algérien Chez Le Rat Avec Un Diabète Induit. Mémoire Magister. Badji Mokhtar Université Annaba, p: 55.
 - ✓ Eric K et Rowinsky M.D., 1997. The development and Clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.* 48, 74-353.
 - ✓ F.A.O., 2002. Production 2001. Collection F.A.O. Statistique 55(170), Rome, 259 p.
 - ✓ Fain, O. (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne* 25, 872–880.
 - ✓ Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* pp: 108-115.
 - ✓ Fuhr U, Kummert AL. 1995 The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *J Clin Pharm. Ther*;58: 365–373.

- ✓ Ganther H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxinreductase. *Carcinogenesis*.20 (19): 1657-1666.
- ✓ Gattuso, G. (2020). Citrus Flavones : An Update on Sources, Biological Functions, and Health Promoting Properties. *Plants*, 9(3), 288. <https://doi.org/10.3390/plants9030288>.
- ✓ Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescencemethod. *AAPS Pharm Sci*. 5 (2):5p.
- ✓ Gharibi, S., Sayed Tabatabaei, B. E., Saeidi, G., Talebi, M., & Matkowski, A. (2019). The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech.f. *Phytochemistry*, 162, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.004>.
- ✓ Ghosal, Kajal, Dipanwita Ghosh, and Sanjoy Kumar Das. 2018. -Preparation and Evaluation of Naringin-Loaded Polycaprolactone Microspheres Based Oral Suspension Using Box-
- ✓ Giannuzzo, Amelia N, Héctor J Boggetti, Mónica A Nazareno, and Horacio T Mishima. 2003.
- ✓ González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., & García-Villalba, R. (2020). Structural Diversity of Polyphenols and Distribution in Foods. In F. A. Tomás-Barberán, A. González-Sarrías, & R. García-Villalba (Éds.), *Dietary Polyphenols* (1re éd., p. 1-29). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch1>.
- ✓ Gravot A., 2008. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- ✓ Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*. 19: 141-158.
- ✓ HACHEM Rand, (2020). Détermination in vitro et in silico des risques mutagènes et/ou cancérogènes de quelques pesticides les plus utilisés en agriculture dans la région d'Eloued. Mémoire de Master en toxicologie. Université d'Eloued. 85p
- ✓ Hadj salem J 2009. (doctorat) Extraction, Identification, Caractérisation des Activités

- Biologiques de Flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et Synthèse de Dérivés de ces Molécules par Voie Enzymatique. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- ✓ Hagar HH, El-Medany A, El-Eter E, Arafa M. Ameliorative effect of pyrrolidinedithiocarbamate on acetic acid induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 554: 69-77.
 - ✓ Hanane, Bouanane, and Benloucif Ahlam. 2016. -Approche Pour La Conception de Médicaments Assistée Par Ordinateur.¶
 - ✓ Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
 - ✓ Hebi, M., & Eddouks, M. (2016). Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie*, 14, 17 – 22.
 - ✓ Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572 – 584.
 - ✓ Herrera, E., and Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.*, 57(1), 43-56.
 - ✓ High-Performance Liquid Chromatography.¶ *Chemical reviews* 119(6): 3674–3729.
 - ✓ Hirose, Keiji. 2001. -A Practical Guide for the Determination of Binding Constants.¶ *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 39: 193–209.
 - ✓ Ho PC, Saville DJ, Coville PF, Wanwimolruk S. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm Acta Helv* 2000; 74: 379–385.
 - ✓ Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Sci* 2001;4:217-27.
 - ✓ Huang Y. S. , S. C. Ho, Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel, *Food Chem.*, 119 (2010) 868-873.
 - ✓ Hvoslef, J. (1968). The crystal structure of l-ascorbic acid, vitamin C'. I. The X-ray analysis. *Acta Crystallographica Section B*, 24(1), 23-35.
 - ✓ Ishii K., et al., 1997. Determination of naringin and naringenin in human urine by high

- performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 704:299–305.
- ✓ Iwalewa EO, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff JN (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to
 - ✓ Jablonský, M, J Kočíš, A Ház, and J Šima. 2015. –Characterization and Comparison by UV Spectroscopy of Precipitated Lignins and Commercial Lignosulfonates. *Cell. Chem. Technol* 49(3–4): 267–74.
 - ✓ Jacob, L. (2007). *L'insuffisance rénale aiguë*. Ed. Springer Science & Business Media, France. 344p.
 - ✓ Jacques B, and André R. 2004. *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220- 223-225.
 - ✓ 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.
 - ✓ Jensen, S. R. (1992). Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 284-302.
 - ✓ Johnson, A.R., et al., 2013. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev*, 249: 218–238.
 - ✓ KAN Y., GOKBULUT A., KARTAL M., KONUKLUGIL B., et YILMAZ G., 2007- Development and Validation of a LC Method for the Analysis of Phenolic Acids in Turkish *Salvia* Species. *Chromatographia Supplement Vol. 66*: S147–S152.
 - ✓ 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.
 - ✓ KHENAKA K., 2011- Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Université Mentouri. Constantine. p81.
 - ✓ Khennoufa, Ali et al. 2021. –Spectrophotometric, Voltammetric and Molecular Docking Studies of Binding Interaction of N-Ferrocenylmethylnitroanilines with Bovine

- Serum Albumin. | *Journal of Molecular Structure* 1224: 129052.
- ✓ Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30:620-650.
 - ✓ Kruidenier, L. A., and Verspaget, H. W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Alim. Pharm. Ther.*, 16(12), 1997-2015.
 - ✓ Lamina S., Ezema C. I., Theresa A. I. and Anthonia E. U. (2013). Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* 2(2): 83-91.
 - ✓ Lanez, Elhafnaoui, Lazhar Bechki, and Touhami Lanez. 2019. -Computational Molecular Docking, Voltammetric and Spectroscopic DNA Interaction Studies of 9N-(Ferrocenylmethyl) Adenine. | *Chemistry & Chemical Technology*, 1 (13), 2019 (1): 11–17.
 - ✓ Lebbam., (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l' Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
 - ✓ Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.*, 30: 1076-1081.
 - ✓ Li, N., Ma, Y., Yang, C., Guo, L., Yan, X. (2005). Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *BiopHys. Chem.* , 116, 199.
 - ✓ Lim. T.K. (2012). *Citrus reticulata* Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer sciences et Business Media B.V; 4: 695-715.
 - ✓ Liochev S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 60: 1-4.
 - ✓ 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.

- ✓ Loussert, R.1989. Les agrumes. Volume 1 Arboriculture. Paris. France. Technique et Documentation Lavoisier. 113p.
- ✓ Lutge U., Kluge M., Bauer G., 2002 : Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris.P: 211.
- ✓ M.A.P. 1997. programme de réhabilitation et de développement de l'agrumiculture. Ed.Mini.agri.peche.alger 20 p.
- ✓ Ma Y., Ye X., Hao Y., Xu G., Xu G., Liu D. (2008). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel; *Ultrasonics Sonochemistry*; 15: 227–232.
- ✓ MADR (La Ministre de l'Agriculture et du développement du Rural).2009. La direction des statistiques Agricoles et des systèmes d'information. MADR. Algérie.
- ✓ Marais JJ, Deavours B, Dixon RA et Ferreira D 2006. The Stereochemistry of Flavonoids. In: Grotewold E (éd) *The Science of Flavonoids*. Springer, US, pp. 01-46.
- ✓ Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. (Thèse de doctorat : Université de LIMOGES), 181.
- ✓ Marouf A., Reynaud J. La botanique de A à Z. Dunod, Paris, 2007, p. 342.
- ✓ Martinez-Cayuela M. 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*.77: 147-161.
- ✓ Meddour A., Yahia M., Benkiki1 N., Ayachi A. 2011. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa L. *Lebanese Science Journal* 14(1):49-60.
- ✓ Melle HAMDAOUI Narimane & Melle HEDOUD Hadjer. Evaluation de quelques activités biologiques d'extrait préparé à partir de la plante *Plantago albicans* L d'El Oued. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Master. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED.
- ✓ Menichini. F, Loizzo M.R., Bonesi M., Conforti F., Luca D., Statti G. A., Cindio B., Menichini F.,Tundis R. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Dia-

- mante.
- ✓ Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E, Mauri PL, Spigno P, Soressi GP, Pietta PG. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 64–69.
 - ✓ Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26: 211-219.
 - ✓ 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.
 - ✓ Moulehi, S. Bourgou, I. Ourghemmi, T. M. Saidani, Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Ind. Crops Prod.*, 39 (2012) 74-80.
 - ✓ Mukht AR. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.
 - ✓ Mukht AR. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.
 - ✓ Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* 2 (7), 1-10.
 - ✓ Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33 : 2-16.
 - ✓ 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.

- ✓ Ognjanović, B. I., Pavlovic, S. Z., Maletic, S. D., Zikic, R. V., Stajn, A. S., Radojicic, R. M., and Petrovic, V. M. (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol. Res.*, 52(5), 563-570.
 - ✓ Pastre, J.O.C. 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 120p.
 - ✓ Perrin, Charles L, and Jennifer B Nielson. 1997. –‘Strong’ Hydrogen Bonds in Chemistry and Biology.‡ *Annual review of physical chemistry* 48(1): 511–44
 - ✓ Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63: 1035-1042.
 - ✓ Pinzi, Luca, and Giulio Rastelli. 2019. –Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery.‡ *International journal of molecular sciences* 20(18): 4331.
 - ✓ Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*,(4), 1– 8, 25-39.
- Rajesh K., Swamy A.H.M V., Inamdar S.S., Joshi V. and Kurnool A.N. (2013). Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of mentha arvensis leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *International Journal of PharmTech Research* 5(2): 426-430.
- ✓ Rangaswami S, Seshadri TR, Veeraraghaviah J. Constitution of naringin. The position of the sugar group. *J Proc Ind Acad Sci* 1939; 9: 328–332.
 - ✓ Rangaswami, S., Seshadri, T., 1939. 7-HydroXychromone-8-aldehydes and their conversion into chromono-7: 8- α -pyrones. In: *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A*. Springer, pp. 7–9.
 - ✓ Rapisarda P., Fabroni S., Peterek S., Russo G., Mock H.P. (2009). Juice of New citrus hybrids (*Citrus clementine* Hort ex Tan.C. *sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants; *Food Chemistry*; 117: 212–218.

- ✓ Rashida U., Ibrahimc M., Yasinb S., Yunusa R., Taufiq-Yapd Y.H., Knothee G. (2013). Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock; *Industrial Crops and Products*; 45: 355–359.
 - ✓ Reguieg L.2011. , Using medicinal plants in Algeria . *Am. J. Food. Nutr*, 1(3), 126-127.
 - ✓ Rincon A.M., Vasquez A.M., Sadille F.C. (2005). Chemical composition and bioactive compounds of flow of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and gape fruit (*Citrus paladin*) peels cultivated in Venezuela; *Arch Latinoam Nutr*; 55(3): 305-310.
 - ✓ Risch, M J et al. 1988. -Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004; C. Lee, W. Yang, RG Parr. *Phys. Rev. B* 37: 785.
 - ✓ Rissanen, Taija et al. 2006. -Characterization of Organic Compounds in Aerosol Particles from a Coniferous Forest by GC–MS. *Chemosphere* 64(7): 1185–95.
 - ✓ Rodriguez-Bernaldo, A. Q. F. S., Frecha, P. A., Vidal., & Lopez, H. J. (2010). Antioxydant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology*, 231 (3), 495-498
- Rouseff RL, Martin SF, Youtsey CO. Quantitative survey of narirutin, nar- ingin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem* 1987; 35: 1027–103.
- ✓ Salentin, Sebastian et al. 2015. -PLIP: Fully Automated Protein–Ligand Interaction Profiler. *Nucleic acids research* 43(W1): W443–47.
 - ✓ Satyanarayana T, Anjana AM and VijethaP (2008). Phytochemical and Pharmacological Review of Some Indian Capparis Species. *Pharmacognosy Reviews*[Phcog Rev.]. 2 (4): 36-45.
 - ✓ Schwab, M. (2011). *Encyclopedia of Cancer* .Ed: 3. Springer Science & Business Media, New York. 3934p.
 - ✓ Sherma, Joseph. 2000. -Thin-Layer Chromatography in Food and Agricultural Analysis. *Journal of chromatography A* 880(1–2): 129–47.
 - ✓ 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.

Shukla, S., & Gupta, S. (2010). Apigenin : a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical research*, 27(6), 962-978.

- ✓ Shuo Wang, Tianren Xue, Baolong Niu, Liqiao Wei, Huifang Wang. (2022). Preparation, characterization and antibacterial property of naringin loaded PLGA nanospheres.
- ✓ Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 916-21.
- ✓ Simoneit, Bernd R T. 1986. -Characterization of Organic Constituents in Aerosols in Relation to Their Origin and Transport: A Review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 23(3): 207–37.

Sinclair WB. The grapefruit: its composition, physiology & products. Berkeley: UC ANR publications; 1972: 134.

- ✓ 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.

Sun, C., Chen, K., Chen, Y. & Chen, Q. 2005. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry*, 93, 599-605.

- ✓ Supercritical Fluid Extraction of Naringin from the Peel of Citrus Paradisi. *Phytochemical Analysis* 14(4): 221–23.

Suseem SR, Joseph D (2019) The myth and the fact on naringin-A review. *Res J Pharm Tech* 12: 367-374.

- ✓ Systèmes, Dassault. 2016. -Biovia, Discovery Studio Modeling Environment. *Dassault Systèmes Biovia: San Diego, CA, USA*.

- ✓ Terstappen, Georg C, and Angelo Reggiani. 2001. -In Silico Research in Drug Discovery. || *Trends in pharmacological sciences* 22(1): 23–26.
 - ✓ Tokatlı, Mehmet et al. 2015. -In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. || *BioMed research international* 2015.
 - ✓ Torres De Pinedo, A., Pen alver, P., & Morales, J. C. (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chem*, 103, 55–61.
 - ✓ Tounsi, M.S W. A. Wannes. I. Ouerghemmi et al. (2011). -Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties, || *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, no. 1, pp. 142–151, 2011.
 - ✓ treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2868- 2885.
- Tripoli E., Guardia M. L., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chemistry*; 104: 466–479.
- ✓ 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.
- Tumbas Vesna .T, Ćetković Gordana S., Djilas Sonja M., Čanadanović-Brunet Jasna M, Vulić, Željko Knez Jelena J., Škerget Mojca. (2010). Antioxydant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel; *BIBLID* ; 40: 195-203.
- ✓ Venkatesh Shiva Kumar, Anuchandra Ramchandra Rajmane, Mohammad Adil, Amit Dattatraya, Kandhare, Pinaki Ghosh, Subhash Laxman Bodhankar. (2014). Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of endogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. *The Journal of Biomedical Research*, 2014, 28(2):132- 145.
 - ✓ Vijesh, A M et al. 2013. -Molecular Docking Studies of Some New Imidazole Derivatives for Antimicrobial Properties. || *Arabian Journal of Chemistry* 6(2): 197–204.
- Vinson J.A., Liang X., Proch J. Hontz B.A., Dance L.J., Sanedone N. (2002).

- Polyphénols antioxydants in citrus juices: in vitro and in vivo studies related to heart disease; *Adv Exp Med Biol*; 505: 113-122.
- W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L – Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J. (2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718 s-737.
- ✓ Wallingford CT *Gaussian 09* 2009.. Wallingford, CT: Gaussian.
 - ✓ Wang, HaiLin et al. 2013. -Characterization and Assessment of Volatile Organic Compounds (VOCs) Emissions from Typical Industries. *Chinese Science Bulletin* 58: 724–30.
 - ✓ 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, X., Wu, J., Guan, M., Zhao, C., Geng, P., & Zhao, Q. (2020). ARABIDOPSIS MYB4 plays dual roles in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 101(3), 637-652. <https://doi.org/10.1111/tpj.14570>
- Wichtl M., Anton R. *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 2ème édition, Ed. TEC & DOC, 2003.
- ✓ Wild, Frank. 2003. *Characterization of Organic Compounds*. CUP Archive.
 - ✓ Wishart, David S. 2013. -Characterization of Biopharmaceuticals by NMR Spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 48: 96–111.
 - ✓ Yusof, Salmah, Hasanah Mohd Ghazali, and Gan Swee King. 1990. -Naringin Content in Local Citrus Fruits. *Food Chemistry* 37(2): 113–21.
 - ✓ Zhang, X., Abraham, C., Colquhoun, T. A., & Liu, C.-J. (2017). A Proteolytic Regulator Controlling Chalcone Synthase Stability and Flavonoid Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 29(5), 1157-1174. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00855>

- ✓ Zhao, L., Yuan, X., Wang, J., Feng, Y., Ji, F., Li, Z., & Bian, J. (2019). A review on flavones targeting serine/threonine protein kinases for potential anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(5), 677-685.
- ✓ Žuvela, Petar et al. 2019. -Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase

Site web

- ✓ <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.01.027>
- ✓ (1)<http://www.veghttp://www.jardinsdefrance.org/lorigine-des-agrumes-leur-evolution-et-la-naissance-des-especes-cultivees/>. Consultation le 5/5/2017